

AUTOREFERAT

dr Edyta Konecka

Zakład Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań

1. Imię i nazwisko

Edyta Konecka

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii-mikrobiologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2005 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Właściwości fenotypowe i zróżnicowanie genetyczne szczepów *Bacillus thuringiensis* chorobotwórczych dla *Carpocapsa pomonella* L. i *Leucoma salicis* L.”. Promotor: Prof. dr hab. Adam Kaznowski

- Dyplom magistra biologii, specjalizacja biologia eksperymentalna, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2001 r. Tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja gatunków genomowych *Aeromonas* metodą 16S rDNA RFLP wyizolowanych z wody pitnej miasta Poznania”. Promotor: Prof. dr hab. Adam Kaznowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 01.10.2005 r. do chwili obecnej adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (UAM) w Poznaniu

4. Osiągnięcie* wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Aktywność insektycydowa nowych preparatów
zawierających białka krystaliczne *Bacillus thuringiensis***

b) Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Publikacje w czasopismach naukowych

1. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Baranek J., Bielińska I., Tadeja A., Kaznowski A. 2014. Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. *Science of the Total Environment* 472: 296-301.

IF₂₀₁₄: 4,099; Punkty MNiSW₂₀₁₄: 35; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 2, procentowy udział habilitantki: 60%.

2. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Baranek J., Hrycak A., Kaznowski A. 2012. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. The Scientific World Journal 2012, Article ID 710501, doi:10.1100/2012/710501.
IF₂₀₁₂: 1,73; Punkty MNiSW₂₀₁₂: 35; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 5, procentowy udział habilitantki: 80%.
3. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Baranek J., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K. 2012. Interaction between crystalline proteins of two *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera exigua*. Entomologia Experimentalis et Applicata 143: 148-154.
IF₂₀₁₂: 1,669; Punkty MNiSW₂₀₁₂: 30; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 4, procentowy udział habilitantki: 65%.
4. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Hrycak A., Kaznowski A. 2015. Synergistic effect of *Bacillus thuringiensis* crystalline toxins against *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Tortricidae: Lepidoptera). Entomologia Generalis 35: 157-166.
IF₂₀₁₅: 0,067; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 15; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 8, procentowy udział habilitantki: 80%.
5. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Czarniewska E., Kaznowski A., Grochowska J. 2018. Insecticidal activity of thymol and *Bacillus thuringiensis* crystals mixtures. Industrial Crops and Products 117: 272-277.
IF₂₀₁₇: 3,849; punkty MNiSW₂₀₁₆: 40; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 0, procentowy udział habilitantki: 70%.
6. Konecka E. (autorka korespondencyjna), Kaznowski A., Tomkowiak D. 2019. Insecticidal activity of mixture of *Bacillus thuringiensis* toxins with plant oils of *Sinapis alba* and *Azadirachta indica*. Annals of Applied Biology, doi: 10.1111/aab.12502.
IF₂₀₁₇: 2,046; punkty MNiSW₂₀₁₆: 35; liczba cytowań publikacji wg bazy Web of Science: 0, procentowy udział habilitantki: 80%.

Sumaryczny „impact factor” czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego: **13,46**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania prac wchodzących w skład osiągnięcia: **190**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Web of Science: **19**

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg bazy Scopus: **23**

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Celem badań było określenie przydatności preparatów zawierających białkowe toksyny krystaliczne Cry wytwarzane przez entomopatogenne bakterie *Bacillus thuringiensis* w ograniczaniu liczebności szkodliwych owadów z rzędu Lepidoptera. Zadania obejmowały: (1) izolację szczepów *B. thuringiensis* z próbek gleby i wody, (2) określenie potencjalnego zakresu aktywności insektycydowej kryształów bakterii w oparciu o analizę profilu genów białek krystalicznych identyfikowanych techniką PCR, (3) izolację toksyn białkowych *B. thuringiensis* z mieszaniny spor i kryształów oraz (4) oznaczenie aktywności owadobójczej białek Cry dla wybranych szkodników roślin i jej porównanie z toksycznością handlowego preparatu zawierającego spory i toksyny *B. thuringiensis*. Ponadto określono aktywność mieszanin toksyn krystalicznych wytwarzanych przez różne szczepy *B. thuringiensis*, a także mieszanin białek bakteryjnych i substancji pochodzenia roślinnego (azadirachtyna, olejek gorczycowy, tymol) wobec roślinożernych owadów z rzędu Lepidoptera: owocówki jabłkówekczki *Cydia pomonella* z rodziny Tortricidae (szkodnik owoców, głównie jabłek i gruszek) oraz światłówki naziemnicy *Spodoptera exigua* z rodziny Noctuidae (szkodnik warzyw, zbóż i roślin ozdobnych w uprawach polowych i szklarniowych). Dodatkowo aktywność kombinacji substancji botanicznych i toksyn Cry oznaczono wobec barczatki sosnówki *Dendrolimus pini* z rodziny Lasiocampidae (szkodnik drzew iglastych, głównie sosny *Pinus sylvestris*). Ze względu na występowanie spor w dostępnych na rynku biopestycydach opartych na *B. thuringiensis*, badania poprzedzono określeniem czasu utrzymywania się bakterii w glebie i na liściach drzew po zastosowaniu insektycydu co pozwoliło oszacować zasadność eliminacji spor z nowych preparatów.

Najważniejsze spostrzeżenia wynikające z przeprowadzonych badań:

I.

- Spory bakteryjne pochodzące z bioinsektycydu opartego na *Bacillus thuringiensis* utrzymywały się w glebie i na powierzchni roślin. Ze względu na to, że (1) formy wegetatywne bakterii kiełkujące ze spor mogą wytwarzać czynniki wirulencji dla człowieka oraz (2) duża liczba komórek *B. thuringiensis* w środowisku może wywierać presję selekcyjną na owady i przyczyniać się do rozwoju odporności u szkodników na czynniki owadobójcze wytwarzane przez bakterie, postuluje się, aby pestycydy oparte na *B. thuringiensis* nie zawierały spor.

II.

- Białka krystaliczne *B. thuringiensis* MPU B9 miały wyższą aktywność insektycydową wobec gąsienic *Spodoptera exigua* i *Cydia pomonella* w porównaniu z toksycznością handlowego preparatu Foray zawierającego mieszaninę spor i toksyn *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1.
- Aktywność owadobójcza toksyn krystalicznych *B. thuringiensis* MPU B63 dla *C. pomonella* była wyższa niż biopestycydu Foray.

- Wyższa aktywność preparatów kryształów białkowych *B. thuringiensis* MPU B9 dla *S. exigua* i *C. pomonella*, a także MPU B63 wobec *C. pomonella* w porównaniu z insektycydem Foray, wskazuje na potencjalną użyteczność ww. preparatów w ograniczaniu liczebności szkodników roślin z rzędu Lepidoptera.

III.

- Toksyny Cry szczepów *B. thuringiensis* MPU B6 i MPU B9 wykazywały addytywną interakcję wobec larw *S. exigua*.
- Białka krystaliczne *B. thuringiensis* MPU B9 i MPU B63 działały synergistycznie względem *C. pomonella*.
- Aktywność mieszanin toksyn krystalicznych dwóch izolatów *B. thuringiensis* MPU B6 i MPU B9 w stosunku do larw *S. exigua*, a także MPU B9 i MPU B63 wobec gąsienic *C. pomonella* była wyższa w porównaniu z handlowym preparatem Foray.
- Mieszaniny toksyn krystalicznych różnych szczepów *B. thuringiensis* mogą wykazywać większą użyteczność w ograniczaniu liczebności szkodników roślin z rzędu Lepidoptera niż toksyny pojedynczych izolatów bakterii.

IV.

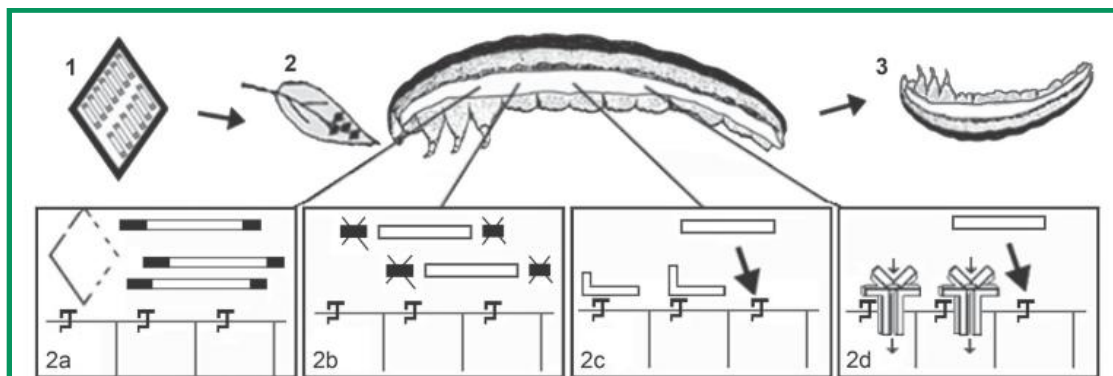
- Toksyny *B. thuringiensis* i olejek roślinny (tymol, olejek gorzycowy, azadirachtyna) wykazywały synergistyczną interakcję wobec larw *S. exigua*, *C. pomonella* i *Dendrolimus pini*.
- Mieszaniny białek krystalicznych *B. thuringiensis* i substancji botanicznych mają potencjalną przydatność do opracowania nowych bioinsektycydów. Aktualnie dostępne na rynku biopestycydy zawierają jedną substancję czynną. Proponuje się nową strategię ochrony roślin w ramach której preparaty insektycydowe zawierają dwa różnie działające składniki wykazujące synergistyczną aktywność dla owadów, co nie będzie sprzyjało powstawaniu odporności u szkodników. Jednoczesna aplikacja produktu roślinnego i bakteryjnego pozwoli na stosowanie niższych dawek preparatów owadobójczych niż w przypadku użycia biopestycydów jednoskładnikowych.

Krótkie streszczenie prac przedstawiam poniżej.

Wprowadzenie

Bakterie *Bacillus thuringiensis* wytwarzają podczas sporulacji kryształy białkowe zawierające toksyny Cry o aktywności owadobójczej. W komórce powstaje jeden lub kilka kryształów zbudowanych z nieaktywnych form toksyn reprezentujących od jednej do pięciu grup białek (Aronson, 2002). Aktualnie liczba poznanych grup toksyn Cry wynosi 78 (Crickmore i in., 2019). Potencjalny zakres aktywności kryształów może być określony w oparciu o analizę profilu genów kodujących ww. białka (Vidal-Quist i in., 2009; Baig i Mehnaz, 2010). Etap ten jest istotny i pozwala wyselekcjonować szczepy wytwarzające kryształy o wysokiej toksyczności dla owadów, a tym samym ograniczyć koszt i czas badań dotyczących oznaczenia aktywności toksyn oraz możliwości ich wykorzystania w ochronie roślin.

Ze względu na wybiórczy charakter toksyczności białek Cry dla owadów przy jednoczesnym jej braku dla kręgowców, toksyny te wraz ze sporami *B. thuringiensis* są stosowane do produkcji biopestycydów wykorzystywanych w ograniczaniu liczebności szkodników upraw roślinnych (Rosas-García, 2009; Lacey i in., 2015; Ruiu, 2015; Damalas i Koutroubas, 2018). Insektycydy oparte na *B. thuringiensis* mają działanie żołądkowe (Ryc. 1).



Ryc. 1. Mechanizm działania toksyn Cry *Bacillus thuringiensis* (Konecka i in., 2011). Kryształy (1) spożywane są przez owada z pokarmem (2). W jelicie owada następuje rozpuszczenie kryształów i uwolnienie protoksyn (2a). Protoksyny ulegają aktywacji do formy czynnej poprzez proteolityczne odcięcie części łańcucha aminokwasowego (2b). Aktywne toksyny przyłączają się do receptorów błon komórek epitelialnych i zmieniają konformację przestrzenną (2c). Białka Cry wbudowują się w błony enterocytów, oligomeryzują i tworzą pory (2d). Larwa zamiera (3).

Po spożyciu preparatu, kryształy rozpuszczają się w jelicie środkowym owada. Protoksyny są aktywowane do formy czynnej, a następnie wiążą się z receptorami błony komórek epitelialnych. Uszkodzenie komórek jelita (Saiyad, 2017) umożliwia sporom wejście do hemocelu owada. Spory kiełkują w formy wegetatywne i bakterie namnażają się (Argôlo-Filho i Loguercio, 2014). Hemocyty fagocytują komórki mikroorganizmów i tworzą agregaty. Podczas zakażenia zaobserwowano zmiany w strukturze komórek hemolimfy u owadów z rzędu Lepidoptera, np. perforacje w błonie komórkowej, zniekształcenie jądra komórkowego i tworzenie się w cytoplazmie pęcherzyków przypominających lizosomy (El-Aziz i Awad, 2010). Niektóre szczepy *B. thuringiensis* wytwarzają dodatkowo hemolizynę wykazującą właściwości lityczne względem hemocytów i makrofagów (Tran i in., 2013).

Środki ochrony roślin zawierające spory i kryształy białkowe *B. thuringiensis* stanowią alternatywę dla chemicznych insektycydów. Syntetyczne preparaty chemiczne, w przeciwieństwie do pestycydów biologicznych, zaburzają oddziaływania w łańcuchach pokarmowych w ekosystemach, mają negatywny wpływ na organizmy nie będące szkodnikami, a ich długotrwałe stosowanie indukuje odporność u owadów. Selektywne działanie i duża skuteczność w walce ze szkodnikami upraw roślinnych sprawiają, że zainteresowanie bioinsektycydami zwiększa się. Trwają poszukiwania nowych szczepów *B. thuringiensis* wytwarzających białka krystaliczne o wysokiej toksyczności dla szkodników (Palma i in., 2014) również ze względu na wdrożenie w krajach Unii Europejskiej Dyrektywy ustanawiającej działania w ramach zrównoważonego stosowania pestycydów i zasad Integrowanej Ochrony Roślin (IOR). Wprowadzenie Dyrektywy przyczyniło się do zintensyfikowania badań dotyczących możliwości użycia biologicznych preparatów

w ochronie roślin, w tym środków opartych na substancjach roślinnych i toksynach bakteryjnych. IOR nie wyklucza stosowania środków chemicznych, ale powinny być one używane w ostateczności, gdy inne metody niechemiczne są niewystarczające w ograniczaniu liczebności szkodników (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE, Dz.U.poz.455, <http://www.minrol.gov.pl/>) (Matyjaszczyk, 2018). Ponadto proponuje się strategię ochrony roślin wykorzystującą mieszaninę insektycydów (Sharifzadeh i in., 2018) o różnym mechanizmie działania (Zhu i in., 2016) co pozwoli zapobiec lub opóźnić rozwój odporności u owadów (Sudo i in., 2018), jak również ograniczy koszty produkcji preparatu (Das, 2014) oraz zmniejszy dawki pestycydu stosowane podczas zabiegu ochrony roślin w przypadku, gdy składniki mieszaniny będą działały synergistycznie (Wraight i Ramos, 2005).

