



WYDAWNICTWO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

MONOGRAFIE KOMITETU INŻYNIERII ŚRODOWISKA

vol. 161



**ŹRÓDŁA ZANIECZYSZCZEŃ MIKROBIOLOGICZNYCH
WÓD RZEKI ŁYNY**

Anna Gotkowska-Płachta

Warszawa 2019

**POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET INŻYNIERII ŚRODOWISKA**

**MONOGRAFIE
Nr 161**

**ŹRÓDŁA ZANIECZYSZCZEŃ MIKROBIOLOGICZNYCH
WÓD RZEKI ŁYNY**

Anna Gotkowska-Plachta

WARSZAWA 2019

Wydawnictwo Polskiej Akademii Nauk 2019

© Komitet Inżynierii Środowiska PAN
ISBN 978-8363714-56-7

Komitet Redakcyjny

prof. Anna Anielak	prof. Korneliusz Miksch
prof. Kazimierz Banasik	dr hab. inż. Maciej Mrowiec
prof. January Bień	prof. Hanna Obarska–Pempkowiak
prof. Ryszard Błażejowski	prof. Artur Pawłowski
prof. Michał Bodzek	dr hab. inż. Bernard Quant
dr hab. inż. Marcin Chodak	prof. Czesława Rosik–Dulewska
prof. Wojciech Dąbrowski	prof. Jadwiga Rotnicka
prof. Marzenna Dudzińska	prof. Marek Sozański
prof. Marek Gromiec	prof. Joanna Surmacz–Górska
dr hab. inż. Katarzyna Ignatowicz	prof. Krzysztof Szamałek
prof. Janusz Jeżowiecki	dr inż. Krystian Szczepański
prof. Katarzyna Juda–Rezler	mgr Andrzej Szweda–Lewandowski
prof. Małgorzata Kabsch–Korbutowicz	prof. Kazimierz Szymański
dr hab. inż. Piotr Koszelnik	prof. Maria Waclawek
prof. Mirosław Krzemieniewski	prof. Józefa Wiater
prof. Izabela Majchrzak–Kucęba	prof. Tomasz Winnicki
prof. Tadeusz Kuczyński	prof. Krzysztof Wojdyga
prof. Marian Kwietniewski	mgr Krzysztof Zaręba
prof. Marian Mazur	prof. Mirosław Żukowski

Redaktor Naczelny

prof. Lucjan Pawłowski

Recenzenci wydawniczy

prof. dr hab. inż. Hanna Obarska-Pempkowiak

prof. dr hab. inż. Joanna Surmacz-Górska

Druk

Perfekta info Paweł Markisz, tel. 81 46 10 229
20-280 Lublin, ul. Doświadczalna 48
www.perfekta.info.pl

SPIS WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

- ARB** – bakterie antybiotykooporne (z ang. - antibiotic resistant bacteria)
- ARGs** – geny oporności na antybiotyki (z ang. - antibiotic resistance genes)
- FIB** – wskaźniki sanitarne (z ang. fecal indicator bacteria)
- VRE** – enterokoki odporne na wankomycynę (z ang. vancomycin resistant enterococci)
- FISH** – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
- PCR** – łańcuchowa reakcji polimerazy
- RDW** – Ramowa Dyrektywa Wodna
- VBNC** – mikroorganizmy żywe, których nie można hodować w warunkach laboratoryjnych na klasycznych podłożach mikrobiologicznych (z ang. viable but not culturable)
- OECD** – Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (z ang. Organisation for Economic Co operation and Development)
- NPOA** – Narodowy Program Ochrony Antybiotyków
- ECDC** – Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (z ang. European Centre for Disease Control and Prevention)
- ChZT** – chemiczne zapotrzebowanie tlenu ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$)
- DO** – tlen rozpuszczony w wodzie ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$)
- TDS** – całkowite substancje rozpuszczone (mg l^{-1})
- N_{NH4⁺}** – azot amonowy ($\text{mg N}_{\text{NH}_4^+} \text{ l}^{-1}$)
- N_{NO2⁻}** – azot azotynowy ($\text{mg N}_{\text{NO}_2^-} \text{ l}^{-1}$)
- N_{NO3⁻}** – azot azotanowy ($\text{mg N}_{\text{NO}_3^-} \text{ l}^{-1}$)
- P_{PO4³⁻}** – fosfor fosforanowy (mg P l^{-1})
- P_{og}** – fosfor ogólny (mg P l^{-1})
- TOC** – ogólny węgiel organiczny (mg C l^{-1})
- POC** – cząsteczkowy węgiel organiczny (mg C l^{-1})
- DOC** – rozpuszczony węgiel organiczny (mg C l^{-1})
- OLB** – ogólna liczba bakterii
- MIC** – minimalne stężenie hamujące, MIC (z ang. minimum inhibitory concentration)
- MDR** – wielolekooporność (z ang. multidrug-resistance)
- XDR** – rozszerzona oporność (z ang. extensively drug resistance)
- Ekosystemy lotyczne** – system płynących wód słodkich (np. rzeki, źródła, potoki, strumienie)
- Wankomycyna** – organiczny związek chemiczny, antybiotyk o działaniu bakteriobójczym
- Komensale** – organizmy pozostające w symbiozie z innym organizmami, żywiące się produktami pokarmowymi niewykorzystanymi przez te organizmy

Spis treści

1. Wprowadzenie	6
2. Przegląd literatury	7
3. Cel i zakres badań.....	14
4. Teren i metodyka badań.....	15
4.1. Charakterystyka terenu badań	15
4.1.1. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych.....	17
4.1.2. Pobór próbek wody rzeki Łyny i ścieków do badań.....	21
4.2. Metodyka badań	22
4.2.1. Oznaczenia fizykochemiczne	22
4.2.2. Analizy mikrobiologiczne.....	22
4.2.3. Analiza statystyczna	31
5. Wyniki badań	32
5.1. Analiza fizyko-chemiczna wód rzeki Łyny.....	32
5.2. Badania mikrobiologiczne wód rzeki Łyny metodami klasycznymi.....	36
5.2.1. Analiza ilościowa i jakościowa mikroorganizmów wskaźnikowych i stanu sanitarnego oraz wankomycyno opornych enterokoków w wodzie Łyny	36
5.2.2. Analiza jakościowa i liczebności mikroorganizmów wskaźnikowych i stanu sanitarnego oraz wankomycyno-opornych enterokoków w ściekach komunalnych.....	41
5.3. Badanie mikrobiologiczne wód rzeki Łyny metodami molekularnymi	44
5.3.1. Ogólna liczba bakterii (OLB) oraz analiza jakościowa i liczebności bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> na obszarach o różnym użytkowaniu zlewni.....	44
5.3.2. Przeżywalność <i>in situ</i> ogólnej liczby bakterii (OLB) w wodzie rzeki Łyny oznaczana metodą LIVE/DEAD BacLight™.....	50
5.4. Analiza statystyczna	51
5.4.1. Analiza statystyczna zależności pomiędzy oznaczanymi grupami mikroorganizmów a parametrami fizyko-chemicznymi w wodzie rzeki Łyny.....	57
5.4.2. Analiza zależności pomiędzy oznaczanymi grupami mikroorganizmów a parametrami fizyko-chemicznymi w analizowanych ściekach.....	60
5.5. Identyfikacja ilościowa i jakościowa szczepów enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny.....	60
5.6. Różnorodność gatunkowa i skład procentowy enterokoków w ściekach szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny	62
5.7. Wyznaczanie antybiotykooporności bakterii enterokoków w wodzie rzeki Łyny	66
5.8. Występowanie genów oporności na wankomycynę <i>van</i> wśród enterokoków w wodzie rzeki Łyny przez zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).....	72

5.9. Identyfikacja genów kodujących czynniki wirulencji wśród enterokoków izolowanych z rzeki Łyny	74
5.10. Antybiotykooporność i wirulencja bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> w ściekach.....	77
5.10.1. Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wankomycyny i tejkoplaniny wobec szczepów enterokoków izolowanych ze ścieków.....	83
5.10.2. Wykrywanie genów oporności na wankomycynę (<i>van</i>) wśród oznaczonych ścieków szpitalnych	84
5.10.3. Identyfikacja czynników wirulencji wśród izolowanych enterokoków ze ścieków	85
5.10.4. Określenie przeżywalności ex situ antybiotykoopornego i wirulentnego szczepu <i>Enterococcus faecalis</i> izolowanego z wód rzeki Łyny	88
5.10.5. Analiza podobieństwa występowania oporności fenotypowej i genotypowej oraz wirulencji szczepów enterokoków izolowanych z wody i ścieków.....	90
6. Dyskusja wyników	92
6.1. Charakterystyka jakości mikrobiologicznej wód rzeki Łyny	92
6.2. Liczebność i aktywność metaboliczna ogólnej liczby bakterii (OLB) oraz bioróżnorodność bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> w wodzie rzeki Łyny płynącej przez analizowane obszary	97
6.3. Charakterystyka lekoopornych i wirulentnych enterokoków izolowanych z rzeki Łyny i odprowadzanych ścieków.....	100
7. Podsumowanie i wnioski.....	108
8. Literatura.....	113
9. Źródła internetowe:	128
10. Spis tabel.....	129
11. Spis rysunków	131
STRESZCZENIE	134
MONOGRAFIE KOMITETU INŻYNIERII ŚRODOWISKA POLSKIEJ AKADEMII NAUK ..	136

1. Wprowadzenie

Rzeki to dynamiczne ekosystemy meandrujące duże obszary w środowisku o zróżnicowanym charakterze użytkowania. Podlegają one wpływowi wielu czynników środowiskowych i antropogenicznych, a jednocześnie są ważnym źródłem wody wykorzystywanej do celów gospodarczych i rekreacyjnych. Potencjalnym źródłem zanieczyszczeń tych lotycznych ekosystemów są spływy powierzchniowe z terenów użytkowanych rolniczo oraz wody i ścieki z obszarów zurbanizowanych (Bojarczuk i in. 2018, Glińska-Lewczuk i in. 2016, Gotkowska-Płachta i in. 2016, Kacar 2011). Wraz ze zrzutem zanieczyszczeń do wód dostają się różne patogenne mikroorganizmy pochodzenia kałowego, w tym antybio-tykooporne bakterie (ARB z ang. - antibiotic resistant bacteria) i geny oporności na antybiotyki (ARGs z ang. - antibiotic resistance genes) (Korzeniewska i Harnisz 2018, Lekunberri i in. 2017, Niestępski i in. 2019, Osińska i in. 2017, Ziemińska-Buczyńska i in. 2015).

Rzeki płynąc przez rozległe tereny o różnym stopniu antropopresji transportują te zanieczyszczenia na znaczne odległości i stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego oraz powodują wzrost zagrożenia epidemiologicznego mórz, do których wpływają. Określenie głównych źródeł zanieczyszczeń tych wód i tempa ich rozprzestrzeniania w perspektywie wzrastającej presji człowieka na środowisko jest priorytetowym zadaniem w zakresie działalności lokalnej jak i globalnej. Problematyka bezpieczeństwa i jakości mikrobiologicznej ekosystemów przyrodniczych stanowi od wielu lat główne zadania jakimi zajmuje się: Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA), Komisja Europejska (EC), czy Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), (Noble i in. 2003, Caruso i in. 2004, Kay i in. 2004, Soller i in. 2017). Wśród wielu parametrów fizyko-chemicznych i biologicznych najczulszymi indykatorami jakości wód są mikroorganizmy, które wykazują dużą wrażliwość i dają szybką „odповідź” nawet na minimalnie zmieniające się warunki środowiskowe. Obecnie na całym świecie do monitorowania jakości wody ze względu na aspekt ewentualnego zagrożenia sanitarno-epidemiologicznego używane są tzw. wskaźniki sanitarne FIB (z ang. fecal indicator bacteria), do których należą *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis*. Pośrednio służą one do oceny ryzyka związanego z występowaniem innych bakterii patogennych, a tym samym przenoszenia chorób drogą wodną w wyniku kontaktu ze skażonym środowiskiem (Boehm i Soller 2011, Cabral 2010, Islam i in. 2017, Olapade i Weage 2010, WHO 2006).

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie skierowane jest na możliwość występowania i rozprzestrzeniania się w środowiskach przyrodniczych bakterii zaliczanych do szpitalnych patogenów alarmowych. Drobnoustroje te są lekooporne i szczególnie niebezpieczne ze względu na ograniczenia terapeutyczne przez co zagrażają życiu i stanowią poważny problem epidemiologiczny. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują enterokoki, które przez lata uważano za nieszkodliwe dla ludzi i nieważne z medycznego punktu widzenia. Natomiast w dobie narastającej antybio-tykooporności zarówno w Europie jak i na świecie obserwuje się szybkie rozprzestrzenianie patogennych gatunków tych bakterii zarówno w środowisku szpitalnym jak i poza nim. Szczególnie niebezpieczne pod tym względem są gatunki *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* odporne na wankomycynę i określane jako VRE (z ang. vancomycin resistant enterococci). Szczegółowe raporty na ten temat są przedstawione w biuletynach

Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (NPOA) i w Europejskim Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC, ang. European Centre for Disease Control and Prevention).

Jak dotąd niewiele badań skupia się na określeniu głównych antropogenicznych i środowiskowych źródeł wielolekoopornych i wirulentnych enterokoków (szczególnie VRE) w wodach rzecznych. Przeważnie badania tego typu dotyczą identyfikacji szczepów szpitalnych lub skupiają się na pewnym wyinku środowiska np. są prowadzone w strefie zrzutu ścieków oczyszczonych do odbiorników. Dopiero uwzględnienie w badaniach obszarów praktycznie bez wpływu działalności ludzkiej oraz poddanych antropopresji pozwala szerzej spojrzeć na problem związany z rozprzestrzenianiem się i źródłami zanieczyszczeń bakteriologicznych. Zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych różnych metod zarówno klasycznych jak i molekularnych (fluorescencyjna hybrydyzacji *in situ* (FISH), LIVE/DEAD, łańcuchowa reakcji polimerazy - PCR), gwarantuje rzetelne wyniki w czasie zbliżonym do rzeczywistego i daje możliwość oceny bezpieczeństwa epidemiologicznego wód rzecznych.

2. Przegląd literatury

Zanieczyszczenie wód powierzchniowych to problem, z którym boryka się wiele krajów zarówno w Europie jak i w świecie. Rozwój cywilizacji i związana z nim ekspansywna gospodarka i uprzemysłowienie generują duże ilości zanieczyszczeń, których odbiornikami są przede wszystkim wody powierzchniowe. Szczególnie narażone na wpływ czynników środowiskowych i antropogenicznych są rzeki płynące przez rozległe obszary o różnym sposobie użytkowania zlewni. Potencjalne zagrożenie dla jakości tych wód stanowią spływy z obszarów użytkowanych rolniczo, zrzuty ścieków przemysłowych, bytowych oraz burzowych odprowadzanych z miast i wsi. Zanieczyszczenia te wpływają na stan troficzny, jakość mikrobiologiczną i bezpieczeństwo epidemiologiczne tych ekosystemów (Bojarczuk i in. 2018, Lenart-Boroń i in. 2016, Gotkowska-Płachta i in. 2016, Glińska-Lewczuk i in. 2016, Wilkes i in. 2011). W dobie ograniczonego dostępu do czystych zasobów wody słodkiej rzeki są powszechnie wykorzystywane jako źródło wody pitnej oraz do celów gospodarczych i rekreacyjnych. Szacuje się, że na całym świecie w wyniku korzystania z wody zanieczyszczonej odchodami dochodzi do ponad 120 milionów przypadków chorób żołądkowo-jelitowych i 50 milionów przypadków chorób układu oddechowego (Halliday i Gast 2011, Shuval 2003). Dlatego ochrona i monitoring ekosystemów wodnych w aspekcie bezpieczeństwa sanitarnego jest priorytetowym zadaniem wielu krajów.

W państwach członkowskich Unii Europejskiej nadrzędnym aktem prawnym stanowiącym o ochronie wód w obszarze Unii Europejskiej jest Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 r. nazywana powszechnie Ramową Dyrektywą Wodną (RDW). Główne zadania jakie określa RDW to ochrona, monitoring i racjonalne zarządzanie jakością wód powierzchniowych. Według wytycznych tego aktu prawnego w ocenie jakości wód uwzględnia się różne czynniki fizyko-chemiczne i ekologiczne. Zgodnie z wymogami RDW w biomonitoringu wód powinny być brane pod uwagę organizmy eukariotyczne: fitoplankton, fitobentos, makrofity, zoobentos i ichtiofauna. Identyfikacja tych organizmów nie wskazuje jednak bezpośrednio na zanieczyszczenie kałowe

badanych zbiorników wodnych. Wśród wielu parametrów fizyko-chemicznych i biologicznych najczulszymi indykatorami jakości wód są mikroorganizmy, które wykazują dużą wrażliwość i dają szybką „odповідź” nawet na minimalnie zmieniające się warunki środowiskowe (Tiquia 2010, Ma i in. 2016, Bacelar-Nicolau i in. 2003). Dobrymi wskaźnikami stanu sanitarnego wód są bakterie „kałowe” (*Escherichia coli*, paciorkowce kałowe, *Clostridium perfringens*) określane jako FIB (z ang. fecal indicator bacteria) (Haller i in. 2009, Oliver i in. 2009, Shah i in. 2011). Bakterie te pełniące funkcje bioindykatorów jakości sanitarnej środowiska występują w dużych ilościach w jelitach i fekaljach. Nie oznacza się ich w wodach nie zanieczyszczonych materiałem kałowym, przeżywiają dłużej niż patogeny a ich liczebności są proporcjonalne do poziomu skażenia. Ponadto są one bardziej odporne na środki dezynfekcyjne i nie namnażają się w środowiskach wodnych lub ich namnażanie jest ograniczone. Poza tym drobnoustroje te można wykryć za pomocą prostych i tanich technik laboratoryjnych, z dużą powtarzalnością wyników, w stosunkowo krótkim czasie (Cabral 2010, WHO 2008, Medema i in. 2003, George 2002, Gauthier i Archibald 2001).

Zgodnie z RDW wskaźniki sanitarne powinny być oznaczane jedynie w ocenie jakości stanu sanitarnego kąpielisk, co reguluje dyrektywa 2006/7/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 15 lutego 2006 r. dotycząca zarządzania jakością wody w kąpieliskach i uchylająca dyrektywę 76/160/EWG). Pomimo, iż dostosowanie polskich norm prawnych dotyczących określania stanu środowisk wodnych do wytycznych RDW spowodowało wycofanie się z obowiązku oznaczania systemu wskaźników mikrobiologicznych, drobnoustroje te ze względu na swoją uniwersalność nadal wykorzystywane są w monitoringu jakości sanitarnej różnych zbiorników wodnych (Wilkes i in. 2009, Boehm i Soller 2011, Cabral 2010, Islam i in. 2017, Olapade i Weage 2010, WHO 2006, Lenart-Boroń i in. 2016, Gotkowska-Płachta i in. 2016). Należy podkreślić, że oznaczenie FIB stanowi pierwszy i podstawowy krok do pełnej oceny danego ekosystemu w aspekcie zmian zanieczyszczeń mikrobiologicznych i ich potencjalnych źródeł. Liczebność bakterii wskaźnikowych i patogennych może szybko zmieniać się w środowisku (Boehm i in. 2003). Wynika to z faktu, iż na rozmieszczenie przestrzenne i czasowe tych drobnoustrojów mają wpływ różne czynniki fizyko-chemiczne i biologiczne jak: temperatura wody, pH, promieniowanie słoneczne, zawartość substancji mineralnych, związków organicznych oraz drapieżnictwo i konkurencja (Huachang i in. 2010, Juhna i in. 2007, Wilkes i in. 2011, Zhu i in. 2011). Ponadto odmienne warunki środowiska mogą wywołać u bakterii „stres” na skutek czego zmieniają one swój metabolizm i przechodzą w stan określany jako żywy, ale niehodowlany VBNC (ang. viable but not culturable) (Halliday i Gast 2011). Komórki w tym stanie nie rosną na klasycznych podłożach hodowlanych, lecz są aktywne metabolicznie i zdolne do resuscytacji. Różnią się one od form hodowlanych morfologią, budową błony i ściany komórkowej, odpornością na stres chemiczny i fizyczny oraz ekspresją genów i wirulencją (Olszewska i Łaniewska-Trokenheim 2013a, 2013b, Polissi i in. 2003). Fenotyp VBNC jest pierwotną strategią przetrwania dla bakterii w środowisku przyrodniczym. W komórce następuje spowolnienie metabolizmu, synteza białek i modyfikacja ich składu na korzyść tzw. białek głodowych (ang. *starvation proteins*) i szoku termicznego (tzw. chaperonów), które zwiększają oporność na niekorzystne

warunki środowiska. Stan VBNC jest notowany dla różnych bakterii w tym pochodzenia jelitowego jak *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* i *E. hirae* (Heim i in. 2002, Lleò i in. 2005, Oliver, 2010). Na podstawie badań dotyczących zdolności do życia *E. faecalis* w sztucznych mikrosamosach wody morskiej stwierdzono, że co najmniej 80% komórek pozostaje żywych, ale niehodowlanych (Lleo i in. 2006). W wodach morskich zaobserwowano przechodzenie w stan VBNC enterotoksycznych szczepów *Escherichia coli* po ekspozycji na światło słoneczne, a następnie utrzymywanie się ich w środowisku przy zachowaniu toksyczności (Pommepuy i in. 1996). Wyniki tych badań pokazują, że FIB w dużej liczbie mogą utrzymywać się w stanie uśpienia w środowisku. Brak możliwości wykrycia VBNC (za pomocą standardowych metod hodowlanych) wśród, których mogą się znajdować mikroorganizmy patogenne, może mieć wpływ na błędną ocenę stanu sanitarnego badanego biotopu. Dlatego wciąż trwają poszukiwania i laboratoryjne testy dobrych markerów odzwierciedlających rzeczywisty poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych w środowisku (Edge i Boehm 2010, Ludwig i Schleifer 2000, Napier i in. 2017, Haugland i in. 2005, Hou i in. 2006).

Mikroskopowe metody fluorescencyjne stosowane w identyfikacji mikroorganizmów

Stosowane powszechnie metody oznaczeń wykorzystujące techniki hodowlane pozwalają na identyfikację jedynie (0,3% w glebie i <0,1% w wodzie) niewielkiego udziału bakterii żyjących w danym środowisku (Amann i in. 1995, Janssen 2006, Rogers i in. 2007). Ponadto nie uwzględniają bakterii VBNC, co może prowadzić do niedoszacowania i błędnej interpretacji wyników. W ostatnich latach pojawiły się molekularne metody bezpośrednie oparte na analizie materiału genetycznego i nie uzależnione od hodowli mikroorganizmów. Pozwalają one w czasie rzeczywistym z dużą precyzją i dokładnością na ocenę składu i rozmieszczenia przestrzennego biocenozy drobnoustrojów w środowisku (Lew i in. 2010, Olszewska i Łaniewska-Trokenheim 2013a, Raszka i in. 2009). Jedną z takich metod jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) z użyciem specyficznych sond oligonukleotydowych. Są to krótkie sekwencje DNA (16-20 nukleotydów) znakowane barwnikiem fluorescencyjnym. Sondy te są komplementarne do sekwencji 16S rRNA występujących w komórkach bakteryjnych, dzięki czemu łączą się z ich materiałem genetycznym. Ponieważ sondy zawierają znaczniki fluorescencyjne, połączenie materiału zawartego w próbce z komplementarną sondą można obserwować w mikroskopie epifluorescencyjnym. Analiza ilościowa polega na obróbce zdjęć mikroskopowych badanego materiału z użyciem zaawansowanego oprogramowania do wizualizacji obrazu. Technika ta otwiera szerokie możliwości, dzięki którym można ocenić rzeczywisty skład ilościowy i jakościowy badanej populacji oraz jej biomasa i strukturę (Amann i in. 1990, Skowrońska i Zmysłowska 2006). Ponadto metoda FISH może wskazywać na stan metaboliczny oznaczanych mikroorganizmów ponieważ miejscem docelowym hybrydyzacji są głównie nieuszkodzone struktury rybosomów, znajdujące się w dużej liczbie jedynie w żywych i aktywnych komórkach (Bouvier i Del Giorgio 2003, Christensen i in. 1999, Gruden i in. 2003, Lew i in. 2010, Lew i Świątecki 2007). Techniki z wykorzystaniem FISH są z powodzeniem stosowane do oznaczania mikrobioty gleb (Barra Caracciolo i in. 2005, Bertaux i in. 2007, Schmidt

i Eickhorst 2013), osadów (Bruns i Berthe-Corti 1998, Pernthaler i in. 2001) czy zbiorników słodkowodnych oraz morskich (Gotkowska-Płachta i in. 2016, Glöckner i in. 1996, Olapade i Weage 2010, Pernthaler i in. 2001). Uwzględnia się je również w badaniach klinicznych związanych z identyfikacją drobnoustrojów chorobotwórczych (Frickmann i in. 2017, Waar i in. 2005, Wellinghausen i in. 2007). Mikroskopowe techniki fluorescencyjne umożliwiające oznaczenie żywych i aktywnych metabolicznie komórek mają szczególne znaczenie w przypadku oceny jakości środowiska, w aspekcie zagrożenia sanitarno-epidemiologicznego. Jedną z metod na podstawie, której można wnioskować o aktywności metabolicznej oznaczanych drobnoustrojów jest test diagnostyczny LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, LiveTechnology, Producent ThermoFisher Scientific). Polega on na fluorochromowym różnicowym barwieniu w próbce żywych i martwych komórek bakterii. Zestaw składa się z dwóch komponentów fluorescencyjnych barwnika (SYTO®9) i jodku propidyny (IP). Żywe komórki bakterii ze zintegrowaną, sprawną błoną komórkową (MEM+) barwione są na kolor zielony za pomocą fluorochromu (SYTO®9) o małej masie cząsteczkowej, który przenika do ich wnętrza. Bakterie z uszkodzoną, niesprawną błoną komórkową (MEM-) tzw. martwe barwione są na czerwono przy pomocy (IP) o dużej masie cząsteczkowej, który wnika tylko do komórek z uszkodzeniami w błonach. Dzięki zastosowaniu tej metody można oszacować stosunek komórek żywych do martwych w badanej próbce. Zastosowanie LIVE/DEAD® BacLight™ pozwala również oszacować liczbę komórek VBNC, co jest niezwykle istotne przy określaniu realnego poziomu zanieczyszczeń mikrobiologicznych w środowisku.

Występowanie i charakterystyka lekoopornych i wirulentnych enterokoków w środowisku

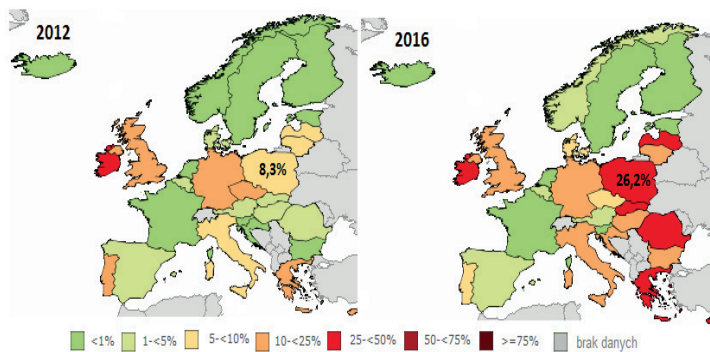
Obecnie nowym nasilającym się problemem na całym świecie jest rozprzestrzenianie się lekoopornych bakterii w środowisku przyrodniczym. Przyczyną tego zjawiska jest nadmierne i powszechne stosowanie antybiotyków w celach terapeutycznych, a także jako promotorów wzrostu u zwierząt (Talaga-Ćwiertnia i Bulanda 2018a b, Landers i in. 2012, Webb i in. 2017, WHO 2017). Konsekwencją nieracjonalnego stosowania środków przeciwdrobnoustrojowych jest selekcja lekoopornych, oportunistycznych i patogennych szczepów w środowisku zarówno szpitalnym jak i przyrodniczym. Problemy związane z ekspansją tych drobnoustrojów dotyczą wielu różnych aspektów życia. Według szacunków OECD (z ang. Organization for Economic Cooperation and Development) wzrastająca oporność na antybiotyki, może spowodować ponad 700 000 zgonów na całym świecie. Liczba ta, przy braku nadzoru nad rozprzestrzenianiem bakterii wielolekoopornych, do 2050 r. może przekroczyć 10 milionów (O'Neill 2014 i 2016). Oporność na antybiotyki generuje również wysokie straty finansowe. W OECD skupiającej 36 wysokorozwiniętych krajów (w tym Polskę) szacuje się, że mogą one osiągnąć od 0,03% (w 2020 r.) do 0,16% (w 2050 r.) produktu krajowego brutto (PKB) (Cecchini i in. 2015). W aspekcie ochrony środowiska i zdrowia publicznego przedostawanie się do ekosystemów wodnych opornych na antybiotyki bakterii ze źródeł antropogenicznych stanowi potencjalne zagrożenie propagacją genów oporności i przenoszenia ich na inne mikroorganizmy, w tym również saprofityczne. Stwarza to ryzyko

powstania zupełnie nowych, opornych szczepów trudnych do zdiagnozowania (Carlet i in. 2012, Giebułtowicz i in. 2018, Tacconelli 2009, Wellington i in. 2013). Szczególnie interesującą grupą pod tym względem są enterokoki, które szybko ewoluują i rozprzestrzeniają się w środowiskach. Są to Gram-dodatnie, nieprzetrwalnikujące, organizmy znane też jako bakterie kwasu mlekowego. Głównie jako komensale występują w dużych ilościach w przewodach pokarmowych ludzi i zwierząt nie powodując żadnych infekcji (De Graef i in. 2003, de Vaux i in. 1998, Koort i in. 2004, Law-Brown i Meyers 2003, Švec i in. 2005). W związku z tym na całym świecie wykorzystywane są jako bakterie wskaźnikowe zanieczyszczenia kałowego (FIB) (Boehm i Soller 2011, USEPA 1986, 2004, Wade i in. 2003, Wade i in. 2006). Różne gatunki enterokoków dosyć powszechnie występują również w żywności (Fortina i in. 2004, Morandi i in. 2012, Tanasupawat i in. 2008), wodzie (Niemi i in. 2012, Sedláček i in. 2013, Sistek i in. 2012) glebie (Byappanahalli i Fujioka 2004, Goto i Yan 2011) i na roślinach (Rahkila i in. 2011, Sukontasing i in. 2007, Švec i in. 2011). Niektóre enterokoki wykorzystywane są w przemyśle spożywczym i weterynaryjnym jako probiotyki i kultury starterowe (Boehm i Sassoubre 2014, Galli i in. 1992, Layton i in. 2010, Franz i in. 2011).

