

STRESZCZENIE

Obecnie na świecie wzrasta zainteresowanie gatunkami obcymi ze względu na ich zdolność do wykształcenia cech inwazyjności i oddziaływania na środowisko naturalne oraz gospodarkę człowieka. Pojawiają się one w nowym środowisku wskutek przypadkowego lub celowego uwolnienia. W krajach UE obowiązuje prawny nakaz eliminacji inwazyjnych gatunków z powodu ich zagrożenia dla środowiska. W Polsce jedynym naturalnie występującym gatunkiem żółwia jest *E. orbicularis* objęty ochroną gatunkową. Obecność w środowisku jego bytowania obcych i inwazyjnych gatunków żółwi może być dla niego niebezpieczna między innymi ze względu na możliwą transmisję obcej mikroflory. Badania naukowe skupiały się dotychczas na izolacji znanych już patogenów od żółwi gatunków inwazyjnych.

Głównym celem badań realizowanych w pracy doktorskiej było dostarczenie dowodów naukowych na poparcie tezy, że obce gatunki żółwi są nie tylko inwazyjne dla środowiska, ale mogą też stanowić zagrożenie epidemiczne jako źródło i wektor bakterii chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt. Założono kompleksową ocenę składu flory bakteryjnej, z wymuszonym ograniczeniem zakresu pracy do bakterii jelitowych, którym poświęcono większą uwagę ze względu na obecność w rodzinie *Enterobacteriaceae* znanych patogenów ludzi i zwierząt – *Salmonella* i *E. coli*. Dokładniejsze analizy poświęcono również powszechnym w środowisku wodnym rzędom bakteryjnym Aeromonadales i Pseudomonadales, obejmującym patogeny ryb.

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej obejmowały dwie grupy żółwi: importowane padłe w trakcie transportu do Polski (n = 16) i obce odławiane ze środowiska (n = 126). Od pierwszej pobrano 28 próbek jelit i narządów wewnętrznych, natomiast od grupy 2. – 329 próbek, w tym: jelita (n = 110), woreczek żółciowy (n = 84), jajniki (n = 71), kał (n = 61) i jaja (n = 3).

Analizy w kierunku *Salmonella* prowadzone były zgodnie z normą ISO 6579-1, ale poszerzone o podłoże RSA, posiewane równolegle do MSRV. Identyfikację *Salmonella* wykonywano tradycyjnymi metodami opartymi o cechy biochemiczne, serologicznymi oraz wspierano się narzędziami bioinformatycznymi do analizy wyników reakcji PCR i sekwencjonowania genomowego. *E. coli* izolowana była na podłożu MacConkeya oraz MacConkeya

wzbogaconym cefotaksydem. Pozostałe dwa kierunki badań miały na celu uchwycenie różnorodności flory jelitowej żółwi, dlatego zastosowano dwa podłoża chromogenne – CHROMAgar Orientation i CHROMAgar Acinetobacter.

Na podstawie uzyskanych wyników obecność *Salmonella* stwierdzono w 70 (14,4%) z 486 badanych próbek pochodzących od 42 (29,6%) ze 142 badanych żółwi obu grup. Statystycznie częściej (χ^2 , Yates $p \leq 0,5$) bakterie te obserwowano u żółwi importowanych, gdzie wykryto je u dziewięciu z 16 zwierząt (56,3%). Stwierdzono je w 12 z 28 badanych próbek, zarówno jelit, jak i narządów wewnętrznych. W grupie 2 – żółwi odłowionych ze środowiska naturalnego – *Salmonella* stwierdzono u 33 z 126 osobników (26,2%), w tym w 12,7% próbek. Statystycznie najczęściej (χ^2 , Bonferroni $p \leq 0,008$) były to izolaty z wymazów z pojemników transportowych (20,6%). Z niższą częstością bakterie te notowano w jelitach (14,5%), ale również woreczku żółciowym (7,1%) i jajnikach (7,0%).