W pracach osiągnięcia habilitacyjnego podjęto zagadnienie potencjalnej użyteczności (1) kryształów szczepów *B. thuringiensis* o wyższej aktywności niż toksyny krystaliczne mikroorganizmów aktualnie wykorzystywane do produkcji biopestycydów, a także (2) mieszanin toksyn Cry i owadobójczych substancji pochodzenia roślinnego. Poszukiwanie nowych środków zwalczających szkodniki upraw leśnych i rolnych, skutecznych i przyjaznych dla środowiska oraz organizmów, które nie są szkodnikami wynika z potrzeby ograniczenia stosowania preparatów chemicznych. **Podjęte badania wpisują się w nurt poszukiwań efektywnych bioinsektycydów w ramach zrównoważonego stosowania pestycydów i zasad IOR. W pracach osiągnięcia habilitacyjnego proponuje się także nową strategię ochrony roślin obejmującą stosowanie preparatów zawierających dwa różne działające czynniki** (bakteryjne toksyny krystaliczne oraz substancje roślinne), co powinno zapobiegać powstawaniu u szkodników odporności na te środki owadobójcze. Proponowane składowe biopestycydów są pochodzenia naturalnego, nie mają negatywnego wpływu na środowisko i inne organizmy niż szkodniki. Ponadto koszt produkcji preparatów zawierających toksyny Cry może być znacznie niższy dzięki dodaniu substancji roślinnych, które zwiększają toksyczność insektycydu.

Bakterie *B. thuringiensis* mogą wytwarzać czynniki warunkujące chorobotwórczość tego drobnoustroju dla człowieka, np: β -egzotoksynę (Mac Innes i Bouwer, 2009), hemolizynę (Mukry i in., 2010) i enterotoksynę (Kim i in., 2015). Pestycydy nie mogą zawierać spor szczepów *B. thuringiensis* wytwarzających czynniki wirulencji dla człowieka lub powinny być to insektycydy pozbawione form przetrwalnych bakterii (Sanahuja i in., 2011). **Badania zaplanowane w realizacji prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne zostały oparte na analizie aktywności preparatów pozbawionych spor bakterii.**

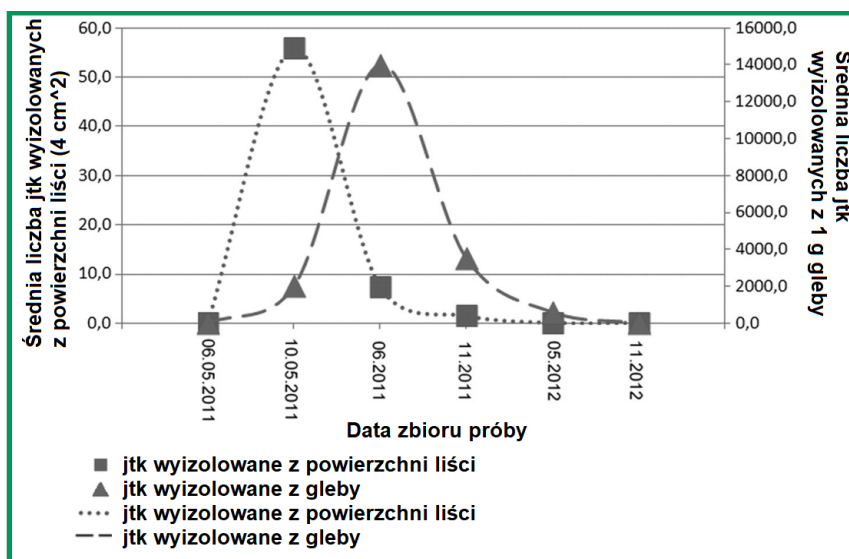
UTRZYMYWANIE SIĘ FORM PRZETRWAŁNYCH *BACILLUS THURINGIENSIS* W GLEBIE I NA LIŚCIACH DRZEW

Konecka E., Baranek J., Bielińska I., Tadeja A., Kaznowski A. 2014. Persistence of the spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* from Foray bioinsecticide in gleysol soil and on leaves. Science of the Total Environment 472: 296-301.

Badania dotyczące użyteczności białek krystalicznych *B. thuringiensis* w ograniczaniu liczebności owadzych szkodników poprzedzono określeniem czasu utrzymywania się spor

bakterii w glebie i na liściach drzew po zastosowaniu insektycydu Foray zawierającego formy przetrwalne *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1 co pozwoliło oszacować zasadność eliminacji spor z nowo opracowywanych preparatów. Foray jest wykorzystywany do zwalczania liściożernych owadów (Federici i Siegel 2008; Federici i in., 2010; Raymond i Federici, 2017). Długotrwałe utrzymywanie się bakterii w środowisku może wywierać presję selekcyjną na szkodniki (Paris i in., 2010) i przyczyniać się do rozwoju u owadów odporności na czynniki owadobójcze wytwarzane przez drobnoustroje (Tetreau i in., 2012).

Zagadnienie przeżywania spor pochodzących ze środka ochrony roślin w środowisku leśnym dotychczas nie zostało podjęte przez innych autorów. W badaniach własnych, utrzymywanie się form przetrwalnych bakterii oznaczono w dwudziestu arbitralnie wybranych lokalizacjach w Dąbrowie Krotoszyńskiej na obszarze 195 hektarów, gdzie bioinsektycyd był stosowany w ochronie drzewostanu dębowego przed zwójką dębową i miernikowcami. Badania przeprowadzono we współpracy z Wydziałem Ochrony Lasu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu. Próby gleby i liści drzew pobrano przed zastosowaniem preparatu Foray, a następnie w ciągu osiemnastu miesięcy po aplikacji bioinsektycydu. Podobieństwo genetyczne bakterii *B. thuringiensis* wyizolowanych z prób oraz szczepu HD-1 wyhodowanego z biopestycydu określano metodą RAPD. Wykazano, że *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1 przeżył w glebie w 14 lokalizacjach przez sześć miesięcy oraz w sześciu przez 12 miesięcy. Na powierzchni liści, szczep HD-1 utrzymywał się przez sześć miesięcy (Ryc. 2).



Ryc. 2. Liczba bakterii *Bacillus thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1 (Foray) w glebie i na powierzchni liści drzew po aplikacji bioinsektycydu.

Publikacje innych autorów podejmujące zagadnienie biopreparatów opartych na *B. thuringiensis* dotyczą głównie ich właściwości owadobójczych, rzadziej odnoszą się do oznaczenia przeżywalności spor bakterii w środowisku, w którym były stosowane oraz potencjalnego wpływu jaki mikroorganizmy *B. thuringiensis* mogłyby wywierać na to środowisko. Uzyskane wyniki badań własnych uzupełniają lukę dotyczącą utrzymywania się form przetrwalnych drobnoustrojów w środowisku leśnym. Ponadto ze względu na możliwość przeżycia spor w glebie i na powierzchni liści dalsze badania

zaplanowane w realizacji prac osiągnięcia habilitacyjnego oparto na analizie aktywności preparatów owadobójczych pozbawionych spor bakterii.

PODSUMOWANIE:

- Spory bakteryjne pochodzące z bioinsektycydu opartego na *B. thuringiensis* utrzymywały się w glebie i na powierzchni roślin. Ze względu na to, że (1) formy wegetatywne mikroorganizmu kielkujące ze spor mogą wytwarzać czynniki wirulencji dla człowieka oraz (2) duża liczba bakterii *B. thuringiensis* w środowisku może wywierać presję selekcyjną na owady i przyczyniać się do rozwoju odporności u szkodników na czynniki owadobójcze wytwarzane przez drobnoustroje, postuluje się, aby pestycydy oparte na *B. thuringiensis* nie zawierały spor.

PRZYDATNOŚĆ BIAŁEK KRYSTALICZNYCH *BACILLUS THURINGIENSIS* W OGRANICZANIU LICZEBNOŚCI ROŚLINOŻERNYCH SZKODNIKÓW OWADZICH Z RZĘDU LEPIDOPTERA

Konecka E., Baranek J., Hrycak A., Kaznowski A. 2012a. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from soil and water. The Scientific World Journal 2012, Article ID 710501, doi:10.1100/2012/710501.

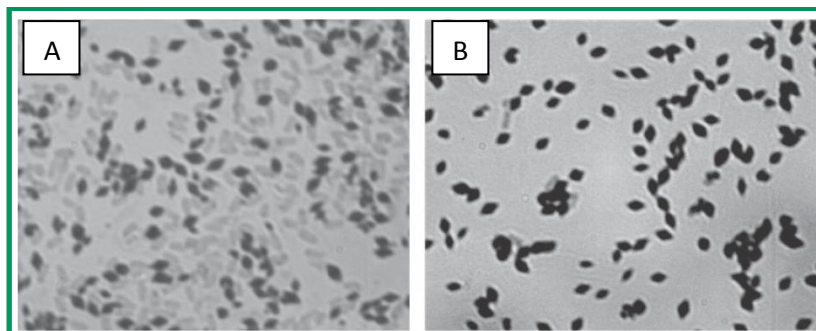
Konecka E., Baranek J., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K. 2012b. Interaction between crystalline proteins of two *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera exigua*. Entomologia Experimentalis et Applicata 143: 148-154.

Konecka E., Hrycak A., Kaznowski A. 2015. Synergistic effect of *Bacillus thuringiensis* crystalline toxins against *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Tortricidae: Lepidoptera). Entomologia Generalis 35: 157-166.

W badaniach użyto izolaty *B. thuringiensis* MPU B6 (Konecka i in., 2012b) i MPU B9 (Konecka i in., 2012b, Konecka i in., 2015). Szczepy wyhodowano z materiału pobranego z martwych gąsienic *Cydia pomonella* podczas epizoocji w hodowli laboratoryjnej owada (Ziemnicka i Ziemnicki, 2001). Szczep MPU B6 miał geny: *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIF* i *cry2Ab* kodujące toksyny Cry aktywne dla owadów z rzędu Lepidoptera. Izolat miał gen *cryIF*, który jest rzadko spotykany wśród *B. thuringiensis*. W genomie *B. thuringiensis* MPU B9 zidentyfikowano dużą liczbę i zróżnicowanie genów *cry*: *cryIAa*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryII*, *cry2Ab*, *cry9B* i *cry9E*. Ponadto mieszanina spor i kryształów MPU B9 wykazała znaczną aktywność insektycydową wobec *C. pomonella* (Konecka i in., 2007), a także kryształy wytwarzane przez MPU B9 powodowały wysoką śmiertelność wśród gąsienic białki wierzbowki *Leucoma salicis* (szkodnik wierzby i topoli) (Konecka i in., 2010).

Poszukując nowych izolatów *B. thuringiensis* przydatnych w ochronie roślin wyizolowano bakterie z próbek gleby i wody, a także określono zakres potencjalnej aktywności owadobójczej kryształów w oparciu o analizę profilu genów *cry*. Spośród szczepów do dalszych badań wybrano izolat MPU B63 mający geny: *cryIAb*, *cryIB* oraz rzadko występujący wśród *B. thuringiensis* *cryI5*, kodujące syntezę białek toksycznych wobec szkodników z rzędu Lepidoptera (Konecka i in., 2012a).

Wstępna ocena domniemanej aktywności owadobójczej kryształów wytwarzanych przez izolaty *B. thuringiensis* MPU B6, MPU B9 (Konecka i in., 2007) i MPU B63 (Konecka i in., 2012a) w oparciu o analizę profilu genów białek Cry wskazywała na użyteczność toksyn bakterii w ochronie roślin. Dla porównania szczep *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1 z handlowego preparatu Foray miał geny kodujące syntezę toksyn Cry1A, Cry1I i Cry 2A (Konecka i in., 2007). Z mieszaniny spor i kryształów wyizolowano białka krystaliczne MPU B6, MPU B9 i MPU B63 w gradiencie stężeń sacharozy (Ryc. 3) (Konecka i in., 2012a, 2012b, 2015).



Ryc. 3. Mieszanina spor i kryształów *Bacillus thuringiensis* MPU B9 (A). Białka krystaliczne MPU B9 po oczyszczeniu ze spor (B).

Aktywność insektycydową białek krystalicznych pojedynczych izolatów *B. thuringiensis* oraz mieszaniny kryształów dwóch szczepów oznaczono w stosunku do wybranych szkodników upraw z rzędu Lepidoptera: światłówki naziemnicy *Spodoptera exigua* (Konecka i in., 2012b) i owocówki jabłkowieczki *C. pomonella* (Konecka i in., 2012a, 2015). Obliczono wartości LC_{50} preparatów w stosunku do owadów metodą probitową. Aktywność białek krystalicznych izolatów porównano z toksycznością handlowego pestycydu Foray opartego na *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD-1 rekomendowanego do ograniczania liczebności owadzych szkodników (Konecka i in., 2012a, 2012b, 2015).

Toksyczność białek krystalicznych MPU B63 dla *C. pomonella* była ok. 24-krotnie wyższa niż biopestycydu Foray. Profile genów *cry* szczepów MPU B63 i HD-1 różniły się. MPU B63 miał geny *cry1B* oraz *cry15*, których nie zidentyfikowano u HD-1. Wyższa aktywność insektycydowa kryształów MPU B63 w porównaniu z HD-1 mogła być uwarunkowana działaniem białek Cry1B i Cry15 (Konecka i in., 2012a). Toksyczność Cry1B oraz Cry15 dla *C. pomonella* została wykazana wcześniej przez innych autorów (Boncheva i in., 2006; Naimov i in., 2008).

Wartość LC_{50} kryształów MPU B9 dla *C. pomonella* była ok. 240-krotnie niższa (Konecka i in., 2015), a także ok. 25-krotnie niższa dla *S. exigua* (Konecka i in., 2012b) w porównaniu do LC_{50} insektycydu Foray dla owadów. Wyższa aktywność kryształów białkowych *B. thuringiensis* MPU B9 dla *S. exigua* (Konecka i in., 2012b) i *C. pomonella* (Konecka i in., 2015), a także MPU B63 dla *C. pomonella* (Konecka i in., 2012a) w porównaniu z pestycydem handlowym wskazuje na potencjalną użyteczność preparatów w ograniczaniu liczebności szkodników roślin z rzędu Lepidoptera. Dodatkowo białka krystaliczne dwóch szczepów *B. thuringiensis* MPU B9 i MPU B63 wykazywały synergistyczny efekt działania względem *C. pomonella*. Obserwowana śmiertelność gąsienic

owocówki jabłkoweczki powodowana przez mieszaninę kryształów MPU B9 i MPUB B63 była 3-3,5-krotnie wyższa niż śmiertelność oczekiwana w zależności od proporcji stężeń kryształów dwóch szczepów w mieszaninie. Efekt synergii między białkami Cry zaobserwowano w mieszaninie zawierającej kryształy MPU B9 w stężeniu powodującym 10-50% śmiertelności owadów i kryształy MPU B63 w stężeniu subletalnym, a także w mieszaninie kryształów MPU B63 w stężeniu powodującym 10-50% śmiertelności gąsienic i kryształów MPU B9 w stężeniu subletalnym. Aktywność mieszaniny kryształów dla ww. owadów była wyższa w porównaniu z handlowym preparatem Foray (Konecka i in., 2015).

Określono także charakter interakcji między białkami krystalicznymi syntetyzowanymi przez szczepy MPU B6 i MPU B9 dla światłówki naziemnicy. Wartość LC_{50} kryształów MPU B9 dla *S. exigua* była 10-krotnie niższa niż LC_{50} kryształów MPU B6, stąd zmieszano kryształy tak, aby stężenie białek MPU B9 było 10-krotnie niższe niż MPU B63. Toksyny Cry szczepów *B. thuringiensis* MPU B6 i MPU B9 wykazywały addytywną interakcję w stosunku do *S. exigua*. Analiza profili genów *cry* szczepów wskazywała na duże zróżnicowanie białek Cry i szerokie spektrum działania mieszaniny (Konecka i in., 2012b). Symultaniczne działanie białek reprezentujących różne grupy toksyn Cry i łączących się z różnymi receptorami w błonach komórek epitelialnych owada może przeciwdziałać lub opóźniać rozwój odporności na pestycydy *B. thuringiensis* (Ibargutxi i in., 2008).