Przez wiele lat uważano, że enterokoki są nieszkodliwe dla ludzi i nieważne z medycznego punktu widzenia. Niestety obecnie drobnoustroje te pokazują swoje „drugie oblicze”. W dobie narastającej lekooporności zaliczane są do najczęstszych szpitalnych patogenów alarmowych zarówno w Europie jak i na świecie (Talaga-Ćwiertnia i Bulanda 2018a b, O’Driscoll i Crank 2015, Żabicka 2018). Raporty na ten temat są szczegółowo przedstawione w biuletynach Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (NPOA) i w Europejskim Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC, ang. European Centre for Disease Control and Prevention). Największą uwagę zwraca się na dwa najważniejsze pod względem epidemiologicznym gatunki *E. faecalis* i *E. faecium*. Mniejsze znaczenie w zakażeniach szpitalnych mają *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* i *E. raffinosus* (Guzman i in. 2016, Jackson i in. 2004). Od połowy lat dziewięćdziesiątych bakterie *E. faecalis* stanowiły 90-95% izolatów klinicznych, a zakażenie *E. faecium* było rzadkie (5-15%) (Huycke i in. 1998). Od tamtej pory odsetek izolatów *E. faecium* systematycznie rośnie, głównie ze względu na rozprzestrzenianie się antybiotykoodporności. Gatunek ten jest obecnie zaliczany do najgroźniejszych patogenów wielolekoopornych, określanych akronimem ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), grupy bakterii odpowiedzialnych za zakażenia związane z opieką medyczną (Boucher 2009, Talaga-Ćwiertnia i Bulanda 2018 a, b). Do najczęstszych zakażeń wywoływanych przez enterokoki należą infekcje dróg moczowych, zapalenie wsierdza, zakażenia noworodków, infekcje ośrodkowego układu nerwowego, infekcje brzucha i miednicy oraz ogólne zakażenia pooperacyjne (Moellering 1992, Morrison i in. 1997, Murray 1990). Szczególnie istotna jest wewnętrzna oporność niektórych gatunków tych bakterii na aminoglikozydy i cefalosporyny, naturalna oporność na niskie stężenia antybiotyków glikopeptydowych (fenotyp oporności *vanC* u *E. gallinarum* i *E. casseliflavus/flavescens*) lub nabyta oporność na wiele innych antybiotyków

a zwłaszcza na wankomycynę (VRE – z ang. vancomycin resistant enterococci) (Talaga-Ćwiertnia i Bulanda 2018 a, b, Tendolkar i in. 2003).

Do tej pory określono osiem fenotypów oporności na glikopeptydy (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL i VanM) w zależności od poziomu oporności na wankomycynę i tejkoplaninę. Najczęściej występujące fenotypy vanA i van B opisano głównie u *E. faecalis* i *E. faecium*, natomiast fenotyp vanC u *E. casseliflavus* i *E. gallinarum* (Murray 1998, Przybylski 2007b). Poza tym enterokoki mogą mieć różne geny, warunkujące ich wirulencję (Kafil i in. 2012, Przybylski 2007a). Najważniejsze czynniki wirulencji u tych bakterii są kodowane przez geny: *cylA* (koduje cytolizynę, mającą zdolność do lizy wielu komórek zarówno prokariotycznych i eukariotycznych), *hyl* (koduje hialuronidazę, która odgrywa rolę w zwiększaniu inwazyjności bakterii), *ace* (koduje białko wiążące kolagen i biorące udział w połączeniu bakterii z białkiem gospodarza), *efaA* (kodujący białko związane z zapaleniem wsierdza), *gelE* (koduje metaloendopeptydazę cynku, która ma zdolność do hydrolizy żelatyny, kazeiny i hemoglobiny), *as* (koduje substancję agregującą (AS), czyli białko pośredniczące w wiązaniu z nabłonkiem gospodarza), *esp* (koduje białko powierzchniowe enterokoków (ESP), które bierze udział w tworzeniu biofilmu i jest związane z kolonizacją i utrzymywaniem w układzie moczowym) oraz *cob*, *cpd* i *ccf* (kodują feromony płciowe biorące udział w przenoszeniu genów oporności na antybiotyki) (Comerlato i in. 2013, Prażmo i in. 2016, Przybylski 2007a). Rozprzestrzenianie się zjadliwych i lekoopornych enterokoków w środowisku jest alarmujące. W Polsce w roku 2012 liczba izolatów *E. faecalis* VRE wynosiła 8,3%, a w 2016 roku już 26,2% (Rys.1).



Rys.1. *Enterococcus faecium*: odsetek izolatów z zakażeń inwazyjnych opornych na wankomycynę w krajach Unii Europejskiej (UE) i Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EOG) w latach 2012 i 2016 (opracowanie własne na podst. interaktywnej bazy danych ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases (<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/>))

W przeciągu pięciu lat stwierdzono ponad trzykrotny wzrost liczebności tych drobnoustrojów. Liczba izolatów opornych na wankomycynę rośnie w całej Europie, niestety nasz kraj pod tym względem jest w czołówce z dwukrotnie wyższym odsetkiem szczepów VRE niż średnia dla krajów EU/EOG (europejski obszar gospodarczy) wynoszącym 14,9%. Coraz częściej podkreślana jest też możliwość występowania i rozprzestrzeniania się wielolekoopornych i wirulentnych enterokoków w różnych

środowiskach przyrodniczych (Ferguson i in. 2016, Lata i in. 2016, Sadowy i Łuczkiwicz 2014, Servais i in. 2007, Talaga-Ćwiertnia i Bulanda 2018 a, b). Pojawienie się szczepów patogennych tych drobnoustrojów poza placówkami medycznymi możliwe jest ze względu na wyjątkowo plastyczny genom tych bakterii. Enterokoki poprzez łatwą wymianę genów umiejscowionych na mobilnych elementach genetycznych (m. in. transpozony, plazmidy) łatwo nabywają, kumulują ale też przekazują innym bakteriom oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. Mechanizmy i źródła rozprzestrzeniania się tych drobnoustrojów nie są do końca wyjaśnione. Za główną przyczynę występowania wielolekoopornych enterokoków i innych ARB w środowisku uważa się stosowanie antybiotyków jako dodatków paszowych. Szczególnie istotne dla ekspansji szczepów VRE było stosowanie awoparcyny w produkcji zwierzęcej. We wszystkich ośmiu krajach Unii Europejskiej (Belgia, Dania, Finlandia, Francja, Niemcy, Wielka Brytania, Holandia i Norwegia), gdzie stosowano ten antybiotyk jako dodatek paszowy, izolowano szczepy enterokoków opornych na wankomycynę od zwierząt gospodarskich (Przybylski 2007b). UE zakazała stosowania awoparcyny jako dodatku do pasz w 1997 r., a pozostałych antybiotyków w 1999 r. Pomimo tego liczba szczepów VRE izolowanych na całym świecie nadal rośnie (Kühn i in. 2005). Paradoksem jest to, że szczepy te rozprzestrzeniają się w różnych środowiskach (woda, zwierzęta, żywność, ludzie, szpitale) w krajach gdzie stosowano awoparcynę jedynie przez rok w 1975 (Szwecja) lub nie stosowano jej nigdy (Stany Zjednoczone) (Przybylski 2007a, Nilsson 2012). Szczepy wielolekooporne w tym VRE mogą się rozprzestrzeniać w wyniku kontaktu z zarażonymi zwierzętami podczas prac gospodarskich, za pośrednictwem żywności pochodzenia zwierzęcego, czy spływów z obszarów rolniczych nawożonych obornikiem lub gnojowicą (Bartley 2001, Nowakiewicz i in. 2014, Talebi i in. 2015, Torres i in. 2018). Istnieją również doniesienia o izolacji opornych na wankomycynę bakterii wśród dzikich zwierząt leśnych (Lozano i in. 2016, Mallon i in. 2002, Nowakiewicz i in. 2014). Duża pula szczepów VRE i innych antybioopornych bakterii (ARB z ang. - antibiotic resistant bacteria) i genów oporności na antybiotyki (ARGs z ang. - antibiotic resistance genes) występuje w ściekach szpitalnych, komunalnych czy odzwierzęcych. Wraz ze zrzutem tego typu zanieczyszczeń lekooporne bakterie przedostają się głównie do płynących wód powierzchniowych. (Iweriebor i in. 2015, Korzeniewska i Harnisz 2018, Lekunberri i in. 2017, Łuczkiwicz i in. 2011, Niestępski i in. 2019, Osińska i in. 2017, Ziemińska-Buczyńska 2015, Varela i in. 2013). Mikrobiologiczne zanieczyszczenia przemieszczają się wzdłuż kontinuum rzecznoego, gdzie może zachodzić transfer genów oporności do zasiedlających te środowisko bakterii natywnych. Wody wówczas stają się potencjalnym rezerwuarem ARB i ARGs, które stanowią poważne zagrożenie sanitarno-epidemiologiczne dla użytkowników korzystających z dobrodziejstwa tych ekosystemów. Warto również spojrzeć na zagadnienie nie tylko z własnej antropocentrycznej perspektywy ale ze świadomością, że każde naruszenie homeostazy środowiska przyrodniczego powoduje jego nieodwracalne zmiany. Rozpoznanie głównych źródeł zanieczyszczeń mikrobiologicznych i fizyko-chemicznych w ekosystemach lotycznych powinno więc być priorytetowym działaniem, które pozwoli na podjęcie odpowiednich kroków prewencyjnych w celu ochrony tych środowisk.

3. Cel i zakres badań

Głównym celem naukowym niniejszej pracy było określenie wpływu źródeł środowiskowych i antropogenicznych na mikrobiologiczną jakość wód rzeki Łyny, ze szczególnym uwzględnieniem występowania antybiotykoopornych i wirulentnych enterokoków.

W ramach pracy postawiono następujące hipotezy badawcze, których wyjaśnienie stało się celem przeprowadzonych badań:

- 1) sposób użytkowania zlewni wpływa na kształtowanie ilościowe i jakościowe populacji drobnoustrojów w wodzie rzeki płynącej przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane,
- 2) wybrane wskaźniki mikrobiologiczne są czułym bioindykatorem zanieczyszczeń wód rzeki Łyny płynącej przez obszary o różnym sposobie użytkowania zlewni,
- 3) ścieki szpitalne, nieoczyszczone i oczyszczone są głównym źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych, a szczególnie antybiotykoopornych i wirulentnych enterokoków, przedostających się do wód płynących stanowiących ich odbiorniki.

Do zrealizowania głównego celu badań wyznaczono następujące szczegółowe cele badawcze:

- przeprowadzenie długoterminowej ilościowej i jakościowej analizy mikrobiologicznej wód rzeki w zależności od miejsc poboru próbek (z uwzględnieniem potencjalnych źródeł zanieczyszczeń), sezonu badań i wpływu czynników fizyko-chemicznych;
- zastosowanie wskaźników sanitarnych do porównania mikrobiologicznej jakości wód płynących przez tereny leśne, rolne i zurbanizowane;
- identyfikację i oznaczenie składu gatunkowego enterokoków oraz analizę ich profili antybiotykooporności i czynników wirulencji w wodach rzeki Łyny, a także w odprowadzanych do niej miejskich ściekach komunalnych;
- określenie ładunku zanieczyszczeń mikrobiologicznych wnoszonych do rzeki wraz z oczyszczonymi ściekami i porównanie rodzaju ścieków w aspekcie ich zanieczyszczeń bakteriologicznych;
- określenie przeżywalności: *in situ* ogólnej liczby bakterii w wodzie rzeki Łyny w różnych sezonach badawczych oraz *ex situ* lekoopornego i wirulentnego *Entererococcus faecalis* w różnych warunkach temperaturowych i troficznych.

4. Teren i metodyka badań

4.1. Charakterystyka terenu badań

Badania mikrobiologiczne prowadzono w latach od 2009 do 2010. Do badań wytypowano ścieki szpitalne i komunalne wytwarzane na terenie miasta Olsztyna i odprowadzane do rzeki Łyny, natomiast w latach 2011-12 i 2015 badania rozszerzono włączając system rzeki Łyny od jej źródeł do granicy z Rosją. W badaniach założono, że pula i rodzaj zanieczyszczeń mikrobiologicznych zależy od czynników środowiskowych i antropogenicznych. Charakter rzeki Łyny i sposób zagospodarowania jej zlewni, gdzie można wyróżnić objęte ochroną obszary leśne oraz tereny użytkowane rolniczo i zurbanizowane, pozwolił na przeprowadzenie wszechstronnej oceny tego ekosystemu w odniesieniu do zanieczyszczeń bakteriologicznych a tym samym określić ich dominujące źródła.

Rzeka Łyna

Łyna płynie przez obszar północno-wschodniej Polski jako najdłuższa rzeka regionu Warmii i Mazur (Rys. 2). Jej całkowita długość wynosi 263,7 km, powierzchnia dorzecza zajmuje obszar 7126 km², głębokość wynosi 1,5-2,5m, szerokość natomiast od 5 do kilkunastu metrów w górnym biegu. Łyna jest dopływem rzeki Pregoly, która wpada do Zalewu Wiślanego w Obwodzie Kaliningradzkim w Rosji. W granicach kraju znajduje się około 200 km długości i 5700 km² powierzchni zlewni. Jest to typowa rzeka pojezierna, która płynie leniwie, ale też silnie meandruje i posiada strefy przełomu, gdzie przypomina górski strumień. Dno rzeki jest przeważnie piaszczyste lub ilaste, żwirowe, rzadko gliniaste. Źródła rzeki znajdują się na wysokości 153 m n.p.m. na terenie pokrytego lasem mieszanym krajobrazowo-geomorfologicznego rezerwatu przyrody „Źródła Rzeki Łyny”. Rezerwat powstał w celu zachowania obszaru źródłiskowego Łyny i bardzo rzadkiego zjawiska na niżu tak zwanej erozji wstecznej. W górnym biegu rzeka charakteryzuje się wybitnymi walorami przyrodniczymi, gdzie działalność człowieka jest ograniczona. Płynie przez rezerwat przyrody Las Warmiński o powierzchni 1656 ha, który wchodzi w skład dwóch obszarów Natura 2000. Są to obszary specjalnej ochrony ptaków i siedlisk (Puszcza i Ostoja Napiwodzko-Ramucka). Występują tu ciekawe gatunki zwierząt (wydra europejska, łasica, borsuk, jeleń europejski, wilk, bielik, rybołów, kania czarna i in.) oraz różne, podlegające ochronie rośliny. Na ponad trzech czwartych swej długości Łyna przepływa przez obszar Pojezierza Olsztyńskiego, gdzie przecina szereg jezior rynnowych. Ponadto znajduje się ona w obszarze Chronionego Krajobrazu "Dolina Środkowej Łyny". W dolnym biegu Łyna przepływa w kierunku granicy państwa przez teren Równiny Sępopolskiej włączonej w obszar Natura 2000 „Ostoja Warmińska”. Przeciętny przepływ roczny rzeki szacuje się na około 14,45 m³s⁻¹. Wiosną na skutek opadów i topnienia śniegu przepływy są największe (62,8 m³s⁻¹), latem przy niskiej wodzie znacznie niższe (13,3 m³s⁻¹). W okresie prowadzonych badań (zima 2011 - jesień 2012) w Sępopolu przy granicy Polski i Rosji zarejestrowany przepływ był prawie dwukrotnie wyższy od średniego i wynosił 23,4 m³s⁻¹. Wpływ na taki stan wód mogły mieć opady, które według Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej w Polsce (IMGW) w

2012 roku przekraczały wieloletnią średnią (Glińska-Lewczuk i Burandt 2011, Kalinowski i in. 2012, Glińska -Lewczuk i in. 2016). Stan wód rzeki Łyny pod względem ekologicznym i chemicznym określany był przeważnie jako umiarkowany lub zły. Często też nie były spełnione wymogi dla obszarów chronionych, o czym raportuje WIOŚ w Olsztynie (za lata 2012-2015). Na jakość wód Łyny wpływa wiele zanieczyszczeń środowiskowych i antropogenicznych, których źródła zlokalizowane są w zlewni rzeki. Łyna przepływa przez obszary zalesione, użytkowane rolniczo i zurbanizowane. W południowej i środkowej części zlewni Łyny dominują lasy, które zajmują 68% jej obszaru, natomiast w północnej przeważają grunty orne. Tereny rolnicze łącznie z łąkami i pastwiskami stanowią 53% powierzchni całej zlewni rzeki (Kalinowski 2011). Ponadto rzeka płynie przez tereny zurbanizowane (liczne wsie i 5 miast) w tym stolicę województwa warmińsko-mazurskiego Olsztyn o liczbie mieszkańców wynoszącej 175 tysięcy. Całkowita powierzchnia miejska obejmuje 122,74 km², co stanowi 2,15% jej zlewni. Z terenów miejskich do rzeki odprowadzane są ścieki po mechaniczno-biologicznym oczyszczeniu z oczyszczalni w Olsztynie, Bartoszycach, Lidzbarku Warmińskim, Dobrym Mieście, Stawigudzie i Sępopolu (Informacja o korzystaniu ze środowiska za 2011 r., Raport o stanie środowiska województwa warmińsko-mazurskiego w 2012 i 2015 r.). Oczyszczone ścieki charakteryzują się wysokim stopniem usunięcia zanieczyszczeń mikrobiologicznych (97 - 99%) pomimo tego mogą stanowić zagrożenie sanitarno-epidemiologiczne dla wód Łyny. Rozpoznanie największych źródeł zanieczyszczeń i możliwości ich rozprzestrzeniania wzdłuż biegu rzeki jest szczególnie ważne ze względu na fakt, że pełni ona istotne funkcje gospodarcze, turystyczne i ekologiczne dla całego regionu Warmii i Mazur.

Miejska oczyszczalnia ścieków „Łyna” w Olsztynie

W celu określenia, jaki wpływ, na jakość mikrobiologiczną wód rzeki Łyny mają punktowe zrzuty zanieczyszczeń prowadzono badania ścieków oczyszczanych w miejskiej oczyszczalni „Łyna” w Olsztynie. Miejska mechaniczno-biologiczna oczyszczalnia zlokalizowana jest w północnej części miasta przy ulicy Leśnej (N53°81'45.91", E20°45'33.35") w bezpośrednim sąsiedztwie rzeki Łyny. Obiekt zajmuje powierzchnię wynoszącą 22 ha i jest oddalony 4 km od centrum miasta. Doprowadzane ścieki oczyszczane są za pomocą metod mechaniczno-biologicznych z wykorzystaniem osadu czynnego i wspomaganie chemicznego PIX. Proces mechaniczny stanowi oczyszczanie wstępne (cedzenie na kratkach, sedimentacja zawiesin mineralnych w piaskownikach i organicznych w osadnikach wstępnych). Podoczyszczone ścieki trafiają do części biologicznej gdzie w procesie nityfikacji, denityfikacji i defosfatacji usuwany jest z nich azot, fosfor i węgiel. Następnie kierowane są do 3 osadników wtórnych w celu oddzielenia osadu. Oczyszczone ścieki odprowadzane są bezpośrednio do rzeki Łyny. Ponad 95% (wg danych US w Olsztynie) ludności miasta korzysta z sieci kanalizacyjnych, pozostałe gospodarstwa domowe posiadają szamba lub przydomowe oczyszczalnie ścieków. Oczyszczalnia może przyjąć maksymalnie 72 tys. m³ ścieków na dobę. Średnio dopływa do niej 32 tys. m³ nieoczyszczonych ścieków na dobę. Poza ściekami z gospodarstw domowych do oczyszczalni dopływają też nieoczyszczone ścieki z trzech szpitali zlokalizowanych na terenie miasta Olsztyn. Ścieki te stanowią przeważnie

mniej niż 2% w całej puli nieoczyszczonych ścieków komunalnych (odpowiednio 54, 328, i 49 m³ dziennie ze szpitali SZ1, SZ2 i SZ3), (Korzeniewska i in. 2013). W badanym okresie ilość ścieków oczyszczonych odprowadzonych do odbiornika wyniosła około 13 500 tys. m³/rok. Ścieki szpitalne niosą ze sobą duży ładunek drobnoustrojów patogennych o wysokim wskaźniku antybiotykooporności i wirulencji, które mimo procesów oczyszczania mogą przedostawać się do wód Łyny. Biorąc to pod uwagę przebadano ścieki szpitalne bezpośrednio w miejscu ich powstawania tj. na odpływie z terenu szpitali.

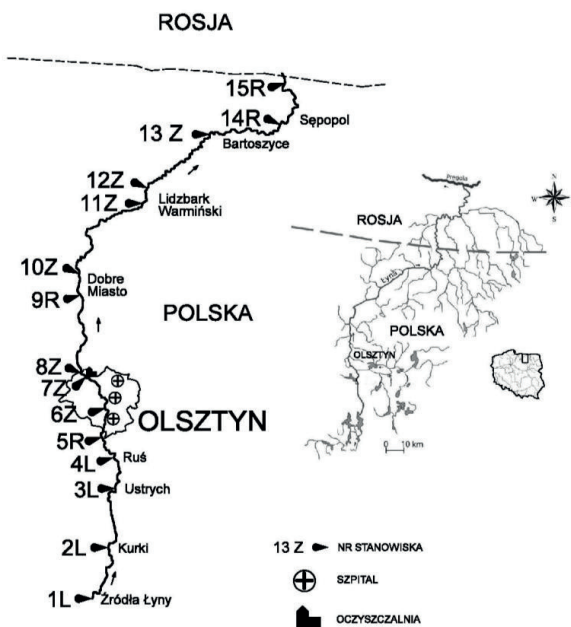
Szpitalne w mieście Olsztyn

Badano nieoczyszczone ścieki szpitalne wytwarzane przez trzy szpitale zlokalizowane na terenie miasta Olsztyn. Szpitale te nie posiadają własnych oczyszczalni ścieków jak też różnią się zakresem i charakterem świadczonych usług medycznych oraz wielkością.

Szpital pierwszy (SZ1) to najstarsza i działająca nieprzerwanie od 150 lat placówka medyczna w stolicy Warmii i Mazur. Szpital ma 14 oddziałów, na których znajduje się 321 łóżek. W skład szpitala wchodzi również 14 poradni specjalistycznych. W ciągu roku w szpitalu jest hospitalizowanych około 18500 pacjentów. Wytwarzane ścieki pochodzą z laboratoriów szpitalnych, jednostek wewnętrznych i oddziałów w tym z chirurgii, kardiologii, urologii, ginekologii, okulistyki, neonatologii dziecięcej, kardiologii, anestezjologii, intensywnej terapii, dermatologii i otolaryngologii. Szpital drugi (SZ2), to największa placówka opieki zdrowotnej w województwie warmińsko-mazurskim, zlokalizowana w centralnej części Olsztyna (53°46'12"N, 20°29'31"E) To wysokospecjalistyczna, wieloprofilowa i konsultacyjna jednostka w rejonie północno - wschodniej Polski. Działalność szpitala polega na świadczeniu różnych specjalistycznych, ambulatoryjnych i stacjonarnych usług zdrowotnych. W szpitalu tym hospitalizowanych jest około 20000 pacjentów rocznie i udzielanych jest ponad 70 000 konsultacji medycznych. Szpital trzeci (SZ3) położony jest na terenie lasu miejskiego. W skład tej jednostki wchodzi 7 oddziałów i 5 poradni. Zajmuje się głównie leczeniem chorób płuc takich jak: astma, zapalenie płuc, sarkoidoza, bezdech senny, nowotwory płuc oraz różne atopowe i śródmiąższowe zapalenia tego organu. Szpital posiada 215 łóżek i leczy około 7900 pacjentów rocznie (Korzeniewska i in. 2013, [www¹](#), [www²](#), [www³](#)).

4.1.1. Lokalizacja i charakterystyka stanowisk badawczych

Badania mikrobiologiczne i chemiczne prowadzono na ponad 190 kilometrowym odcinku rzeki Łyny płynącej przez północno-wschodnie tereny Polski. Próbkę wód pobierano w nurcie rzeki z 15 stanowisk badawczych wyznaczonych wzdłuż jej biegu od źródeł do granicy z Rosją. Schemat rozmieszczenia stanowisk na rzece Łynie przedstawiono na (Rys. 2). Szczegółowa charakterystyka stanowisk została podana w (Tab. 1).



Rys. 2. Schemat lokalizacji stanowisk badawczych na rzece Łynie od źródeł do granicy z Rosją (L – obszary leśne, R – obszary rolne, Z – obszary zurbanizowane)

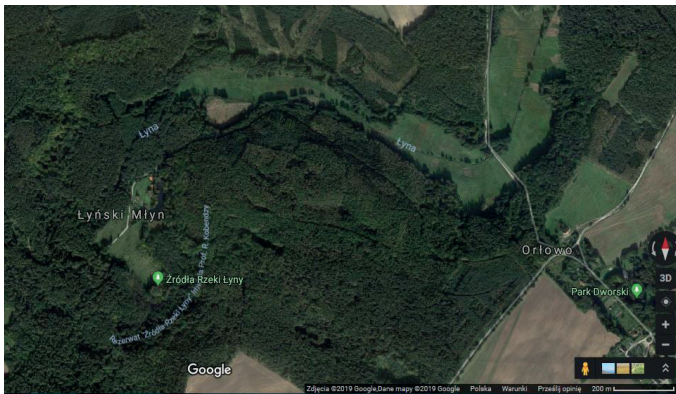
Tab. 1. Charakterystyka stanowisk badawczych wyznaczonych na rzece Łynie

Symbol	Stanowiska	Bieg rzeki (km)	Powierzchnia zlewni (km ²)	Przepływ średni rzeki (m ³ s ⁻¹)	Populacja mieszkańców
1 L	Źródła Łyny	263.1	5.8	0,1	50
2 L	Kurki	252.8	358.6	2,2	100
3 L	Ustrych	238.0	437.4	2,8	50
4 L	Ruś	226.7	474.4	3,2	400
5 R	Posorty	218.7	567.7	3,7	1200
6 Z	Olsztyn centrum	213.5	578.6	4,1	175 000
7 Z	Olsztyn - za oczyszczalnię ścieków (31500 m ³ 24h ⁻¹)*	212.5	1785.1	8,9	
8 Z	Redykajny	212.3	1790.1	–	
9 R	Przed Dobrym Miastem	173.9	2034.9	13,9	450
10 Z	Poniżej Dobrego Miasta (1600 m ³ 24h ⁻¹)*	167.3	2056.8	13,8	16200
11 Z	Lidzbark Warmiński	127.9	2426.1	15,9	600
12 Z	Poniżej Lidzbarka Warmińskiego (4400 m ³ 24h ⁻¹)*	125.3	2449.3	20,5	16600
13 Z	Bartoszyce (3400 m ³ 24h ⁻¹)*	94.3	3169.6	21,6	24719
14 R	Sępólno, (4200 m ³ 24h ⁻¹)	72.1	3606.1	22,8	
15 R	Stopki - łąki, grunty orne	60.9	5314.9	23,4	6689

* Źródło: opracowane na podstawie Gotkowska-Plachta i in. 2016, Glińska-Lewczuk i in. 2016, Raport o stanie środowiska województwa warmińsko-mazurskiego w 2012 i 2015 r. Ilość ścieków oczyszczonych (m³24h⁻¹) odprowadzanych do wód rzeki Łyny

Stanowiska podzielono na trzy grupy zgodnie z dominującym charakterem użytkowania obszaru zlewni, przez który przepływa rzeka:

- a) **obszary zalesione (L)** występują głównie w południowej części zlewni rzeki, pokrywając ponad 50% dorzecza górnej Łyny. Na terenach tych zaznacza się przewaga lasów liściastych i mieszanych, występuje rzadka zabudowa wiejska i nieużytki. Gleba jest przepuszczalna i uboga w składniki pokarmowe oraz próchnicę. Na rzece płynącej przez tereny zalesione wyznaczono cztery stanowiska (1L, 2L, 3L, 4L) zlokalizowane na obszarach rezerwatów „Źródła rzeki Łyny” i „Las Warmiński”.