Wśród wyizolowanych *Salmonella* zaobserwowano dużą różnorodność serowarów i klonów ($D = 0,897$). Były to serowary często występujące u zwierząt hodowlanych i człowieka (*S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Tennessee*), ale też „egzotyczne” (*S. Kimberley*, *S. Lindern*, *S. enterica* subsp. *salamae* 16:m,t:-). *Salmonella* wyizolowane od żółwi odławianych ze środowiska poddane badaniu WGS charakteryzowały się dużą różnorodnością wysp patogenności ($D = 0,857$) i stosunkowo różnorodnymi plazmidami ($D = 0,757$). *Salmonella* od obu grup żółwi różniły się opornością na substancje przeciwbakteryjne: wyizolowane od żółwi importowanych były wrażliwe na wszystkie badane środki przeciwdrobnoustrojowe, natomiast *Salmonella* od żółwi odławianych ze środowiska były odporne na ciprofloksacynę, kwas nalidyksowy i gentamycynę. Zidentyfikowano geny oporności na chinolony – mutacje w genach *gyrA* i *parC* w regionie QRDR oraz mechanizm plazmidowy *qnrB19*, geny *aac(6′)-Iaa* (gen kryptyczny, wymagający pojawienia się mutacji do jego aktywacji) [254] i *ant(2′′)-Ia* warunkujące oporność na aminoglikozydy, a także oporność na sulfonamidy (*sul1*) i nieobjęte badaniem fosfomicyny (*fosA7*).

W genomach sekwencjonowanych szczepów *Salmonella* stwierdzono występowanie 11 wysp patogenności ($D = 0,857$). Wszystkie szczepy posiadały C63PI, a większość ($n = 40$; 95,2%) - SPI-13. Odnotowano również m. in. wyspy SPI-8, SPI-12. W sekwencjach genomowych *Salmonella* stwierdzono siedem typów replikonów plazmidów ($D = 0,757$).

W badaniach uzyskano również 64 szczepy *E. coli*. Zdecydowanie częściej (χ^2 Yates $p \leq 0.01$) bakterie te obserwowano wśród żółwi padłych w czasie kwarantanny (grupa 1) niż odławianych ze środowiska naturalnego. Analiza szczepów *E. coli* wykazała dużą różnorodność stwierdzanych typów ST ($D = 0,981$).

Wszystkie izolaty *E. coli* wyizolowane od żółwi importowanych wykazywały oporność obejmującą wszystkie badane klasy środków przeciwdrobnoustrojowych – aminoglikozydy, penicyliny, cefalosporyny, chinolony, trimetoprim i sulfametoksazol, polimyksyny, a ich genomy zawierały geny odpowiedzialne za fenotypowy obraz oporności. Zaobserwowany synergizm działania pomiędzy cefalosporynami a kwasem klawulanowym potwierdził, że szczepy te produkowały β -laktamazy o poszerzonym spektrum działania, a fenotypowa oporność na cefoksytynę wskazywała na produkcję cefalosporynaz typu AmpC. Wśród szczepów opornych na ciprofloksacynę i kwas nalidyksowy obecne były mutacje w regionie QRDR – *gyrA*, *parC*, *parE*. Wykazano również obecność mechanizmów oporności na chinolony kodowane plazmidowo (PMQR) - *qnrS1*, *qepA*, *aac(6)-Ib-cr* kodujący enzym modyfikujący ciprofloksacynę. W przypadku *E. coli* od żółwi odławianych ze środowiska, oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe stwierdzono u trzech szczepów. W sekwencjonowaniu genomowym stwierdzono geny oporności na β -laktamy (*bla_{TEM-1B}*), makrolidy, linkozamidy i streptograminę B (*mdf(A)*), sulfonamidy (*sul1*, *sul2*), tetracykliny (*tet(A)*, *tet(B)*), trimetoprim (*drfA5*, *drfA12*). Dwa szczepy miały geny oporności na aminoglikozydy (*aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*). W jednym ze szczepów zidentyfikowano geny oporności na streptomycynę (*aadA2*) oraz mutacje odpowiedzialne za oporność na fluorochinolony (*gyrA* (S83L, D87N), *parC* (A56T, S80I)).

Replikony plazmidów obecne u *E. coli* charakteryzowały się dużą różnorodnością ($D = 0,860$). Najczęściej występowały IncFIB, IncFII. Obecne u *E. coli* markery patogenności odpowiadały za kodowanie fimbrii, bakteriocyn, czynników zwiększających przeżywalność w surowicy, czynnik martwicy i białka transportujące w poprzek błony komórkowej.

Od żółwi wyizolowano również liczne i różnorodne bakterie zakwalifikowane do 13 rzędów ($D = 0,924$). Najliczniej reprezentowane były Enterobacteriales, Aeromonadales. Rodzaje *Pseudomonas* oraz *Aeromonas* były dominujące pod względem liczby wyizolowanych szczepów.