PODSUMOWANIE:

- Białka krystaliczne *B. thuringiensis* MPU B9 wykazywały wysoką aktywność insektycydową dla gąsienic *S. exigua* i *C. pomonella* w porównaniu z toksycznością handlowych preparatu Foray zawierającego spory i toksyny *B. thuringiensis*.
- Aktywność owadobójcza toksyn krystalicznych *B. thuringiensis* MPU B63 dla *C. pomonella* była wyższa niż biopestycydu Foray.
- Wyższa aktywność preparatów kryształów białkowych *B. thuringiensis* MPU B9 dla *S. exigua* i *C. pomonella*, a także MPU B63 dla *C. pomonella* w porównaniu z insektycydem Foray wskazuje na potencjalną użyteczność tych preparatów w ograniczaniu liczebności szkodników roślin z rzędu Lepidoptera.
- Toksyny Cry szczepów *B. thuringiensis* MPU B6 i MPU B9 wykazywały addytywną interakcję wobec larw *S. exigua*.
- Białka krystaliczne *B. thuringiensis* MPU B9 i MPU B63 działały synergistycznie względem larw *C. pomonella*.
- Aktywność mieszaniny kryształów dwóch izolatów *B. thuringiensis* wobec owadów była wyższa w porównaniu z handlowym preparatem Foray.
- Mieszaniny białek krystalicznych dwóch szczepów *B. thuringiensis* MPU B6 i MPU B9, a także MPU B9 i MPU B63 wykazują użyteczność w ograniczaniu liczebności szkodników roślin z rzędu Lepidoptera.

Badania były wykonywane w ramach grantu MNiSW i NCN Nr N N310 079936 "Skuteczność działania białek Cry *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu szkodników roślin", którego byłam kierownikiem, a także w ramach projektu NCN Nr UMO-2011/01/B/NZ9/00699 "Aktywność owadobójcza białek Vip *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników upraw", którego byłam wykonawcą.

UŻYTECZNOŚĆ MIESZANIN BIAŁEK KRYSTALICZNYCH
BACILLUS THURINGIENSIS I SUBSTANCJI POCHODZENIA ROŚLINNEGO
W OGRANICZANIU LICZEBNOŚCI ROŚLINOŻERNYCH
SZKODNIKÓW OWADZICH Z RZĘDU LEPIDOPTERA

Konecka E., Czarniewska E., Kaznowski A., Grochowska J. 2018a. Insecticidal activity of thymol and *Bacillus thuringiensis* crystals mixtures. *Industrial Crops and Products* 117: 272-277.

Konecka E., Kaznowski A., Tomkowiak D. 2019. Insecticidal activity of mixture of *Bacillus thuringiensis* toxins with plant oils of *Sinapis alba* and *Azadirachta indica*, doi: 10.1111/aab.12502.

Aby zwiększyć skuteczność działania preparatów kryształów *B. thuringiensis* zmieszano je z substancjami pochodzenia roślinnego (olejek gorczycowy, azadirachtyna i tymol). Następnie oznaczono aktywność mieszanin dla *C. pomonella*, *S. exigua* i barczatki sosnowki *Dendrolimus pini*.

Mieszaniny tymolu i kryształów *B. thuringiensis* MPU B9 w proporcjach stężeń 1:100 oraz 1:250 powodowały wyższą śmiertelność owadów niż preparaty białek Cry i tymolu podane gąsienicom pojedynczo. Białka krystaliczne i tymol w mieszaninach, w których stężenie toksyn Cry było $\geq 0.4\%$ działały synergistycznie względem larw (Konecka i in., 2018b: Patent nr 228067). Procent obserwowanej śmiertelności gąsienic był od około 1,6- (Konecka i in., 2018a) do 4,5-krotnie (Konecka i in., 2018b: Patent nr 228067) wyższy niż śmiertelności oczekiwanej. Preparaty zawierające 500-25000 ng tymolu przypadające na 1 ng kryształów charakteryzowały się niższą aktywnością insektycydową. Składniki w tych mieszaninach działały addycyjnie lub antagonistycznie. Białka krystaliczne, tymol oraz ich mieszanina nie indukowały zmian w morfologii i żywotności hemocytów owadów. W hemocytach nie wykryto charakterystycznych dla apoptozy cech, takich jak: obkurczanie się i zmiana kształtu komórek, degradacja i fragmentacja chromatyny, tworzenie się ciałek apoptotycznych, zmiany w cytoszkielecie komórki wynikające z depolimeryzacji F-aktyny oraz aktywacja kaspaz (Konecka i in., 2018a).

Olejek gorczycowy i białka krystaliczne *B. thuringiensis* MPU B9 działały synergistycznie wobec owadów (Konecka i in., 2017: Patent nr 227005; Konecka i in., 2019). Dodanie do olejku gorczycowego kryształów w stężeniu do 0,3% skutkowało ponad dwukrotnie większą obserwowaną śmiertelnością gąsienic *D. pini* w stadium L1 w porównaniu do śmiertelności oczekiwanej. Podobny wynik otrzymano dla larw *C. pomonella* w stadium L1 przy zastosowaniu mieszanin, w których stężenie kryształów wynosiło do 1,3%, a także dla gąsienic *S. exigua* w stadium L3 przy użyciu kombinacji z dodatkiem toksyn Cry w stężeniu 7%-20% (Konecka i in., 2019).

Kryształy *B. thuringiensis* MPU B9 i azadirachtyna działały synergistycznie dla owadów. Dodanie do toksyn Cry azadirachtyny w stężeniu do 2,5% skutkowało wysoką aktywnością insektycydową mieszaniny. Najwyższy procent śmiertelności obserwowanej owadów w porównaniu ze śmiertelnością oczekiwaną zaobserwowano dla gąsienic *S. exigua*, którym podano mieszaninę zawierającą 5% preparatu azadirachtyny - śmiertelność obserwowana larw

była 5-krotnie wyższa niż śmiertelność oczekiwana. Mieszaniny zawierające do 20% preparatu azadirachtyny wykazywały użyteczność w ograniczaniu liczebności szkodników z rzędu Lepidoptera (Konecka i in., 2019).

PODSUMOWANIE:

- Toksyny *B. thuringiensis* i substancje roślinne (tymol, olejek gorczycowy, azadirachtyna) wykazywały synergizm działania wobec *S. exigua*, *C. pomonella* i *D. pini*.
- Charakter interakcji między białkami krystalicznymi i produktem botanicznym zależał od proporcji ich stężeń w mieszaninie.
- Mieszaniny toksyn Cry i substancji roślinnych mają potencjalną przydatność do opracowania nowych bioinsektycydów. Aktualnie dostępne na rynku biopestycydy zawierają jedną substancję czynną. Proponuje się nową strategię ochrony roślin w ramach której preparaty insektycydowe zawierają dwa różnie działające składniki wykazujące efekt synergii względem larw owadów, co nie będzie sprzyjało powstawaniu odporności u szkodników. Jednoczesna aplikacja produktów botanicznych i bakteryjnych pozwoli na stosowanie niższych dawek preparatów owadobójczych niż w przypadku użycia biopestycydów jednoskładnikowych.

PIŚMIENNICTWO

- Argôlo-Filho R.C., Loguercio L.L. 2014. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. *Insects* 5: 62-91.
- Aronson A. 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 417-425.
- Baig D.N., Mehnaz S. 2010. Determination and distribution of *cry*-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. *Microbiological Research* 165: 376-383.
- Boncheva R., Dukiandjiev S., Minkov I., de Maagd R.A., Naimov S. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 84-87.
- Crickmore N., Baum J., Bravo A., Lereclus D., Narva K., Sampson K., Schnepf E., Sun M., Zeigler D. R. (2019) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.btnomenclature.info/>
- Damalas Ch.A., Koutroubas S.D. 2018. Current status and recent developments in biopesticide use. *Agriculture* 8: 13.
- Das S.K. 2014. Scope and relevance of using pesticide mixtures in crop protection: a critical review. *International Journal of Environmental Science and Toxicology Research* 2: 119-125.
- El-Aziz N.M.A., Awad, H.H. 2010. Changes in the haemocytes of *Agrotis ipsilon* larvae (Lepidoptera: noctuidae) in relation to dimilin and *Bacillus thuringiensis* infections. *Micron* 41: 203-209.
- Federici A.B., Siegel J.P. 2008. Safety assessment of *Bacillus thuringiensis* and Bt crops used in insect control. W Hammond B.G. Food safety of proteins in agricultural biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group. USA.
- Federici B.A., Park H.W., Bideshi D.K. 2010. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *The Open Toxinology Journal* 3: 154-171.
- Ibargutxi M.A., Muñoz D., de Escudero I.R., Caballero P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control* 47: 89-96.
- Kim M.J., Han J.K., Park J.S., Lee J.S., Lee S.H., Cho J.I., Kim, K.S. 2015. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 872-879.

- Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H. 2007. Analysis of *cry* gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Current Microbiology* 55: 217-222.
- Konecka E., Ziemnicka J., Baranek J., Kaznowski A. 2010. Potential usefulness of *Bacillus thuringiensis* MPU B9 protein crystals for reducing the number of white satin moth (*Leucoma salicis* L.). *Progress in Plant Protection* 50: 357-360.
- Konecka E., Kaznowski A., Baranek J. 2011. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. *Postępy mikrobiologii* 50: 303-311.
- Konecka E., Kaznowski A., Tomkowiak D., Baranek J. 2017. Patent nr 227005 na wynalazek pt. „Kompozycja owadobójcza” dotyczący aktywności owadobójczej mieszaniny kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* i olejku gorczycowego.
- Konecka E., Kaznowski A., Grochowska J. 2018b. Patent nr 228067 na wynalazek pt. „Kompozycja owadobójcza i zastosowanie kompozycji” dotyczący aktywności owadobójczej mieszaniny kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* i tymolu.
- Lacey L.A., Grzywacz D., Shapiro-Ilan D.I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1-41.
- Mac Innes T.C., Bouwer G. 2009. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 137-139.
- Matyjaszczyk E (2018) “Biorationals” in integrated pest management strategies. *Journal of Plant Diseases and Protection* 25: 523-527.
- Mukry S.N., Ahmad A., Khan S.A. 2010. Screening and partial characterization of hemolysins from *Bacillus* sp.: strain s128 and s144 are hemolysin b (hbl) producers. *Pakistan Journal of Botany* 42: 463-472.
- Naimov S, Boncheva R, Karlova R, Dukijandjiev S, Minkov I, DeMaagd R.A. 2008. Solubilization, activation, and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar thompsoni HD542 crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7145-7151.
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6: 3296-3325.
- Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David JP. 2011. Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Management Science* 67: 122-128.
- Raymond B., Federici B.A. 2017. In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity - a response to EFSA. *FEMS Microbiology Ecology* 93: fix084.
- Rosas-García N.M. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 28-36
- Ruiu L. 2015. Insect pathogenic bacteria in Integrated Pest Management. *Insects* 6: 352-367.
- Saiyad S.A. 2017. Application of *Bacillus thuringiensis* as an effective tool for insect pest control. *International Organization of Scientific Research – Journal of Agriculture and Veterinary Science* 10: 27-29.
- Sanahuja G., Banakar R., Twyman R.M., Capell T., Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283-300.
- Sharifzadeh M.S., Abdollahzadeh G., Damalas Ch.A., Rezaei R. 2018. Farmers’ criteria for pesticide selection and use in the pest control process. *Agriculture* 8: 24.
- Sudo M., Takahashi D., Andow D.A., Suzuki Y., Yamanaka T. 2018. Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal. *Evolutionary Applications* 11: 271-283.
- Wraight S.P., Ramos M.E. 2005. Synergistic interaction between *Beauveria bassiana*- and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 139-150.
- Tetreau G., Alessi M., Veyrenc S., Pérignon S., David J.P., Reynaud S., Després L. 2012. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field: evidence for spore recycling and differential persistence of toxins in leaf litters. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 8362-8367.

- Tran S.L., Guillemet E., Lereclus D., Ramarao N. 2013. Iron regulates *Bacillus thuringiensis* haemolysin hlyII gene expression during insect infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 113: 205-208.
- Vidal-Quist J.C., Castañera P., González-Cabrera J. 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 749-759.
- Vilas-Bôas G.T., Santos C.A. 2010. Conjugation in *Bacillus thuringiensis*: insights into the plasmids exchange process. W: Sansinenea E. *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer. Dordrecht Heidelberg London New York.
- Zhu F., Lavine L., O'Neal S., Lavine M., Foss C., Walsh D. 2016. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects* 7: 2.
- Ziennicka J., Ziennicki K. 2001. *Bacillus thuringiensis*: an epizootic agent in laboratory cultures of codling moth (*Cydia pomonella* L.). *Progress in Plant Protection* 41: 503-508.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Studia ukończyłam w 2001 r. uzyskując magisterium z biologii ze specjalnością biologia eksperymentalna. Pracę magisterską wykonałam w Zakładzie Mikrobiologii UAM pod kierownictwem prof. dr hab. Adama Kaznowskiego.

W wyżej wymienionym Zakładzie zrealizowałam pracę doktorską pt.: „Właściwości fenotypowe i zróżnicowanie genetyczne szczepów *Bacillus thuringiensis* chorobotwórczych dla *Carpocapsa pomonella* L. i *Leucoma salicis* L.” pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Kaznowskiego. W dniu 22 września 2005 r. dysertacja doktorska została wyróżniona uchwałą Rady Wydziału Biologii UAM. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane (Konecka i in., 2007. Journal of Invertebrate Pathology 94: 56-63; Konecka i in., 2007. Current Microbiology 55: 217-222). Przygotowano także artykuł przeglądowy (Konecka i in., 2011. Postępy mikrobiologii 50: 303-311).

Podczas trwania studiów doktoranckich (01.10.2001 r. - 22.09.2005 r.), obok realizacji celu rozprawy, praca naukowa obejmowała identyfikację bakterii z rodzaju *Aeromonas* metodą 16S rDNA RFLP, a także określenie polimorfizmu genetycznego szczepów *Aeromonas* spp. wyizolowanych z wody pitnej miasta Poznania (Kaznowski A., Konecka E. 2005. Polish Journal of Microbiology 54: 335-338).

Od dnia 01.10.2005 r. podjęłam pracę na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biologii UAM. Moja praca doświadczalna była kontynuacją zagadnień realizowanych w poprzednich latach, związanych z **potencjalną użytecznością biopreparatów bakteryjnych w ograniczaniu liczebności szkodników upraw roślin**. Od 2011 r. prowadzę także doświadczenia dotyczące **występowania mikroorganizmów endosymbiotycznych u roztoczy Oribatida**.

Krótkie streszczenie prac obejmujących pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze przedstawiam poniżej.

POTENCJALNA UŻYTECZNOŚĆ BAKTERYJNYCH BIOPREPARATÓW W OCHRONIE UPRAW ROŚLIN

Publikacje w czasopismach naukowych (wykaz A Ministra NiSW)

Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K. 2007a. Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. Journal of Invertebrate Pathology 94: 56-63 (IF₂₀₀₇: 1,463; Punkty KBN₂₀₀₇: 24).

Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H. 2007b. Analysis of *cry* gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. Current Microbiology 55: 217-222 (IF₂₀₀₇: 1,167; Punkty KBN₂₀₀₇: 10).