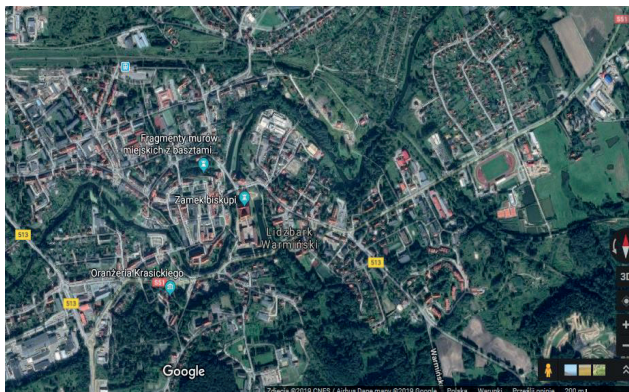
Rys. 3. Rzeka Łyna płynąca przez obszary zalesione (źródło: www.google.pl/maps)

- b) **obszary użytkowane rolniczo (R)** występują głównie w północnej (dolnej) części zlewni rzeki Łyny. Przeważają tu gliny lekkie, piaski, żwiry i ropy, a obszary te są wykorzystywane jako grunty orne, pastwiska, sady i łąki. Na rzece płynącej przez te obszary wyznaczono stanowiska 5R, 9R, 14R, 15R.

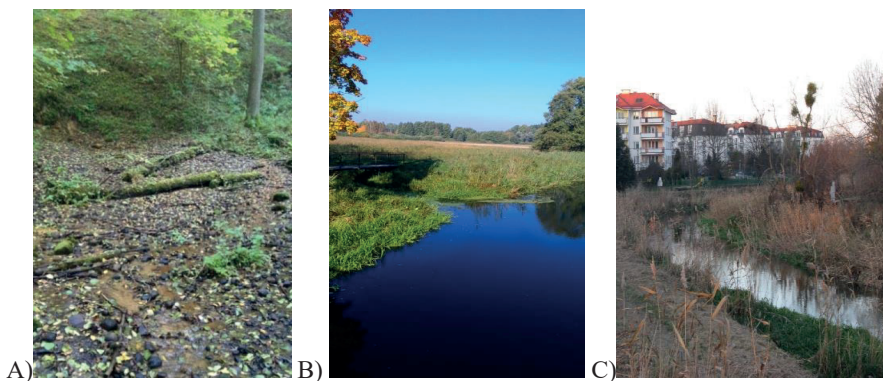


Rys. 4. Rzeka Łyna płynąca przez obszary użytkowane rolniczo (źródło : www.google.pl/maps)

c) **obszary zurbanizowane (Z)** są rozmieszczone nierównomiernie wzdłuż biegu rzeki Łyny i zajmują 11% jej zlewni. Największe miasta na trasie rzeki to: Olsztyn, Dobre Miasto, Lidzbark Warmiński, Bartoszyce i Sępólno. Miasta te zajmują obszar 122,74 km² powierzchni, co stanowi 2,15% zlewni rzeki w obrębie granic Polski. Każde miasto posiada mechaniczno-biologiczną oczyszczalnię, z której oczyszczone ścieki odprowadzane są bezpośrednio do Łyny. Siedem stanowisk badawczych (6Z, 7Z, 8Z, 10Z, 11Z, 12Z, 13Z) wyznaczono w obszarze miast i kilkaset metrów od zrzutu ścieków oczyszczonych do wód rzeki Łyny.



Rys. 5. Rzeka Łyna płynąca przez obszary zurbanizowane (źródło : www.google.pl/maps)

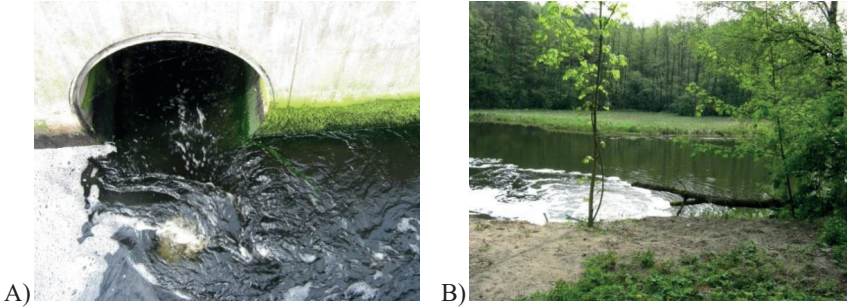


Rys. 6. A) Źródła rzeki Łyny, B) Rzeka Łyna płynąca przez obszary rolne i C) Rzeka Łyna płynąca przez obszary zurbanizowanie (fot. A. Gotkowska-Płachta)

Ponadto w celu określenia, czy powstające na terenie aglomeracji miejskiej ścieki komunalne mogą być emitorem do wód rzeki Łyny antybiotykoopornych i patogennych mikroorganizmów (ze szczególnym uwzględnieniem obecności wankomycynoopornych enterokoków - VRE), badano próbki:

A) ścieków dopływających do miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” w Olsztynie (SN),

- B) ścieków oczyszczonych odprowadzanych z oczyszczalni ścieków w Olsztynie bezpośrednio do wód rzeki Łyny (SO),
C) ścieków nieoczyszczonych z trzech szpitali miejskich zlokalizowanych na terenie miasta Olsztyn (SSZ).



Rys. 7. Ścieki oczyszczone odprowadzane z miejskiej oczyszczalni „Łyna” w Olsztynie do wód rzeki Łyny, A) kolektor odprowadzający ścieki, B) bezpośredni wpływ ścieków do Łyny (Fot. A. Gotkowska-Płachta)

4.1.2. Pobór próbek wody rzeki Łyny i ścieków do badań

Pobór i badania próbek wody rzeki Łyny i ścieków komunalnych prowadzono od 2009 do 2015 roku. Próbkę wody pobierano z 15 stanowisk od zimy 2011 do jesieni 2012 roku dwukrotnie w każdym z 4 sezonów badawczych (zima, wiosna, lato, jesień) oraz kontrolnie jesienią 2015 roku. Woda pobierana była ze środka koryta rzeki zgodnie z wytycznymi zawartymi w Polskich Normach PN-ISO 5667-6:2003, (zastąpiona PN-EN ISO 5667-6:2016-12) i PN-EN ISO 19458:2007.

Próbki ścieków nieoczyszczonych odpływających z trzech szpitali (SSZ) pobierano siedmiokrotnie od wiosny 2009 do wiosny 2010 roku w okresie 12 miesięcy w odstępach 8 -tygodniowych. W całym cyklu prowadzonych badań (2009-2015) równolegle pobierano ścieki nieoczyszczone (SN) i oczyszczone (SO) z oczyszczalni ścieków „Łyna” w Olsztynie, zgodnie z PN-ISO 5667-10:1997. Ścieki komunalne pobierano około 22 godzin po pobraniu ścieków szpitalnych, uwzględniając ich czas przepływu zanim trafią do oczyszczalni ścieków. Próbkę wody i ścieków pobierano do szklanych jałowych naczyń. W przypadku wód rzeki Łyny próbki wody pobierano w nurcie rzeki bezpośrednio z głębokości 0,3 - 0,5 m pod powierzchnią wody. Przewożono je do laboratorium w pojemnikach termoizolacyjnych w temperaturze 4°C. Czas od momentu poboru próbek do wykonania ich analizy nie przekraczał 24h.

Łącznie w całym badanym okresie pobrano 150 próbek wody rzeki Łyny (40 na terenach leśnych, 40 na terenach użytkowanych rolniczo i 70 na terenach zurbanizowanych) oraz 55 próbek ścieków (17 próbek ścieków nieoczyszczonych, 17 próbek ścieków oczyszczonych i 21 próbek ścieków szpitalnych).

4.2. Metodyka badań

4.2.1. Oznaczenia fizykochemiczne

Przeprowadzono następujące oznaczenia właściwości fizykochemicznych wody i ścieków komunalnych (nieoczyszczonych i oczyszczonych): temperatury ($^{\circ}\text{C}$), odczynu (pH), chemicznego zapotrzebowania tlenu (mg ChZT l^{-1}), stężenia rozpuszczonego tlenu w wodzie (DO) ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$), ogólnych substancji rozpuszczonych (mg TDS l^{-1}), azotu amonowego ($\text{mg N}_{\text{NH}_4^+} \text{ l}^{-1}$), azotu azotynowego ($\text{mg N}_{\text{NO}_2^-} \text{ l}^{-1}$), azotu azotanowego, ($\text{mg N}_{\text{NO}_3^-} \text{ l}^{-1}$), fosforu fosforanowego ($\text{mg P}_{\text{PO}_4^{3-}} \text{ l}^{-1}$), fosforu ogólnego (P_{og}), węgla organicznego (mg C l^{-1}): w zawiesinie (POC), całkowitego (TOC) i rozpuszczonego (DOC). Do oznaczenia poszczególnych frakcji węgla wykorzystano technikę mikrofiltracji, przy użyciu filtra membranowego - $0,45 \mu\text{m}$, (Sartorius Stedim Biotech GmbH) w połączeniu z metodą pomiaru węgla organicznego zastosowaną w analizatorze HACH IL 550 TOC-TN, gdzie związki organiczne mineralizowane są do CO_2 w temperaturze 800°C , w obecności czystego tlenu i katalizatora platynowego. Powstały CO_2 oznaczany jest detektorem NDIR. Badanie te wykonano zgodnie z Polską Normą PN-EN 1484-1999P. Oznaczenia prowadzono we współpracy z Katedrą Gospodarki Wodnej, Klimatologii i Kształtowania Środowiska Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa oraz z Katedrą Inżynierii Ochrony Wód Wydziału Nauk o Środowisku. Oznaczenia fizykochemiczne: temperatury, pH, rozpuszczonego tlenu ($\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) mierzono wieloparametrowym aparatem YSI 556 Multiprobe System (MPS) z dokładnością pomiaru: $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,01 \text{ pH}$, $\pm 0,01 \text{ mg O}_2$. Pozostałe oznaczenia przeprowadzono zgodnie z metodyką podaną przez Hermanowicza i in. (1999).

4.2.2. Analizy mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne prowadzone były metodami klasycznymi oraz molekularnymi. W badaniach molekularnych wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną *in situ* FISH, barwienie materiału biologicznego metodą DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol), barwienie fluorescencyjne LIVE/DEAD BacLight™ jak również amplifikację metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Metody klasyczne

W badaniach uwzględniono następujące oznaczenia:

- liczby bakterii heterotroficznych mezofilnych (A_{37}) na podłożu TSA (agar tryptozowo-sojowy TSA, Oxoid), w temp. $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 48 h inkubacji; zgodnie z PN-EN ISO 6222:2004,
- liczby bakterii heterotroficznych psychrofilnych (A_{22}) na podłożu TSA (agar tryptozowo-sojowy TSA, Oxoid), w temp. $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 72 h inkubacji; zgodnie z PN-EN ISO 6222:2004,
- liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (TC) na podłożu CCA (chromocult coliform agar, Merck) w temp. $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ po 24 h inkubacji, zgodnie z PNEN-ISO 9308-1:2004 (zastąpiona przez PN-EN ISO 9308-1:2014-12),
- liczby bakterii z grupy coli typu fekalnego (FC) na podłożu mFC (Merck) w temp. $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ po 24h inkubacji. zgodnie z PN-EN ISO 9308-1:2004 (zastąpiona przez PN-EN ISO 9308-1:2014-12)

- liczby paciorkowców kałowych (enterokoków - E) na podłożu SB (Slanetza i Bartleya, Merck) w temp. $36 \pm 2^\circ\text{C}$ po 48 h inkubacji oraz potwierdzającym podłożu z żółcią eskuliną i azydkiem sodowym (Bile Aesculin Azide Agar, Merck) w temp. $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ po 2h inkubacji, zgodnie z PN-EN ISO 7899-2:2004,
- liczby enterokoków opornych na niskie stężenia wankomycyny (E_{VAN}) na podłożu SB (Slanetza i Bartleya, Merck) z dodatkiem $6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ wankomycyny w $36 \pm 2^\circ\text{C}$ po 48/72 h inkubacji.

Po odpowiednim czasie inkubacji wyrosłe na płytkach (trzy powtórzenia dla każdej próbki) kolonie bakterii zliczano, a wszystkie uzyskane wyniki przeliczano na jednostki tworzące kolonie (jtk) w ml wody lub ścieków. W pracy podano wyniki w tej samej objętości (1ml) w celu ich bardziej łatwego porównania między sobą. Szczegółowe informacje dotyczące składu podłoży i metod pomiarów przedstawiono w pracach Gotkowska-Płachta i in. (2016) i Glińska-Lewczuk i in. (2016).

Metody molekularne

W celu określenia bioróżnorodności gatunkowej enterokoków, oraz ich procentowego udziału w ogólnej liczbie bakterii (OLB), w wodach rzeki Łyny i ściekach komunalnych zastosowano metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) i barwienia przy pomocy 4',6'-diamidino-2-phenyloindolu (DAPI). Pierwszy etap przygotowania i utrwalenia pobranych próbek wody przeprowadzono według protokołu zaproponowanego przez Korzeniewską i Harnisz (2012) oraz Loy i in. (2007). Oznaczenie OLB i liczebności poszczególnych form morfologicznych bakterii w badanych próbkach metodą barwienia DAPI przeprowadzono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Pernthaler i in. (2001) i opisano szczegółowo w pracy Gotkowska-Płachta i in. (2016). W przypadku oznaczenia składu ilościowego i jakościowego enterokoków proces hybrydyzacji przeprowadzono uwzględniając odpowiednie stężenie formamidu, czas oraz temperaturę hybrydyzacji w zależności od rodzaju gatunkowo specyficznych sond dla oznaczanych gatunków. Po wstępnych analizach laboratoryjnych niektóre warunki hybrydyzacji modyfikowano dla uzyskania optymalnych wyników. Użyte sondy oligonukleotydowe wybrane do identyfikacji enterokoków oraz warunki hybrydyzacji podano w Tabeli 2.

Tab. 2. Sondy oligonukleotydowe i warunki hybrydyzacji uwzględnione w badaniach

Sondy	Sekwencja (5'-3')	Nazwa	Czas (h) i % FA ^a	Pozycja	Literatura
Lab158	GGTATTAGCA(C:T)CTGTTTCCA	<i>Lactobacillus</i> / <i>Enterococcus</i>	3/30	16S rRNA	Harmsen i in. (1999)
ENC38i	CTCTACCTCCATCATTCT	<i>Enterococci</i>	3/20	16S rRNA	Frahm i in. (1998)
ENC176	CA GTT CTC TGC GTC TAC CTC	<i>Enterococcus</i> spp ^b .	1,5/30	23S rRNA	Wellinghausen i in. (2007)
ENF191	GAA AGC GCC TTT CAC TCT TAT GC	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,5/30	16S rRNA	Wellinghausen i in. (2007)
ENU140	TTC ACA CAA TCG TAA CAT CCT	<i>Enterococcus faecium</i>	1,5/30	23S rRNA	Wellinghausen i in. (2007)
EGAC183	CAA CTT TCT TCC ATG CGG AAA AT	<i>Enterococcus gallinarum</i> ^c	3/30	16S rRNA	Wellinghausen i in. (2007)
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Domena Eubacteria	1,5/35	16S rRNA	Amann i in. (1990)
NON338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Kontrola negatywna	3/35	16S rRNA	Wallner i in. (1993)

^a Czas hybrydyzacji i stężenie formamidu w buforze do hybrydyzacji (FA), ^b Również *Carnobacterium* spp.

^c Sonda charakterystyczna dla *Enterococcus gallinarum*, *E. flavescens* i *E. casseliflavus* (grupa VanC)

Do oznaczenia składu ilościowego i jakościowego enterokoków metodą FISH pobierano od 10 do 100 ml wody lub ścieków (analizowana objętość uwarunkowana była miejscem poboru próbki i zawartości zawiesiny). Próbki homogenizowano przez 2 x 1,5 min przy 7000 rev/min (Silent Crusher, Heidolph) i utrwalano paraformaldehydem (PFA, pH 7,4) do stężenia roztworu 4% (w końcowej objętości). Utrwalone próbki filtrowano przez poliwęglanowe filtry membranowe (0,2 μm , Millipore). W celu strawienia Gram-dodatniej ściany komórkowej enterokoków wysuszone filtry inkubowano z lizozymem (Sigma–Aldrich) w stężeniu $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ w 30°C przez 15 minut (warunki ustalono eksperymentalnie). Reakcję zatrzymano przez dokładne płukanie filtra sterylną wodą destylowaną (Gescher i in. 2008). Hybrydyzację próbek utrwalonych na filtrach przeprowadzano przy użyciu znakowanych fluorochromami na 5' końcach sond oligonukleotydowych komplementarnych do konserwatywnego fragmentu 16S rRNA lub 23S rRNA typowego dla danego rodzaju bakterii. Wszystkie sondy były znakowane fluorescencyjnie za pomocą barwnika cyjaninowego CY3 (Oligo.pl -Serwis sekwencjonowania i syntezy DNA IBB PAN). Dodatkowo zastosowano sondę EUB338 dla określenia bakterii z domeny Eubacteria (Amann i in. 1990). Jako kontrolę niespecyficznego wiązania sond użyto negatywną sondę nonsensowną NON338 (Amann i in. 1996). Po hybrydyzacji odpłukane filtry suszono i dobarwiano roztworem DAPI ($0,1\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 5 minut, temp. 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), w ciemności). Następnie przygotowywano preparaty mikroskopowe. W tym celu filtry mocowano do szkiełek podstawowych za pomocą oleju immersyjnego Citifluor (Agar Scientific, Essex, UK) oraz Vecta Shield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Skład jakościowy i liczebność enterokoków w przygotowanych preparatach oznaczano na podstawie komputerowej analizy obrazu w mikroskopie epifluorescencyjnym BX51 (Olympus) z obiektywem immersyjnym 100x, lampą UV, filtrami dla DAPI i CY3 oraz kamerą CCD (Olympus). Uzyskany obraz analizowano za pomocą programu komputerowego Cell F (Olympus). Dla każdej z badanych próbek i użytych sond (FISH) obliczono ponad 100 komórek bakterii. W przypadku badania DAPI z jednej próbki zliczano pomiędzy tysiącem a dziesięćmioma tysiącami komórek. Wartości średnie i odchylenia standardowe obliczano z 20 losowo wybranych pól widzenia w każdym odcinku filtra i przeliczano zgodnie z równaniem (1):

$$E = \frac{(N20 \cdot k)}{(V \cdot 20)} \quad (1)$$

gdzie:

- E – liczba oznaczanych bakterii w 1 ml wody lub ścieków;
- N20 – liczba komórek bakterii w 20 polach widzenia obrazu mikroskopowego;
- k – iloraz powierzchni filtracyjnej do powierzchni pola zliczania obrazu mikroskopowego,
- V – objętość przefiltrowanej wody (ml).

Izolacja enterokoków z analizowanych próbek wody i ścieków

Enterokoki w analizowanych próbkach wody i ścieków oznaczano metodą filtracji membranowej na podłożu Slanetza i Bartleya (SB) opracowanym dla paciorkowców kalowych (opis podłoża i warunków hodowli podano w rozdziale 2.5). Użyto również podłoża SB, które wzbogacono wankomycyną w stężeniu 6 mg l⁻¹ dla określenia enterokoków wankomycynoopornych w badanych próbkach wody. W celu uzyskania czystych izolatów do dalszych analiz z każdej badanej próbki wybierano do 10 reprezentatywnych, od jasno do ciemnoczerwonych lub kasztanowych kolonii wyrosłych na tych podłożach i przeszczepiano na agar z wyciągiem mózgowo-sercowym BHI (Brain heart infusion broth, Biocorp). Łącznie w całym okresie badawczym z wody i ścieków do dalszych oznaczeń przeszczepiono 1958 kolonii bakterii. Czyste szczepy wyrosłe w 37°C przez 24-48h wstępnie identyfikowano do rodzaju *Enterococcus* przy pomocy barwienia Grama, testu na katalazę, wzrostu w bulionie z dodatkiem 6,5% NaCl, oraz hydrolizy eskuliny do eskuletyny na podłożu z żółcią eskuliną i azydkiem sodowym (Bile Aesculin Azide Agar, Merck) (Facklam i Collins 1989). Do rodzaju *Enterococcus* zakwalifikowano wstępnie 1333 przebadane szczepy. Izolaty do dalszych analiz przechowywano na podłożu LB Millera (Merck) z 10% glicerolem w temperaturze – 80°C.

Identyfikacja enterokoków na poziomie rodzaju i gatunku

Przynależność szczepów do rodzaju *Enterococcus* określono przez wykrycie genu *tuf*, kodującego czynnik wydłużenia EF-Tu, którego sekwencja jest silnie zakonserwowana ewolucyjnie u tych bakterii oraz przy zastosowaniu starteru zaprojektowanego do wewnętrznego fragmentu (*sodA int*) genu *sodA*, kodującego dysmutazę manganową. Do identyfikacji gatunków wykorzystano amplifikację genów *ddl* kodujących ligazę D-alaninowo-D-alanylową (D-Ala-D-Ala). Startery specyficzne do fragmentu tego genu pozwoliły na identyfikację 2 typowych w zakażeniach ludzi i zwierząt gatunków *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Ponadto określono przynależność szczepów do gatunków: *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*/*E. casseliflavus*. (Tab. 3). Kontrolę reakcji przeprowadzono równoległe z zastosowaniem szczepów referencyjnych *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 19434, *E. casseliflavus* ATCC 49605; *E. gallinarum* ATCC700425, *E. durans* ATCC 6056, *E. hirae* ATCC 8043.

Tab. 3. Sekwencje oligonukleotydów i rozmiary produktów starterów zastosowanych w identyfikacji enterokoków

Nazwa	Gen	Sekwencja (5'-3')	Długość produktu PCR	Literatura
<i>Enterococcus</i>	<i>tuf</i>	Ent1-TACTGACAAACCATTTCATGATG Ent2-AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Ke i in. (1999)
<i>Enterococcus</i>	<i>sodA</i>	Ent1-TCA ACC GGG GAG GGT Ent2-ATT ACT AGC GAT TCC GG	733	Desay i in. (2000)
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i>	Eis1-ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG Eis2-ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	941	Kariyama i in. (2000)
<i>E. faecium</i>	<i>ddl</i>	Eum1-TTGAGGCAGACCAGATTGACG Eum2-TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Cheng i in. (1997)
<i>E. durans</i>	<i>ddl</i>	Edu1-CCTACTGATATTAAGACAGCG Edu2-TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295	Jackson i in. (2004)
<i>E. hirae</i>	<i>ddl</i>	Ehi1-CTTTCTGATATGGATGCTGTC Ehi2-TAAATTCTTCCTTAAATGTTG	187	Jackson i in. (2004)
<i>E. avium</i>	<i>ddl</i>	Eav1-GCTGCGATTGAAAAATATCCG Eav2-AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	368	Jackson i in. (2004)
<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	Egall1-GGTATCAAGGAAACCTC Egall2-CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dutka-Malen i in. (1995)
<i>E. casseliflavus</i>	<i>vanC2/C3</i>	Ecas1-CGGGGAAGATGGCAGTAT Ecas2-CGCAGGGACGGTGATTTT	484	Kariyama i in. (2000)
Kontrola	<i>rrs</i> (16S rRNA)	Rrrs1-GGATTAGATACCCTGGTAGTCC Rrrs2-TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	320	Van de Klundert i Vliegenthart (1993)

Określanie wrażliwości enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny i ścieków komunalnych oraz szpitalnych na antybiotyki i chemioterapeutyki

Wszystkie izolaty enterokoków zostały przetestowane pod względem wrażliwości na 11 antybiotyków i 2 chemioterapeutyki z zastosowaniem metody dyfuzyjno-krążkowej i użyciem krążków bibulowych nasączonych antybiotykami firmy Oxoid (Banningstoke, Hampshire, England). Wybrano antybiotyki należące do 10 różnych grup powszechnie używanych w leczeniu zakażeń lub rolnictwie. Na tej podstawie zakwalifikowano badane szczepy do MDR - wielolekooporność (z ang. multidrug-resistance) i XDR – rozszerzona oporność (ang. extensively drug resistance). Wielolekooporność oznaczanych szczepów definiowano jako niewrażliwość na co najmniej jeden antybiotyk z co najmniej trzech grup leków przeciwbakteryjnych aktywnych wobec danego gatunku. Rozszerzoną oporność określano jako oporność na przynajmniej jeden antybiotyk we wszystkich z wyjątkiem dwóch grup antybiotyków, aktywnych wobec danego gatunku (Żabicka i in. 2012, Magiorakos i in. 2012). Odpowiednie zawartości krążków bibulowych nasączonych środkami przeciwdrobnoustrojowymi z 10 różnych grup były następujące: (1) **Penicyliny**: ampicilina (AMP - 2µg); (2) **Karbapenemy**: imipenem (IPM - 10 µg), (3) **Aminoglikozydy**: gentamycyna (GEN - 30 µg); streptomycyna (S - 300 µg); (4) **Glikopeptydy**: teikoplana (TEC - 30 µg), wankomycyna (VAN - 5 µg); (5) **Streptograminy**: chinupristina/dalfopristina (QD

- 15 µg); (6) **Glicylokliny**: tigecyklina (TGC - 15 µg); (7) **Oksazolidynony**: linezolid (LZD - 10 µg); (8) **Tetracykliny**: doksycyklina (DO - 30 µg); (9) **Fluorochinolony**: ciprofloksacyna (CIP 5 - 5 µg), (10) **Chemioterapeutyki**: nitrofurantoina (NIT - 100 µg), trimetoprim (W5 - 5 µg). Badanie lekowrażliwości izolowanych szczepów przeprowadzono na podłożu Mueller–Hintona (bioMerieux). Płytki Petriego z podłożem zaszczipiano wykalibrowanym (0,5 Mc Farlanda) inokulum czystej i całonocnej hodowli badanego szczepu, następnie nanoszono odpowiednie krążki nasączone antybiotykami za pomocą 6 kanałowego dyspensera (Oxoid). Bakterie inkubowano w 37°C przez 16-18 h, dla wankomycyny przez pełne 24 h. Średnice stref zahamowania były zapisane w milimetrach, a wyniki interpretowane jako wrażliwe lub odporne. Szczep referencyjny *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 zastosowano jako szczep kontrolny. Oceny wrażliwości dokonano zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości EUCAST (2012) i Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2012).

Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC - minimum inhibitory concentration) szczepów enterokoków wobec antybiotyków glikopeptydowych

Oporność na antybiotyki glikopeptydowe szczepów enterokoków określono na podstawie minimalnego stężenia hamującego MIC (od ang. minimum inhibitory concentration) wobec wankomycyny (VAN) i tejkoplaniny (TEC) metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu stałym BHI. Zgodnie z zaleceniami Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD 2009) wyznaczono stężenia antybiotyków charakterystycznych dla najczęściej występujących fenotypów oporności u enterokoków. Agar BHI z dodatkiem wankomycyny (Sigma Aldrich) w podwójnym gradiencie stężeń od 4 do 1024 mg l⁻¹ oraz tejkoplaniny (Sigma Aldrich) w stężeniach od 1 do 256 mg l⁻¹ zaszczipiano świeżą 24h zawiesiną bakterii o gęstości odpowiadającej 0,5 McFarlanda. Posiane płytki Petriego inkubowano w temperaturze 37°C przez 24/48 godzin i oznaczano MIC. Jako kontrolę jakości stosowano szczep referencyjny *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. faecalis* ATCC 51299. Wartości graniczne MIC zdefiniowane jako najniższe stężenie badanego środka przeciwdrobnoustrojowego, które hamuje widoczny wzrost organizmu oparto na kryteriach Europejskiego Komitetu ds. Oznaczenia Lekowrażliwości EUCAST (2012) i Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2012).

Identyfikacja izolatów enterokoków oraz wykrywanie genów oporności na wankomycynę i czynników wirulencji metodą analizy reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR)

Po wstępnych testach biochemicznych do rodzaju *Enterococcus* wstępnie zakwalifikowano 1333 szczepy wyizolowane z wody rzeki Łyny (955) i ścieków (378). Przynależność gatunkową oznaczanych szczepów, obecność genów oporności na wankomycynę i wirulencji przeprowadzono przy użyciu pojedynczych i multipleksowych reakcji PCR. Sekwencje starterów (zsyntetyzowanych w firmie Genomed), wielkość produktu oraz metodykę według, której przeprowadzono poszczególne reakcje podano w (Tab. 3).

Izolacja genomowego DNA enterokoków i ogólne warunki reakcji PCR

Pojedynczą namnożoną 24 h kolonię bakterii zbierano z płytki agarowej (agar BHI) zawieszano w buforze Tris-EDTA, trawiono lizozymem ($0,6 \text{ mg l}^{-1}$) i ogrzewano w 95°C przez 10 minut (termoblok QBD2, Grant). Po odwirowaniu w 5000 obrotów przez 5 minut w 4°C , stężenie i jakość wyizolowanego DNA określano spektrofotometrycznie (Eppendorf BioSpectrometer® kinetic, Eppendorf). Jeśli jakość DNA była niewystarczająca izolowano je ponownie przy użyciu zestawu Genomic Mini AX Bacteria Mini (SPIN) (A&A Biotechnology), zgodnie z dołączonym protokołem. Genomowy DNA wyizolowano w trzech powtórzeniach i przechowywano w temperaturze -20°C do dalszych analiz. Pojedyncze i multipleksowe reakcje łańcuchowej polimerazy (PCR -z ang. Polymerase Chain Reaction) przeprowadzano w całkowitej objętości mieszaniny od 20-50 μl (w zależności od typu reakcji i oznaczanych cech bakterii). Mieszaniny reakcyjne zawierały: polimerazę Run DNA polymerase (polimeraza Taq), 10x bufor reakcyjny (100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM Tris-HCl (pH 8.5), 20 mM MgSO_4 , 1% Triton X-100) (A&A Biotechnology), startery (Genomed, Warszawa), mieszaninę deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Sigma) oraz DNA bakterii i jałową wodę dejonizowaną do PCR. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze (Eppendorf, typ Mastercycler Family). Poszczególne fazy procesu amplifikacji (denaturacja, hybrydyzacja i elongacja) były dostosowane do danego typu reakcji (Tab. 1-3). Rozdział i wizualizację zamplifikowanych produktów reakcji przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydy (1 mg l^{-1}), (zestaw do elektroforezy Sub-Cell®GT Bio-Rad). Jako markera wielkości molekularnych wykorzystano DNA 100-1000bp i 142-3794bp (A&A Biotechnology). Wizualizację prążków DNA wykonano w świetle ultrafioletowym, używając zestawu do archiwizacji żelów (Kucharczyk, typ DGelScan). W celu potwierdzenia tożsamości izolatów enterokoków – losowo wybrane amplikony zostały zsekwencjonowane i zidentyfikowane w programie BLAST dostępnym na stronie internetowej Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Wykrywanie genów oporności na wankomycynę u szczepów z rodzaju *Enterococcus*

W wyizolowanych szczepach zbadano obecność najczęściej występujących genów kodujących oporność na wankomycynę: *vanA*, *vanB*, *vanC1* i *vanC2/C3* przy użyciu multipleksowej reakcji PCR zgodnie z protokołem zaproponowanym przez Kariyama i in. (2000) (Tab. 4).