Sekwencjonowanie genomowe i analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów wykazały znaczne zróżnicowanie genetyczne *P. putida*, *A. veronii* i *A. hydrophila*. Podczas gdy żaden z izolatów *P. putida* nie posiadał genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, to wszystkie szczepy *A. veronii* niosły jednocześnie co najmniej dwa geny oporności na β -laktamy. U wszystkich szczepów *A. hydrophila* zidentyfikowano gen *ampH* odpowiedzialny za oporność na ampicylinę i amoksycylinę, a u części z nich – geny oporności na aminoglikozydy, sulfametoksazol, chloramfenikol lub tetracykliny. Genom oporności obserwowanym u *Aeromonas* nie towarzyszyły replikony plazmidów.

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że inwazyjne gatunki żółwi mogą pełnić rolę wektora bakterii chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt. Są to nie tylko bakterie o udokumentowanych właściwościach chorobotwórczych, jak *Salmonella*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, czy *K. oxytoca*, ale również bakterie niosące geny oporności na licznych i różnorodnych plazmidach. Żółwie są też źródłem nieznanymi dotychczas typów sekwencyjnych *P. putida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* oraz *S. enterica* subsp. *salamae* (16:m,t;-), ale również bakterii, które posiadają geny oporności na licznych i różnorodnych plazmidach.

SUMMARY

Currently, the interest in alien species is increasing worldwide due to their ability to develop invasive features and due to their impact on natural environment and the human economy. They appear in a new environment as a result of accidental or deliberate release. In the EU countries there is a legislation for eradication of invasive species due to their threat to the environment. In Poland the only native species of turtle is *E. orbicularis*, that is under strict protection. The presence in it's environment of alien and invasive turtle species may be dangerous among the other, due to the possible transmission of alien microflora. The studies so far undertaken focused on the isolation of already known pathogens from invasive turtles. The main goal of the dissertation study was to provide scientific evidence to support the thesis that alien turtles are not only invasive to the environment, but can also pose an epidemic threat as a source and vector of pathogenic bacteria for humans and animals. A comprehensive assessment of the composition of bacterial flora was assumed, although the scope was limited to intestinal bacteria, which received attention because of the presence in

family *Enterobacteriaceae* of known human and animal pathogens, such as *Salmonella* and *E. coli*. More detailed analyzes were also devoted to the bacterial orders Aeromonadales and Pseudomonadales that are common in aquatic environment and that include fish pathogens.

The research conducted for the dissertation covered two groups of turtles: imported turtles that died during transport to Poland (n = 16) and alien that are caught from the environment (n = 126). From the first group, 28 samples of intestines and internal organs were collected, while from the second group – 329 samples, including intestines (n = 110), gall bladder (n = 84), ovaries (n = 71), feces (n = 61), and eggs (n = 3).

Salmonella analyzes were conducted in accordance with the ISO 6579-1 standard, but with addition of RSA medium inoculated parallel to MSRV medium. *Salmonella* identification was performed using traditional methods based on biochemical and serological features and was supported by bioinformatics tools for PCR and genomic sequencing results analyses. *E. coli* was isolated on MacConkey and MacConkey medium supplemented with 1% cefotaxime. The other two fields of study were aimed at evaluation of turtles intestinal flora, which is why two chromogenic media – CHROMagar Orientation and CHROMagar Acinetobacter were used.

Based on the obtained results the presence of *Salmonella* was found in 70 (14,4%) out of 486 tested samples from 42 (29,6%) out of 142 tested turtles of both groups. Statistically more often (χ^2 Yates $p \leq 0,5$) these bacteria were observed in imported turtles, where they were detected in nine out of 16 animals (56,3%). They were found in 12 out of 28 samples, both of the intestines and organs. In second group of turtles captured from the environment, *Salmonella* was found in 33 out of 126 turtles (26,2%), including 12,7% samples. Statistically, the most common (χ^2 Benferroni $p \leq 0,008$) isolates originated from transport containers swabs (20,6%). With a lower frequency, these bacteria were isolated from intestines (14,5%) but also from gall bladder (7,1%) and ovaries (7,0%).