W latach 1990-1999 obserwowano powtarzające się epizootcje powodowane przez szczepy *B. thuringiensis* w laboratoryjnych hodowlach *C. pomonella* prowadzonych

w Zakładzie Biologicznych Metod i Kwarantanny Instytutu Ochrony Roślin (IOR) w Poznaniu oraz w Zakładzie Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W latach 1990, 1995 i 1996 epizootycje powtarzały się kilkakrotnie w ciągu jednego roku (Ziemnicka i Ziemnicki, 2001) Ponieważ śmiertelność wśród zakażonych owadów była wysoka i sięgała 44-91% nasunęło to pomysł, żeby określić czy któryś ze szczepów mógłby być użyty w produkcji biopreparatu stosowanego w ochronie upraw roślinnych. Do badań włączono izolaty wyhodowane z martwych gąsienic *L. salicis*, a także szczepy referencyjne *B. thuringiensis*, *B. cereus* i *B. subtilis*.

Szczepy scharakteryzowano w zakresie właściwości fenotypowych, polimorfizmu genetycznego oraz potencjalnej chorobotwórczości dla owadów w oparciu o analizę profilu genów warunkujących syntezę białek Cry oraz oznaczeniu biologicznej aktywności spor i kryształów *B. thuringiensis* dla *C. pomonella*.

Ogólne podobieństwo w zakresie właściwości fenotypowych wszystkich szczepów wynosiło co najmniej 92%. Epizootyczne izolaty *B. thuringiensis* nie utworzyły odrębnej grupy o unikatowych cechach fenotypowych co wskazuje, że nie stanowiły jednego biotypu. Analiza wykazała obecność trzech grup szczepów przy stopniu podobieństwa równym 100%.

Podobieństwo klonalne szczepów określono przy zastosowaniu metody RAPD. Komputerowe dodanie profili DNA bakterii wykazało, że większość zakażeń w hodowlach laboratoryjnych *C. pomonella* powodowana była przez szczepy o różnych genotypach. Stwierdzono także obecność dwóch grup szczepów, każda o identycznym wzorze produktów amplifikacji DNA. Pierwszą grupę utworzyły dwa izolaty, z których jeden wyosobniono w roku 1990, a drugi w 1992 z owadów hodowli IOR. W skład drugiej grupy weszły szczepy *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki*, z których jeden wyhodowano z handlowego biopreparatu Biobit, a drugi to szczep referencyjny HD-1-S-1980 na bazie którego opracowano bioinsektycyd. Szczepy tworzące grupę 1 i 2 miały także identyczne właściwości fenotypowe oraz takie same profile białkowe. Wyizolowanie szczepów *B. thuringiensis* o identycznych fenotypach i genotypach oraz profilach białkowych w różnym czasie z zakażonych owadów wykazało możliwość (1) przeżycia bakterii na terenie laboratorium oraz (2) spowodowania zakażenia insektów w różnych latach przez mikroorganizmy spokrewnione klonalnie.

Potencjalną aktywność kryształów białkowych oznaczono na podstawie analizy profilu genów toksyn krystalicznych. U izolatów epizootycznych zidentyfikowano od jednego do ośmiu genów kodujących syntezę białek z grupy Cry1, Cry2 i Cry9 (Konecka i in., 2007b) toksycznych dla owadów z rzędu Lepidoptera, Coleoptera i Diptera (Zeigler, 1999). Porównanie zróżnicowania genów *cry* oraz potencjalnego zakresu aktywności owadobójczej kryształów szczepów epizootycznych i referencyjnych stosowanych w produkcji pestycydów sugerowało możliwość wykorzystania niektórych izolatów jako źródła spor i kryształów do opracowania nowego insektycydu.

Określono wartość LC_{50} preparatu spor i białek krystalicznych trzech izolatów MPU B3, MPU B4 i MPU B9 wobec larw *C. pomonella*. Kryterium doboru szczepów do badań była duża liczba i zróżnicowanie genów toksyn krystalicznych. MPU B3 i MPU B4 miały *cry1Aa*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1I*, *cry2Ab*, *cry9B* i *cry9E*. Natomiast u MPU B9 stwierdzono *cry1Aa*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1I*, *cry2Ab*, *cry9B* i *cry9E*.

Największą aktywność insektycydową względem *C. pomonella* miał preparat spor i kryształów MPU B9. Wartość LC_{50} ww. preparatu dla owadów było ok. 6-krotnie niższa

niż preparatu zawierającego spory i kryształ szczepy referencyjnego *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* BTK STANDARD firmy Novo Nordisk produkującej środki ochrony roślin oparte na *B. thuringiensis* co pretendowało szczep MPU B9 do dalszych badań dotyczących użyteczności wytwarzanych przez niego kryształów w produkcji nowego biopestycydu.

Badania były wykonane w ramach pracy doktorskiej.

Konecka E., Kaznowski A., Baranek J. 2011. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. Postępy mikrobiologii 50: 303-311 - artykuł przeglądowy (IF₂₀₁₁: 0,151; Punkty MNiSW₂₀₁₁: 15).

Bakterie *Bacillus thuringiensis* wytwarzają podczas sporulacji kryształy białkowe zbudowane z toksyn Cry aktywnych dla szkodliwych owadów. Spory i kryształy *B. thuringiensis* są wykorzystywane do produkcji pestycydów. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla insektów jest także uwarunkowana działaniem czynników syntetyzowanych podczas wegetatywnej fazy wzrostu bakterii: białek Sip, chitynazy czy białek Vip. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* wytwarzają związki niekorzystnie działające dla człowieka, np. enterotoksynę lub β -egzotoksynę stąd biopestycydy oparte na *B. thuringiensis* nie powinny zawierać form przetrwalnych mikroorganizmu.

Praca była finansowana ze środków grantu MNiSW i NCN Nr N N310 079936 "Skuteczność działania białek Cry *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu szkodników roślin", którego byłam kierownikiem.

Konecka E., Baranek J., Kaznowski A. 2013. Genetic similarity and distribution of *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic for *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). Biocontrol Science and Technology 23: 474-479 - short communication (IF₂₀₁₃: 0,731; Punkty MNiSW₂₀₁₃: 20).

W badaniach użyto 26 szczepy *B. thuringiensis* wyhodowane z materiału pobranego od martwych gąsienic *S. exigua* oraz *Agrotis segetum* pochodzących z laboratoryjnej hodowli owadów. Wysoką śmiertelność owadów w hodowli obserwowano od kwietnia do grudnia 2009 r.

Podobieństwo klonalne bakterii określono metodą RAPD. Komputerowe dodanie profili DNA *Bacillus* spp. uzyskanych przy użyciu pięciu starterów wykazało obecność trzech grup izolatów, każda o identycznym wzorze produktów amplifikacji. Szczepy o takich samych profilach DNA wyizolowano z martwych owadów w różnym czasie co może wskazywać na możliwość (1) przeżycia bakterii na terenie laboratorium, a także (2) spowodowania zakażenia owadów w różnych miesiącach przez mikroorganizmy spokrewnione klonalnie.

Potencjalny zakres aktywności owadobójczej toksyn krystalicznych bakterii określono na podstawie profilu genów *cry* kodujących syntezę białek krystalicznych. U szczepów zidentyfikowano geny *cry1* oraz *cry2*: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1I*, *cry2Aa* i *cry2Ab* (Konecka i in., 2013). Geny *cry1* warunkują wytwarzanie toksyn o aktywności dla owadów z rzędów Lepidoptera, Diptera i Coleoptera; *cry2* dla insektów reprezentujących Diptera, Hemiptera i Lepidoptera (Frankenhuyzen, 2009). Spośród izolatów bakteryjnych, szczep MPU B32b miał największe zróżnicowanie genów: *cry1Aa*, *1Ab*, *1Ac*, *1I*, *2Aa* i *2Ab*.

U szczepu wykazano obecność genu *cryIAb* (Konecka i in., 2013) kodującego białko Cry1Ab toksyczne dla szkodników upraw leśnych (Rausell i in., 2000) oraz rolnych (Cheng i in., 2005). Genu *cryIAb* nie stwierdzono u pozostałych izolatów. Szczep MPU B32b miał gen *cryIAc* (Konecka i in., 2013) kodujący syntezę białka Cry1Ac działającego synergistycznie z innymi toksynami krystalicznymi w stosunku do owadów (Sharma i in., 2010). Wśród analizowanych bakterii, izolat MPU B32b wykazywał największą przydatność do opracowania bioinsektycydu.

Badania były wykonywane w ramach grantu MNiSW i NCN Nr N N310 079936 "Skuteczność działania białek Cry *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu szkodników roślin", którego byłam kierownikiem.

Baranek J., Kaznowski A., **Konecka E.**, Naimov S. 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 72-81 (IF₂₀₁₅: 2,198; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 40).

Baranek J., **Konecka E.**, Kaznowski A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl* 62: 649-658 (IF₂₀₁₇: 1,924; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 40).

Podczas wegetatywnej fazy wzrostu, bakterie *B. thuringiensis* mogą wytwarzać białka Vip (*ang.* Vegetative insecticidal proteins) o aktywności owadobójczej (Palma i in., 2014). Geny kodujące syntezę toksyn identyfikowano u 31 izolatów wyhodowanych z próbek gleby, wody oraz martwych owadów. Gen *vip3* stwierdzono w DNA 87% szczepów. Nie uzyskano produktu PCR genów *vip1* oraz *vip2*. Analiza sekwencji genów (każda o długości 2370 pz) wykazała obecność dwóch polimorficznych form *vip3Aa58* i *vip3Aa59* różniących się 19 nukleotydami. Sekwencje białek Vip3Aa i Vip3Aa59 różniły się dziewięcioma aminokwasami. Ekspresję genów *vip3Aa* uzyskano w komórkach *Escherichia coli*, a następnie białka Vip3Aa izolowano i oznaczono aktywność insektycydową protoksyn oraz aktywowanych enzymatycznie białek wobec larw *D. pini* w stadium L2, *C. pomonella* w stadium L1, *S. exigua* w stadium L1 i L3 oraz mącznika młynarka *Tenebrio molitor* (owad z rzędu Coleoptera, szkodnik zboża i produktów zbożowych) w stadium L1. Białko Vip3Aa58 wykazywało aktywność insektycydową zbliżoną do aktywności Vip3Aa59 względem *S. exigua* i *C. pomonella*. Śmiertelność gąsienic *D. pini* była znacznie wyższa po podaniu Vip3Aa58 niż Vip3Aa59. Najmniejszą wartość LC₅₀ równą $0,14 \pm 0,04$ pmol/cm² uzyskano dla białka Vip3Aa aktywowanego trypsyną wobec larw *S. exigua* w stadium L1. Śmiertelność owadów po aplikacji protoksyn oraz aktywowanych białek była porównywalna - nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między wartościami LC₅₀. Wykazano, że toksyny Vip3Aa miały wyższą aktywność dla gąsienic *S. exigua* w stadium L1 niż L3. Białka nie były aktywne dla *T. moitor*. Wysoka aktywność Vip3Aa względem owadów wskazuje na użyteczność toksyn w ograniczaniu liczebności szkodników upraw roślin z rzędu Lepidoptera.

Mieszaniny Vip3Aa i kryształów MPU B9 podano gąsienicom *C. pomonella* i *S. exigua* w stadium L1, a także *D. pini* w L2. W zależności od proporcji stężeń białek w kombinacjach zaobserwowano synergistyczny lub addycyjny efekt interakcji między toksynami. Użycie

w mieszaninach toksyn Cry w stężeniu mniejszym lub równym połowie wartości LC_{50} dla owadów powodowało znaczący wzrost śmiertelności gąsienic w porównaniu ze śmiertelnością obserwowaną po podaniu białek Vip i kryształów osobno. Wykazano działanie synergistyczne toksyn w ww. kombinacjach. W mieszaninach, w których zastosowano wyższe stężenie kryształów zaobserwowano addycyjny charakter interakcji między Cry i Vip. Ze względu na różny mechanizm działania białek Cry i Vip oraz synergizm ich działania dla szkodników, preparaty oparte na mieszaninie tych toksyn mogą mieć szersze spektrum aktywności, nie będą indukować odporności wśród owadów oraz mogą być stosowane w niższych stężeniach w porównaniu do bioinsektycydów opartych tylko na jednym składniku.

Badania były wykonywane w ramach projektu NCN Nr UMO-2011/01/B/NZ9/00699 "Aktywność owadobójcza białek Vip *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników upraw", którego byłam wykonawcą.

Publikacje w czasopismach naukowych (wykaz B Ministra NiSW)

Konecka E., Ziemnicka J., Baranek J., Kaznowski A. 2010. Potencjalna przydatność kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* MPU B9 w ograniczaniu liczebności białki wierzbowki (*Leucoma salicis* L.). Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, 50: 357-360 (Punkty MNiSW₂₀₁₀: 6).

Konecka E., Baranek J., Ziemnicka J., Kaznowski A. 2011. Aktywność mieszaniny kryształów białkowych szczepów *Bacillus thuringiensis* MPU B7 i MPU B9 dla białki wierzbowki (*Leucoma salicis* L.). Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin 51: 393-396 (Punkty MNiSW₂₀₁₁: 5).

Określono aktywność biologiczną kryształów toksyn *B. thuringiensis* MPU B9 wobec gąsienic *L. salicis* z rzędu Lepidoptera. Do badań włączono szczep MPU B7, który miał trzy geny kodujące syntezę toksyn krystalicznych: *cryII*, *cry2Ab* (Konecka i in., 2007) oraz *cry25* (Konecka i in., 2014) i oznaczono toksyczność mieszaniny kryształów dwóch szczepów *B. thuringiensis* MPU B9 i MPU B7. Aktywność ww. preparatów porównano z aktywnością biopestycydu Foray.

Wartość LC_{50} kryształów MPU B9 wynosiła $2,61 \times 10^6$ kryształów w 10 μ l zawiesiny na jednego owada. Stwierdzono, że preparat kryształów *B. thuringiensis* wykazywał działanie owadobójcze w stosunku do *L. salicis* już w pierwszym dniu po jego podaniu. Po trzech dniach, przy zastosowaniu zawiesiny toksyn w stężeniu 6×10^7 kryształów w 10 μ l na jednego owada, stwierdzono 100% śmiertelności larw.

LC_{50} insektycydu Foray dla *L. salicis* była równa $3,79 \times 10^7$ spor i kryształów preparatu/gąsienicę. Aktywność kryształów MPU B9 była około 15-krotnie większa niż handlowego preparatu Foray.

Wartość LC_{50} dla gąsienic *L. salicis*, którym podano toksyny izolatu MPU B7 wynosiła $2,92 \times 10^7$ kryształów/larwę. Porównano wartości LC_{50} kryształów szczepów MPU B7 i MPU B9:

$$(LC_{50} \text{ kryształów izolatu MPU B7}) : (LC_{50} \text{ kryształów izolatu MPU B9}) = 2,92 \times 10^7 : 2,61 \times 10^6 \approx 11 : 1.$$

Mieszaninę kryształów białkowych szczepów *B. thuringiensis* MPU B7 i MPU B9 przygotowano łącząc zawiesinę białek każdego z izolatów w proporcji stężeń kryształów powodujących śmiertelność 50% larw *L. salicis*, tzn. tak, aby białek izolatu MPU B9 było 11-krotnie mniej niż toksyn szczepu MPU B7. Wartość LC_{50} mieszaniny białek krystalicznych *B. thuringiensis* MPU B7 + MPU B9 wynosiła $1,41 \times 10^7$ kryształów/gąsienicę. Oczekiwana wartość LC_{50} obliczona według wzoru Tabashnik (1992) była równa $1,38 \times 10^7$ kryształów/larwę. Stosunek określonej wartości LC_{50} kryształów w przeprowadzonym doświadczeniu do wartości oczekiwanej był zbliżony 1. Współczynnik interakcji według Bakuniaka (1973) pomiędzy kryształami MPU B7 i MPU B9 był równy 1,1. Uzyskane wyniki wskazują na addytywną interakcję toksyn Cry szczepów *B. thuringiensis* MPU B7 oraz MPU B9. Wyższa aktywność kryształów izolatu MPU B9 w porównaniu z biopestycydem Foray predestynuje ten szczep do dodatkowych doświadczeń określających jego użyteczność w ograniczaniu liczebności białki wierzbówki.