Tab. 4. Sekwencje oligonukleotydów i starterów zastosowanych w identyfikacji genów oporności na wankomycynę u enterokoków

Nazwa	Primery	Sekwencja (5'-3')	Długość produktu PCR	Literatura
Enterokoki oporne na wankomycynę	<i>vanA</i>	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1,030	Kariyama i in. (2000)
	<i>vanB</i>	GTGACAAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	433	
	<i>vanC1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	
	<i>vanC2/C3</i>	CGGGGAAGATGGCAGTAT CGCAGGGACGGTGATTTT	484	

Określenie czynników wirulencji u szczepów z rodzaju *Enterococcus*

Określono 10 najważniejszych genów czynników zjadliwości występujących u enterokoków: *cytA* – cytolizyna toksyna zwana też hemolizyną; *hyl* - enzym hialuronidaza; *ace* - białko powierzchniowe wiążące kolagen; *EfaA* – adhezyny ściany komórkowej; *gelE* – żelatynaza; *as* - substancja agregująca *esp* - zewnątrzkomórkowe białko powierzchniowe oraz *cpd*, *cob*, *ccf*- feromony płciowe biorące udział w wymianie materiału genetycznego pomiędzy szczepami (Tab. 5).

Tab. 5. Sekwencje oligonukleotydów i starterów zastosowanych w identyfikacji wirulencji enterokoków

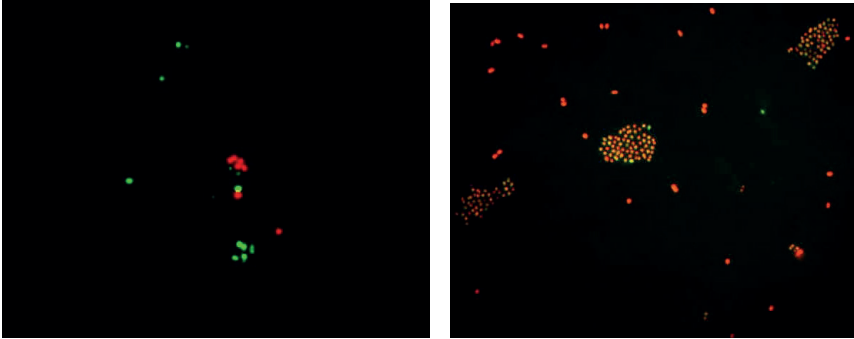
Nazwa	Gen	Sekwencja (5'-3')	Długość produktu PCR	Literatura
Toksyna cytolityczna	<i>cytA</i>	Cyl1-ACTCGGGGATTGATAGGC Cyl2-GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	Vankerckhoven i in. (2004)
Hialuronidaza	<i>hyl</i>	Hyl1-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG Hyl2-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	
Przyczepność (białko wiążące kolagen)	<i>ace</i>	Ace1-AAAGTAGAATTAGATCCACAC Ace2-TCTATCACATTCGGTTGCG	320	Mannu i in. (2003)
Adhezyny ściany komórkowej	<i>efaA</i>	efaA1-CGTGAGAAAGAAATGGAGGA efaA2-CTACTAACACGTCACGAATG	499	
Żelatynaza	<i>gelE</i>	gelE1-AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC gelE2-CTTCATTATTACACGTTTG	402	
Substancja agregująca	<i>as</i> (agg)	AS1-CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC AS2-TAGCTTTTTTTCATTCTGTGTTTGT	406	
Białko powierzchniowe	<i>esp</i>	Esp1-TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC Esp2-CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	913	Shankar i in. (1999)
Feromony	<i>cpd</i>	Cpd1-TGGTGGGTTATTTTCAATTC Cpd2-TACGCTCTGGCTTACTA	782	Eaton i Gasson (2001)
Feromony	<i>cob</i>	Cob1-AACATTCAGCAAACAAGC Cob2-TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1405	
Feromony	<i>ccf</i>	Ccf1-GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG Ccf2-AGCCGCTAAAAATCGGTAAAAAT	543	

Oznaczanie *in situ* ogólnej liczby bakterii żywych i martwych

Oceny aktywności życiowej OLB dokonano z użyciem testu diagnostycznego LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, LiveTechnology, Producent ThermoFisher Scientific). Test polega na fluorochromowym różnicowym barwieniu w próbce żywych i martwych komórek bakterii. Zestaw składa się z dwóch komponentów fluorescencyjnych barwnika SYTO®9 (widmo wzbudzenia/emisji 480/500nm) i jodku propidyny IP (widmo wzbudzenia/emisji 490/635nm). Żywe komórki bakterii ze zintegrowaną, sprawną błoną komórkową (MEM+) barwione są na kolor zielony za pomocą fluorochromu SYTO®9 o małej masie cząsteczkowej, która przenika do ich wnętrza. Bakterie z uszkodzoną, niesprawną błoną komórkową (MEM-) tak zwane martwe barwione są na czerwono przy pomocy IP o dużej masie cząsteczkowej, który wnika tylko do komórek z uszkodzeniami w błonach. Badane próbki wody z wybarwionymi (zgodnie z protokołem dołączonym do testu) komórkami bakterii przesączało przez czarne poliwęglanowe filtry membranowe (0,2 µm, Millipore GTBP). Filtry suszono w ciemności, przyklejano (olejek niefluoryzujący BackLight™ Mounting Oil) do szkiełka podstawowego i analizowano pod mikroskopem epifluorescencyjnym zaopatrzone w odpowiednie filtry charakterystyczne dla widma stosowanych barwników. Komórki zliczano z 20 obrazów mikroskopowych dla każdej badanej próbki, wyniki podano jako log komórek w mililitrze (log kom. ml⁻¹). Uzyskane wyniki badań przeliczono zgodnie ze wzorem podanym w rozdziale 5.1.2 i podano jako procent komórek żywych i martwych w stosunku do ich całkowitej liczby.

Określenie przeżywalności *ex situ* *E. faecalis* w filtrowanej i niefiltrowanej wodzie rzecznej

Badano przeżywalność środowiskowego szczepu *E. faecalis* izolowanego z wód Łyny stosując metodę hodowlaną i barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes). Badany szczep zaszczepiano do filtrowanej i niefiltrowanej wody rzeki Łyny rozlanej do 300 ml jałowych kolb z wodą rzeczna, którą przechowywano w 4 i 10°C. Filtrację wody rzecznej przeprowadzono z wykorzystaniem filtrów membranowych o porach 0,22 µm, następnie wyjałowiono w autoklawie w temp. 120°C przez 15min. Zaszczepianą dawkę (ok 10⁷ komórek ml⁻¹) ustalono na podstawie wskaźnika McFarlanda. Przeprowadzono 11 analiz w tym po 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 35, 56, 133 i 250 dniach. Po odpowiednim czasie inkubacji wykonywano rozcieńczenia badanej próbki i zaszczepiano 1 ml na podłoże SB i inkubowano przez 24-48 h w temperaturze 37°C. Następnie zliczano wyrosłe kolonie i wynik podano jako log jtk·ml⁻¹. Ze względu na mikrobiotę towarzyszącą oznaczenie żywych i martwych komórek *E. faecalis* za pomocą metody LIVE/DEAD (opis metody podano w rozdziale powyżej) przeprowadzono tylko dla próbek wody filtrowanej. Komórki żywe (zielone) i martwe (czerwone) *E. faecalis* (Rys. 8) zliczano z 20 obrazów mikroskopowych dla każdej badanej próbki, a wyniki podano jako log komórek w mililitrze (log kom. ml⁻¹).



Rys. 8. Bakterie *Enterococcus faecalis* żywe (zielone) i martwe (czerwone) oznaczane w filtrowanej wodzie rzecznej za pomocą metody barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes), (mikroskop epifluorescencyjny Olympus BX51, powiększenie x 1000) (Fot. A. Gotkowska-Płachta)

4.2.3. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników badań przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA 12 (StatSoft Polska) i Excel 2016. Podstawowe statystyki dla zmiennych ilościowych dotyczyły określenia średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, minimum i maksimum. Podobieństwo rozkładu danej zmiennej do rozkładu normalnego oceniano testem Shapiro-Wilka, natomiast jednorodność wariancji testem Levene'a. Test t-Studenta wykorzystano do wykazania różnic (lub ich braku) pomiędzy dwiema grupami danych. Dla większej liczby porównywanych grup danych przeprowadzono jednoczynnikową lub wieloczynnikową analizę wariancji (ANOVA) uzupełnioną testem post-hoc Tukeya. W modelu wariancji obszar i stanowisko potraktowano jako efekt stały a sezon jako efekt losowy. Wartości dla których poziom istotności różnic pomiędzy średnimi był $p < 0,05$ uznawano za statystycznie istotny. Związek pomiędzy zmiennymi badano z wykorzystaniem współczynnika korelacji Pearsona (r), przyjmując za istotne statystycznie wartości $p < 0,05$ (oznaczone*), jako wysoce istotne $p < 0,01$ (oznaczone jako **).

Ponadto została przeprowadzona analiza składowych głównych (ang. principal component analysis, PCA) Wyniki analizy podano w tabelach zawierających wartości ładunków czynnikowych oraz na wykresach rozrzutu zmiennych na płaszczyznę czynników. Przeprowadzono także analizę skupień metodą aglomeracji z zastosowaniem miary odległości euklidesowej po wyborze skalowania: $100 \cdot \text{odl. wiązania} / \text{odl. maks.}$ Analiza ta posłużyła do podziału zbioru danych na podzbiory, w których znajdowały się najbardziej podobne do siebie parametry doboru zmiennych do PCA.

5. Wyniki badań

5.1. Analiza fizyko-chemiczna wód rzeki Łyny

Oznaczone wartości parametrów fizyko-chemicznych w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane w latach 2011 - 2015 podano w (Tab. 6 i 7). Średnie wartości pH w wodzie rzeki były zbliżone w całym okresie badań i zmieniały się od 7,20 (obszary zurbanizowane) do 7,75 (obszary zalesione). Przeważnie nieco wyższe średnie wartości pH (na poziomie 7,83) notowano latem na obszarach zalesionych, natomiast mniejsze (pH=7,13) wiosną w wodzie płynącej przez obszary rolne. Oznaczone wartości pH w wodzie Łyny były przeważnie charakterystyczne dla wód I lub II klasy czystości (Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 5 sierpnia 2016).

Średnia temperatura wody rzeki Łyny oscylowała w granicach 14°C. Najniższe temperatury na poziomie około 2°C notowano zimą w próbkach wody ze stanowiska 3L pobieranych z obszarów zalesionych, najwyższe natomiast latem (26,1°C) w wodzie pobieranej ze stanowiska 8Z na terenach zurbanizowanych. Latem badana temperatura wody na większości wyznaczonych stanowisk rosła powyżej wartości 24°C (wartość charakterystyczna dla wód pozaklasowych wg Rozporządzenia Ministra Środowiska). Natomiast w całym okresie badawczym oznaczana średnia temp. nie przekroczyła wartości granicznej (22°C) zalecaniej dla wód I klasy czystości.

W wodach rzeki Łyny zbadano również trzy wskaźniki materii organicznej określające zawartość węgla organicznego całkowitego (TOC - Total Organic Carbon), cząsteczkowego (POC - Particulate Organic Carbon) i organicznego rozpuszczonego (DOC - Dissolved Organic Carbon). Najwyższe średnie wartości oznaczanych wskaźników notowano przeważnie w próbkach wody pobieranych na obszarach rolnych. Średnie zawartości TOC i DOC w rzece płynącej przez te obszary wynosiły odpowiednio 12,31 mg C l⁻¹ i 10,20 mg C l⁻¹. Natomiast najwyższe stężenie POC wynoszące 2,33 mg C L⁻¹ stwierdzano w wodzie z terenów zurbanizowanych. Najniższe średnie wartości TOC i DOC odnotowano w wodzie na terenach zurbanizowanych odpowiednio 2,84 i 2,67 mg C l⁻¹ oraz w przypadku POC w wodzie na terenach leśnych 0,48 mg C l⁻¹. Przeważnie najmniejsze wartości oznaczanych związków węgla stwierdzano w próbkach wody pobieranych ze wszystkich stanowisk jesienią.

Oznaczone wskaźniki, tlen rozpuszczony mg O₂ l⁻¹ (DO - dissolved oxygen) i ChZT, charakteryzujące warunki tlenowe i zanieczyszczenia organiczne w wodzie Łyny kształtowały się na różnym poziomie w zależności od sezonu i miejsca poboru wody do badań. Średnie stężenie tlenu rozpuszczonego zmieniało się od 8,18 mg O₂ l⁻¹ w wodzie na obszarach zurbanizowanych (st. 7Z) do 10,55 mg O₂ l⁻¹ w wodzie pobieranej ze źródeł rzeki Łyny (st. 1L). Oznaczone wartości były charakterystyczne dla wód I klasy czystości. W sezonach badawczych najwyższe średnie stężenie DO notowano w próbkach wody pobieranej wiosną na każdym z obszarów przez, który przepływała rzeka. W całym okresie badawczym maksymalne stężenie tlenu (14,50 mg O₂ l⁻¹) w tym sezonie było stwierdzane w wodzie na obszarach zalesionych, najmniejsze natomiast latem (7,30 mg O₂ l⁻¹) w wodzie płynącej przez obszary zurbanizowane. Zakres średnich wartości ChZT mieścił się od 9,25 mg l⁻¹ (w próbkach wody pobieranych ze stanowiska 1L zlokalizowanego na obszarze źródeł Łyny) do 26,88 mg l⁻¹ w wodzie pobieranej na

stanowisku 15R zlokalizowanym we wsi Stopki, położonej kilka kilometrów od granicy państwa z Rosją. Zakres wartości tego parametru zmieniał się w zależności od sezonu i miejsca badań. Przeważnie oznaczane wartości ChZT w badanych próbkach wody były charakterystyczne dla wód I i II klasy czystości. Jedynie zimą na obszarach rolniczych oraz latem na obszarach rolniczych i zurbanizowanych oznaczane parametry przekraczały wartość $30 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ i były charakterystyczne dla wód pozaklasowych.

Grupa wskaźników charakteryzujących warunki biogenne obejmowała oznaczenie $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$, $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$, $\text{N}_{\text{NO}_3^-}$, $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$ i P_{og} . Średnie stężenie $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$ oznaczane w próbkach wód rzeki z obszarów leśnych i rolnych nie przekraczało $0,11 \text{ mg l}^{-1}$ a zurbanizowanych $0,21 \text{ mg l}^{-1}$. Wartości te były charakterystyczne dla I i II klasy czystości wód. W poszczególnych sezonach badawczych wzrost $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$ w badanej wodzie powyżej $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ (charakteryzującej wody pozaklasowe) notowano zimą na obszarach leśnych i zurbanizowanych, latem na obszarach rolnych i jesienią na obszarach zurbanizowanych. Średnie stężenie w badanych próbkach wody $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$ i $\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ kształtowało się na różnym poziomie klasyfikując wody rzeki Łyny do I lub II klasy czystości. Przeważnie średnie wartości $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$ były najniższe ($0,004 \text{ mg l}^{-1}$) w wodzie płynącej przez obszary leśne, a najwyższe (średnia $0,05 \text{ mg l}^{-1}$) w próbkach wody z obszarów zurbanizowanych. W przypadku $\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ podobnie mniej ich było w wodzie ze zlewni leśnej ($0,06\text{-}0,12 \text{ mg l}^{-1}$) (za wyjątkiem st. 1L gdzie średnio osiągały wartość $2,44 \text{ mg l}^{-1}$), a więcej na obszarach rolnych ($0,12\text{-}0,88 \text{ mg l}^{-1}$). W sezonach badawczych obserwowano wzrost stężenia obydwu związków biogenych zimą ($0,09 \text{ mg N}_{\text{NO}_2^-} \text{ l}^{-1}$) na obszarach zurbanizowanych oraz latem ($2,75 \text{ mg N}_{\text{NO}_3^-} \text{ l}^{-1}$) na terenach zalesionych, co dyskwalifikowało dobrą jakość badanych wód w tym okresie. Oznaczane średnie wartości fosforu fosforanowego i ogólnego w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary leśne rolne i zurbanizowane były przeważnie wyższe niż wartości przypisane dla I ($\leq 0,065 \text{ mg P}_{\text{PO}_4^{3-}} \text{ l}^{-1}$; $\leq 0,20 \text{ mg P}_{\text{og}} \text{ l}^{-1}$) i II ($\leq 0,101 \text{ mg P}_{\text{PO}_4^{3-}} \text{ l}^{-1}$; $\leq 0,30 \text{ P}_{\text{og}} \text{ l}^{-1}$) klasy czystości wód (Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 5 sierpnia 2016). W sezonach badawczych najwyższe stężenie $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$ oznaczono latem ($0,55 \text{ mg l}^{-1}$) w wodzie z obszarów rolnych, najniższe natomiast ($0,02 \text{ mg P}_{\text{PO}_4^{3-}} \text{ l}^{-1}$) wiosną i latem w wodzie z obszarów zalesionych. Najniższe średnie stężenie P_{og} oznaczano zimą i wiosną w próbkach wody pochodzących z terenów zalesionych ($0,18\text{-}0,24 \text{ P}_{\text{og}} \text{ l}^{-1}$). Fosfor ogólny w największym stężeniu występował w próbkach wody pobieranych latem ($1,01 \text{ mg P}_{\text{og}} \text{ l}^{-1}$) na obszarach zurbanizowanych.

Statystycznie istotne zróżnicowanie stwierdzono pomiędzy wartościami większości parametrów fizyko-chemicznych (z wyjątkiem temperatury, pH i DO) pomiędzy poszczególnymi obszarami badań oraz pomiędzy sezonami badawczymi (z wyjątkiem $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$ i $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$).

Tab. 6. Właściwości fizyko-chemiczne oznaczone w wodzie rzeki Łyny na obszarach zalesionych, rolnych, i zurbanizowanych w sezonach badawczych

sezon	pH	Temp. (°C)	TOC (mg C l ⁻¹)	DOC (mg C l ⁻¹)	POC (mg C l ⁻¹)	ChZT (mg l ⁻¹)	TDS (mg l ⁻¹)	DO (mg O ₂ l ⁻¹)	N _{NH4+} (mg l ⁻¹)	N _{NO2-} (mg l ⁻¹)	N _{NO3-} (mg l ⁻¹)	Prost ³⁺ (mg l ⁻¹)	Pog (mg l ⁻¹)
obszary zalesione													
zima	7,18*	4,95	6,81	4,61	0,73	16,70	300,0	9,30	0,08	0,01	0,73	0,16	0,31
	6,90–7,80	1,90–7,30	4,58–10,64	4,25–5,13	0,33–1,22	4,20–24,70	270,0–330,0	8,40–10,20	0,04–0,20	0,007–0,01	0,08–2,49	0,04–0,26	0,24–0,48
wiosna	7,70	13,20	6,10	5,34	0,84	15,70	250,0	11,28	0,11	0,01	0,57	0,15	0,28
	7,30–8,70	9,80–21,10	4,44–6,93	2,31–7,60	0,48–1,26	9,20–19,20	180–370,0	9,30–14,50	0,09–0,15	0,007–0,01	0,05–2,09	0,02–0,29	0,18–0,35
lato	7,83	24,90	5,32	4,77	0,84	23,10	200	8,65	0,05	0,01	0,74	0,12	0,71
	7,70–8,00	24,50–25,20	2,51–7,08	1,73–5,95	0,28–1,15	20,40–28,00	180,0–240,0	8,40–8,90	0,04–0,06	0,00–0,02	0,05–2,75	0,02–0,34	0,61–0,81
jesień	7,18	11,30	5,01	4,35	0,67	11,50	250,0	8,45	0,04	0,01	0,66	0,09	0,45
	7,1–7,3	9,20–14,00	3,24–6,43	2,89–6,43	0,00–1,35	3,20–15,60	230,0–270,0	7,60–9,00	0,02–0,08	0,007–0,01	0,05–2,42	0,04–0,17	0,27–0,63
obszary rolne													
zima	6,98	8,73	8,85	8,65	1,05	24,30	290,0	8,80	0,07	0,02	0,38	0,37	0,48
	6,70–7,20	7,30–9,50	6,98–11,86	5,55–11,51	0,35–1,83	17,30–35,30	250,0–330,0	8,60–9,20	0,06–0,08	0,01–0,02	0,15–0,57	0,22–0,53	0,38–0,64
wiosna	7,13	11,13	12,89	10,05	2,94	17,43	260,0	10,08	0,10	0,04	0,20	0,33	0,48
	6,80–7,60	9,30–13,90	10,53–14,28	9,32–11,12	1,95–4,11	13,50–19,70	200,0–300,0	9,70–10,70	0,07–0,13	0,01–0,06	0,08–0,34	0,11–0,54	0,30–0,80
lato	7,40	22,75	11,04	8,87	2,14	29,60	280,0	8,03	0,13	0,03	0,30	0,43	0,97
	7,30–7,50	21,00–24,60	8,56–13,60	7,50–10,47	1,35–3,13	23,20–35,60	200,0–340,0	7,60–8,30	0,04–0,22	0,02–0,03	0,09–0,62	0,27–0,55	0,88–0,16
jesień	7,45	12,73	8,40	6,87	1,28	21,40	350,0	8,75	0,06	0,02	0,83	0,21	0,68
	7,10–7,90	12,00–13,60	5,98–9,54	4,32–7,93	0,33–1,82	14,40–26,80	270,0–420,0	8,30–9,40	0,02–0,10	0,01–0,03	0,14–2,31	0,15–0,28	0,29–0,93
obszary zurbanizowane													
zima	6,99	9,71	8,96	8,19	0,80	20,30	270,0	8,51	0,10	0,03	0,21	0,41	0,55
	6,80–7,20	8,60–11,00	5,59–10,52	4,89–10,11	0,00–1,70	15,80–25,80	230,0–320,0	7,90–9,00	0,06–0,29	0,01–0,09	0,11–0,28	0,32–0,51	0,37–0,68
wiosna	7,31	14,06	10,52	8,70	2,09	19,66	230,0	10,03	0,11	0,03	0,12	0,27	0,50
	6,90–7,80	10,20–24,90	0,00–14,05	0,00–10,51	1,08–4,04	15,20–28,80	140,0–260,0	7,80–13,40	0,04–0,20	0,01–0,06	0,05–0,18	0,22–0,37	0,28–0,13
lato	7,56	21,13	8,98	7,24	1,71	30,23	240,0	7,77	0,09	0,03	0,20	0,33	0,87
	7,40–7,70	13,60–26,10	0,00–11,78	0,00–9,74	0,00–2,92	22,80–36,80	210,0–270,0	7,30–8,20	0,05–0,16	0,02–0,05	0,09–0,32	0,20–0,47	0,61–1,01
jesień	7,46	12,70	8,56	7,46	1,10	19,64	280,0	9,01	0,11	0,02	0,39	0,16	0,56
	7,00–7,80	9,70–13,70	5,80–9,92	5,80–8,11	0,00–2,09	12,80–26,00	250,0–330,0	8,50–10,30	0,05–0,23	0,01–0,04	0,16–1,20	0,05–0,29	0,24–0,89

* średnia i zakres wartości

Tab. 7. Właściwości fizyko-chemiczne oznaczone w wodzie rzeki Łynty na obszarach zalesionych, rolnych, i zurbanizowanych

Stanowisko	pH	Temp. (°C)	TOC (mg C l ⁻¹)	DOC (mg C l ⁻¹)	POC (mg C l ⁻¹)	ChZT (mg l ⁻¹)	TDS (mg l ⁻¹)	DO (mg O ₂ l ⁻¹)	N _{NH4} ⁺ (mg l ⁻¹)	N _{NO2} ⁻ (mg l ⁻¹)	N _{NO3} ⁻ (mg l ⁻¹)	PO4 ³⁻ (mg l ⁻¹)	Pog (mg l ⁻¹)
(średnia ±SD) ^a													
obszary zalesione													
1L	7,53±0,34	13,10±7,9	3,69±0,9	2,79±1,1	0,48±0,2	9,25±7,9	290,0±100,0	10,55±2,7	0,06±0,05	0,01±0,004	2,44±0,3	0,26±0,1	0,48±0,3
2L	7,33±0,36	14,15±7,6	6,13±0,7	5,57±1,5	1,05±0,4	20,20±5,5	260,0±100,0	8,90±1,5	0,09±0,08	0,01±0,002	0,09±0,05	0,09±0,1	0,45±0,2
3L	7,75±0,76	14,63±10,6	6,39±0,6	5,77±0,5	0,71±0,6	18,08±2,7	230,0±100,0	8,73±0,4	0,07±0,02	0,00±0,003	0,06±0,01	0,06±0,1	0,35±0,2
4L	7,28±0,33	12,48±8,9	7,01±2,6	4,92±0,9	0,83±0,4	19,48±5,5	220,0±40,0	9,50±0,8	0,05±0,03	0,01±0,001	0,12±0,1	0,10±0,1	0,47±0,1
obszary rolne													
5R	7,30±0,45	13,38±7,5	8,34±1,9	7,49±2,2	1,89±0,2	22,53±9,3	270,0±100,0	8,78±0,9	0,07±0,04	0,01±0,003	0,12±0,03	0,19±0,1	0,50±0,3
9R	7,30±0,29	14,90±6,8	10,05±1,9	8,48±0,9	1,20±1,0	19,70±5,4	280,0±40,0	8,73±0,8	0,09±0,02	0,02±0,007	0,20±0,1	0,32±0,1	0,64±0,3
14R	7,10±0,29	13,75±5,2	10,47±3,1	8,27±2,0	2,20±1,3	23,63±7,0	310,0±40,0	9,03±0,8	0,09±0,04	0,03±0,019	0,51±0,2	0,47±0,1	0,83±0,1
15R	7,25±0,30	13,30±5,6	12,31±2,1	10,20±1,7	2,11±1,3	26,88±6,6	320,0±30,0	9,13±1,1	0,11±0,07	0,03±0,019	0,88±1,0	0,36±0,1	0,64±0,2
obszary zurbanizowane													
6Z	7,4±0,37	14,15±4,50	2,84±3,28	2,67±3,10	0,63±0,94	17,65±5,10	220,0±17,0	8,57±0,9	0,06±0,02	0,01±0,004	0,37±0,55	0,23±0,07	0,44±0,31
7Z	7,23±0,33	14,88±7,1	10,05±1,9	8,72±1,5	1,39±0,4	22,35±4,1	230,0±10,0	8,18±0,6	0,21±0,06	0,05±0,03	0,18±0,03	0,31±0,2	0,79±0,3
8Z	7,35±0,48	15,08±7,6	9,06±1,6	7,68±1,8	1,32±0,1	24,6±7,1	250,0±10,0	9,40±2,7	0,11±0,06	0,04±0,01	0,14±0,1	0,30±0,1	0,68±0,3
10Z	7,38±0,39	14,63±7,1	10,09±1,3	8,93±1,1	1,17±1,0	20,7±6,5	260,0±10,0	8,78±1,1	0,11±0,06	0,03±0,008	0,23±0,1	0,29±0,1	0,64±0,3
11Z	7,20±0,29	13,35±5,3	10,87±1,3	9,06±1,3	1,82±1,3	24,45±9,1	260,0±20,0	9,23±1,6	0,07±0,01	0,02±0,004	0,21±0,1	0,32±0,1	0,58±0,3
12Z	7,33±0,10	14,03±4,6	10,41±2,3	9,10±1,7	1,32±1,0	23,52±8,8	280,0±40,0	8,80±0,7	0,06±0,01	0,02±0,005	0,20±0,1	0,30±0,2	0,50±0,1
13Z	7,43±0,38	14,70±4,7	11,45±1,9	9,12±0,9	2,33±1,1	23,90±6,0	290,0±40,0	8,88±0,8	0,09±0,03	0,03±0,022	0,27±0,1	0,29±0,1	0,73±0,2
Istotność różnic między:													
obszar	F 2,0	2,19	49,69	43,26	7,48	12,29	5,79	2,21	2,37	14,17	8,68	29,43	9,65
P	<0,1450	<0,1239	<0,0000	<0,0000	<0,0017	<0,0000	<0,0059	<0,1221	<0,1054	<0,0000	<0,0006	<0,0000	<0,0003
sezon	F 7,9	30,74	6,86	3,61	6,78	11,05	6,51	16,96	1,1862	1,24	4,44	12,08	21,62
P	<0,0002	<0,0000	<0,0007	<0,0209	<0,0008	<0,0000	<0,0010	<0,0000	<0,3265	<0,3076	<0,0084	<0,0000	<0,0000

^a średnia i odchylenie standardowe (±SD)^b stanowiska na Łynie płynącej przez tereny: lesne (L), rolne (R) i zurbanizowane (Z)^c Jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA sprawdzająca istotność różnic wartości parametrów fizykochemicznych wody rzeki Łynty w zależności od obszaru i pory roku, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wewnątrzgrupowej, P – poziom istotności

5.2. Badania mikrobiologiczne wód rzeki Łyny metodami klasycznymi

5.2.1. Analiza ilościowa i jakościowa mikroorganizmów wskaźnikowych i stanu sanitarnego oraz wankomycyno opornych enterokoków w wodzie Łyny

Ocenę jakości wód rzeki Łyny ustalono na podstawie analizy wskaźników mikrobiologicznego zanieczyszczenia związkami organicznymi (bakterie psychrofilne A₂₂, bakterie mezofilne A₃₇) i stanu sanitarnego (bakterie z grupy coli -TC, bakterie coli typu fekalnego (*Escherichia coli*) - FC, paciorkowce kałowe (enterokoki) - E). Dodatkowo oznaczano liczebność, opornych na niskie stężenia wankomycyny enterokoków - E_{VAN}.