Among isolated *Salmonella* a large variety of serovars and clones were observed ($D = 0,897$). These were serovars occurring in farmed animals (*S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Tennessee*) but also “exotic” ones (*S. Kimberley*, *S. Lindern*, *S. enterica* subsp. *Salamae* 16:m,t:-). The wild-caught turtles *Salmonella* isolates in WGS study were characterized by a high diversity of pathogenic islands ($D = 0,857$) and low plasmids variability ($D = 0,757$). *Salmonella* from both turtle groups differed in their resistance to antimicrobial agents: these isolated from imported turtles were

sensitive to all tested antimicrobial agents, while *Salmonella* from wild-caught turtles were resistant to ciprofloxacin, nalidixic acid and gentamicin. Quinolone resistance genes were identified – mutations in *gyrA* and *parC* gene in the QRDR region and the *qnrB19* plasmid mechanism, the *aac(6′)-Iaa* and *ant(2′′)-Ia* genes that confer resistance to aminoglycosides, as well as sulfonamides (*sul1*) and fosfomycin (*fosA7*) not addressed in the study.

In sequenced *Salmonella* genomes 11 *Salmonella* Pathogenicity Islands (D = 0,857) were found. All strains harboured C63PI and the majority (n = 40; 95,2%) had sPI-13. Among other SPI there were also SPI-8, SPI-12. Seven plasmid replicons were found in *Salmonella* genomic sequences (D = 0,757).

A total of 64 strains of *E. coli* were isolated in this study. These bacteria were observed more often (χ^2 Yates $p \leq 0,01$) from turtles that died during quarantine than those from wild-caught animals. *E. coli* analysis showed a large variety of ST types (D = 0,981).

All *E. coli* isolates from imported turtles showed resistance to all classes of tested antimicrobial agents – aminoglycosides, penicillins, cephalosporins, quinolones, trimethoprim and sulfamethoxazole, polymyxins and their genomes contained genes responsible for the phenotypic pattern of resistance. The synergy of action between cephalosporins and clavulanic acid confirmed that these strains produced extended-spectrum β -lactamases, and the phenotypic resistance to ceftiofur suggests the AmpC-type cephalosporins production. Among the strains resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid, mutations in QRDR region were present – *gyrA*, *parC*, *pare*. Mechanisms of resistance to plasmid-encoded quinolones (PMQR) – *qnrS1*, *qepA*, *aac(6)-Ib-cr* encoding the ciprofloxacin modifying enzyme have also been observed. In *E. coli* strains from wild-caught turtles, antimicrobial resistance was found in three strains. Genomic sequencing revealed genes of resistance to β -lactams (*bla_{TEM-1B}*), macrolides, lincosamides and streptogramin B (*mdf(A)*), sulfonamides (*sul1*, *sul2*), tetracyclines (*tet(A)*, *tet(B)*), trimethoprim (*drfA5*, *drfA12*). There were two strains that had aminoglycoside resistance genes (*aph(3′)-Ia*, *aph(3′′)-Ib*). Streptomycin resistance genes (*aadA2*) and mutations responsible for fluoroquinolone resistance (*gyrA* (S83L, D87N), *parC* (A56T, S80I)) were identified in one of the strains.

Diverse plasmid replicons were identified in *E. coli* (D = 0, 860). The most common were IncFIB, IncFII. Pathogenicity markers of *E. coli* included fimbriae, bacteriocins, serum survival factors, necrosis factor and transmembrane transport proteins.

Numerous and diverse bacteria isolated from turtles were classified into 13 orders (D = 0,924). The most numerous ones were Enterobacteriales, Aeromonadales. The genera *Aeromonas* and *Pseudomonas* were dominant in terms of the number of isolated strains. The genomic sequencing and single nucleotide polymorphism analysis revealed significant genetic variation between *P. putida*, *A. veroni*, and *A. hydrophila*. While none of *P. putida* isolates carried antimicrobial resistance genes, all *A. veronii* strains carried at least two β -lactam resistance genes simultaneously. The *ampH* gene responsible for resistance to ampicillin and amoxicillin was identified in *A. hydrophila* and in some strains – resistance genes to aminoglycosides, sulfamethoxazole, chloramphenicol or tetracyclines. *Aeromonas* resistance genes were not accompanied by plasmid replicons.

Summarising the obtained results, it can be concluded that invasive turtle species can be a vector of pathogenic bacteria for humans and animals. These are not only bacteria with documented pathogenic features, such as *Salmonella*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, or *K. oxytoca*. Turtles are also the source of unknown sequence types of *P. putida*, *A. hydrophila*, *A. veronii* and *S. enterica* subsp. *salamae* 16:m,t;- but also bacteria that carry resistance genes on numerous and diverse plasmids.