Badania były wykonywane w ramach grantu MNiSW i NCN Nr N N310 079936 "Skuteczność działania białek Cry *Bacillus thuringiensis* w zwalczaniu szkodników roślin", którego byłam kierownikiem.

Baranek J., **Konecka E.**, Kaznowski A. 2012. Zastosowanie techniki PCR oraz testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych do określenia potencjalnej toksyczności białek Vip *Bacillus thuringiensis*. Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, 52: 777-780 (Punkty MNiSW₂₀₁₂: 5).

Techniką PCR określono występowanie genu *vip3A* u 10 szczepów *B. thuringiensis*. Aktywność toksyn Vip oznaczono w przesączach pochodowlanych, które dodawano do pożywki dla larw *S. exigua*. Filtraty wykazały aktywność insektycydową - odsetek martwych larw owadów wynosił 12-100%. Zastosowanie reakcji PCR i testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych stanowi dobrą strategię we wstępnej ocenie toksyczności białek Vip poszczególnych szczepów. Pozwala szybko określić, które z bakterii wytwarzają białka Vip, wstępnie ocenić aktywność owadobójczą toksyn i wytypować szczepy do dalszych badań mających na celu opracowanie nowych bioinsektycydów.

Badania były wykonywane w ramach projektu NCN Nr UMO-2011/01/B/NZ9/00699 "Aktywność owadobójcza białek Vip *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników upraw", którego byłam wykonawcą.

Konecka E., Baranek J., Kaznowski A. 2014. Crystalline protein profiling and *cry* gene detection in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. Biological Letters 51: 83-92 (Punkty MNiSW₂₀₁₄: 8).

Profil genów toksyn krystalicznych porównano z profilem białek krystalicznych szczepów *B. thuringiensis*. Szczepy miały od jednego do 10 genów *cry*. W kryształach stwierdzono jedno do ośmiu białek o masie 36-155 kDa. Nie wykazano zależności między liczbą i zróżnicowaniem genów *cry* oraz liczbą i masą protein. Analiza profilów białek

otrzymanych metodą SDS-PAGE nie pozwoliła na oznaczenie składu kryształów oraz potencjalnego zakresu ich aktywności dla owadów.

Badania były wykonywane w ramach projektu NCN Nr UMO-2011/01/B/NZ9/00699 "Aktywność owadobójcza białek Vip *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników upraw", którego byłam wykonawcą.

Konecka E., Kaznowski A., Stachowiak M., Maciąg M. 2018. Activity of spore-crystal mixtures of new *Bacillus thuringiensis* strains against *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). 2018. Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry 60: 91-98 (Punkty MNiSW₂₀₁₆: 14).

Określono aktywność preparatu spor i kryształów *B. thuringiensis* MPU B54 dla *D. pini* i *S. exigua*, a także preparatu spor i kryształów *B. thuringiensis* MPU B9 dla *D. pini*. Toksyczność preparatów porównano z aktywnością mieszaniny spor i kryształów bakterii *B. thuringiensis* podgat. *kurstaki* HD1 wyhodowanej z handlowego bioinsektycydu Foray. Aktywność owadobójcza preparatów MPU B9, MPU B54 w porównaniu do HD-1 była zbliżona. Spory i kryształy MPU B9 i MPU B54 stanowią alternatywę dla preparatu opartego na HD-1 w ograniczaniu liczebności owadów.

Badania były wykonywane w ramach projektu NCN Nr UMO-2011/01/B/NZ9/00699 "Aktywność owadobójcza białek Vip *Bacillus thuringiensis* w stosunku do szkodników upraw", którego byłam wykonawcą. Ponadto prace prowadzono we współpracy z Wydziałem Ochrony Lasu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu.

BAKTERIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWE
U MECHOWCÓW (ACARI: ORIBATIDA):
WYSTĘPOWANIE I ANALIZA FILOGENETYCZNA

Wprowadzenie

W poznaniu biologii organizmów eukariotycznych przydatna jest wiedza dotycząca bakterii zasiedlających tkanki gospodarza. Mikroorganizmy symbiotyczne oddziałują na ekologię, sposób rozmnażania (Duploux i Horner, 2018) oraz ewolucję stawonogów promując specjację (Elias-Costa i in., 2019), zmieniając zakres tolerancji ekologicznej i powodując zmiany w genach (Russel i in., 2008). W genomach niektórych mikroorganizmów znajdują się ruchome elementy genetyczne oraz proste sekwencje powtarzające się (Werren i in., 2008; Chrostek i Teixeira, 2015) warunkując jego plastyczność (Ramírez-Puebla i in., 2016) i transfer DNA pomiędzy genomami bakteryjnymi (Ros i in., 2009; Newton i in., 2016), a także między genomami bakteryjnymi i zakażonych stawonogów (Harris i in., 2010; Kajtoch i Kotásková, 2018).

Partenogenetyczna forma rozmnażania może pojawić się u stawonogów w wyniku zakażenia endosymbiontami bakteryjnymi dziedziczonymi w linii matczynej z rodzajów: *Wolbachia*, *Cardinium* i *Rickettsia* (Cordaux i in., 2011; Ma i Schwander, 2017; van der Kooi i in., 2018). Drobnoustroje te mogą również powodować zwiększenie liczby samic w stosunku do liczby samców w populacji bezkręgowców przyczyniając się do obumierania męskich zarodków oraz rozwoju fenotypowych samic z genetycznych samców czyli feminizacji (Cordaux i in., 2011; Gebiola i in., 2017; Nguyen i in., 2017). Mogą także indukować niezgodność cytoplazmatyczną pojawiającą się w wyniku zapłodnienia niezakażonej komórki jajowej zakażonym plemnikiem (Beckmann i in., 2019) lub w przypadku połączenia oocytu i plemnika zainfekowanych „niekompatybilnymi” szczepami bakterii tego samego gatunku. W następstwie niezgodności cytoplazmatycznej rozwijający się zarodek obumiera (Bandi i in., 2001). Bakterie wzbogacają również dietę niektórych stawonogów dostarczając związki odżywcze (Hosokawa i in., 2010; López-Madrigo i Gil, 2017) oraz chronią gospodarzy przed zakażeniami pasożytami (Xue i in., 2012) i wirusami (Chrostek i in., 2013; Tan i in., 2017; Geoghegan i in., 2017; Haqshenas i in., 2019). Innymi endosymbiontami przekazywanymi w linii matczynej są np. bakterie reprezentujące rodzaje: *Spiroplasma*, *Arsenophonus* (Cordaux i in., 2011) i *Hamiltonella* (Dykstra i in., 2014). Skutkiem zakażeń *Spiroplasma* i *Arsenophonus* u bezkręgowców może być śmierć męskich zarodków (Cordaux i in., 2011). Występowanie *Hamiltonella* u stawonogów chroni gospodarza przed rozwojem pasożytów (Cayetano i in., 2015) i pozwala na uzupełnienie diety związkami azotowymi (Su i in., 2014).

Komórki mikroorganizmów endosymbiotycznych stwierdzano w cytoplazmie gamet (Sacchi i in., 2010) i w komórkach somatycznych zakażonych bezkręgowców (Merçot i Poinot, 2009; Strunov i Kiseleva, 2016). Endosymbiontów nie można hodować poza organizmem eukariotycznym przy zastosowaniu konwencjonalnych technik bakteriologicznych w warunkach laboratoryjnych. Ich identyfikacja, badania populacji oraz analiza rozprzestrzeniania się zakażenia bakteryjnego jest możliwa przy zastosowaniu

metod biologii molekularnej opartych na technice **PCR** (Saridaki i Bourtzis, 2010). Bakteryjne endosymbionty mogą być charakteryzowane w oparciu o **sekwencje genu 16S rRNA oraz genów podstawowego metabolizmu komórki**. Metoda ta jest użyteczna w typowaniu bakterii oraz genetycznych i ewolucyjnych badaniach populacji organizmów, pozwala scharakteryzować szczepy bakteryjne zakażające zróżnicowane grupy bezkręgowców. Sekwencje są deponowane w powszechnie dostępnych bazach genów i wykorzystywane w genetycznych badaniach porównawczych bakterii (Baldo i in., 2006). Analiza filogenetyczna szczepów *Wolbachia* oparta na sekwencjach genów podstawowego metabolizmu i 16S rRNA pozwoliła na wyodrębnienie 16 supergrup bakterii (A - Q) (Bing i in., 2014; Głowska i in., 2015). Szczepy *Cardinium* różnicuje się cztery grupy przy wykorzystaniu analizy filogenetycznej z użyciem sekwencji genu 16S rRNA oraz *gyrB* (Nakamura i in., 2009; Santos-Garcia i in., 2014).

Mechowce (Acari: Oribatida) to grupa pajęczaków, w której udział gatunków rozmnażających się bez udziału samców jest niespotykane wysoki (ok. 10%). O genezie i mechanizmie tego zjawiska wiadomo bardzo niewiele. Pod względem liczebności, mechowce przeważają wśród stawonogów w organicznej warstwie gleby lasów strefy umiarkowanej. Szacuje się, że liczba osobników Oribatida osiąga setki tysięcy na metr kwadratowy. Wraz ze skoczogonkami (Collembola), mechowce stanowią istotny składnik mezofauny glebowej przyczyniając się do fragmentacji i rozkładu materii organicznej (Schatz i Behan-Pelletier, 2008). Pomimo, że są powszechnie występującymi w glebie bezkręgowcami, informacje o zasiedlających je mikroorganizmach są znikome. Tylko nieliczni badacze podjęli prace nad zagadnieniem występowania endosymbiontów bakteryjnych determinujących płęć u Oribatida (Perrot-Minnot i Norton, 1997; Weeks i in., 2003). Wyniki badań opierali jedynie na analizowaniu pojedynczych osobników roztoczy wybranych gatunków. Tylko w jednym przypadku odnotowano obecność *Wolbachia* i *Cardinium* u *Oppiella nova* (Weeks i in., 2003). Liana i Witaliński (2010) również zaobserwowali w oocytach *Hermannia gibba* obecność komórek bakterii, ale endosymbiont nie został zidentyfikowany. Dane dotyczące występowania mikroorganizmów wewnątrzkomórkowych u mechowców oraz rekonstrukcja powiązań filogenetycznych drobnoustrojów mogłyby pomóc w zrozumieniu historii ewolucyjnej bakterii i ich gospodarzy. Ponadto wiedza o występowaniu wśród mechowców endosymbiotycznych „manipulatorów płci” przyczyniłaby się do wyjaśnienia braku samców w niektórych populacjach tych zwierząt. Ze względu na niedostatek informacji o występowaniu mikroorganizmów wewnątrzkomórkowych u mechowców podjęto badania nad tą tematyką i określono występowanie endosymbiotycznych drobnoustrojów, w tym mikroorganizmów wpływających na sposób rozmnażania stawonogów u Oribatida. **Celem badań** było testowanie hipotez:

1. Mikroorganizmy endosymbiotyczne tego samego gatunku zakażają mechowce (Acari: Oribatida) reprezentujące różne taksony.
2. Bakterie z rodzaju *Wolbachia* u Oribatida tworzą odrębne supergrupy.
3. Mikroorganizmy *Cardinium* u Oribatida tworzą odrębne grupy.
4. Występowanie endosymbiontów bakteryjnych jest ograniczone do niektórych populacji wybranych gatunków.

5. Endosymbionty bakteryjne występują zarówno u gatunków mechowców rozmnażających się partenogenetycznie jak i płciowo.

Zadania obejmowały: (1) poszukiwanie i identyfikację mechowców zakażonych bakteriami wewnątrzkomórkowymi, (2) molekularną charakterystykę i analizę filogenetyczną bakterii w oparciu o sekwencje genów: 16S rRNA, gyrazy B i podstawowego metabolizmu komórki.

Najważniejsze osiągnięcia i spostrzeżenia wynikające z przeprowadzonych badań dotyczących występowania bakteryjnych endosymbiontów u Oribatida:

1. Po raz pierwszy wykryto bakterie z rodzaju *Wolbachia* u mechowców *Gustavia microcephala* i *Ceratozetes thienemanni*.
2. Sekwencje 16S rDNA oraz genów podstawowego metabolizmu *Wolbachia* u mechowców wykazały wysoki stopień podobieństwa ($\geq 90\%$) do genów *Wolbachia* u skoczogonków (Collembola).
3. Analiza filogenetyczna oparta zarówno na pojedynczych genach (16S rRNA i podstawowego metabolizmu komórki) jak i na dodanych sekwencjach wszystkich genów wykazała przynależność bakterii u *G. microcephala* i *C. thienemanni* do supergrupy E *Wolbachia* reprezentowanej dotychczas przez endosymbionty wykryte u Collembola. Dodatkowo wysoki stopień pokrewieństwa między szczepami supergrupy E potwierdzono w analizie dywergencji.
4. W genie 16S rRNA *Wolbachia* u *C. thienemanni* oraz skoczogonków stwierdzono unikatową dla supergrupy E bakterii sekwencję DNA: 5'-GGGGTAATGGCC-3'.
5. *Wolbachia* wykryto także u *Oppiella nova*. Szczep bakterii nie należał do supergrupy A, B, C, D, E, F, H i M.
6. Po raz pierwszy wykryto *Cardinium* u *Achipteria coleoptrata*.
7. W 16S rDNA *Cardinium* Zchori-Fein i in. (2004) wykazali obecność dwóch swoistych dla *Cardinium* sekwencji: GCGGTGTAATAATGAGCGT i GGTCTTTAACTGACGCT. W badaniach własnych, w genie symbionta u *A. coleoptrata* stwierdzono pierwszą z ww. sekwencji, w drugiej nukleotyd w siódmej pozycji był inny (A zamiast T).
8. Analiza filogenetyczna *Cardinium* oparta na sekwencjach genu *gyrB* i 16S rDNA wykazała, że symbiont u *A. coleoptrata* nie przynależał do grup A-D i tworzył odrębną grupę E.
9. Zarówno przynależność szczepu bakterii wykrytego u *A. coleoptrata* do nowej grupy *Cardinium* jak i różnica w sekwencji nukleotydowej opisanej jako swoistej dla endosymbiontów z rodzaju *Cardinium* wskazuje na unikatowość szczepu, a także *A. coleoptrata* jak gospodarza bakterii.
10. Endosymbionty występowały u mechowców rozmnażających się płciowo (*G. microcephala*, *A. coleoptrata*) i u roztoczy partenogenetycznych (*O. nova*, *C. thienemanni*), co sugeruje inną funkcję bakterii niż indukcja partenogenezy u Oribatida.
11. W populacji *A. coleoptrata*, osobniki zakażone bakteriami wewnątrzkomórkowymi stanowiły ok. 30% co wskazuje na fakultatywną rolę mikroorganizmów.
12. Po raz pierwszy nieznanie bakterie zostały wykryte u mechowców *A. coleoptrata*. Analiza filogenetyczna mikroorganizmów oparta na genie 16S rRNA wykazała (1) przynależność bakterii wykrytej u *A. coleoptrata* do rodziny Holosporaceae (rząd

Holosporales, klasa Alphaproteobacteria), a także (2) najwyższe pokrewieństwo bakterii u *A. coleoprata* oraz bakteryjnych symbiontów gąbki, koralowca, pantofelków, krewetki i owada.