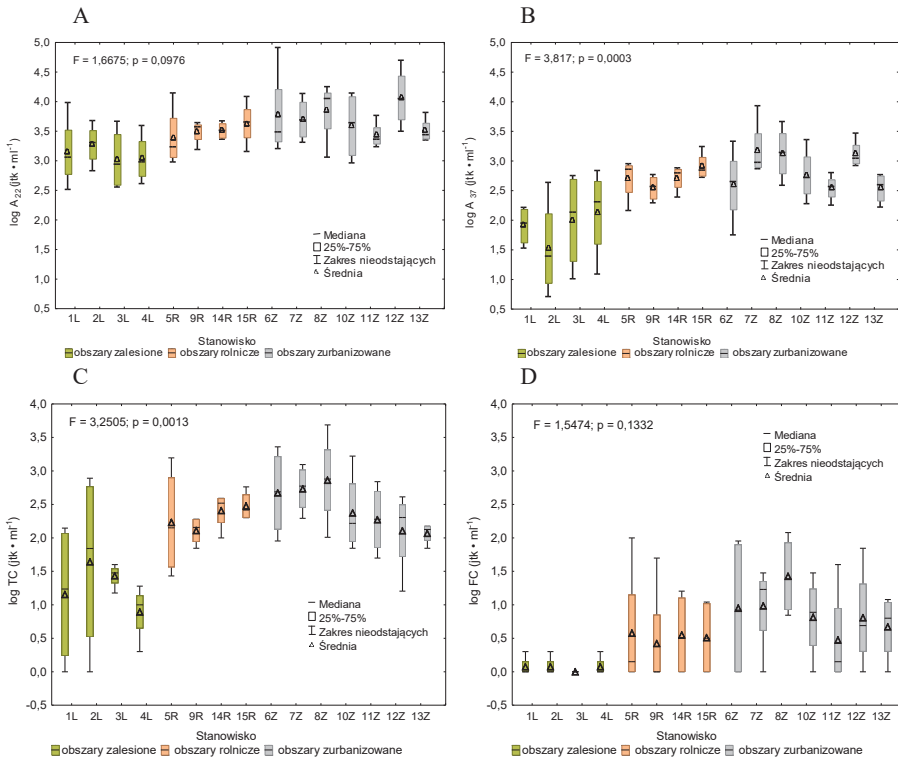
W wodzie rzeki Łyny liczba oznaczanych drobnoustrojów kształtowała się w zakresie od 0 do 4,9 log jtk·ml⁻¹ w zależności od rodzaju wskaźnika i miejsca poboru próbek. Na obszarach leśnych (1L - 4L) z ograniczonym wpływem antropopresji stwierdzono najmniejsze liczebności wszystkich oznaczanych bakterii wskaźnikowych. Średnie liczebności bakterii A₂₂ i A₃₇ w wodzie z tych obszarów nie przekraczały odpowiednio 3,12 i 1,89 log jtk·ml⁻¹. Natomiast średnie liczebności TC, FC, E i E_{VAN} wahały się w zakresie od 0,001 do 1,28 log jtk·ml⁻¹. Liczba wszystkich oznaczanych drobnoustrojów wzrastała w wodzie rzeki na stanowiskach (5R, 9R, 14R, 15R) położonych w zlewni użytkowanej rolniczo. Wartości A₂₂ i A₃₇ kształtowały się wówczas odpowiednio na poziomie od 2,97 – 4,13 log jtk·ml⁻¹ i od 2,15 – 3,23 log jtk·ml⁻¹. Natomiast średnie liczebności TC, FC, E i E_{VAN} wynosiły odpowiednio: 2,31, 0,52, 0,21 i 0,06 log jtk·ml⁻¹. Największe średnie liczebności oznaczanych bakterii wskaźnikowych stwierdzano w Łynie płynącej przez tereny zurbanizowane (Tab. 8).

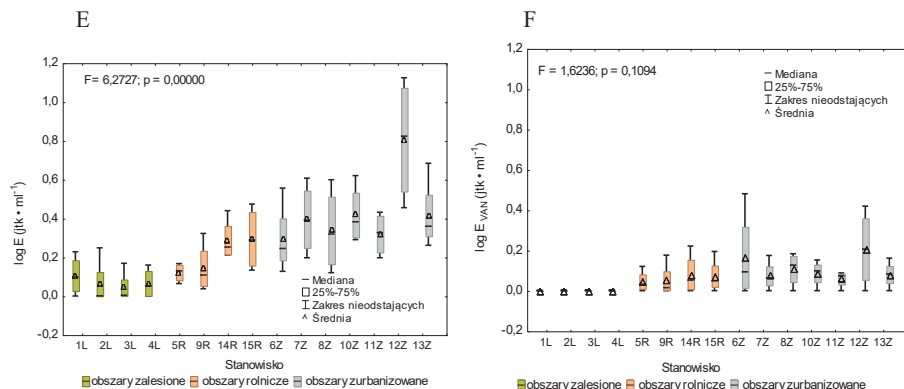
Tab. 8. Średnia liczba, zakres i odchylenie standardowe (SD) oznaczanych bakterii wskaźnikowych (log jtk·ml⁻¹) w wodzie rzeki Łyny

Obszary		Liczebność bakterii wskaźnikowych (log jtk·ml ⁻¹) w wodzie na obszarach o zróżnicowanym użytkowaniu zlewni					
		A22	A37	TC	FC	E	E _{VAN}
zalesione	średnia	3,12	1,89	1,28	0,06	0,07	0,001
	min	2,51	0,70	0	0	0	0
	max	3,97	2,83	2,80	0,30	0,25	0,004
	SD	0,45	0,68	0,86	0,12	0,09	0,002
rolne	średnia	3,50	2,71	2,31	0,52	0,21	0,06
	min	2,97	2,15	1,43	0,00	0,04	0
	max	4,13	3,23	3,20	2,00	0,47	0,22
	SD	0,32	0,28	0,43	0,70	0,13	0,08
zurbanizowane	średnia	3,70	2,83	2,44	0,88	0,43	0,11
	min	2,95	1,74	1,20	0	0,12	0
	max	4,90	3,92	3,69	2,08	1,12	0,48
	SD	0,48	0,47	0,57	0,71	0,24	0,11

SD – odchylenie standardowe

Na obszarach zurbanizowanych znaczny wzrost wartości oznaczanych bioindykatorów notowano przeważnie w wodzie ze stanowisk zlokalizowanych za aglomeracjami miejskimi. Największe ich liczebności stwierdzano za punktowym zrzutem ścieków oczyszczonych do wód Łyna. Maksymalna średnia liczba bakterii A_{22} i A_{37} w badanych próbkach wody wahała się na poziomie od 2,95 do 4,90 log jtk·ml⁻¹ i od 1,74 do 3,92 log jtk·ml⁻¹. Średnie maksymalne liczebności bakterii TC i FC (3,69 i 2,08 log jtk·ml⁻¹), odnotowano w wodzie na stanowisku 8Z zlokalizowanym 200 m za oczyszczalnią ścieków Łyna (Rys 9. C, D). Natomiast największe średnie liczebności enterokoków (E) (0,4 – 0,8 log jtk·ml⁻¹) stwierdzono w próbkach wody pobieranych ze stanowisk usytuowanych poniżej Dobrego Miasta (10Z), Lidzbarka Warmińskiego (12Z) i Bartoszczy (13Z) (Rys. 9 E). Natomiast E_{VAN} w największej liczebności (0,48 log jtk·ml⁻¹) zidentyfikowano w próbkach wody pobieranych ze stanowiska 6Z (w centrum Olsztyna na terenie parku miejskiego) oraz 12Z (0,42 log jtk·ml⁻¹) poniżej Lidzbarka Warmińskiego (Rys. 9 F).





Rys. 9. Liczebności ($\log \text{jtk}^{-1}$) bakterii wskaźnikowych: A – psychofilnych A_{22} , B – mezofilnych A_{37} , C – grupy coli TC, D – coli typu fekalnego FC, E – paciorkowców kałowych E i F – paciorkowców kałowych wankomycynoopornych E_{VAN}) w wodzie rzeki Łyny na obszarach o zróżnicowanym użytkowaniu zlewni

Na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA (sprawdzającej wpływ rodzaju użytkowania zlewni na liczebność bakterii w wodzie rzeki Łyny) stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy liczebnościami wszystkich oznaczanych drobnoustrojów z poszczególnych obszarów badań (Tab. 9), oraz pomiędzy liczebnościami bakterii A_{37} , TC i E również pomiędzy poszczególnymi stanowiskami badawczymi ($p < 0,01$) (Rys. 9).

Tab. 9. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA

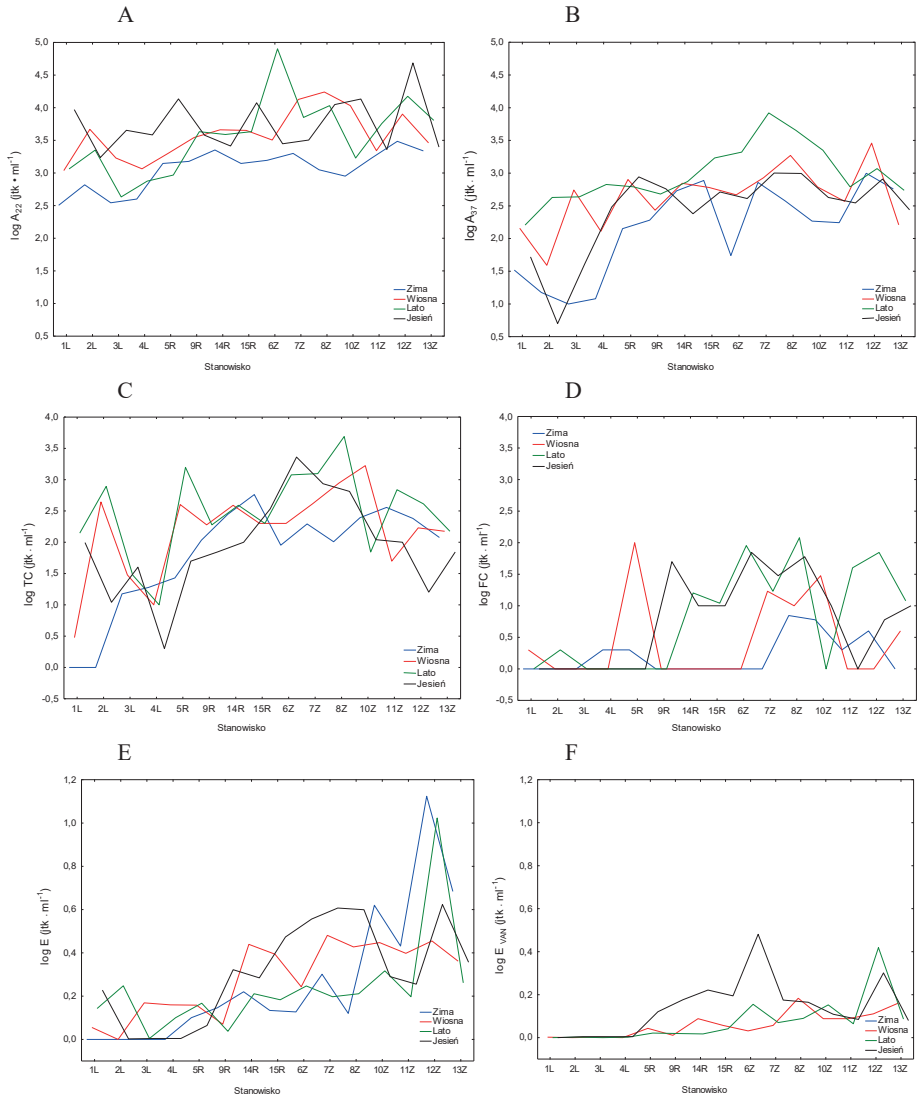
Oznaczone bakterie	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Bakterie psychofilne (A_{22})	13,563	0,000029	[R, Z] [L]
Bakterie mezofilne (A_{37})	38,156	0,000000	[L] [R, Z]
Bakterie z grupy coli (TC)	21,3973	0,000000	[L] [R, Z]
<i>Escherichia coli</i> (FC)	9,58629	0,000372	[L, R] [R, Z]
Enterokoki (E)	26,5573	0,000000	[L] [R] [Z]
Enterokoki odporne na wankomycynę (E_{VAN})	10,75186	0,000170	[L, R] [R, Z]

L – obszary leśne, R – obszary rolne, Z – obszary zurbanizowane, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

W sezonach badawczych najmniejsze średnie liczebności analizowanych grup bakterii (A_{22} , A_{37} , TC, FC) stwierdzano w próbkach wód pobieranych zimą, kiedy to temperatura wody wahała się od 2°C do 11°C (Tab. 6, 7). Wynosiły one odpowiednio: 3,06, 2,15, 1,79 i 0,21 log jtk·ml⁻¹ (Tab. 10). Największe liczebności tych bakterii odnotowywano przeważnie latem, gdy średnia temperatura wody oscylowała w granicach 22°C. Maksymalne liczebności oznaczanych A_{22} , A_{37} , TC i FC wynosiły wówczas odpowiednio: 4,90, 3,92, 3,69 i 2,08 log jtk·ml⁻¹. Natomiast średnie liczebności enterokoków (E) (0,24 - 0,31 log jtk·ml⁻¹) i E_{VAN} (0 - 0,14 jtk·ml⁻¹) kształtowały się na podobnym poziomie w każdym z sezonów badawczych. Wzrost liczebności E i E_{VAN} notowano odpowiednio zimą i jesienią na stanowiskach występujących na obszarze zurbanizowanym. Jedynie liczba E (zimą) i E_{VAN} (jesienią) wzrastała do kilkunastu jtk w ml, wody rzeki Łyny (Tab. 10, Rys. 10). Na podstawie analizy wariancji (ANOVA) stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy wszystkimi oznaczanymi grupami bakterii wskaźnikowych (z wyjątkiem E) pomiędzy poszczególnymi sezonami badawczymi (Tab. 11).

Tab. 10. Liczba (log jtk·ml⁻¹) oznaczanych bakterii wskaźnikowych (średnia, zakres i ± SD) w poszczególnych sezonach badawczych w wodzie rzeki Łyny

Sezony badawcze		Liczebności bakterii wskaźnikowych (log jtk·ml ⁻¹) w wodzie rzeki Łyny					
		A22	A37	TC	FC	E	E_{VAN}
Zima	średnia	3,06	2,15	1,79	0,21	0,27	0
	min	2,51	1,00	0	0	0	0
	max	3,49	3,00	2,76	0,85	1,12	0
	SD	0,31	0,69	0,86	0,30	0,32	0
Wiosna	średnia	3,59	2,63	2,17	0,44	0,28	0,06
	min	3,04	1,59	0,48	0	0	0
	max	4,24	3,46	3,22	2	0,48	0,18
	SD	0,37	0,47	0,73	0,67	0,17	0,06
Lato	średnia	3,57	2,98	2,48	0,82	0,24	0,08
	min	2,63	2,21	1,0	0	0,004	0
	max	4,90	3,92	3,69	2,08	1,02	0,42
	SD	0,58	0,44	0,70	0,81	0,23	0,11
Jesień	średnia	3,75	2,43	1,95	0,77	0,31	0,14
	min	3,24	0,70	0,30	0	0,002	0
	max	4,69	3,00	3,36	1,85	0,62	0,48
	SD	0,40	0,63	0,77	0,72	0,23	0,13



Rys. 10. Sezonowe zmiany liczebności (log-jtk⁻¹) bakterii wskaźnikowych: A – psychofilnych A₂₂, B – mezofilnych A₃₇, C – grupy coli TC, D – coli typu fekalnego FC, E – paciorkowców kałowych E i F – enterokoków wankomycynoopornych E_{VAN} w wodzie rzeki Łyny na obszarach o różnicowanym użytkowaniu zlewni

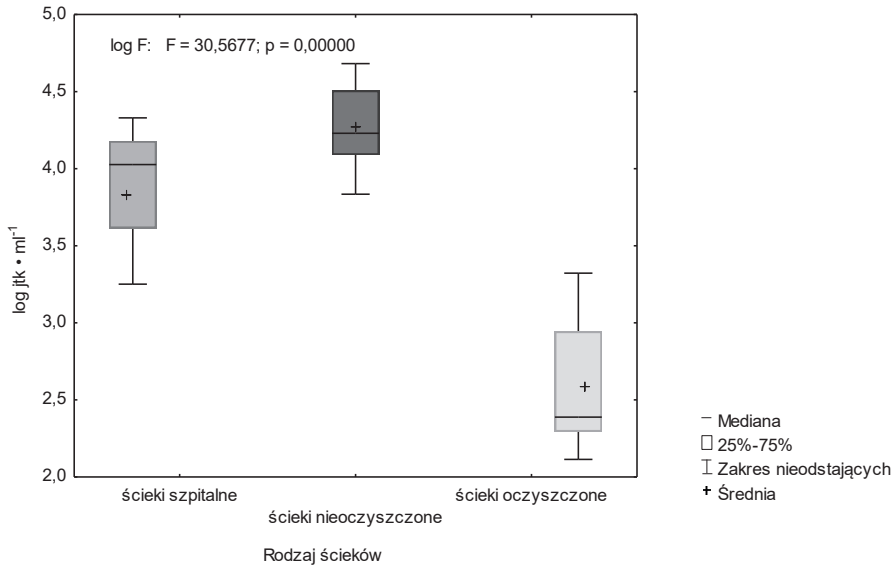
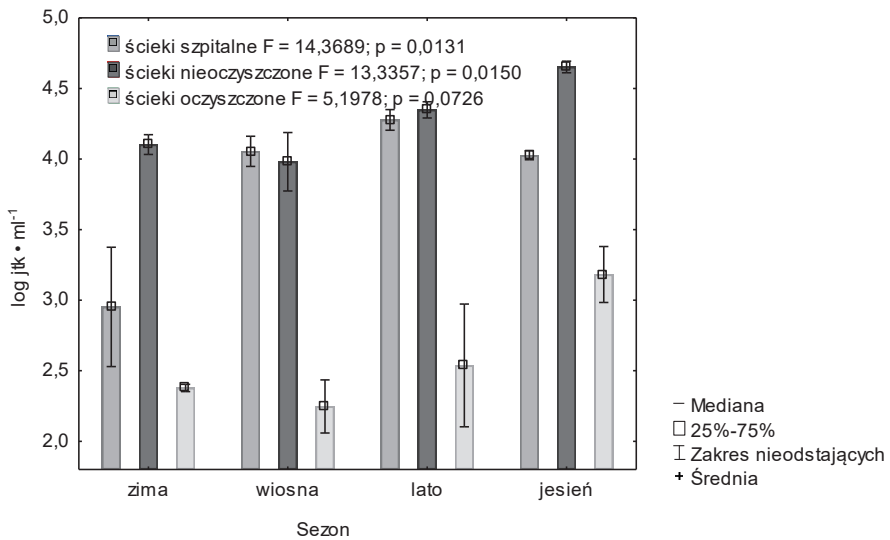
Tab. 11. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej wpływ pory roku na liczebność bakterii w wodzie rzeki Łyny

Oznaczone bakterie	F	p	Grupy jednorodne w teście Tukeya (HSD)
Bakterie psychrofilne (A ₂₂)	10,653	0,000025	[L, W, J] [Z]
Bakterie mezofilne (A ₃₇)	14,419	0,000001	[Z, J] [J, W] [L]
Bakterie z grupy coli (TC)	3,9686	0,014080	[Z, J, W] [J, W, L]
<i>Escherichia coli</i> (FC)	3,50913	0,023304	[Z, J, W] [J, W, L]
Enterokoki (E)	0,5649	0,641167	[L, Z, W, J]
Enterokoki odporne na wankomycynę (E _{VAN})	8,55351	0,000150	[Z, W] [W, L] [L, J]

Z – zima, W – wiosna, L – lato, J – jesień, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wariancji wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

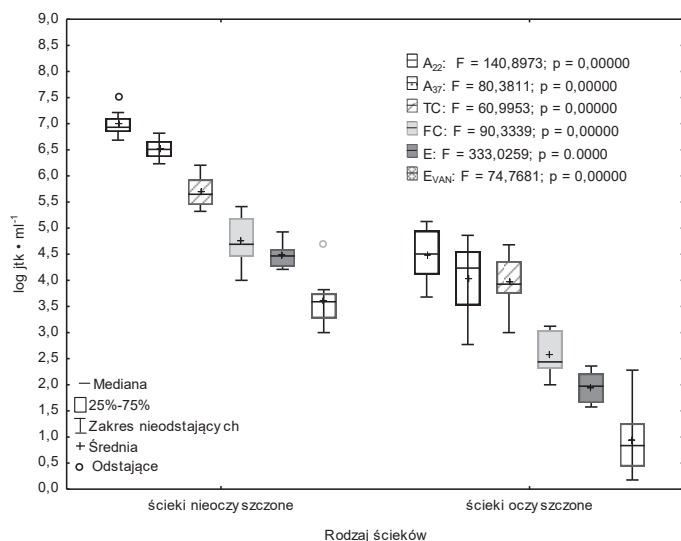
5.2.2. Analiza jakościowa i liczebności mikroorganizmów wskaźnikowych i stanu sanitarnego oraz wankomycyno-opornych enterokoków w ściekach komunalnych

W latach 2009 - 2010 oznaczano liczbę bakterii wskaźnikowych (paciorkowce kałowe E) w nieoczyszczanych ściekach szpitalnych pochodzących z trzech największych placówek medycznych zlokalizowanych w mieście Olsztyn. Równolegle badano ich liczbę w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczanych na terenie miejskiej oczyszczalni ścieków Łyna. W ściekach szpitalnych średnie liczebności E wahały się od 2,95 log jtk·ml⁻¹ zimą do 4,28 log jtk·ml⁻¹ latem. (Rys. 11, 12). Stanowiły one od 4 do 88% enterokoków stwierdzanych w ściekach nieoczyszczonych. W procesie oczyszczania ścieków liczba tych bakterii ulegała usunięciu w zakresie około 96 do 98%. Jednak, pomimo wysokiej skuteczności procesu oczyszczania, w ściekach oczyszczonych średnia liczba tych drobnoustrojów utrzymywała się na poziomie od 2,24 log jtk·ml⁻¹ (zimą) do 2,53 log jtk·ml⁻¹ (latem) oraz do 3,18 log jtk·ml⁻¹ (jesienią) (Rys. 11, 12).

Rys. 11. Średnia liczba enterokoków – E ($\log \text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$) w ściekach w latach 2009- 2010Rys. 12. Sezonowe zmiany średniej liczby enterokoków – E ($\log \text{jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$) w ściekach w latach 2009 - 2010

Liczebności bakterii wskaźnikowych w ściekach komunalnych, w latach 2011-2012 i 2015, były przeważnie o kilka rzędów wielkości większe niż stwierdzone w wodzie rzeki Łyny. W ściekach nieoczyszczonych maksymalne średnie liczebności bakterii A_{37} i A_{22} nie przekraczały odpowiednio 7,36 i 6,61 log jtk·ml⁻¹. Koncentracje bakterii TC, FC i E wynosiły odpowiednio: 5,45 – 5,87 log jtk·ml⁻¹; 4,50 – 5,19 log jtk·ml⁻¹ i 4,24 – 4,74 log jtk·ml⁻¹. Stwierdzano również dużą średnią liczebność bakterii E_{VAN} , która wynosiła 3,02 – 4,19 log jtk·ml⁻¹ (Tab. 12). Stopień usuwania oznaczanych drobnoustrojów w procesie oczyszczania ścieków komunalnych w miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” w Olsztynie był wysoki i wahał się od 97,0% (TC) do 99,6 % (E). Pomimo tego w ściekach oczyszczonych odprowadzanych do wód rzeki Łyny bakterie wskaźnikowe stopnia zanieczyszczenia (A_{22} , A_{37}) i stanu sanitarnego (TC, FC, E) oraz E_{VAN} nadal stanowiły znaczną pulę zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Średnia liczba bakterii psychrofilnych i mezofilnych w ściekach oczyszczonych odprowadzanych do wód Łyny wahała się w przedziale od 3,52 log jtk·ml⁻¹ do 4,79 log jtk·ml⁻¹. Pozostałe grupy bakterii (średni log jtk·ml⁻¹) mieściły się w zakresie: 3,53 – 4,67 (TC), 2,24 – 3,04 (FC), 1,78 – 2,21 (E) i 0,18 – 1,60 (E_{VAN}) (Rys. 13).

W sezonach badawczych przeważnie mniejsze średnie liczebności oznaczanych bakterii stwierdzano zimą natomiast nieco większe przeważnie latem i jesienią. Różnice te jednak nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$) (Tab. 12, Rys 13).



Rys. 13. Średnia liczba bakterii: A) A_{37} i A_{22} B) TC, FC, E i E_{VAN} oznaczana w ściekach w latach 2011-2012 i 2015

Tab. 12. Średnia liczba, zakres i odchylenie standardowe (SD) bakterii wskaźnikowych ($\log \text{ jtk} \cdot \text{ml}^{-1}$) oznaczane w całym okresie badawczym w nieoczyszczonych i oczyszczonych ściekach komunalnych

Sezony	Ścieki nieoczyszczone				Ścieki oczyszczone			
	Średnia	Min	Max	SD	Średnia	Min	Max	SD
A₂₂ (p = 0,8944)*								
Zima	6,84	6,81	6,88	0,05	3,73	3,68	3,77	0,06
Wiosna	6,81	6,68	6,94	0,18	4,79	4,46	5,13	0,47
Lato	6,96	6,92	6,99	0,05	4,66	4,51	4,82	0,22
Jesień	7,36	7,21	7,51	0,21	4,79	4,51	5,07	0,40
A₃₇ (p = 0,9094)								
Zima	6,54	6,53	6,55	0,01	3,52	3,00	4,05	0,74
Wiosna	6,53	6,23	6,82	0,41	4,51	4,15	4,86	0,50
Lato	6,61	6,45	6,78	0,24	4,55	4,50	4,61	0,08
Jesień	6,38	6,29	6,48	0,14	3,55	2,77	4,32	1,10
TC (p = 0,8219)								
Zima	5,80	5,76	5,83	0,05	4,67	4,66	4,68	0,01
Wiosna	5,45	5,40	5,49	0,07	3,80	3,66	3,94	0,20
Lato	5,87	5,53	6,20	0,47	3,87	3,83	3,91	0,05
Jesień	5,67	5,32	6,03	0,50	3,53	3,00	4,06	0,75
FC (p = 0,8902)								
Zima	4,65	4,61	4,68	0,05	2,35	2,30	2,40	0,07
Wiosna	4,50	4,30	4,70	0,28	2,72	2,32	3,12	0,56
Lato	4,71	4,00	5,41	1,00	2,24	2,00	2,48	0,34
Jesień	5,19	5,00	5,38	0,27	3,04	3,00	3,08	0,06
E (p = 0,9698)								
Zima	4,24	4,21	4,27	0,05	1,85	1,70	2,00	0,21
Wiosna	4,32	4,25	4,38	0,09	1,78	1,61	1,95	0,24
Lato	4,59	4,59	4,59	0,00	1,97	1,57	2,36	0,56
Jesień	4,74	4,56	4,93	0,26	2,21	2,08	2,34	0,19
E_{VAN} (p = 0,7195)								
Zima	3,02	3,00	3,05	0,03	0,18	0,18	0,18	0,00
Wiosna	3,54	3,50	3,58	0,06	0,84	0,70	0,98	0,20
Lato	3,71	3,60	3,82	0,16	1,14	0,75	1,54	0,56
Jesień	4,19	3,67	4,71	0,73	1,60	0,92	2,28	0,96

*p – poziom istotności

5.3. Badanie mikrobiologiczne wód rzeki Łyny metodami molekularnymi

5.3.1. Ogólna liczba bakterii (OLB) oraz analiza jakościowa i liczebności bakterii z rodziny *Enterococaceae* na obszarach o różnym użytkowaniu zlewni

W wodzie rzeki Łyny zidentyfikowano ogólną liczbę bakterii (OLB) za pomocą barwienia DAPI i bakterie z rodziny *Enterococaceae* przy użyciu specyficznych sond oligonukleotydowych za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Metodą FISH oznaczono: bakterie z grupy *Lactobacillus/Enterococcus* (sonda LAB158); bakterie z rodziny *Enterococaceae* (sonda ENC38i); bakterie

z rodzaju *Enterococcus* (sonda ENC176); *Enterococcus faecium* (ENU140); *Enterococcus faecalis* (sonda ENF191); *Enterococcus gallinarum* (sonda EGAC183). Tą metodą oznaczono również ogólną pulę bakterii zaliczanych do *Eubacteria* (sonda EUB338). Średnią liczbę, medianę, odchylenie standardowe i frakcję % oznaczanych grup bakterii w stosunku do ich ogólnej liczby (OLB) przedstawiono w (Tab. 13) i na (Rys. 14).

Liczebność oznaczanych bakterii wahała się w zakresie kilku rzędów wielkości (1,9 – 7,28 log kom.·ml⁻¹) (Tab. 13, Rys. 14). Najmniejsze średnie liczebności OLB stwierdzano w wodzie Łyny płynącej przez obszary zalesione. W próbkach wody z tych obszarów (na stanowiskach 1L – 4L) OLB mieściła się w zakresie 6,65 – 6,74 log kom. ml⁻¹. Liczebność OLB wzrastała w wodzie na terenach rolniczych (7,02 – 7,12 log kom. ml⁻¹) natomiast maksymalne liczebności (7,12 – 7,28 log kom.·ml⁻¹) osiągała w wodzie na obszarach zurbanizowanych. Największe średnie liczebności OLB wynoszące powyżej 7,25 log kom.·ml⁻¹ oznaczono w wodzie na stanowiskach 7Z, 8Z i 10Z zlokalizowanych za Olsztynem i Dobrym Miastem (Tab. 13).

Tab. 13. Ogólna liczba (OLB) i procentowy udział oznaczanych grup bakterii w wodzie rzeki Łyny

Stanowisko	OLB (log kom.·ml ⁻¹) (\bar{x} ±SD)	Frakcja (%) bakterii (średnia±SD) ^a oznaczana w stosunku do OLB						
		EUB338	LAB158	ENC38i	ENC176	ENF 191	ENU140	EGAC183
obszary leśne								
1L ^b	6,65±0,20	63,2±20	4,6±1	2,8±1	1,5±0,2	0,2±0,1	0,1±0,01	0,01±0,004
2L	6,73±0,09	50,3±26	6,3±1	2,8±1	1,7±0,4	0,1±0,03	0,05±0,02	0,005±0,00
3L	6,68±0,19	44,2±19	6,7±3	2,6±1	1,3±0,2	0,2±0,1	0,1±0,03	0,01±0,001
4L	6,74±0,12	40,2±16	4,3±2	2,2±0,2	1,4±0,3	0,1±0,04	0,04±0,01	0,004±0,00
obszary rolne								
5R	7,02±0,19	51,0±13	8,7±8	4,5±3	1,9±2	0,3±0,2	0,1±0,05	0,01±0,01
9R	7,03±0,21	49,9±15	6,2±3	3,1±1	1,3±1	0,2±0,04	0,1±0,02	0,01±0,002
14R	7,04±0,19	63,2±22	9,5±3	4,0±1	1,9±1	0,3±0,1	0,1±0,04	0,02±0,003
15R	7,12±0,15	57,2±28	8,1±2	3,1±1	1,6±0,4	0,2±0,02	0,1±0,05	0,02±0,004
obszary zurbanizowane								
6Z	7,23±0,15	57,2±9	5,5±1	2,9±1	1,4±0,2	0,2±0,1	0,1±0,03	0,01±0,005
7Z	7,28±0,20	53,3±8	5,7±1	2,6±1	1,4±1	0,2±0,04	0,1±0,02	0,01±0,004
8Z	7,26±0,11	46,4±4	4,2±2	2,2±1	1,1±0,2	0,2±0,1	0,04±0,03	0,01±0,003
10Z	7,25±0,12	71,4±12	8,7±4	3,5±1	1,8±1	0,3±0,04	0,1±0,01	0,02±0,004
11Z	7,24±0,11	67,5±7	6,6±1	2,2±1	1,8±0,4	0,1±0,1	0,1±0,02	0,01±0,01
12Z	7,19±0,13	46,0±7	4,6±2	2,2±1	1,3±1	0,2±0,1	0,1±0,04	0,01±0,01
13Z	7,13±0,20	42,8±8	7,2±5	2,9±2	1,1±2	0,2±0,1	0,1±0,03	0,01±0,01
istotność różnic między ^c :								
obszar F	189,4	79,03	33,53	100,1	55,6	67,96	44,4	85,76
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
sezon F	38,3	26,08	15,23	23,9	20,8	23,93	28,50	19,05
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

^a procent bakterii (średnia ± SD) oznaczanych w odniesieniu do ogólnej liczby bakterii (OLB) zidentyfikowanych metodą DAPI; liczby zostały skorygowane przez odjęcie NON338,

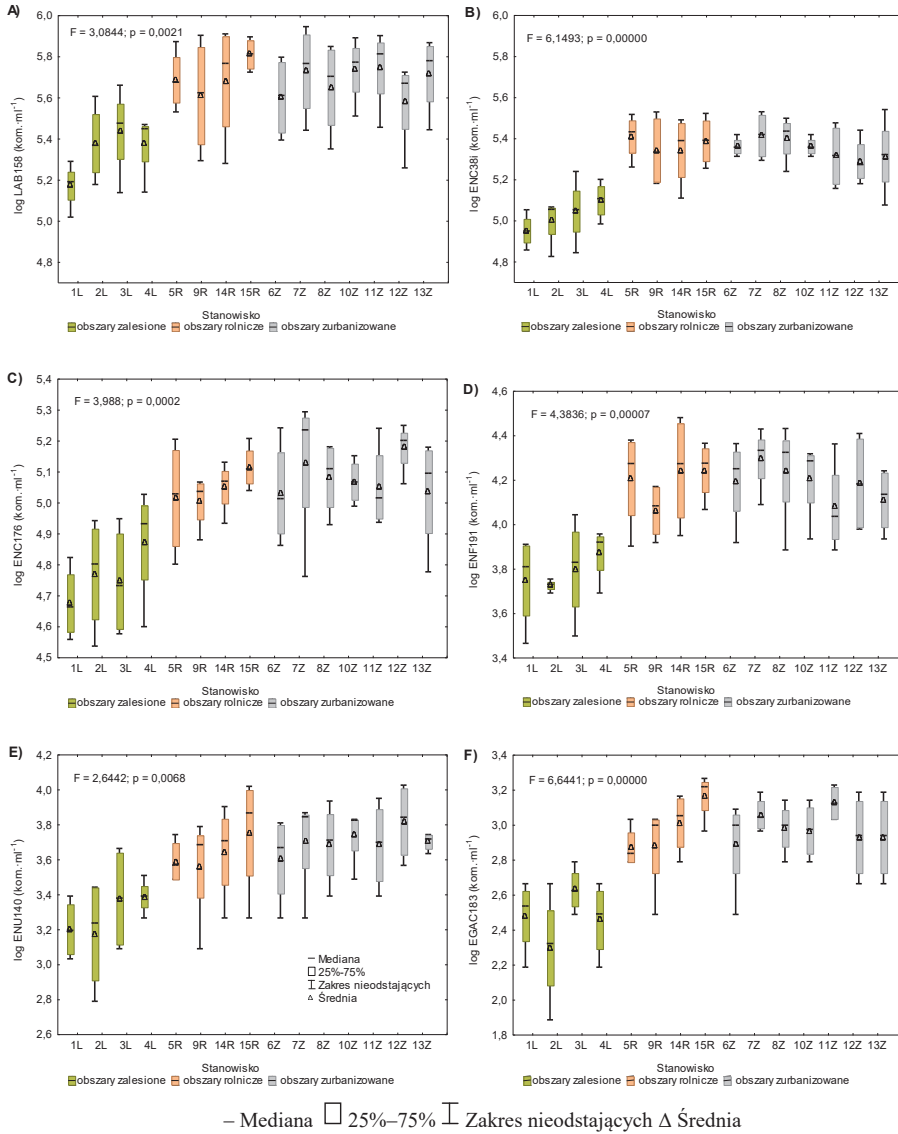
^b stanowiska na Łynie płynącej przez tereny: leśne (L), rolne (R) i zurbanizowane (Z),

^c jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA sprawdzająca istotność różnic wartości parametrów fizykochemicznych wody rzeki Łyny w zależności od obszaru i pory roku, F – stosunek wariancji międzygrupowej do wewnątrzgrupowej, p – poziom istotności

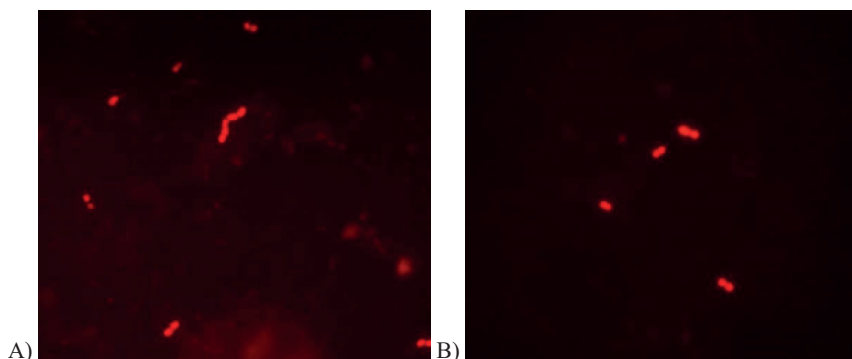
Zmiany liczebności bakterii z rodziny *Enterococaceae* oznaczanych metodą FISH były związane z typem użytkowania zlewni rzeki. Liczebności bakterii oznaczanych za pomocą sond LAB158, ENC38i, ENC176, ENF191, ENU140, EGAC183 stwierdzone w wodzie Łyny na obszarach zalesionych nie przekraczały odpowiednio: 5,65; 5,23; 5,02 4,04; 3,66; 2,78 log kom. \cdot ml⁻¹ (Rys. 14). W rzece przepływającej przez obszary użytkowane rolniczo i zurbanizowane liczba oznaczanych bakterii wzrastała przeważnie kilkukrotnie. W wodzie z obszarów użytkowanych rolniczo stwierdzano większe liczby enterokoków oznaczonych za pomocą ENF191 (4,47 log kom. \cdot ml⁻¹), ENU140 (4,02 log kom. \cdot ml⁻¹) i EGAC 183 (3,26 log kom. \cdot ml⁻¹). Maksymalne liczebności oznaczanych drobnoustrojów (log kom. \cdot ml⁻¹) stwierdzano w wodzie płynącej przez tereny zurbanizowane, gdzie osiągały wartości: 5,94 (LAB158); 5,49 (ENC38i); 5,29 (ENC176). Podobne wyniki uzyskano porównując udział procentowy tych bakterii wśród OLB w próbkach wody płynącej przez różne obszary użytkowania zlewni rzeki Łyny. Oznaczone sondami LAB158, ENC38i, ENC176, ENF191, ENU140, EGAC183 bakterie nie przekraczały odpowiednio: 7%, 3%, 2%, 0,2%, 0,1% i 0,01% w wodzie z obszarów zalesionych; 10%, 5%, 2%, 0,3%, 0,1% i 0,02% w wodach z terenów użytkowanych rolniczo oraz 9%, 4%, 2%, 0,3%, 0,1% i 0,02% w próbkach wód na obszarach zurbanizowanych (Tab. 13). Stwierdzano niższy procentowy udział powyższych oznaczanych enterokoków w stosunku do OLB, w rzece płynącej przez obszary zalesione aniżeli użytkowane rolniczo i zurbanizowane.

Przeważnie dwa naistotniejsze z medycznego punktu widzenia gatunki *E. faecalis* (ENF191) i *E. faecium* (ENU140) (Rys. 15), w większej liczbie występowały w wodzie z obszarów rolnych i pobieranych za miastami i oczyszczalniami ścieków.

Analiza wariancji ANOVA, uzyskanych wyników badań potwierdziła statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy procentowymi udziałami większości oznaczanych metodą FISH bakterii między poszczególnymi obszarami (za wyjątkiem EUB338 i ENF191) i sezonami (za wyjątkiem ENF191). Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy oznaczanymi liczebnościami wszystkich grup bakterii w wodzie na poszczególnych stanowiskach (Rys 14).

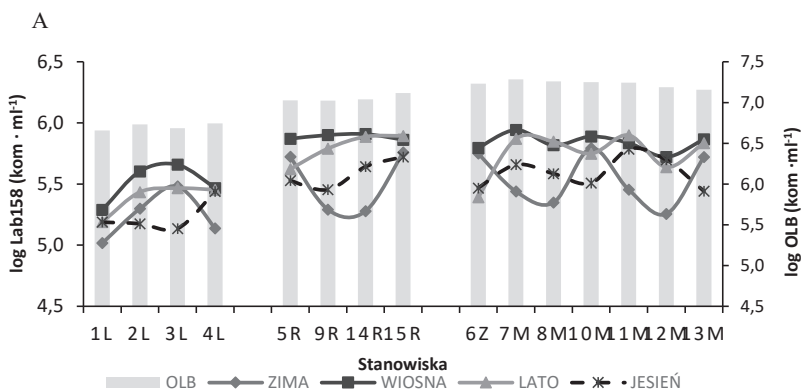


Rys. 14. Średnia liczba (log kom. ml⁻¹) oznaczonych bakterii: A) *Lactobacillus/Enterococcus* (sonda LAB158); B) z rodziny *Enterococaceae* (sonda ENC38i); C) z rodzaju *Enterococcus* (sonda ENC176); D) *Enterococcus faecium* (ENU140); E) *Enterococcus faecalis* (sonda ENF191); F) *Enterococcus gallinarum* (sonda EGAC183) oznaczonych metodą *in situ* FISH w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary: L - leśne, R - rolne i Z - zurbanizowane

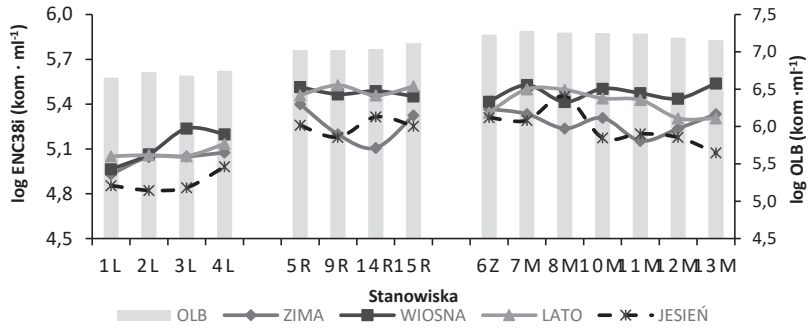


Rys. 15. Bakterie *Enterococcus faecalis* (ENF191) i B) *Enterococcus faecium* (ENU140) zidentyfikowane w wodzie rzeki Łyny metodą *in situ* (FISH)

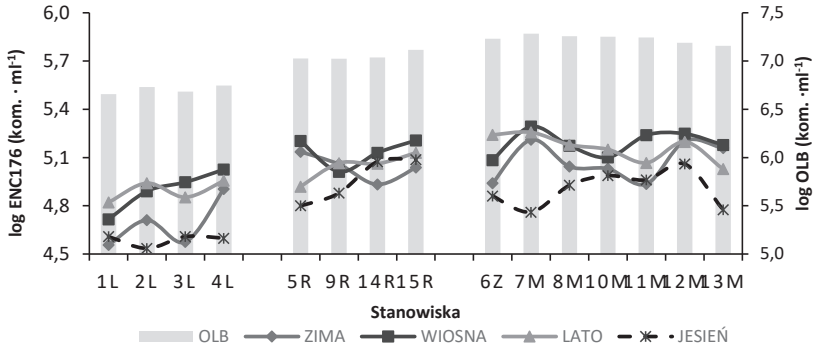
W sezonach badawczych przeważnie najmniejsze średnie liczebności oznaczanych grup bakterii (OLB, EUB338, LAB158, ENC38i, ENC176, ENF191, ENU140, EGAC183) stwierdzano zimą kiedy temperatura wody wahała się od 2°C do 11°C (Tab. 6, 7). W badanych próbkach wody średnie liczebności oznaczanych drobnoustrojów w tym sezonie mieściły się z zakresie od 2,5 do około 6,7 log kom. · ml⁻¹. Największe średnie liczebności oznaczanych mikroorganizmów notowano przeważnie wiosną i latem, gdy temperatura wody wahała się w zakresie 10°C - 26°C. Wówczas obserwowano przeważnie dwukrotny wzrost liczebności tych drobnoustrojów w porównaniu do ich wartości stwierdzanych zimą i jesienią (Rys. 16 A, B, C, D, E, F).



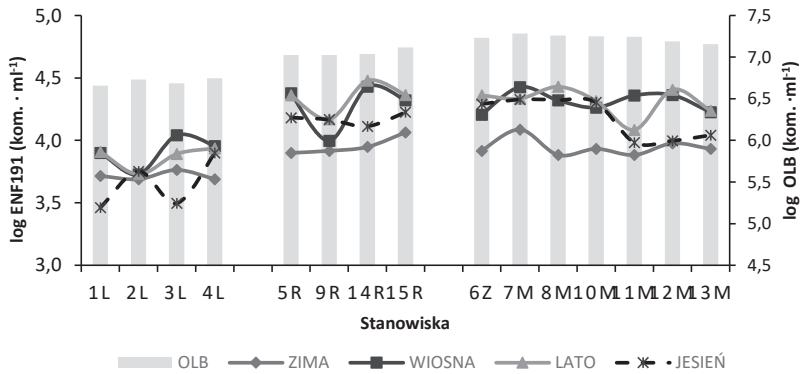
B

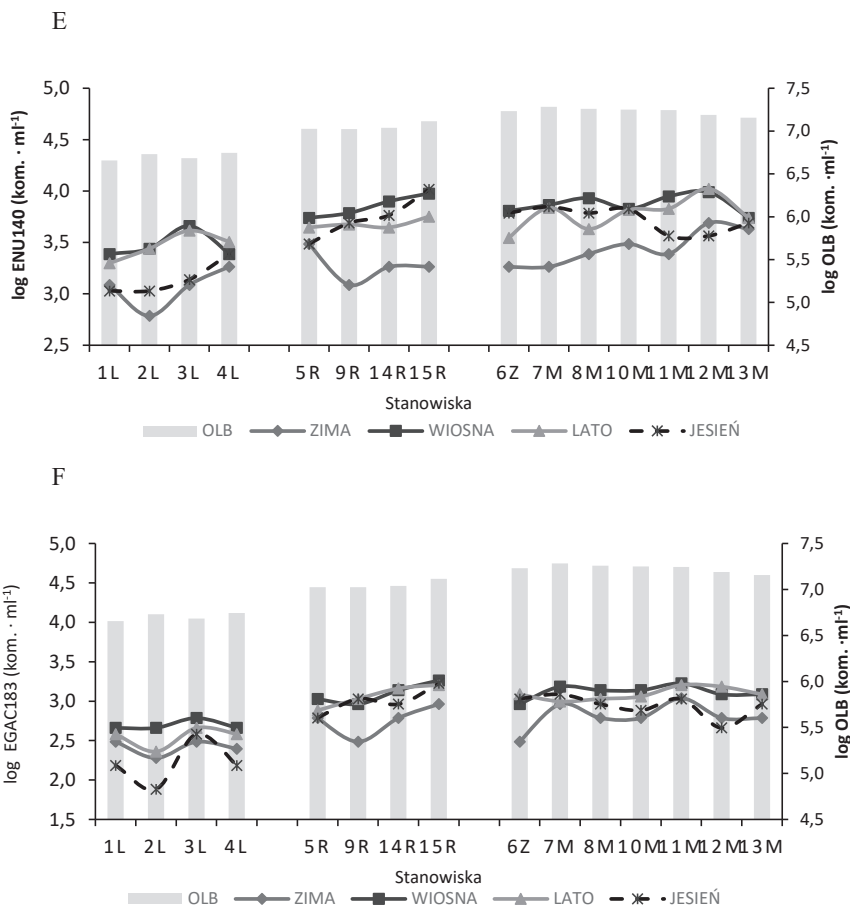


C



D



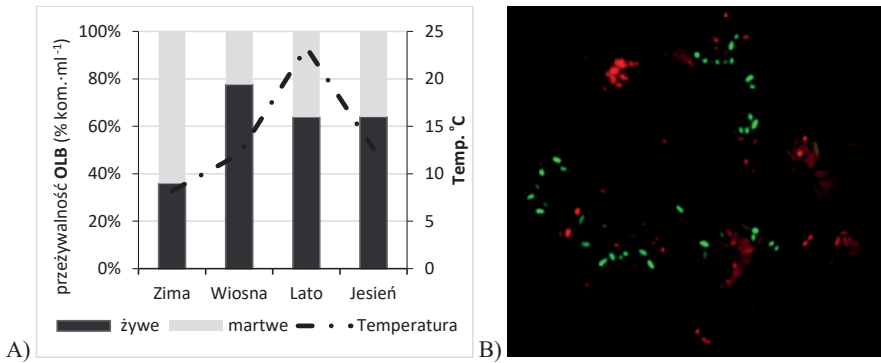


Rys. 16. Sezonowe zmiany średnich liczebności (kom. · ml⁻¹) oznaczanych bakterii: A) *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB158); B) z rodziny *Enterococaceae* (ENC38i); C) z rodzaju *Enterococcus* (ENC176); D) *Enterococcus faecium* (ENU140); E) *Enterococcus faecalis* (ENF191); F) *Enterococcus gallinarum* (EGAC183) w stosunku do średnich liczebności OLB w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary: L - leśne, R - rolne i Z – zurbanizowane

5.3.2. Przeżywalność *in situ* ogólnej liczby bakterii (OLB) w wodzie rzeki Łyny oznaczana metodą LIVE/DEAD BacLight™

W celu określenia stanu fizjologicznego OLB zastosowano metodę barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes). Oznaczana żywotność OLB w wodach rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych była podobna i wynosiła średnio około 60%. Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) w przeżywalności oznaczanych bakterii w wodzie w zależności od miejsca poboru próbek do badań. Biorąc pod uwagę poszczególne sezony badawcze, najmniejszą liczbę komórek żywych wśród OLB (35,9%) odnotowano zimą, kiedy średnia temp. badanej wody wynosiła 8°C. Najwięcej żywych komórek (77,6%)

oznaczono wiosną gdy średnia temp. wody wzrosła do poziomu 12°C. Latem i jesienią pomimo różnic w oznaczanej temperaturze żywotność oznaczanych OLB utrzymywała się na podobnym poziomie i wynosiła około 65% (Rys. 17).

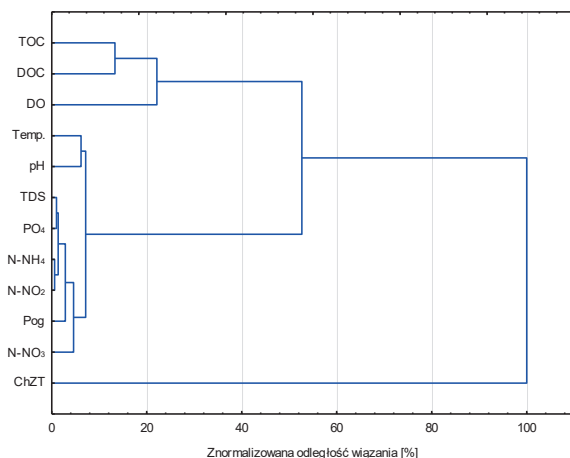


Rys. 17. Żywotność ogólnej liczby bakterii (OLB) w wodzie rzeki Łyna A) w poszczególnych sezonach badawczych B) bakterie żywe - zielone (oznaczone SYTO 9), bakterie martwe - czerwone (wybarwione za pomocą PI), (Fot. A. Gotkowska-Płachta)

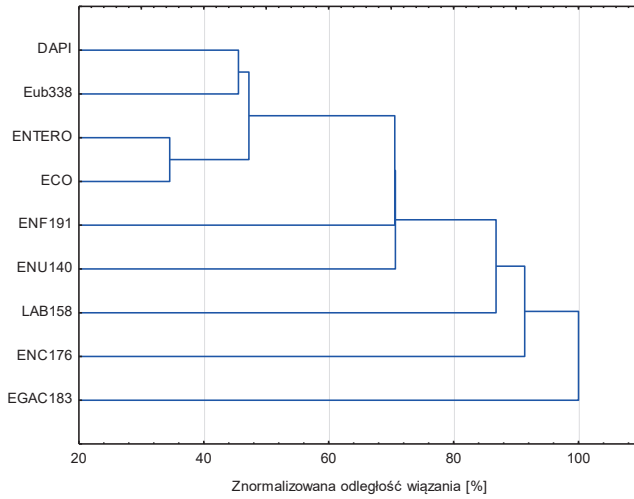
5.4. Analiza statystyczna

Analiza składowych głównych (ang. *principal component analysis*, PCA) oparta na macierzy korelacji zmiennych standaryzowanych i na podstawie testu osypiska, została przeprowadzona w celu zmniejszenia liczby zmiennych służących do charakterystyki mikrobiologicznej wód rzeki Łyny z zastosowaniem pakietu STATISTICA 12.5 (Statsoft). Wyniki analizy składowych głównych zaprezentowano w tabelach zawierających wartości ładunków czynnikowych oraz na wykresach rozrzutu zmiennych na płaszczyznę czynników. Przeprowadzono także analizę skupień metodą aglomeracji z zastosowaniem miary odległości euklidesowej po wyborze skalowania: 100*odl.wiązania/odl.maks. Analiza ta posłużyła do podziału zbioru danych na podzbiory, w których znajdowały się najbardziej podobne do siebie parametry i doboru zmiennych do PCA. Analizie poddano oznaczane w wodzie rzeki Łyny własności fizyko-chemiczne (temp., pH, ChZT, DO, TOC, DOC, TDS, $N_{NH_4^+}$, $N_{NO_2^-}$, $N_{NO_3^-}$, $P_{PO_4^{3-}}$, P_{org}) i mikrobiologiczne identyfikowane za pomocą metod fluorescencyjnych (ogólna liczba bakterii – OLB; bakterie z grupy *Lactobacillus/Enterococcus* – LAB158; bakterie z rodziny *Enterococaceae* – ENC38i; bakterie z rodzaju *Enterococcus* – ENC176; *Enterococcus faecalis* – ENF191; *Enterococcus faecium* – ENU140; *Enterococcus gallinarum* – EGAC183, bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* – ENTERO i *Escherichia coli* – ECO). Wyniki uzyskane przy użyciu sond ENTERO i ECO uwzględniono w niniejszej pracy jedynie do porównań statystycznych, natomiast szczegółowe dane na temat tych bakterii zostały opisane w pracy Gotkowska-Płachta i in. (2016). W analizie uwzględniono również bakterie stanu sanitarnego oznaczane metodami klasycznymi: bakterie mezofilne (A_{37}), bakterie z grupy coli (TC), *Escherichia coli* (FC), paciorkowce kałowe (E) i (E_{VAN}). Na podstawie wykresów

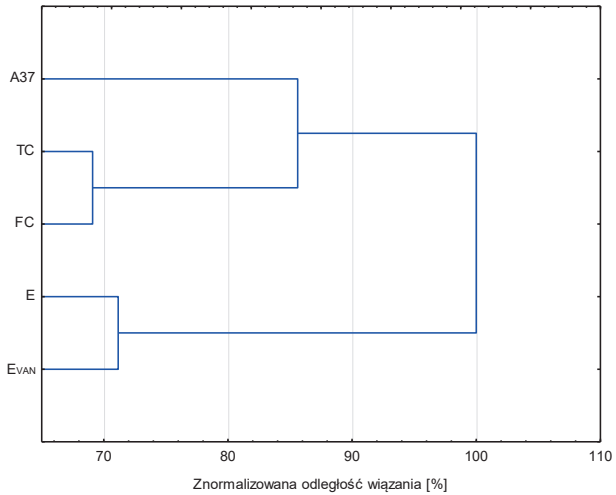
drzewa aglomeracji zmiennych (Rys.18, 19, 20) wyznaczono najbardziej podobne do siebie parametry i do PCA wybrano te, które najbardziej się od siebie różniły. Na podstawie dendrogramu (Rys. 18) zróżnicowania parametrów fizyko-chemicznych, oznaczanych w wodzie Łyny, największe odległości wiązania zaobserwowano pomiędzy ChZT, a grupą wartości utworzoną przez DO-TOC-DOC oraz klastrem składającym się z pozostałych parametrów chemicznych: TDS, $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$, $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$, $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$, P_{Og} , $\text{N}_{\text{NO}_3^-}$ oraz fizycznych: temperatura i pH. Najbardziej podobne do siebie skupienia parametrów chemicznych z najmniejszymi odległościami wiązania obserwowano w przypadku par TDS– $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$, $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$ – $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$ oraz TOC–DOC (Rys. 18). Na tej podstawie zredukowano ilość parametrów najbardziej podobnych w poszczególnych parach (TDS, $\text{N}_{\text{NH}_4^+}$, DOC) (pary klas między, którymi odległość jest najmniejsza łączone są w jedną) a pozostawiono parametry, które pozwalają wyjaśnić większość wariancji układu zmiennych. W związku z tym, do analizy PCA, jako zmienne wybrano następujące parametry: ChZT, DO, TOC, $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$, $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$, P_{Og} , $\text{N}_{\text{NO}_3^-}$, oraz temperaturę i pH. Na podstawie dendrogramu zróżnicowania parametrów mikrobiologicznych oznaczanych metodą FISH (Rys. 19) wyróżniono pary zmiennych: ENTERO-ECO, DAPI-EUB338, ENF191-ENU140, o wzrastającym poziomie zróżnicowania między sobą. Należy podkreślić, że największe zróżnicowanie (na poziomie 90% - znormalizowana odległość wiązania na hierarchicznym drzewie aglomeracji) zaobserwowano pomiędzy bakteriami oznaczanymi sondą EGAC183, ENC176 i pozostałymi parametrami. Biorąc pod uwagę znormalizowaną odległość wiązania pomiędzy skupieniami tworzonymi przez parametry mikrobiologiczne oznaczone metodą FISH do PCA wybrano bakterie oznaczane sondami: Eub338, Lab158, ECO, ENF191, ENU 140, EGAC183, oraz ENC176 (Rys. 19). W sposób analogiczny wykonano analizę aglomeracji dla bakterii wskaźnikowych stanu sanitarnego oznaczanych metodami klasycznymi (Rys. 20) i do dalszej analizy PCA wykorzystano dendrogram zróżnicowania E– E_{VAN} oraz FC, TC i A_{37} . W przypadku analizy tej grupy bakterii do analizy PCA zakwalifikowano wszystkie badane drobnoustroje.