13. Sekwencje genów bakterii endosymbiotycznych wykrytych u Oribatida zdeponowano w bazie GenBank i są dostępne do genetycznych badań porównawczych mikroorganizmów.

Wstępne wyniki dotyczące występowania i powiązań filogenetycznych *Cardinium* i *Wolbachia* wykrytych u Oribatida zachęcają do kontynuowania badań wyjaśniających rolę bakterii u mechowców.

Krótkie streszczenie prac przedstawiam poniżej.

Konecka E., Olszanowski Z. 2015. A screen of maternally inherited microbial endosymbionts in oribatid mites (Acari: Oribatida). *Microbiology-SGM* 161: 1561-1571 (IF₂₀₁₅: 2,268; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 30).

Symbionty *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, mikrosporidia, a także bakterie z rodziny Anaplasmataceae w tym z rodzaju *Wolbachia* identyfikowano wśród 20 gatunków Oribatida reprezentujących 14 rodzin. Identyfikacja genu 16S rRNA Anaplasmataceae wykazała obecność symbionta *Wolbachia* u jednego gatunku mechowca - *Oppiella nova*. Amplifikacja genu *wsp* kodującego syntezę białka powierzchniowego bakterii (*ang.* *Wolbachia* surface protein) pozwoliła na uzyskanie produktu PCR o wielkości 400 pz, która nie odpowiadała oczekiwanej wielkości amplikonu. Zsekwencjonowane produkty amplifikacji porównane z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank były podobne do genów *Wolbachia*, jednak amplikon otrzymany przy użyciu specyficznych starterów do identyfikacji genu *wsp* nie wykazywał podobieństwa sekwencji do genów *wsp* innych szczepów *Wolbachia* zdeponowanych w GenBank. Sekwencja ww. amplikonu była zbliżona do genu kodującego syntezę nieznanego hipotetycznego białka *Wolbachia*. Otrzymane sekwencje genów *Wolbachia* u *O. nova* zamieszczono w bazie GenBank.

Po raz pierwszy *Wolbachia* sp. u *O. nova* została scharakteryzowana w oparciu o sekwencje genów podstawowego metabolizmu komórki. Amplifikacja pięciu genów przy użyciu specyficznych starterów pozwoliła na uzyskanie sekwencji dwóch z nich: *hcpA* (gen konserwatywnego białka, *ang.* conserved hypothetical protein) oraz *fbpA* (gen aldolazy fruktozo-bisfosforanowej, *ang.* fructose biphosphate aldolase). Produkty klonowano w komórkach *E. coli* i sekwencjonowano. Otrzymane sekwencje genów bakterii u *O. nova* zamieszczono w GenBank, a następnie określono pokrewieństwo *Wolbachia* z użyciem dodatkowych 32 sekwencji różnych szczepów *Wolbachia* wykrytych u innych gospodarzy: owadów (Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hemiptera), skorupiaków (Isopoda), roztoczy (Tetranychidae), skoczogonków (Hexapoda) i nicieni (Nematoda) zdeponowanych w bazie GenBank oraz reprezentujących supergrupy *Wolbachia*: A, B, C, D, E, F, H i M. Skonstruowano drzewo filogenetyczne *Wolbachia* u stawonogów w oparciu o dodane sekwencje genów *hcpA* i *fbpA*. Szczep *Wolbachia* zidentyfikowany

u *O. nova* nie należał do supergrupy A, B, C, D, E, F, H i M. Ponadto wykluczono zmienność rekombinacyjną sekwencji w analizowanych genach *Wolbachia* przy użyciu testu rekombinacji ϕ , co dodatkowo potwierdziło przynależność *Wolbachia* u *O. nova* do nowej grupy filogenetycznej.

Konecka E., Olszanowski Z., Koczura R. 2019. *Wolbachia* of phylogenetic supergroup E identified in oribatid mite *Gustavia microcephala* (Acari: Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135: 230-235 (IF₂₀₁₇: 4,412; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).

Konecka E., Olszanowski Z. 2019. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA, *gltA*, *gatB*, and *hcpA* gene sequences of *Wolbachia* from the novel host *Ceratozetes thienemanni* (Acari: Oribatida). *Infection, Genetics and Evolution* 170: 175-181 (IF₂₀₁₇: 2,545; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).

Po raz pierwszy bakterie z rodzaju *Wolbachia* zostały wykryte u mechowców *Gustavia microcephala* i *Ceratozetes thienemanni*. Zwierzęta wyizolowano z dwóch odrębnych populacji. *G. microcephala* ekstrahowano z próby gleby, ściółki i mchu zebranej w lesie liściastym na terenie woj. wielkopolskiego. *C. thienemanni* wyizolowano z próby pochodzącej z lasu mieszanego w woj. świętokrzyskim.

Amplikon 16S rDNA oraz genu syntazy cytrynianowej *gltA* uzyskano dla *Wolbachia* obu gatunków bezkręgowców. Dodatkowo otrzymano produkt amplifikacji genu białka podziału komórkowego *ftsZ* bakterii wykrytej u *G. microcephala*, a także genu amidotransferazy glutamyl-tRNA *gatB* i genu *hcpA* *Wolbachia* u *C. thienemanni*. Sekwencje genów zdeponowano w bazie GenBank.

Sekwencja 16S rDNA bakterii wykrytej u *G. microcephala* była prawie identyczna z sekwencją 16S rDNA *Wolbachia* u skoczogonków (Collembola): *Folsomia candida* (nr akcesyjne GenBank KU255239, EU330430, AY549179) i *Parisotoma notabilis* (nr akcesyjny KC767947). Sekwencje mikroorganizmów u Oribatida i Collembola różniły się tylko dwoma nukleotydami. Najwyższy stopień podobieństwa genu *ftsZ* równy 91% wykazano dla amplikonu bakterii u *G. microcephala* i skoczogonka *Mesaphorura italica* (nr akcesyjny AJ575103). Sekwencja genu *gltA* *Wolbachia* u mechowca była podobna do genu bakterii u *F. candida* (nr akcesyjny CP015510) – stopień podobieństwa sekwencji był równy 95%.

Wykazano podobieństwo sekwencji 16S rDNA bakterii wykrytej u *C. thienemanni* i *Wolbachia* u *F. candida* (nr akcesyjne EU330430 i AF179630) równe 98%. Stwierdzono także wysoki stopień podobieństwa (90-92%) sekwencji *gatB*, *gltA* i *hcpA* *Wolbachia* u *C. thienemanni* i *F. candida* (nr akcesyjne CP015510 i KT799605).

Podobieństwo sekwencji genów 16S rRNA i *gltA* *Wolbachia* u *G. microcephala* i *C. thienemanni* było wysokie i wynosiło odpowiednio 98% i 90%. Sekwencje genu *hcpA* bakterii wykrytej u *C. thienemanni* i *O. nova* także wykazywały wysoki procent (87%) identyczności.

W genie 16S rRNA *Wolbachia* u *C. thienemanni* oraz skoczogonków stwierdzono unikatową dla supergrupy E bakterii sekwencję DNA: 5'-GGGGTAATGGCC-3'. Analizowany fragment 16S rDNA o długości 514 pz *Wolbachia* u *G. microcephala* (nr akcesyjny MH595554) nie obejmował rejonu genu z ww. sekwencją.

Dodatkowo określono zróżnicowanie nukleotydów między supergrupami *Wolbachia* w wybranych pozycjach 16S rDNA zgodnie z propozycją Czarnetzki i Tebbe (2004). U bakterii zidentyfikowanej u *G. microcephala* i u innych gospodarzy analizowano podobieństwo nukleotydów w trzech pozycjach. Profil nukleotydów *Wolbachia* u *G. microcephala* był identyczny jak bakterii należącej do supergrupy E wykrytej u *F. candida*, ale odmienny niż *Wolbachia* również reprezentującej supergrupę E zidentyfikowaną u innego gatunku Collembolla - *M. italica*. Ponadto w dwóch pozycjach nukleotydy bakterii u *G. microcephala* i *C. thienemanni* były identyczne, w trzeciej pozycji różniły się: (1) u szczepu *G. microcephala* był nukleotyd C (podobnie jak u endosymbionta wykrytego u *Mesaphorura macrochaeta*, *M. italica* i *Paratullbergia callipygos*), (2) w genie bakterii u *C. thienemanni* był T (tak jak u szczepu *Wolbachia* zsiadającego *F. candida*). W sekwencji 16S rDNA bakterii wykrytej u *C. thienemanni* analizowano profil nukleotydów odczytanych w 12 pozycjach genu. W sześciu pozycjach nukleotydy były identyczne jak u szczepów *Wolbachia* supergrupy E opisanych u skoczogonków *M. macrochaeta*, *M. italica* i *P. callipygos*. W pięciu pozostałych pozycjach nukleotydy były takie same jak u bakterii supergrupy E wykrytej u *F. candida*. Analiza profilu nukleotydów wskazuje na podobieństwo szczepów *Wolbachia* u mechowców i skoczogonków.

Analiza filogenetyczna oparta zarówno na pojedynczych genach jak i na dodanych sekwencjach wszystkich genów wykazała przynależność bakterii u mechowców do supergrupy E *Wolbachia* reprezentowanej dotychczas przez endosymbionty wykryte u Collembola. Dodatkowo wykluczono zmienność rekombinacyjną sekwencji w analizowanych genach *Wolbachia* przy użyciu testu rekombinacji ϕ .

Dywergencję między bakteriami określono w oparciu o sekwencję trzech genów (16S rDNA, *ftsZ*, *gltA*). Niska dywergencja genetyczna (0,08) została wykazana między *Wolbachia* supergrupy E u *F. candida* i *M. italica*. Pomędzy szczepami *Wolbachia* u *G. microcephala* oraz u skoczogonków *F. candida* i *M. italica* był niski poziom dywergencji wynoszący odpowiednio 0,061 oraz 0,055. Dywergencja między *Wolbachia* u *G. microcephala* i bakteriami reprezentującymi inne supergrupy niż E była wyższa i wynosiła 0,075-0,212.

Wykazano zarówno wysokie podobieństwo sekwencji genów 16S rDNA i podstawowego metabolizmu komórki szczepów *Wolbachia* występujących u mechowców i skoczogonków jak i przynależność *Wolbachia* u mechowców i Collembola do tej samej supergrupy bakterii. Dodatkowo pokrewieństwo między szczepami zostało potwierdzone w analizie dywergencji. Wyniki mogą sugerować horyzontalny transfer bakterii pomiędzy tymi wymienionymi grupami bezkręgowców.

Konecka E., Olszanowski Z. 2019. A new *Cardinium* group of bacteria found in *Achipteria coleoptrata* (Acari: Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 131: 64-71 (IF₂₀₁₇: 4,412; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).

Po raz pierwszy bakterie z rodzaju *Cardinium* zostały wykryte u mechowca *Achipteria coleoptrata* z próby gleby zebranej w lesie liściastym Dąbrowy Krotoszyńskiej na terenie woj. wielkopolskiego. Obecność symbionta wykazano u ok. 30% osobników. Występowanie

w populacji roztoczy niezakażonych mechowców wskazuje na fakultatywną rolę mikroorganizmów.

Sekwencja 16S rDNA *Cardinium* u *A. coleoprata* była podobna (przy stopniu podobieństwa 95%) do sekwencji 16S rDNA szczepów bakterii u owadów: *Culicoides imicola* (nr akcesyjny JN166961) i *Euides speciosa* (nr akcesyjny AB506775) reprezentujących odpowiednio grupę C i A *Cardinium*. Podobny poziom podobieństwa sekwencji wykazano dla mikroorganizmu u *A. coleoprata* i *Cardinium* grupy A u innego mechowca - *O. nova*.

W genie 16S rRNA *Cardinium* Zchori-Fein i in. (2004) wykazali obecność dwóch swoistych dla bakterii sekwencji: GCGGTGTAAAATGAGCGT i GGTCTTTAACTGACGCT. W badaniach własnych, w genie symbionta u *A. coleoprata* stwierdzono pierwszą z ww. sekwencji, w drugiej nukleotydu w siódmej pozycji był inny (A zamiast T). Sekwencja genu 16S rRNA bakterii miała 49% par G-C. Zawartość par G-C była taka sama jak w genie szczepów *Cardinium* wykrytych u innych gospodarzy.

Analiza filogenetyczna oparta na sekwencji genu 16S rRNA wykazała obecność pięciu grup *Cardinium*. Symbiont u *A. coleoprata* nie przynależał do grup A-D i tworzył odrębną grupę E.

Szczep *Cardinium* u *A. coleoprata* scharakteryzował także w oparciu o sekwencję genu *gyrB*. Największe podobieństwo sekwencji genu równe 82% wykazano dla bakterii u *A. coleoprata* oraz szczepów *Cardinium* reprezentujących grupę A wykrytych u roztocza *Tetranychus urticae* (nr akcesyjne KU323550, AB506785, AB506786, AB506787), roztocza *Petrobia harti* (nr akcesyjny KU323549) i owada *Encarsia pergandiella* (nr akcesyjny HE983995).

Analiza filogenetyczna oparta na sekwencji genu *gyrB* potwierdziła przynależność *Cardinium* u *A. coleoprata* do grupy E. W analizie nie uwzględniono bakterii grupy D ze względu na brak dostępności sekwencji genu w bazie GenBank.

Zarówno przynależność szczepu bakterii wykrytego u *A. coleoprata* do nowej grupy *Cardinium* jak i różnica w sekwencji nukleotydowej opisanej jako swoistej dla endosymbiontów z rodzaju *Cardinium* wskazuje na unikatowość szczepu, a także *A. coleoprata* jako gospodarza bakterii.

Konecka E., Olszanowski Z. Detection of a new bacterium of the family Holosporaceae (Alphaproteobacteria, Holosporales) associated with the oribatid mite *Achipteria coleoprata*. *Biologia - Bratislava*, doi: 10.2478/s11756-019-00251-w - short communication (IF₂₀₁₇: 0,696; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 15).

Nieznane bakterie zostały wykryte u mechowca *A. coleoprata* wyizolowanego z próby mchów zebranej w lesie mieszanym w pobliżu Ostrowca Świętokrzyskiego, woj. świętokrzyskie. Analiza podobieństwa sekwencji 16S rDNA o długości 1268 pz bakterii wykrytej u *A. coleoprata* i sekwencji genów zdeponowanych w bazie GenBank wykazała $\geq 89\%$ identyczności sekwencji mikroorganizmu u roztocza i endosymbiotycznych drobnoustrojów:

- (1) „*Candidatus Nucleicultrix amoebiphila*” u ameby *Hartmannella* sp. (nr akcesyjny KF697195),
- (2) „*Candidatus Gortzia infectiva*” u pantofelka *Paramecium jenningsi* (nr akcesyjny HE797907),
- (3) „*Candidatus Gortzia infectiva*” u pantofelka *P. quadecaurelia* (nr akcesyjne HE797908, HE797909, HE797910),
- (4) „*Candidatus Gortzia shahrazadis*” u pantofelka *P. multimicronucleatum* (nr akcesyjny LT5490002),

a także

- (5) niehodowlanych bakterii wykrytych w próbkach wody morskiej (nr akcesyjny JQ194949) oraz wód podziemnych (nr akcesyjny AB294318).

Sekwencja amplikonu była także podobna (przy stopniu podobieństwa 88%) do sekwencji endosymbionta gąbki *Xestospongia muta* (nr akcesyjny JN596597).