Rys. 18. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji właściwości fizykochemicznych oznaczanych w wodach rzeki Łyny



Rys. 19. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji liczebności oznacznych mikroorganizmów metodą *in situ* FISH w wodach rzeki Łyny



Rys. 20. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji liczebności oznaczanych mikroorganizmów metodami hodowlanymi w wodzie rzeki Łyny

Wyniki analizy PCA wykonanej dla analizowanych własności fizyko-chemicznych i liczebności grup bakterii oznaczanych za pomocą FISH wskazują na istnienie czterech głównych składowych pozwalających na wyjaśnienie ponad 70% zmienności (Tab14). Natomiast analiza PCA pomiędzy parametrami fizykochemicznymi a liczebnością bakterii wskaźnikowych (oznaczanych metodami klasycznymi) wskazała na istnienie dwóch głównych składowych pozwalających na wyjaśnienie 40% zmienności (Tab15).

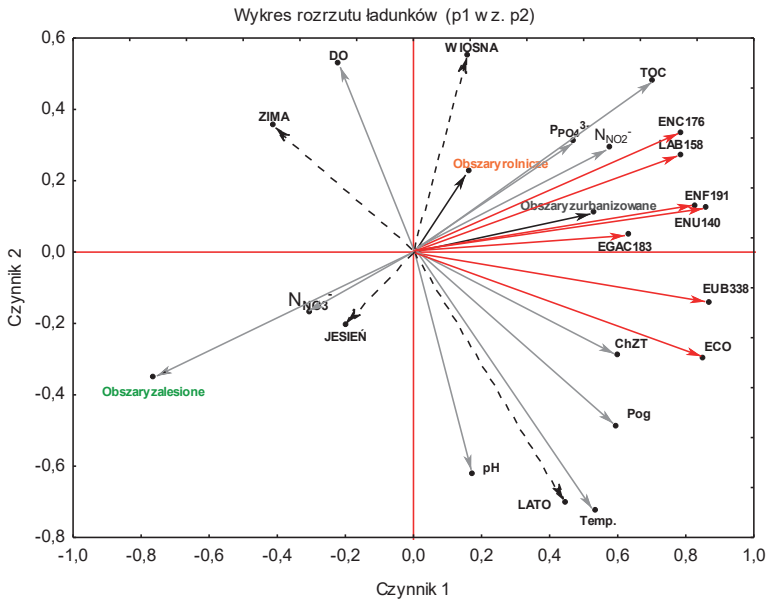
Na podstawie wyników analizy PCA fizykochemia–mikrobiologia (FISH) zaobserwowano, że liczna grupa parametrów mikrobiologicznych (Eub338, LAB158, ENC176, ENF191, ENU140, ECO 1167 oraz EGAC183) cechowała się silnymi dodatnimi ładunkami czynnikowymi z pierwszą składową główną, którą opisuje 35,29% całkowitej zmienności (Tab. 14). Ponadto, pierwszą składową główną budowały także parametry fizykochemiczne tj.: TOC, ChZT, $N_{NO_2^-}$, Pog, $P_{PO_4^{3-}}$ i temperatura, aczkolwiek siła ich ładunków była nieco mniejsza. Po tej samej stronie, czyli także dodatnio skorelowane, były obszary zurbanizowane oraz lato, wskazując na ich największe zanieczyszczenie o tej porze roku. Natomiast skorelowane ujemnie pokazały się obszary zalesione (-0,76) oraz zima (-0,41), które zlokalizowano po przeciwnej stronie na diagramie rozrzutu punktów (Rys. 21). Wskazuje to na najmniejsze zanieczyszczenie mikrobiologiczne tych obszarów w sezonie zimowym. W składzie drugiego czynnika o 14,95% zmienności wyróżnić należy wiosnę, ENC176, DO, oraz TOC najsilniej skorelowane dodatnio natomiast ujemnie lato, ECO1167, temperaturę i pH (Tab. 14), wskazując ponownie na sezon jako ważny czynnik różnicujący jakość wód rzeki Łyny (Rys. 21). Czynnik trzeci wyjaśnił 11,55% zmienności i zróżnicował takie parametry jak: wiosna (0,70) i zima (-0,60) oraz ChZT, P_{Pog} , $P_{PO_4^{3-}}$ (skorelowane dodatnio) i EGAC183, DO i pH (skorelowane ujemnie), (Tab. 14). Natomiast czwarty czynnik wskazał na istotnie różniące się od siebie tereny użytkowane rolniczo (0,73) i obszary zurbanizowane (-0,80), sugerując, że ten pierwszy był bliższy wiosnie, a drugi jesieni, aczkolwiek czynnik ten wyjaśnił jedynie 8,35% całkowitej zmienności oryginalnych danych (Tab. 14).

Podobnych obserwacji dokonano po przeanalizowaniu wyników PCA w układzie fizykochemia–mikrobiologia (metody klasyczne), w wyniku której wyodrębniono dwa czynniki główne (Tab. 15). Z macierzy czynników wynika, że pierwszą składową główną budowały w kolejności od najwyższych dodatnich ładunków czynnikowych: ChZT, Pog., temperatura, lato oraz mikrobiologiczne wskaźniki: A_{37} , TC i FC, jednocześnie charakteryzujące się ujemnym ładunkiem czynnikowym z drugą składową główną. Z kolei pozostałe parametry mikrobiologiczne: E, E_{VAN} cechowały się dodatnim ładunkiem czynnikowym z drugą, a także z pierwszą składową, podobnie jak parametry fizykochemiczne: TOC, $P_{PO_4^{3-}}$, $N_{NO_2^-}$ i parametr: obszary zurbanizowane, których skupisko prezentuje rzut punktów na płaszczyznę czynników 1 i 2 (Rys. 22). Podobnie jak wcześniej, parametr: obszary zalesione prezentuje ujemny i o dużej sile ładunek czynnikowy zarówno z pierwszą jak i drugą składową (Tab. 15, Tab. 14), jak również parametr: zima, który wykazał analogię z wcześniejszą charakterystyką położenia punktów na płaszczyznę czynników (Rys. 21, 22).

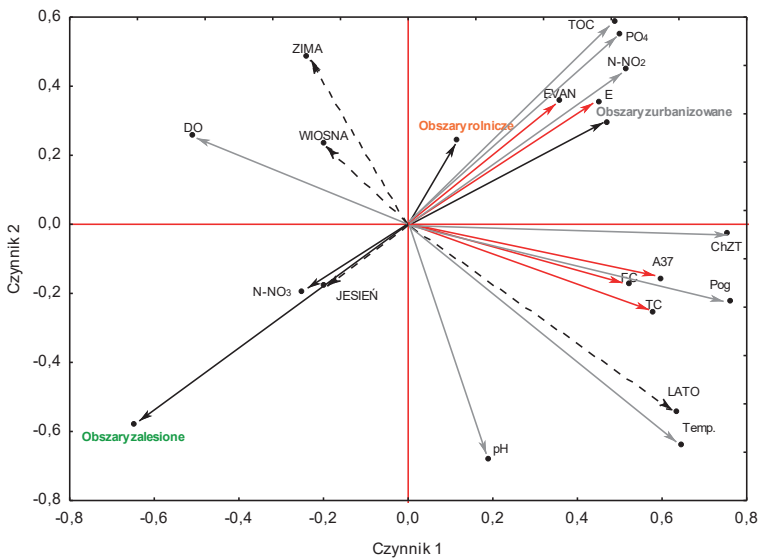
Tab. 14. Wyniki PCA dla właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych oznaczanych metodą FISH w wodach rzeki Łyny

	Czynnik 1	Czynnik 2	Czynnik 3	Czynnik 4
Wartość własna	8,12	3,44	2,66	1,92
Wyjaśniana wariancja (%)	35,29	14,95	11,55	8,35
Skumulowany % wariancji	35,29	50,24	61,79	70,14
Cechy	Ładunki czynnikowe			
Eub338	0,87***	-0,14	-0,18	-0,29
LAB158	0,78***	0,27	-0,13	0,15
ENC176	0,79***	0,33*	0,10	0,03
ENF191	0,86***	0,12	-0,16	0,07
ENU140	0,83***	0,13	-0,40*	0,03
EGAC183	0,63**	0,05	-0,31*	0,19
ECO	0,85***	-0,30*	-0,12	-0,30*
TOC	0,71**	0,48*	0,09	0,10
Temp.	0,54**	-0,73**	-0,07	0,23
pH	0,17	-0,62**	-0,45*	0,14
ChZT	0,60**	-0,29	0,43*	0,10
DO	-0,22	0,53**	-0,51**	0,18
N _{NO2} ⁻	0,58**	0,29	0,25	-0,01
N _{NO3} ⁻	-0,30*	-0,17	-0,10	0,21
P _{PO4} ³⁻	0,47*	0,31*	0,56**	0,15
P _{og}	0,60**	-0,49*	0,37*	0,10
Obszary zalesione	-0,76***	-0,35*	-0,22	0,18
Obszary rolne	0,16	0,23	0,27	0,73**
Obszary zurbanizowane	0,53**	0,11	-0,05	-0,80***
ZIMA	-0,41*	0,36*	0,70**	-0,21
WIOSNA	0,16	0,55**	-0,60**	0,28
LATO	0,45*	-0,70**	0,21	0,24
JESIEŃ	-0,20	-0,21	-0,31*	-0,31*

Ładunki pisane kursywą oznaczają wartości istotne statystycznie. *0.30–0.50 (słaby ładunek); **0.50–0.75 (średni ładunek); ***>0.75 (silny ładunek) na podstawie Liu i in. (2003)



Rys. 21. Diagram rozrzutu punktów symbolizujących właściwości fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne (FISH) wód rzeki Łyny uwzględniający sezony i obszary na płaszczyźnie czynników 1 i 2



Rys. 22. Diagram rozrzutu punktów symbolizujących parametry fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne (metody klasyczne hodowlane) wód rzeki Łyny uwzględniający sezony i obszary na płaszczyźnie czynników 1 i 2

Tab. 15. Wyniki PCA dla właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych (metody klasyczne hodowlane) wód rzeki Łyny

	Czynnik 1	Czynnik 2
Wartość własna	5,17	3,34
Wyjaśniana wariancja (%)	24,64	15,93
Skumulowany % wariancji	24,64	40,57
Cechy	Ładunki czynnikowe	
A ₃₇	0,60**	-0,16
E	0,45*	0,35*
E _{VAN}	0,36*	0,36*
TC	0,58**	-0,25
FC	0,52**	-0,17
TOC	0,49*	0,58**
Temp.	0,65**	-0,64**
pH	0,19	-0,68**
ChZT	0,76***	-0,03
DO	-0,51**	0,26
N _{NO2} ⁻	0,52**	0,45*
N _{NO3} ⁻	-0,25	-0,19
P _{PO4} ³⁻	0,50**	0,55**
P _{og}	0,76***	-0,22
Obszary zalesione	-0,65**	-0,58**
Tereny użytkowane rolniczo	0,11	0,25
Obszary zurbanizowane	0,47*	0,30*
ZIMA	-0,24	0,49*
WIOSNA	-0,20	0,23
LATO	0,64**	-0,54**
JESIEŃ	-0,20	-0,18

Ładunki pisane kursywą oznaczają wartości istotne statystycznie.

*0.30 – 0.50 (słaby ładunek);

**0.50 – 0.75 (średni ładunek);

***>0.75 (silny ładunek) na podstawie Liu i in. (2003)

5.4.1. Analiza statystyczna zależności pomiędzy oznaczanymi grupami mikroorganizmów a parametrami fizyko-chemicznymi w wodzie rzeki Łyny

Przeprowadzono również analizę korelacji Pearsona pomiędzy parametrami mikrobiologicznymi i fizyko-chemicznymi oznaczanymi w wodzie rzeki Łyny. Uwzględniono drobnoustroje oznaczane metodami klasycznymi (A₂₂, A₃₇, TC, FC, E, E_{VAN}) i molekularnymi fluorescencyjnymi za pomocą DAPI i FISH (OLB, EUB338, LAB158, ENC38i, ENC176 ENF191, ENU140, EGAC183) oraz parametry fizyko-chemiczne (temp., pH, TOC, DOC, POC, ChZT, DO, TDS, N_{NH4}⁺, N_{NO2}⁻, N_{NO3}⁻, P_{PO4}³⁻, P_{og}).

Na podstawie analizy korelacji pomiędzy liczebnościami drobnoustrojów oznaczanych zarówno metodami klasycznymi jak i fluorescencyjnymi a wartościami parametrami fizyko-chemicznymi w wodzie rzeki Łyny stwierdzono występowanie statystycznie istotnych ($p < 0,05$) i wysoce istotnych ($p < 0,01$) dodatnich korelacji. Wśród testowanych drobnoustrojów jedynie E_{VAN} nie korelowały z żadnym z badanych składników (Tab. 16 i 17).

W wodzie rzeki Łyny stwierdzano również wysoce istotne ($p < 0,01$) statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy oznaczanymi grupami drobnoustrojów zarówno metodami klasycznymi oraz fluorescencyjnymi (DAPI, FISH). Wyjątek stanowiły bakterie E i E_{VAN} , które nie korelowały z LAB 158, ENC38i oraz ENC176 (Tab. 18).

Tab. 16. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami wskaźnikowymi (\log jtk \cdot ml $^{-1}$) a parametrami fizyko-chemicznymi oznaczonymi w rzece Łynie

Grupy bakterii	Parametry fizyko-chemiczne										
	Temp.	pH	TOC	DOC	POC	ChZT	DO	$N_{NH_4^+}$	$N_{NO_2^-}$	$P_{PO_4^{3-}}$	P_{og}
A22	0,37**	0,13	0,26*	0,28*	0,21	0,18	-0,12	0,11	0,26	0,12	0,29*
A37	0,57**	0,26*	0,42**	0,44**	0,33*	0,42**	-0,18	0,21	0,39**	0,32*	0,47**
TC	0,46**	0,05	0,38**	0,44**	0,16	0,42**	-0,30*	0,21	0,40**	0,42**	0,50**
FC	0,32*	0,13	0,29	0,31*	0,06	0,35**	-0,27*	0,28*	0,22	0,10	0,40**
E	0,13	-0,06	0,41**	0,46**	0,07	0,19	-0,06	0,11	0,23	0,25	0,16
E_{VAN}	0,20	0,19	0,21	0,22	0,09	0,17	-0,04	0,00	0,14	-0,04	0,09

* $p < 0,05$ – statystycznie istotna korelacja, ** $p < 0,01$ – statystycznie wysoce istotna korelacja.

Tab. 17. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami oznaczonymi metodami fluorescencyjnymi (DAPI, FISH) (\log kom. \cdot ml $^{-1}$) i parametrami fizyko-chemicznymi w rzece Łynie

Grupy bakterii	Parametry fizyko-chemiczne									
	Temp.	TOC	DOC	POC	ChZT	$N_{NH_4^+}$	$N_{NO_2^-}$	$N_{NO_3^-}$	$P_{PO_4^{3-}}$	P_{og}
OLB	0,51**	0,54**	0,50**	0,41**	0,51**	0,30*	0,50**	-0,25	0,37**	0,48**
EUB338	0,57**	0,40**	0,37**	0,30*	0,43**	0,23	0,45**	-0,17	0,32*	0,52**
LAB158	0,32*	0,65**	0,63**	0,57**	0,48**	0,30	0,40**	-0,34**	0,30*	0,28*
ENC38i	0,30*	0,66**	0,62**	0,55**	0,46**	0,36**	0,54**	-0,33**	0,48**	0,30*
ENC176	0,30*	0,68**	0,66**	0,49**	0,53**	0,25*	0,53**	-0,30*	0,48**	0,29*
ENF 191	0,41**	0,55**	0,49**	0,51**	0,43**	0,32*	0,48**	-0,18	0,34**	0,37**
ENU140	0,43**	0,62**	0,57**	0,52**	0,37**	0,18	0,36**	-0,16	0,21	0,32*
EGAC183	0,32*	0,69**	0,66**	0,46**	0,46**	0,37*	0,52**	-0,09	0,48**	0,35**

* $p < 0,05$ – statystycznie istotna korelacja, ** $p < 0,01$ – statystycznie wysoce istotna korelacja.

Tab. 18. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami oznaczonymi metodami fluorescencyjnymi (log kom.·ml⁻¹) a bakteriami oznaczonymi metodami klasycznymi (log jtk·ml⁻¹) w wodzie rzeki Łyny

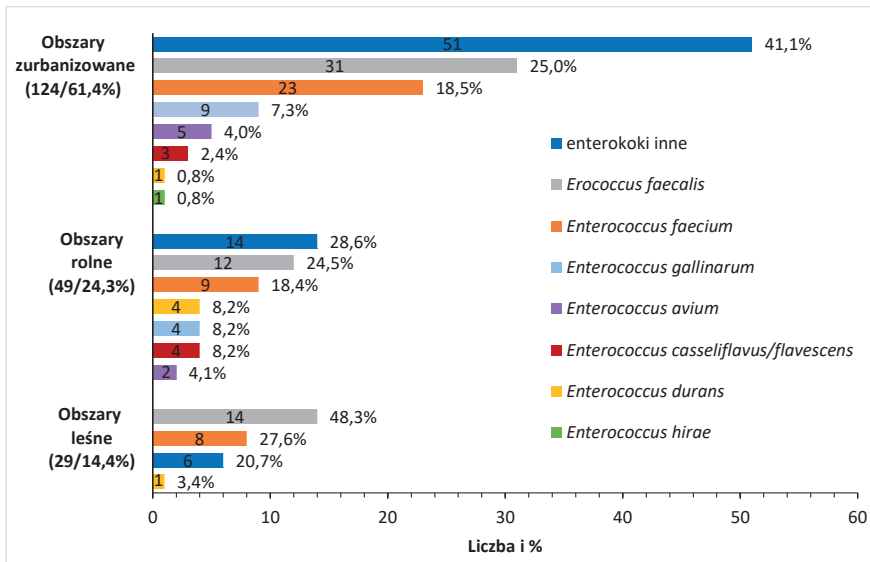
Grupy bakterii	Grupy bakterii												
	OLB	EUB338	LAB158	ENC38i	ENC176	ENF 191	ENU140	EGAC183	A ₂₂	A ₃₇	TC	FC	E
EUB338	0,92**	–											
LAB158	0,68**	0,57**	–										
ENC38i	0,75**	0,63**	0,85**	–									
ENC176	0,68**	0,59**	0,67**	0,82**	–								
ENF 191	0,81**	0,74**	0,70**	0,82**	0,67**	–							
ENU140	0,75**	0,77**	0,71**	0,71**	0,65**	0,81**	–						
EGAC183	0,78**	0,71**	0,72**	0,80**	0,73**	0,82**	0,81**	–					
A ₂₂	0,61**	0,57**	0,36**	0,35**	0,40**	0,49**	0,50**	0,44**	–				
A ₃₇	0,72**	0,71**	0,55**	0,66**	0,69**	0,77**	0,72**	0,71**	0,55**	–			
TC	0,65**	0,60**	0,50**	0,61**	0,55**	0,58**	0,54**	0,63**	0,48**	0,60**	–		
FC	0,57**	0,53**	0,29*	0,39**	0,32*	0,55**	0,47**	0,49**	0,52**	0,46**	0,54**	–	
E	0,47**	0,51**	0,25	0,33**	0,47**	0,42**	0,55**	0,45**	0,41**	0,45**	0,42**	0,41**	–
E _{VAN}	0,47**	0,47**	0,22	0,25	0,23	0,50**	0,53**	0,44**	0,52**	0,36**	0,32**	0,59**	0,55**

5.4.2. Analiza zależności pomiędzy oznaczanymi grupami mikroorganizmów a parametrami fizyko-chemicznymi w analizowanych ściekach

Przeprowadzona analiza korelacji Pearsona (wyniki badań poddano transformacji logarytmicznej) (N=150, braki danych usuwano przypadkami) pomiędzy parametrami mikrobiologicznymi i fizykochemicznymi w badanych ściekach wykazała brak statystycznie istotnej korelacji pomiędzy drobnoustrojami oznaczanymi metodami klasycznymi a parametrami fizyko-chemicznymi w ściekach nieoczyszczonych. W ściekach oczyszczonych korelacje statystycznie istotne ujemne ($p > 0,05$) stwierdzono jedynie pomiędzy liczebnością A_{22} a ChZT ($r = -0,91$) oraz między FC a $N_{NO_2^-}$ ($r = -0,88$) i FC a $N_{NO_3^-}$ ($r = -0,11$).

5.5. Identyfikacja ilościowa i jakościowa szczepów enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny

Ze wszystkich próbek wody rzeki Łyny pobranych do badań wyizolowano 955 kolonii bakterii, które wstępnie zakwalifikowano do rodzaju *Enterococcus*. Odzyskano i potwierdzono przynależność gatunkową 202 szczepów. Wśród nich zidentyfikowano 7 różnych gatunków: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens* (Rys. 23). Najmniejszą liczebność (29 szczepów) i różnorodność gatunkową enterokoków (3 gatunki) stwierdzono w próbkach wody płynącej przez tereny leśne. W rzece płynącej przez obszary rolne zidentyfikowano 6 różnych gatunków wśród 49 izolowanych szczepów. Największą liczbę szczepów (124) i gatunków (7) oznaczono w wodzie pobieranej z terenów zurbanizowanych. *E. faecalis* był dominującym gatunkiem w analizowanych próbkach wody bez względu na miejsce ich poboru (Tab. 21). Udział procentowy tego gatunku na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych wynosił odpowiednio 48,3%, 24,50% i 25,0%. Drugim najczęściej izolowanym gatunkiem był *E. faecium*, którego udział procentowy w wodzie zmieniał się od 18,5 do 27,6 %, odpowiednio na terenach rolnych, zurbanizowanych i leśnych. Skład procentowy pozostałych izolowanych gatunków niezależnie od obszaru, z którego pobierano próbki rzeki do badań, był dużo niższy i nie przekraczał 10% (Rys. 23).



Rys. 23. Liczba i skład procentowy poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych

Ocenę wpływu 13 parametrów fizyko-chemicznych oznaczanych równoległe podczas poboru próbek oraz miejsca i czasu wyznaczonego do badań na liczbę poszczególnych gatunków enterokoków przeprowadzono za pomocą korelacji Pearsona przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Obszary badań i rozmieszczenie stanowisk badawczych korelowało w sposób statystycznie istotny ($p < 0,01$) jedynie z liczebnością enterokoków określonych jako inne. W sezonach badawczych, bez względu na sposób użytkowania zlewni, przeważnie największe liczebności i różnorodność gatunkową oznaczanych drobnoustrojów stwierdzano wiosną i latem, mniejsze zimą i jesienią. Jedynie *E. gallinarum* częściej izolowano jesienią. Jednak analiza Pearsona nie wykazała statystycznie istotnego wpływu sezonu badawczego na skład gatunkowy i liczebność enterokoków w badanych próbkach rzeki za wyjątkiem *E. gallinarum*. Wśród 13 analizowanych parametrów fizykochemicznych 7 wpływało statystycznie istotnie ($p < 0,05$) na liczebności oznaczanych gatunków bakterii. Statystycznie istotne korelacje stwierdzono pomiędzy temperaturą i pH wody a liczebnością *E. faecalis* i *E. faecium*. Stwierdzono też istotne statystycznie różnice pomiędzy liczebnością *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* a różnymi związkami azotu, fosforu i węgla (POC) (Tab 19).

Tab. 19. Statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji Pearsona ($p < 0,05$) między liczebnościami poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyna a właściwościami fizyko-chemicznymi

Zmienna	Oznaczone współczynniki korelacji istotne z $p < 0,050$, N=150 (Braki danych usuwano przypadkami)							
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>avium</i>	<i>Enterococcus:</i>			inne enterokoki
				<i>hirae</i>	<i>gallinarum</i>	<i>casseliflavus/flavescens</i>		
Obszar	0,091	0,118	-0,050	0,158	0,125	0,186	0,079	0,423**
Sezon	0,032	0,075	0,007	0,073	-0,058	0,330*	0,223	0,209
Stanowisko	0,107	0,005	-0,060	0,167	0,211	0,100	0,026	0,443**
Temp.	0,393*	0,315*	0,163	0,211	0,042	0,091	0,116	0,153
Ph	0,284*	0,296*	0,091	0,097	0,060	0,071	0,017	0,014
TDS	-0,349*	-0,200	0,088	0,044	-0,007	0,051	-0,046	-0,089
POC	0,244	0,189	0,036	0,135	0,285*	-0,051	-0,020	0,053
N _{NH4} ⁺	-0,032	0,106	0,263*	0,079	0,038	0,337*	0,082	0,047
N _{NO2} ⁻	0,021	0,043	0,042	0,101	0,326*	0,122	0,026	0,177
P _{PO4} ³⁻	-0,065	-0,096	0,254*	0,075	0,101	-0,088	0,085	0,034

*statystycznie istotne korelacje ($p < 0,05$), **statystycznie istotne korelacje ($p < 0,001$)

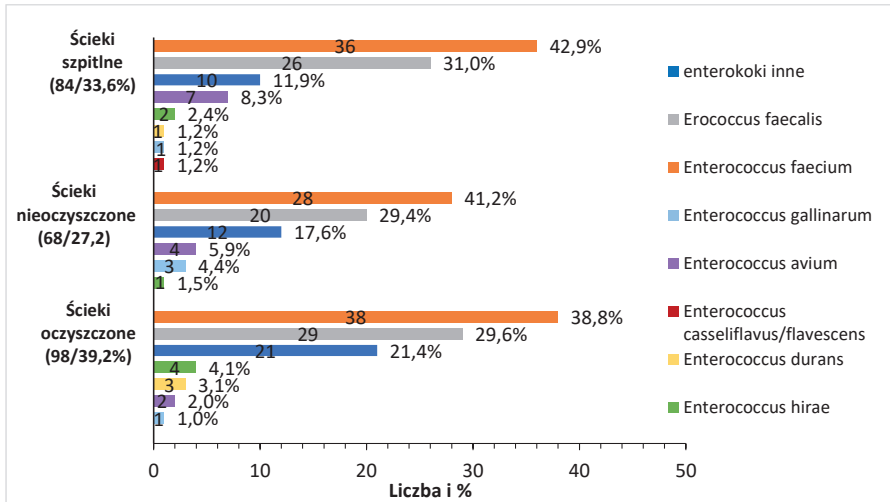
5.6. Różnorodność gatunkowa i skład procentowy enterokoków w ściekach szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyna

W latach 2009-2015 w ściekach szpitalnych oraz komunalnych (nieoczyszczonych i oczyszczonych) z olsztyńskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” wśród 378 wyizolowanych bakterii określonych jako potencjalne enterokoki potwierdzono przynależność gatunkową i rodzajową 250 szczepów. Wśród izolowanych szczepów oznaczono 7 różnych gatunków enterokoków. Były to: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*. Szczepy niezidentyfikowane do gatunku określono jako inne enterokoki (Rys. 24, Tab. 21).

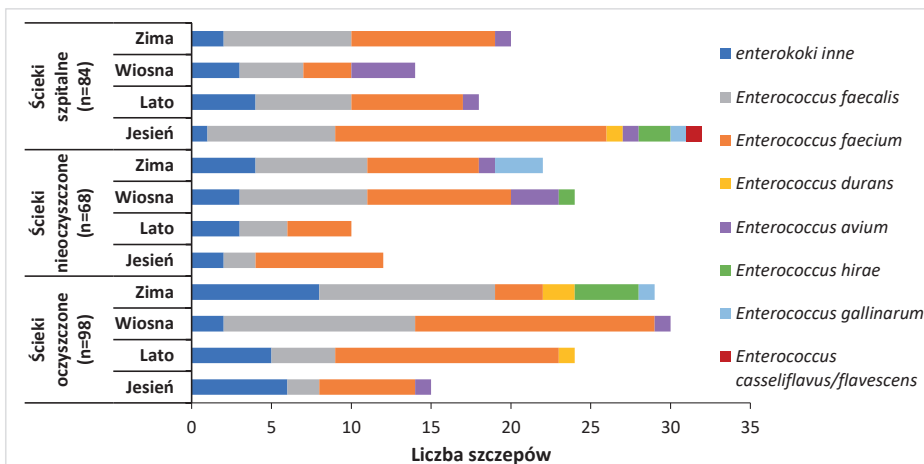
W ściekach szpitalnych gdzie potwierdzono przynależność gatunkową /rodzajową 84 izolatów dominował *E. faecium* (42,9%), na drugim miejscu oznaczono *E. faecalis* (31,0%) i kolejno *E. avium* (8,3%). Pozostałe 4 zidentyfikowane gatunki (*E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*) nie przekraczały 2,5% wśród oznaczonych enterokoków. Inne enterokoki stanowiły 11,9% oznaczanych izolatów. W sezonach badawczych największą liczebność szczepów (32) i różnorodność gatunkową (7) oznaczano jesienią.