Analiza filogenetyczna drobnoustrojów oparta na sekwencjach 16S rDNA wykazała: (1) przynależność bakterii wykrytej u *A. coleoprata* do rodziny Holosporaceae (rząd Holosporales, klasa Alphaproteobacteria), a także (2) najwyższe pokrewieństwo mikroorganizmu u *A. coleoprata* oraz „*Candidatus Hepatobacter penami*” - wewnątrzkomórkowego patogena krewetek, bakterii u koralowca *Porties compressa* i endosymbionta gąbki *X. muta*. Bakteria u mechowca była także blisko spokrewniona z (1) bakteriami wykrytymi w próbach wody, (2) endosymbiontami bakteryjnymi pantofelków *Paramecium* sp.: *Holospora* sp., *Paraholospora nucleivisitans*, „*Candidatus G. infectiva*” i „*Candidatus G. shahrazadis*”, a także (3) bakterią zidentyfikowaną u owada *Oropsylla hirsuta*. Nie można wykluczyć, że bakterie wykryte w wodzie były endosymbiontami organizmów jednokomórkowych obecnych w analizowanych próbach wody.

Występowanie u mechowców bakterii spokrewnionych z mikroorganizmami wykrytymi u gąbki, koralowca, pantofelków, krewetki i owada jest zagadkowe. Nie można wykluczyć, że (1) drobnoustrój jest wewnątrzkomórkowym symbiontem *A. coleoprata* jak i że (2) jest to endosymbiont innego organizmu, w tym jednokomórkowego, zasiedlającego mechowca. Niezależnie od tego kto jest jego gospodarzem, wykrycie nieznannej bakterii budzi ciekawość i zachęca do dalszych analiz, które pozwolą zidentyfikować zakażony organizm oraz określić charakter interakcji między mikroorganizmem i gospodarzem, a także pełnioną przez symbionta funkcję.

POZOSTAŁE PRACE

Kaznowski A., **Konecka E.** 2005. Identification of *Aeromonas culicicola* by 16S rDNA RFLP. Polish Journal of Microbiology 54: 335-338 - short communication (Punkty MNiI₂₀₀₅: 6).

Wykazano użyteczność metody 16S rDNA RFLP w identyfikacji *Aeromonas culicicola*. Cechy fenotypowe ww. gatunku bakterii są podobne do *A. veronii* biotyp *sobria*, *A. sobria* i *A. allosaccharophila*. Sekwencja 16S rDNA *A. culicicola* wykazuje wysokie podobieństwo z sekwencjami genu *A. jandaei*, *A. veronii* i *A. caviae*. Analiza profili DNA uzyskanych po trawieniu amplikonu 16S rDNA enzymami restrykcyjnymi AluI i MboI pozwala odróżnić *A. culicicola* od innych gatunków rodzaju *Aeromonas* z wyjątkiem *A. jandaei*. Użycie dodatkowego enzymu BceAI umożliwia uzyskanie swoistego dla *A. culicicola* profilu DNA różniącego się od wzoru DNA *A. jandaei*.

Konecka E., Kaznowski A., Marcinkiewicz W., Tomkowiak D., Maciąg M., Stachowiak M. 2018. Insecticidal activity of *Brassica alba* mustard oil against lepidopteran pests *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae), and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Plant Protection Research 58: 206-209 - rapid communication (Punkty MNiSW₂₀₁₆: 15).

Po raz pierwszy określono aktywność insektycydową olejku gorczycowego *Brassica alba* podanego drogą pokarmową gąsienicom owadów reprezentujących trzy różne rodziny z rzędu Lepidoptera: *C. pomonella* z rodziny Tortricidae, *D. pini* z rodziny Lasiocampidae i *S. exigua* z Noctuidae. Wartość LC₅₀ olejku dla *C. pomonella* była równa 21,1 µg/owada. Wartości LC₅₀ substancji dla *D. pini* i *S. exigua* były zbliżone i wynosiły odpowiednio 117,4 µg/gąsienicę i 116,6 µg/larwę. Olejek gorczycowy wykazywał wyższą aktywność dla *C. pomonella* w porównaniu do *D. pini* i *S. exigua*. Olejek był aktywny dla owadów szkodników roślin z rzędu Lepidoptera i powodował wysoką śmiertelność gąsienic w niskich stężeniach. Wyniki wskazują na użyteczność olejku w ochronie upraw roślin.

Badania prowadzono we współpracy z Wydziałem Ochrony Lasu Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Poznaniu.

Kaznowski A., **Konecka E.** 2013. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe preparatów pochodzenia roślinnego. W „Ziołolecznictwo, biokosmetyki i żywność funkcjonalna” ISBN: 978-83-64457-00-5, wydawca: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigoń w Krośnie, rok wydania 2013: 150-161 - rozdział w monografii (Punkty MNiSW₂₀₁₃: 4).

Wiele gatunków roślin wytwarza związki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Najbardziej aktywne z nich należą do pochodnych fenoli, terpenoidów, alkaloidów, lektyn i glikozydów. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa preparatów roślinnych związana jest z zaburzeniem struktury błony komórkowej i zwiększeniem jej przepuszczalności,

destabilizacją tworzenia gradientu protonowego błony, zakłóceniem transportu elektronów i aktywnego pobierania substratów odżywczych, redukcją syntezy ATP i inaktywacją enzymów. Fitochemikalia mogą także hamować komunikację międzykomórkową w populacjach bakterii, adhezję do nabłonka i tworzenie biofilmu. Lektyny i polipeptydy blokują adsorpcję i wnikanie wirusów do komórek, natomiast niektóre flawony inaktywują odwrotną transkryptazę. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa naparów, ekstraktów i destylatów roślinnych, nawet pozyskanych z tego samego gatunku rośliny, często jest zróżnicowana i zależy od regionu geograficznego, warunków uprawy, sposobu otrzymywania i części rośliny, z której są uzyskiwane. Obecnie dąży się do szczegółowego określania składu ekstraktów i olejków eterycznych oraz aktywności poszczególnych komponentów, co powinno umożliwić większą standaryzację preparatów. Dużą zaletą olejków eterycznych jest brak przypadków uodparniania się drobnoustrojów na ich działanie.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania możliwością większego wykorzystania preparatów pochodzenia roślinnego w profilaktyce i terapii zakażeń. Związane jest to z narastaniem i szerzeniem się oporności bakterii chorobotwórczych na antybiotyki i chemioterapeutyki. Stwierdzono aktywność preparatów roślinnych w stosunku do wieloopornych szczepów bakterii, stanowiących istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi, w tym *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę, *Staphylococcus epidermidis* tworzących biofilmy, *Enterococcus* sp. opornych na wankomycynę oraz pałeczek Enterobacteriaceae opornych na β -laktamy. Preparaty pochodzenia roślinnego są z powodzeniem stosowane w leczeniu ludzi z zakażeniem jamy ustnej, oskrzeli, dróg moczopłciowych, dermatoz i innych.

Wykazano synergizm działania przeciwdrobnoustrojowego mieszanin olejków eterycznych lub ich składowych otrzymanych z różnych roślin oraz mieszanin preparatów pochodzenia roślinnego ze związkami chemicznymi, np. karwakrolu z etanolem. Perspektywiczne w zwalczaniu zakażeń wydają się także preparaty mieszanin olejków eterycznych lub ich składników z antybiotykami i chemioterapeutykami, np. wykazano synergizm działania eugenolu z tertracyklinami dla *E. coli*.

Duże nadzieje wiąże się z możliwością większego zastosowania preparatów pochodzenia roślinnego jako środków hamujących wzrost grzybów pleśniowych, drożdży, fitopatogenów, ponadto w dezynfekcji wody i powietrza, konserwowaniu farmaceutyków, żywności, kosmetyków, środków drogeryjnych oraz jako alternatywy antybiotykowych stymulatorów wzrostu i kokcydiostatyków w hodowli zwierząt.

Kaznowski A., Krzywińska S., Szczuka E., **Konecka E.**, Jabłońska L. 2014. Probiotyki w profilaktyce i leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego. W „Medycyna naturalna w leczeniu i profilaktyce nowotworów” ISBN 978-83-64457-11-1, wydawca: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigionia w Krośnie, rok wydania 2014: 51-60 - - rozdział w monografii (Punkty MNiSW₂₀₁₄: 4).

Nowotwory przewodu pokarmowego są przyczyną zgonu przeszło 2,2 mln osób rocznie. Choroby te są uwarunkowane czynnikami genetycznymi, epigenetycznymi, immunologicznymi, środowiskowymi, dietą i stylem życia. Istotną rolę w indukowaniu lub zapobieganiu rozwojowi nowotworów przewodu pokarmowego odgrywa naturalna

drobnoustrojowa flora jelitowa (mikrobiota). Jej modyfikacja przez podanie żywych mikroorganizmów, korzystnie wpływających na zdrowie gospodarza (probiotyki) przyczynia się do zwiększenia puli korzystnych gatunków bakterii, poprawy integralności bariery jelitowej, stymulacji przeciwnowotworowej aktywności układu odpornościowego, hamowania rozwoju nowotworów i spadku liczby komplikacji pooperacyjnych. Najczęściej jako probiotyki stosuje się produkty zawierające bakterie rodzajów *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* oraz drożdże *Saccharomyces boulardii*. Probiotyki często podawane są w mieszaninach nazywanych symbiotykami, w skład których oprócz mikroorganizmów wchodzi prebiotyki, składniki żywności niepodlegające trawieniu z udziałem enzymów człowieka, ale stymulujące wzrost i aktywność metaboliczną drobnoustrojów, korzystną dla gospodarza. Dane epidemiologiczne i wyniki klinicznych badań eksperymentalnych uzyskane w ostatnich latach wyraźnie wskazują na istotną przeciwnowotworową aktywność probiotyków w przewodzie pokarmowym człowieka. Obecnie najważniejszym zadaniem jest pełniejsze poznanie interakcji pomiędzy mikroflorą a czynnikami genetycznymi i immunologicznymi oraz dietą i wiekiem człowieka. Dalsze badania mogą doprowadzić do opracowania indywidualnych probiotyków oraz rekomendacji do ich wykorzystania w profilaktyce i leczeniu pacjentów ze zmianami nowotworowymi w przewodzie pokarmowym.

Kaznowski A., Basczok M., **Konecka E.**, 2018. Bakteryjna terapia nowotworów: nadzieje, ograniczenia i perspektywy. W „Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne, żywność funkcjonalna. Nowe nadzieje w fitoterapii”, wydawca: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigionia w Krośnie, strony: 7-24 - rozdział w monografii (Punkty MNiSW₂₀₁₇: 5).

Szacuje się, że w 2018 roku 9,6 mln osób zmarło wskutek chorób nowotworowych. Już w XIX wieku zaobserwowano, że pewne typy nowotworów ulegają regresji podczas infekcji bakteryjnych. William Coley, amerykański chirurg i onkolog odkrył, że u pacjentów z rakiem, którym podawano ekstrakty bakteryjne następuje remisja choroby, a nawet całkowite wyleczenie. Mechanizm zaobserwowanego zjawiska polega na stymulacji układu odpornościowego pacjentów. Brak powtarzalności efektów, trudności interpretacyjne, niekorzystne efekty uboczne i rozwój innych metod terapeutycznych spowodowały na wiele lat zaprzestanie badań nad wykorzystaniem bakterii w zwalczaniu raka. Pierwszym bakteryjnym immunostymulatorem w leczeniu nowotworów, zatwierdzonym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), była szczepionka Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stosowana w leczeniu powierzchniowych postaci raka pęcherza moczowego, a także raka okrężnicy. Dalsze badania wykazały, że niektóre gatunki beztlenowych bakterii, np. *Clostridium* sp., rozwijają się i niszczą ubogie w tlen komórki rakowe, natomiast giną, gdy wejdą w kontakt ze zdrowymi natlenionymi tkankami otaczającymi guz. Wykorzystując techniki molekularne otrzymano genetycznie zmodyfikowane atenuowane szczepy *Salmonella enterica*, zdolne do niszczenia komórek nowotworowych guzów. Ponadto wykazano w badaniach przedklinicznych potencjalną przydatność kilku szczepów bakterii, jako wektorów transportujących przeciwrakowe immunostymulatory lub środków powodujących ekspresję specyficznych antygenów i prowadzących do apoptozy komórek

nowotworowych. Inną strategią leczenia jest użycie modyfikowanych toksyn bakteryjnych (np. egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa*, toksyny błoniczej *Corynebacterium diphtheriae*), roślinnych (np. rycyny, abryny, geloniny, saporyny) lub grzybiczych (restryktocyny, α -sarcyny), które po połączeniu z przeciwciałami lub ich fragmentami mogą być stosowane jako immunotoksyny swoiście niszczące komórki nowotworowe. Do konstruowania immunotoksyn, jako cząsteczki nośnikowe, wykorzystywane są także cytokiny, czynniki wzrostu komórek lub rozpuszczalne receptory. Pierwszą immunotoksyną dopuszczoną do leczenia ludzi była DAB389IL2 (DD, Ontak), stosowana w terapii skórno-chłoniaka T-komórkowego. Niestety immunotoksyny mogą wykazywać wysoką toksyczność uboczną w stosunku do komórek prawidłowych. Najgroźniejsze skutki uboczne to zespół przebiegania naczyniowego, hepatotoksyczność oraz zespół hemolityczno-mocznicowy. Niektóre metody terapii biologicznej nowotworów zostały zatwierdzone przez FDA, inne są obecnie testowane w eksperymentalnych badaniach klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

- Bakuniak E. 1973. Metodyka badań współdziałania substancji owadobójczych stosowanych w postaci dwuskładnikowych mieszanin. *Polskie Pismo Entomologiczne* 43: 395-414.
- Baldo L., Dunning Hotopp J.C.D., Jolley K.J., Bordenstein S.R., Biber S.A., Choudhury R.R., Hayashi C., Maiden M.C.J., Tettelin H., Werren J.H. 2006. Multilocus Sequence Typing System for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7098-7110.
- Bandi C., Dunn A. M., Hurst G. D. D. & Rigaud T. (2001) Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in Parasitology* 17: 88-94.
- Beckmann J.F., Bonneau M., Chen H., Hochstrasser M., Poinot D., Merçot H., Weill M., Sicard M., Charlat S. 2019. The toxin – antidote model of cytoplasmic incompatibility: genetics and evolutionary implications. *Trends in Genetics* 35: 175-185.
- Bing X.L., Xia W.Q., Gui J.D., Yan G.H., Wang X.W., Liu S.S. 2014. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and Evolution* 4: 2714-2737.
- Cayetano L., Rothacher L., Simon J.Ch., Vorburger Ch. 2015. Cheaper is not always worse: strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. *Proceedings of the Royal Society of London B* 282: 20142333.
- Cheng J.C., Hsieh F.C., Liu B.L., Kao S.S. 2005. Cloning and expression of *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIC*, and *cryIDa* genes from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact. Victoria BC, 2005, red. J.C. Côté, I.S. Otvos, J.L. Schwartz, C. Vincent.
- Chrostek E., Marialva M.S.P., Esteves S.S., Weinert L.A., Martinez J., Jiggins F.M., Teixeira L. 2013. *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *Public Library of Science Genetics* 9: e1003896.
- Chrostek E., Teixeira, L. 2015. Mutualism breakdown by amplification of *Wolbachia* genes. *Public Library of Science Biology* 13: e1002065.
- Cordaux R., Bouchon D., Gréve P. 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics* 27: 332-341.
- Czarnetzki A.B., Tebbe Ch.C. 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environmental Microbiology* 6: 35-44.
- Duploux A., Hornett E.A. 2018. Uncovering the hidden players in Lepidoptera biology: the heritable microbial endosymbionts. *PeerJ*. 6:e4629.
- Dykstra H.R., Weldon S.R., Martinez A.J., White J.A., Hopper K.R., Heimpel G.E. 2014. Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* aphids. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 5818-5827.

- Elias-Costa A.J., Confalonieri V.A., Lanteri A.A., Rodriguero M.S. 2019. Game of clones: Is *Wolbachia* inducing speciation in a weevil with a mixed reproductive mode? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 133: 42-53.
- Frankenhuyzen K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.
- Gebiola M., Giorgini M., Kelly S.E., Doremus M.R., Ferree P.M., Hunter M.S. 2017. Cytological analysis of cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* suggests convergent evolution with its distant cousin *Wolbachia*. *Proceedings of the Royal Society B* 284: 20171433.
- Geoghegan V., Stainton K., Rainey S.M., Ant T.H., Dowle A.A., Larson T., Hester S., Charles P.D., Thomas B., Sinkins S.P. 2017. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia* infected *Aedes aegypti* cells. *Nature Communications* 8: 526.
- Głowska E., Dragun-Damian A., Dabert M., Gerth M. 2015. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection, Genetics and Evolution* 30: 140-146.
- Haqshenas G., Terradas G., Paradkar P.N., Duchemin J.B., McGraw EA, Doerig Ch. 2019. A role for the insulin receptor in the suppression of dengue virus and zika virus in *Wolbachia*-infected mosquito cells. *Cell Reports* 26: 529-535.
- Harris H.L., Brennan L.J., Keddie B.A., Braig H.R. 2010. Bacterial symbionts in insects: balancing life and death. *Symbiosis* 51: 37-53.
- Hosokawa T., Koga R., Kikuchi Y., Meng X.Y., Fukatsu T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 107: 769-774.
- Kajtoch Ł. Kotásková N. 2018. Current state of knowledge on *Wolbachia* infection among Coleoptera: a systematic review. *PeerJ*. 6, e4471
- Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H. 2007. Analysis of *cry* gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Current Microbiology* 55: 217-222.
- Konecka E., Baranek J., Kaznowski A. 2014. Crystalline protein profiling and *cry* gene detection in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Biological Letters* 51: 83-92.
- Liana M. Witaliński W. 2010. Microorganisms in the oribatid mite *Hermannia gibba* (C. L. Koch, 1839) (Acari: Oribatida: Hermanniiidae). *Biological Letters* 47: 37-43.
- López-Madrugal S., Gil R. 2017. Et tu, Brute? Not even intracellular mutualistic symbionts escape horizontal gene transfer. *Genes* 8: 8100247.
- Ma, W.J., Schwander, T. 2017. Patterns and mechanisms in instances of endosymbiont-induced parthenogenesis. *Journal of Evolutionary Biology* 30: 868-888.
- Merçot H., Poinot D. 2009. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies* 332: 284-297.
- Nakamura, Y., Kawai, S., Yukuhiro, F., Ito, S., Gotoh, T., Kisimoto, R., Yanase, T., Matsumoto, Y., Kageyama, D., Noda, H., 2009. Prevalence of *Cardinium* bacteria in planthoppers and spider mites and taxonomic revision of “*Candidatus Cardinium hertigii*” based on detection of a new *Cardinium* group from biting midges. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6757-6763.
- Newton I.L.G., Clark M.E., Kent B.N., Bordenstein S.R., Qu J., Richards S., Kelkar J.D., Werren J.H. 2016. Comparative genomics of two closely related *Wolbachia* with different reproductive effects on hosts genome. *Genome Biology and Evolution* 8: 1526-1542.
- Nguyen D.T., Morrow J.L., Spooner-Hart R.N., Riegler M. 2017. Independent cytoplasmic incompatibility induced by *Cardinium* and *Wolbachia* maintains endosymbiont coinfections in haplodiploid thrips populations. *Evolution* 71: 995-1008.
- Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6: 3296-3325.
- Perrot-Minnot M.J., Norton R.A. 1997. Obligate thelytoky in oribatid mites: no evidence for *Wolbachia* inducement. *The Canadian Entomologist* 129: 691-698.
- Ramírez-Puebla S.T., Ormeño-Orrillo E., Vera-Ponce de León A., Lozano L., Sanchez-Flores A., Rosenblueth M., Martínez-Romero E. 2016. Genomes of *Candidatus Wolbachia bourtzisii* wDacA and *Candidatus Wolbachia pipientis* wDacB from the cochineal insect *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *G3 Genes Genomes Genetics* 6: 3343-3349

- Rausell C., Martínez-Ramírez A.C., García-Robles I., Real M.D. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1553-1558.
- Ros V.I.D., Fleming V.M., Feil E.J., Breeuwer J.A.J. 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1036-1043.
- Russell J.A., Goldman-Huertas B., Moreau C.S., Baldo L., Stahlhut J.K., Werren J.H., Pierce N.E. 2009. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution* 63: 624-640.
- Sacchi L., Genchi M., Clementi E., Negri I., Alma A., Ohler S., Sasser D., Bourtzis K., Bandi C. 2010. Bacteriocyte-like cells harbour *Wolbachia* in the ovary of *Drosophila melanogaster* (Insecta, Diptera) and *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera). *Tissue and Cell* 42: 328-333.
- Santos-Garcia D., Rollat-Farnier P.A., Beitia F., Zchori-Fein E., Vavre F., Mouton L., Moya A., Latorre A., Silva F.J. 2014. The genome of *Cardinium* cBtQ1 provides insights into genome reduction, symbiont motility, and its settlement in *Bemisia tabaci*. *Genome Biology and Evolution* 6: 1013-1030.
- Saridaki A., Bourtzis K. 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology* 13: 67-72.
- Schatz H., Behan-Pelletier V.M. 2008. Global diversity of oribatids (Oribatida: Acari: Arachnida). *Hydrobiology* 595: 323-328.
- Sharma P., Nain V., Lakhanpaul S., Kumar P.A. 2010. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Letters in Applied Microbiology* 51: 42-47.
- Strunov A., Kiseleva E. (2016) *Drosophila melanogaster* brain invasion: pathogenic *Wolbachia* in central nervous system of the fly. *Insect Science* 23: 253-264.
- Su Q., Xie W., Wang S., Wu Q., Liu B., Fang Y., Xu B., Zhanget Y. 2014. The endosymbiont *Hamiltonella* increases the growth rate of its host *Bemisia tabaci* during periods of nutritional stress. *Public Library of Science One* 9: e89002.
- Tabashnik B.E. 1992. Evaluation of Synergism among *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3343-3346.
- Tan C.H., Wong P.J., Li M.I., Yang H., Ching L., O'Neill S.L. 2017. wMel limits zika and chikungunya virus infection in a Singapore *Wolbachia* introgressed *Ae. aegypti* strain, wMel-Sg. *Public Library of Science Neglected Tropical Diseases* 19: 1-10.
- van der Kooij C.J., Matthey-Doret C., Schwander T. 2018. Evolution and comparative ecology of parthenogenesis in haplodiploid arthropods. *Evolution Letters* 1-6: 304-316.
- Weeks A.R., Velten R., Stouthamer R. 2003. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 1857-1865.
- Werren, J.H., Baldo, L., Clark, M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6, 741-751
- Xue X., Li S.J., Ahmed M.Z., De Barro P.J., Ren S.X., Qiu B. L. 2012. Inactivation of *Wolbachia* reveals its biological roles in whitefly host. *Public Library of Science One* 7: e48148.
- Zchori-Fein E., Perlman S.J., Kelly S.E., Katzir N., Hunter M.S. 2004. Characterization of a 'Bacteroidetes' symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): proposal of 'Candidatus *Cardinium hertigii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 961-968.
- Zeigler D.R. 1999. *Bacillus thuringiensis* & *Bacillus cereus*. In *Bacillus* genetic stock center catalog of strains, Vol. 2, 7th edn, The Ohio State University, Columbus, Ohio. Available at: <http://www.bgoc.org/catalogs/catpart2.pdf>
- Ziennicka J, Ziennicki K (2001) *Bacillus thuringiensis*: an epizootic agent in laboratory cultures of Codling moth (*Cydia pomonella* L.). *Progress in Plant Protection* 41: 503-508.

Spis prac składających się na pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze:***Publikacje w czasopismach naukowych (wykaz A Ministra NiSW)******- Full-length articles***

1. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K. 2007. Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 56-63 (IF₂₀₀₇: 1,463; Punkty KBN₂₀₀₇: 24).
2. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H. 2007. Analysis of *cry* gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Current Microbiology* 55: 217-222 (IF₂₀₀₇: 1,167; Punkty KBN₂₀₀₇: 10).
3. Baranek J., Kaznowski A., Konecka E., Naimov S. 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 130: 72-81 (IF₂₀₁₅: 2,198; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 40).
4. Konecka E., Olszanowski Z. 2015. A screen of maternally inherited microbial endosymbionts in oribatid mites (Acari: Oribatida). *Microbiology-SGM* 161: 1561-1571 (IF₂₀₁₅: 2,268; Punkty MNiSW₂₀₁₅: 30).
5. Baranek J., Konecka E., Kaznowski A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl* 62: 649-658 (IF₂₀₁₇: 1,924; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 40).
6. Konecka E., Olszanowski Z. 2019. A new *Cardinium* group of bacteria found in *Achipteria coleoptrata* (Acari: Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 131: 64-71 (IF₂₀₁₇: 4,412; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).
7. Konecka E., Olszanowski Z., Koczura R. 2019. *Wolbachia* of phylogenetic supergroup E identified in oribatid mite *Gustavia microcephala* (Acari: Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135: 230-235 (IF₂₀₁₇: 4,412; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).
8. Konecka E., Olszanowski Z. 2019. Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA, *gltA*, *gatB*, and *hcpA* gene sequences of *Wolbachia* from the novel host *Ceratozetes thienemanni* (Acari: Oribatida). *Infection, Genetics and Evolution* 170: 175-181 (IF₂₀₁₇: 2,545; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 30).

- Artykuł przeglądowy

9. Konecka E., Kaznowski A., Baranek J. 2011. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. *Postępy mikrobiologii* 50: 303-311 (IF₂₀₁₁: 0,151; Punkty MNiSW₂₀₁₁: 15).

- Short communications

10. Konecka E., Baranek J., Kaznowski A. 2013. Genetic similarity and distribution of *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* pathogenic for *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 23: 474-479 (IF₂₀₁₃: 0,731; Punkty MNiSW₂₀₁₃: 20).

11. Konecka E., Olszanowski Z. Detection of a new bacterium of the family Holosporaceae (Alphaproteobacteria, Holosporales) associated with the oribatid mite *Achipteria coleoptrata*. *Biologia – Bratislava*, doi: 10.2478/s11756-019-00251-w (IF₂₀₁₇: 0,696; Punkty MNiSW₂₀₁₆: 15).

Publikacje w czasopismach naukowych (wykaz B Ministra NiSW)

- Full-length articles

12. Konecka E., Ziemnicka J., Baranek J., Kaznowski A. 2010. Potencjalna przydatność kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* MPU B9 w ograniczaniu liczebności białki wierzbowki (*Leucoma salicis* L.). *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin*, 50: 357-360 (Punkty MNiSW₂₀₁₀: 6).
13. Konecka E., Baranek J., Ziemnicka J., Kaznowski A. 2011. Aktywność mieszaniny kryształów białkowych szczepów *Bacillus thuringiensis* MPU B7 i MPU B9 dla białki wierzbowki (*Leucoma salicis* L.). *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 51: 393-396 (Punkty MNiSW₂₀₁₁: 5).
14. Baranek J., Konecka E., Kaznowski A. 2012. Zastosowanie techniki PCR oraz testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych do określenia potencjalnej toksyczności białek Vip *Bacillus thuringiensis*. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 52: 777-780 (Punkty MNiSW₂₀₁₂: 5).
15. Konecka E., Baranek J., Kaznowski A. 2014. Crystalline protein profiling and *cry* gene detection in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Biological Letters* 51: 83-92 (Punkty MNiSW₂₀₁₄: 8).
16. Konecka E., Kaznowski A., Stachowiak M., Maciąg M. 2018. Activity of spore-crystal mixtures of new *Bacillus thuringiensis* strains against *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae) and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). 2018. *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry* 60: 91-98 (Punkty MNiSW₂₀₁₆: 14).

- Short/Rapid communications

17. Kaznowski A., Konecka E. 2005. Identification of *Aeromonas culicicola* by 16S rDNA RFLP. *Polish Journal of Microbiology* 54: 335-338 (Punkty MNiSW₂₀₀₅: 6).
18. Konecka E., Kaznowski A., Marcinkiewicz W., Tomkowiak D., Maciąg M., Stachowiak M. 2018. Insecticidal activity of *Brassica alba* mustard oil against lepidopteran pests *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae), and *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Plant Protection Research* 58: 206-209 (Punkty MNiSW₂₀₁₆: 15).

Rozdziały w monografiach

19. Kaznowski A., Konecka E. 2013. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe preparatów pochodzenia roślinnego. W „Ziołolecznictwo, biokosmetyki i żywność funkcjonalna” ISBN: 978-83-64457-00-5, wydawca: Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pigonia w Krośnie, rok wydania 2013: 150-161 (Punkty MNiSW₂₀₁₃: 4).

20. Kaznowski A., Krzywińska S., Szczuka E, Konecka E., Jabłońska L. 2014. Probiotyki w profilaktyce i leczeniu nowotworów przewodu pokarmowego. W „Medycyna naturalna w leczeniu i profilaktyce nowotworów” ISBN 978-83-64457-11-1, wydawca: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pignonia w Krośnie, rok wydania 2014: 51-60 (Punkty MNiSW₂₀₁₄: 4).
21. Kaznowski A., Basczok M., Konecka E., 2018. Bakteryjna terapia nowotworów: nadzieje, ograniczenia i perspektywy. W „Rośliny zielarskie, kosmetyki naturalne, żywność funkcjonalna. Nowe nadzieje w fitoterapii”, wydawca: Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Pignonia w Krośnie, strony: 7-24 (Punkty MNiSW₂₀₁₇: 5).

Patenty

1. Konecka E., Kaznowski A., Tomkowiak D., Baranek J. 2017. Patent nr 227005 na wynalazek pt. „Kompozycja owadobójcza” dotyczący aktywności owadobójczej mieszaniny kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* i olejku gorczycowego (Punkty MNiSW₂₀₁₇: 30).
2. Konecka E., Kaznowski A., Grochowska J. 2018. Patent nr 228067 na wynalazek pt. „Kompozycja owadobójcza i zastosowanie kompozycji” dotyczący aktywności owadobójczej mieszaniny kryształów białkowych *Bacillus thuringiensis* i tymolu (Punkty MNiSW₂₀₁₇: 30).

Sumaryczny „impact factor” wszystkich publikacji według listy Journal Citation Report, zgodnie z rokiem opublikowania: **35,427**

Suma punktów MNiI/KBN/MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania: **606**

Liczba cytowań według bazy Web of Science: **84**

Liczba cytowań według bazy Scopus: **98**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **5**

Indeks Hirscha według bazy Scopus: **6**

Tabela. Dorobek naukowy - podsumowanie.

Lista i rodzaj opublikowanych prac naukowych	przed doktoratem	po doktoracie	razem
publikacje w czasopismach naukowych (wykaz A Ministra NiSW)	0	17	17
publikacje w czasopismach naukowych (wykaz B Ministra NiSW)	1	6	7
rozdziały w monografiach	0	3	3
udzielone patenty	0	2	2
Liczba cytowań wg bazy Web of Science	0	84	84
Sumaryczny „impast factor”	0	35,427	35,427
Punkty MNiI/KBN/MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania	6	600	606
Indeks Hirscha wg bazy Web of Science	5		

Edyta Konecka