Ze ścieków nieoczyszczonych wyizolowano 68 szczepów enterokoków, wśród których zidentyfikowano 5 gatunków. Najczęściej występował *E. faecium* (41,2%), następnie *E. faecalis* (29,4%) i *E. avium* (5,9%). W badanych ściekach *E. hirae* i *E. gallinarum* oznaczano rzadko, a ich udział procentowy nie przekraczał 5,0% wśród zidentyfikowanych szczepów. Największe liczebności szczepów izolowanych z nieoczyszczonych ścieków oznaczano wiosną (24) i zimą (22).

W ściekach oczyszczonych różnorodność gatunkowa izolowanych 98 szczepów była większa niż w ściekach nieoczyszczonych. Wśród zidentyfikowanych gatunków *E. faecium* był izolowany najczęściej i stanowił 38,8%. Wśród oznaczanych izolatów 29,6% stanowił *E. faecalis* i 4,1% *E. hirae*. Inne zidentyfikowane gatunki nie przekraczały w badanych ściekach 3,1%. Podobnie jak w ściekach nieoczyszczonych największą liczbę gatunków enterokoków izolowano wiosną (30 szczepów) (Rys. 24, 25).



Rys. 24. Liczba i skład procentowy poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków



Rys. 25. Liczba i różnorodność gatunkowa enterokoków izolowanych ze ścieków szpitalnych, surowych i oczyszczonych w poszczególnych sezonach badawczych

Na podstawie analizy współczynnika korelacji Pearsona ($p < 0,05$) istotne dodatnie lub ujemne korelacje stwierdzono pomiędzy temperaturą a liczebnością szczepów *E. gallinarum*; ChZT a *E. faecium* oraz formami węgla rozpuszczonego DOC a *E. faecium*. Wysoką statystycznie istotną korelację ($r > 0,05$) stwierdzono między enterokokami innymi, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae* a zawartością $N_{NO_2^-}$ w ściekach (Tab. 20).

Tab. 20. Statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji Pearsona ($p < 0,05$) między liczebnościami poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych a właściwościami fizyko-chemicznymi

Zmienna	Oznaczone współczynniki korelacji istotne z $p < 0,05$					
	<i>Enterococcus</i> :					inne enterokoki
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>hirae</i>	<i>gallinarum</i>	
ścieki	0,218	0,125	0,286	0,286	-0,099	0,383
sezony	-0,071	0,179	0,375	0,375	-0,080	-0,248
temp.	-0,151	0,444	-0,433	-0,433	-0,589*	-0,222
pH	-0,251	0,382	-0,295	-0,295	-0,408	-0,152
DO	0,173	0,244	0,253	0,253	0,032	0,435
ChZT	-0,296	-0,529*	-0,171	-0,171	0,104	-0,274
TDS	-0,180	0,050	-0,149	-0,149	-0,003	-0,259
$N_{NH_4^+}$	-0,151	-0,112	-0,169	-0,169	0,133	-0,450
$N_{NO_2^-}$	0,581*	0,009	0,665**	0,665**	0,150	0,516*
$N_{NO_3^-}$	0,279	0,402	0,393	0,393	0,015	0,367
$P_{PO_4^{3-}}$	-0,171	-0,162	-0,327	-0,327	0,027	-0,408
P_{og}	-0,225	-0,197	-0,332	-0,332	0,021	-0,437
TOC	-0,345	-0,507	-0,162	-0,162	0,237	-0,454
DOC	-0,211	-0,517*	-0,105	-0,105	0,142	-0,419
POC	-0,323	-0,470	-0,147	-0,147	0,282	-0,354

*statystycznie istotne korelacje ($p < 0,05$), **statystycznie istotne korelacje ($p < 0,001$)

Tab. 21. Enterokoki zidentyfikowane w wodzie rzeki Łyny, ściekach komunalnych i szpitalnych w latach 2009-2015

Stanowiska	Liczba szczepów	Liczba (%) szczepów:								
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus/flavescens</i>	inne enterokoki	
Obszary leśne										
1 L	12	3 (25,0)	6 (50,0)	1 (8,3)	0	0	0	0	0	2 (16,7)
2 L	7	4 (57,1)	3 (42,9)	0	0	0	0	0	0	0
3 L	7	1 (14,3)	4 (57,1)	0	0	0	0	0	0	2 (28,6)
4 L	3	0	1 (33,3)	0	0	0	0	0	0	2 (66,7)
suma (%)	29	8 (27,6)	14 (48,3)	1 (3,4)	0	0	0	0	0	6 (20,7)
Obszary rolne										
5 R	20	5 (25,0)	10 (50,0)	0	0	0	0	0	0	5 (25,0)
9 R	10	4 (40,0)	0	0	2 (20,0)	0	0	2 (20,0)	0	0
14 R	11	0	0	4 (36,4)	0	0	0	0	0	7 (63,6)
15 R	8	0	2 (25,0)	0	0	0	0	2 (25,0)	0	2 (25,0)
suma (%)	49	9 (18,4)	12 (24,5)	4 (8,2)	2 (4,1)	0	0	4 (8,2)	0	14 (28,6)
Obszary zurbanizowane										
6 Z	25	8 (32,0)	6 (24,0)	0	1 (4,0)	0	0	0	2 (8,0)	8 (32)
7 Z	16	4 (25,0)	1 (6,3)	0	0	0	0	5 (31,3)	0	6 (37,5)
8 Z	12	2 (16,7)	1 (8,3)	0	0	0	0	4 (33,3)	0	5 (41,7)
10 Z	15	3 (20,0)	3 (20,0)	1 (6,7)	1 (6,7)	0	0	0	1 (6,7)	6 (40)
11 Z	17	0	5 (29,4)	0	0	0	0	0	0	12 (70,6)
12 Z	15	1 (6,7)	7 (46,7)	0	0	0	0	0	0	7 (46,7)
13 Z	24	5 (20,8)	8 (33,3)	0	3 (12,5)	1 (4,2)	0	0	0	7 (29,2)
suma (%)	124	23 (18,5)	31 (25,0)	1 (0,8)	5 (4)	1 (0,8)	0	9 (7,3)	3 (2,4)	51 (41,1)
Ścieki										
szpitalne	84	36 (42,9)	26 (31,0)	1 (1,2)	7 (8,3)	2 (2,4)	1 (1,2)	1 (1,2)	0	10 (11,9)
nicozyszczone	68	28 (41,2)	20 (29,4)	0	4 (5,9)	1 (1,5)	3 (4,4)	0	0	12 (17,6)
oczyszczone	98	38 (38,8)	29 (29,6)	3 (3,1)	2 (2,0)	4 (4,1)	1 (1,0)	0	0	21 (21,4)
suma (%)	250	102 (40,8)	75 (30,0)	4 (1,6)	13 (5,2)	7 (2,8)	2 (0,8)	1 (0,4)	0	43 (17,2)

5.7. Wyznaczanie antybiotykooporności bakterii enterokoków w wodzie rzeki Łyny

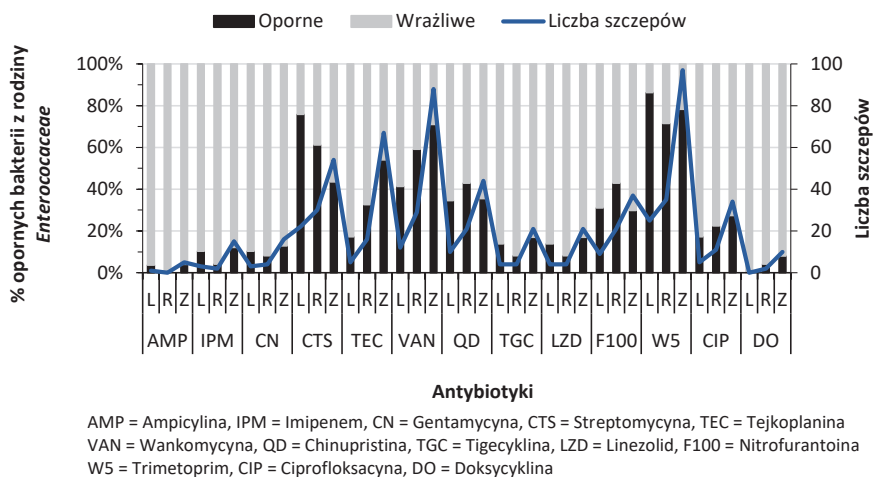
W celu określenia lekowrażliwości 202 szczepów bakterii wyizolowanych z wód Łyny, zakwalifikowanych do rodziny *Enterococaceae*, użyto 11 rodzajów antybiotyków i 2 chemioterapeutyków (należących do 10 różnych grup). Na tej podstawie klasyfikowano izolaty do kategorii MDR (szczepy wielolekooporne) i XDR (szczepy o rozszerzonej oporności). Jako szczepy wielolekooporne (MDR) zakwalifikowano 139 izolatów stanowiących 68,8% wszystkich zidentyfikowanych bakterii (Tab 22). Nie stwierdzano szczepów zaliczanych do XDR. Liczba i rodzaje antybiotyków, na które wykazywały oporność badane szczepy była różna (0-9 różnych antybiotyków) i zależała od oznaczonego gatunku oraz miejsca, z którego izolowano szczepy. Przeważnie szczepy MDR izolowane z wody płynącej przez obszary rolne (31 izolatów – 63,3%) i zurbanizowane (87 izolatów – 70,2%) były niewrażliwe na większą liczbę antybiotyków w porównaniu ze szczepami z terenów zalesionych (20 izolatów – 68,9%) (Tab. 22). W wodzie rzeki Łyny zidentyfikowano 7 różnych gatunków enterokoków, wśród których najczęściej zaliczane do kategorii MDR były *Enterococcus faecalis* (50 izolatów, – 87,7%) i *Enterococcus faecium* (33 izolaty, - 82,5%). Wśród 7 oznaczonych gatunków wielolekooporne szczepy *E. faecalis* dominowały w wodzie z obszarów zalesionych i rolnych stanowiąc 78,6 i 100% MDR. W próbkach rzeki pobieranej z terenów zurbanizowanych w większym procencie (91,3%) do MDR klasyfikowano szczepy *E. faecium*. Oznaczone gatunki *E. durans* i *E. hirae*, izolowane z wody płynącej przez obszary zalesione i zurbanizowane w 100% należały do MDR jednak ze względu na małą ich liczbę (identyfikowano pojedyncze szczepy) nie mogą stanowić miarodajnej oceny przy określaniu dominujących wielolekoopornych gatunków w próbkach wody rzeki. W klasie MDR pozostałe oznaczone gatunki enterokoków (*E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*) mieściły się w przedziale od 0% (tereny zalesione) do 66,7% (tereny zurbanizowane). Enterokoki określone jako inne stanowiły 33,3%, 64,3% oraz 52,9% szczepów MDR odpowiednio w wodzie z obszarów zalesionych, rolnych i zurbanizowanych (Tab. 22).

Tab. 22. Liczba i procent wielolekoopornych szczepów (MDR) enterokoków w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane

	<i>Enterococcus:</i>							inne enterokoki (n=71)
	<i>faecium</i> (n=40)	<i>faecalis</i> (n=57)	<i>durans</i> (n=6)	<i>avium</i> (n=7)	<i>hirae</i> (n=1)	<i>gallinarum</i> (n=13)	<i>casseliflavus/ flavescens</i> (n=7)	
obszary zalesione n=29								
szczepy	8	14	1	0	0	0	0	6
MDR*	6 (75,0)	11 (78,6)	1 (100)	0	0	0	0	2 (33,3)
obszary rolne n=49								
szczepy	9	12	4	2	0	4	4	14
MDR	6 (66,7)	12 (100)	2 (50,0)	0	0	2 (50,0)	0	9 (64,3)
obszary zurbanizowane n=124								
szczepy	23	31	1	5	1	9	3	51
MDR	21 (91,3)	27 (87,0)	1 (100)	3 (60,0)	1 (100)	6 (67,7)	2 (67,7)	27 (52,9)
Rzeka Łyna n=202								
szczepy	40	57	6	7	1	13	7	71
MDR	33 (82,5)	50 (87,7)	4 (66,7)	3 (42,8)	1 (100)	8 (61,5)	2 (28,6)	38 (53,5)

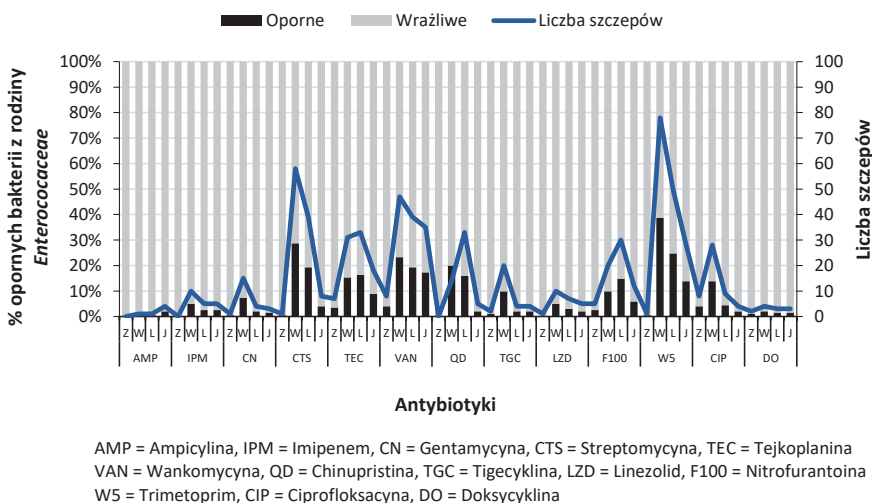
* liczba i procent (%) szczepów wielolekoopornych MDR

Oporność izolowanych szczepów na 13 różnych środków przeciwdrobnoustrojowych była różna w zależności od testowanego gatunku i źródła jego pochodzenia. W próbkach wody pobieranych z obszarów zalesionych najwięcej szczepów (22 i 25) było opornych na streptomycynę CTS (75,9%) i trimetoprim W5 (86,2%). Najniższy procent oporności badanych izolatów (0 i 3,4%) określano w stosunku do doksycykliny DO i ampicyliny AMP. W rzece płynącej przez obszary użytkowane rolniczo najwięcej szczepów (71,4 i 61,2%) było opornych na trimetoprim W5 i streptomycynę CTS, najmniej na doksycyklinę DO (4,1%). Natomiast szczepy izolowane z wody pochodzącej z terenów zurbanizowanych były najczęściej odporne na trimetoprim W5 (78,2%) i niskie stężenia wankomycyny VAN (71,7%). Najmniejszą oporność badane szczepy wykazywały na ampicylinę AMP (4,0%) i doksycyklinę DO (8,1%) (Rys. 26).



Rys. 26. Rozkład procentowy antybiotykoopornych bakterii z rodziny *Enterococaceae* izolowanych z wody rzeki Łyny płynącej przez obszary: L – leśne, R – rolne, Z – zurbanizowane.

W sezonach badawczych największą oporność na badane środki przeciwdrobnoustrojowe wśród izolowanych enterokoków (od 0 do kilkudziesięciu % szczepów) oznaczano przeważnie w wodzie rzeki wiosną i latem. Jedynie liczba opornych szczepów *E. gallinarum*, była większa jesienią. Wśród szczepów opornych na badane antybiotyki dominowały *E. faecium* (od 0 na AMP do 21 na W5) i *E. faecalis* (od 0 na AMP do 30 na W5). Najmniejszą liczbę opornych szczepów (od 0 na AMP do 10 na TEC) stwierdzano natomiast zimą (Tab. 23, Rys. 27, 28).

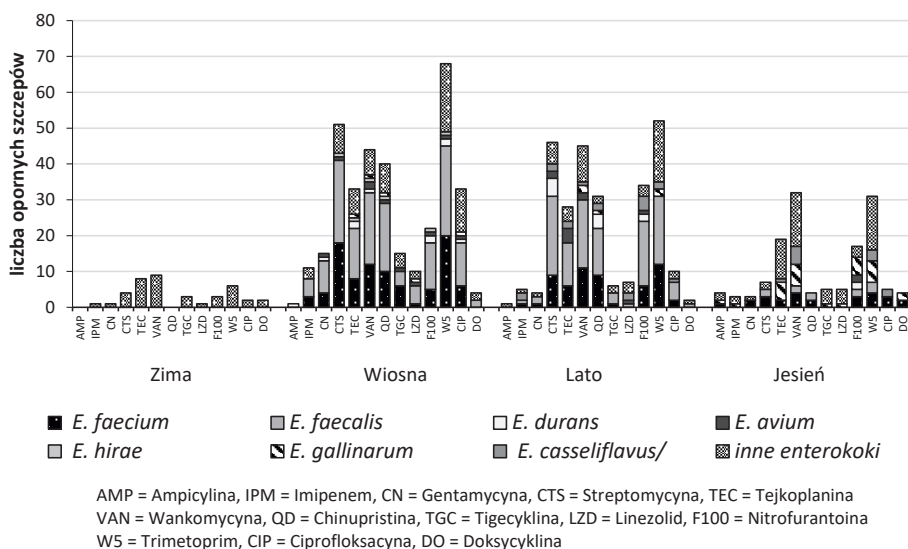


Rys. 27. Procentowe występowanie antybiotykoopornych bakterii z rodziny *Enterococaceae* izolowanych z wody rzeki Łyny w poszczególnych sezonach badawczych: Z – zima, W – wiosna, L – lato, J – jesień

Tab. 23. Profil oporności na antybiotyki gatunków enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny płynącej przez obszary :L – leśne, R – rolne, Z – zurbanizowane

Anty-biotyk	Strefa	obszar	Liczba (%) opornych <i>Enterococcus</i> :							Inne enterokoki
			<i>faecium</i>	<i>faecalis</i>	<i>durans</i>	<i>avium</i>	<i>hirae</i>	<i>gallinarum</i>	<i>casseli-flavus/flavescens</i>	
		L	n=8	n=14	n=1	n=0	n=0	n=0	n=0	n=6
		R	n=9	n=12	n=4	n=2	n=0	n=4	n=4	n=14
		Z	n=23	n=31	n=1	n=5	n=1	n=9	n=3	n=51
AMP	< 8	L	0,0	0,0	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0
		Z	1 (4,8)	0,0	0,0	0,0	0,0	1(11,1)	0,0	3 (5,9)
IPM	18	L	1 (12,5)	2 (14,3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	2 (22,2)	2 (16,7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Z	3 (13,0)	5 (15,2)	0,0	0,0	0,0	1 (11,1)	2 (66,7)	6 (11,8)
CN	< 8	L	0,0	2 (14,3)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	0,0	4 (33,3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Z	7 (33,3)	5 (15,2)	0,0	1 (20)	0,0	0,0	0,0	3 (5,9)
CTS	< 19	L	5 (62,5)	12 (85,7)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	4 (66,7)
		R	9 (100)	11 (91,7)	4 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Z	15	24 (72,7)	0,0	3 (60)	1 (100)	0,0	2 (66,7)	9 (17,6)
TEC	< 16	L	0,0	4 (28,6)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	1 (16,7)
		R	3	4 (33,3)	0,0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
		Z	13	18 (54,5)	1 (100)	2 (40)	1 (100)	6 (66,7)	3 (100)	23 (45,1)
VAN	< 12	L	3	8 (57,1)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1 (16,7)
		R	5	7 (58,3)	0,0	2	0,0	4 (100)	2 (50)	9 (75)
		Z	19	26 (78,8)	1 (100)	2 (40)	1 (100)	7 (77,8)	2 (66,7)	31 (60,8)
QD	< 20	L	1 (75)	6 (50,7)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4 (66,7)
		R	1	12 (100)	4 (100)	0,0	0,0	2 (50)	2 (50)	10 (83,3)
		Z	16	26 (78,8)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 (3,9)
TGC	< 15	L	2	2 (14,3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Z	5	5 (15,2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 (3,9)
LZD	< 19	L	0	1 (78,6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	0	2 (50)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 (16,7)
		Z	1(4,3)	3 (64,5)	0,0	0,0	0,0	2 (22,2)	2 (66,7)	13(25,4)
F100	< 15	L	2 (25)	6 (42,9)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	3	10 (83,3)	2 (50)	0,0	0,0	2 (50)	2 (50)	4 (33,3)
		Z	8	13 (41,3)	1 (100)	2 (40)	1 (100)	5 (55,6)	2 (66,7)	5 (9,8)
W5	< 15	L	7	13 (92,9)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	4 (66,7)
		R	9	12 (100)	0,0	0,0	0,0	2 (50)	2 (50)	10 (83,3)
		Z	21 (10)	29 (87,9)	1 (100)	3 (60)	1 (100)	6 (66,7)	3 (100)	34 (66,7)
CIP	≤15	L	4 (50)	2 (14,3)	1 (100)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	1	4 (33,3)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4 (33,3)
		Z	6	11 (33,3)	0,0	1 (20)	0,0	1 (11,1)	2 (33,3)	14 (27,5)
DO	≤12	L	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 (16,7)
		Z	1 (4,8)	3 (9,1)	0,0	0,0	0,0	2 (22,2)	0,0	4 (7,8)

P = Ampicylina, IPM = Imipenem, CN = Gentamycyna, CTS = Streptomycyna, TEC = Tejkoplanina, VAN = Wankomycyna, QD = Chinupristina, TGC = Tigecyklina, LZD = Linezolid, F100 = Nitrofurantoina, W5 = Trimetoprim, CIP = Ciprofloksacyna, DO = Doksycyklina



Rys. 28. Liczba antybiotykoopornych szczepów enterokoków izolowanych z wody rzeki w poszczególnych sezonach badawczych.

Określono również zakres wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) antybiotyków glikopeptydowych na zidentyfikowane enterokoki. Testowano dwa najczęściej wykorzystywane w leczeniu antybiotyki wankomycynę i tejkoplaninę. Przeważnie szczepy wykazujące oporność na większe stężenia obu antybiotyków oznaczano w próbkach wody pobieranych z terenów zurbanizowanych, natomiast mniej ich było w wodzie z obszarów rolnych i zalesionych (Tab. 24, 25). *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. faecium* i *E. faecalis* izolowane z próbek wody pobieranych z obszarów zurbanizowanych w wodzie rzeki Łyny były odporne na największe wartości MIC wankomycyny ($4 - 1024 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Gatunki *E. faecium* i *E. faecalis* wykazywały również oporność na największe stężenia tejkoplaniny z wartościami MIC: od 1 do $16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (szczepy z obszarów zalesionych), od 1 do $32 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (szczepy z obszarów rolniczych) i od 1 do $128 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (szczepy z obszarów zurbanizowanych). Wśród enterokoków, bez określonej przynależności gatunkowej były szczepy, dla których MIC wankomycyny wynosił $1024 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (1 szczep izolowany z wody na obszarach rolniczych i 7 szczepów izolowanych z wody na obszarach zurbanizowanych). Ponadto dla tej grupy bakterii 6 szczepów enterokoków izolowanych z rzeki na obszarach rolnych i 8 z rzeki na obszarach zurbanizowanych wykazywało również znaczną oporność na tejkoplaninę z wartościami MIC ($1 - 256 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Wśród wszystkich oznaczanych bakterii z rodziny *Enterococaceae* odpowiednio: 31,0%, 37,4% i 57,1% szczepów izolowanych z próbek wody rzeki meandrującej obszary zalesione, zurbanizowane i rolne wykazywało oporność na wankomycynę w granicach MIC $32 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Największa liczba izolowanych szczepów niezależnie od miejsca ich pochodzenia

i przynależności gatunkowej wykazywała oporność w zakresie niskich stężeń wankomycyny z wartościami MIC od 4 – 6 mg·l⁻¹ (Tab. 24).

Tab. 24. Liczba szczepów z określonymi wartościami MIC (mg·l⁻¹) wankomycyny izolowanych z wody rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych

Nazwa	Liczba szczepów	MIC (mg·l ⁻¹) wankomycyny									
		4	6	8	16	32	64	128	256	512	1024
Obszary leśne											
<i>E. faecium</i>	8	4	4	3	3	3	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	14	8	7	5	5	5	0	0	0	0	0
<i>E. durans</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
inne enterokoki	6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
suma	29	14	12	9	10	9	0	0	0	0	0
%		48,3	41,4	31,0	34,5	31,0	0	0	0	0	0
Obszary rolne											
<i>E. faecium</i>	9	6	6	6	6	6	3	2	2	2	1
<i>E. faecalis</i>	12	7	6	4	4	4	1	0	0	0	0
<i>E. durans</i>	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. avium</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. gallinarum</i>	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	4	4	4	2	2	2	0	0	0	0	0
inne enterokoki	14	10	10	10	10	10	6	6	6	6	1
suma	49	33	32	28	28	28	12	10	10	10	4
%		67,3	65,3	57,1	57,1	57,1	24,5	20,4	20,4	20,4	8,2
Obszary zurbanizowane											
<i>E. faecium</i>	23	21	19	16	8	5	4	3	3	3	1
<i>E. faecalis</i>	31	26	21	20	14	10	6	5	5	4	2
<i>E. durans</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
<i>E. avium</i>	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>E. hirae</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	9	7	7	5	5	5	4	3	3	3	0
<i>E. casseliflavus</i>	2	3	2	2	2	2	1	1	0	0	0
inne enterokoki	51	31	31	28	27	21	21	21	21	13	7
suma	123	92	84	75	59	46	39	35	34	25	12
%		75,8	68,3	61,0	48,0	37,4	31,7	28,4	27,6	20,3	9,7

Tab. 25. Liczba szczepów z określonymi wartościami MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) tejkoplaniny izolowanych z wody rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych

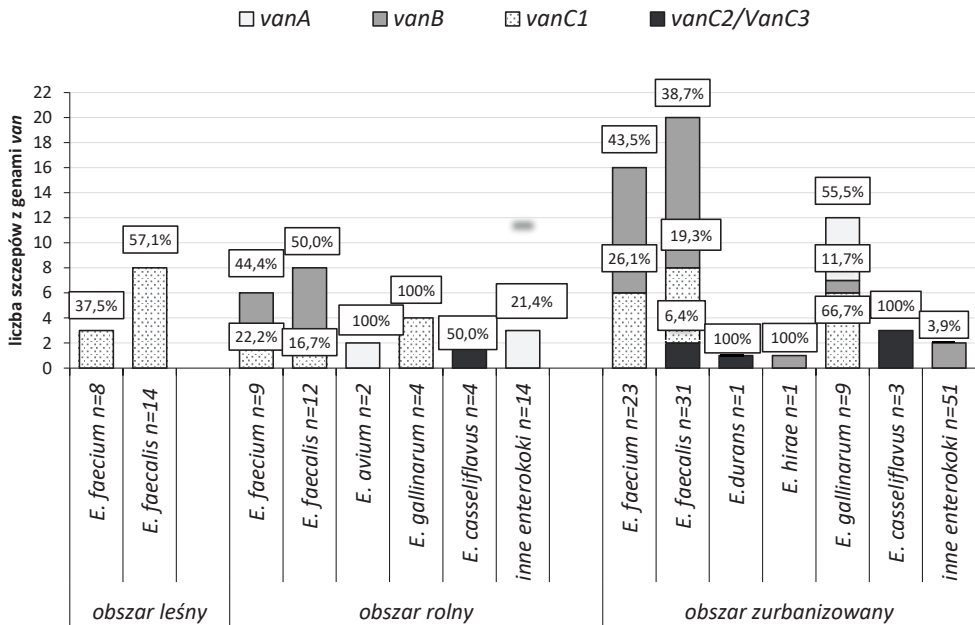
Nazwa	Liczba szczepów	MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) tejkoplaniny					
		1	16	32	64	128	256
obszary leśne							
<i>E. faecium</i>	8	3	0	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	14	9	3	0	0	0	0
<i>E. durans</i>	1	0	0	0	0	0	0
inne enterokoki	6	1	1	1	1	1	0
suma	29	13	4	1	1	1	0
%		44,8	13,8	3,4	3,4	3,4	0
obszary rolne							
<i>E. faecium</i>	9	5	3	1	0	0	0
<i>E. faecalis</i>	12	7	4	1	0	0	0
<i>E. durans</i>	4	0	0	0	0	0	0
<i>E. avium</i>	2	2	2	2	2	0	0
<i>E. gallinarum</i>	4	4	0	0	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	4	0	0	0	0	0	0
inne enterokoki	14	10	7	7	7	6	6
suma	49	28	16	11	9	6	6
%		57,1	32,6	22,4	18,4	12,2	12,2
obszary zurbanizowane							
<i>E. faecium</i>	23	20	8	3	2	1	0
<i>E. faecalis</i>	31	23	10	7	7	2	0
<i>E. durans</i>	1	1	1	1	1	1	0
<i>E. avium</i>	5	3	3	2	1	0	0
<i>E. hirae</i>	1	1	1	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	9	4	4	4	3	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	2	2	1	0	0	0	0
inne enterokoki	51	24	23	22	16	11	8
suma	123	78	51	39	30	15	8
%		63,4	41,5	31,7	24,4	12,2	6,5

5.8. Występowanie genów oporności na wankomycynę *van* wśród enterokoków w wodzie rzeki Łyny przez zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Wśród oznaczonych gatunków enterokoków określano obecność genów warunkujących oporność na wankomycynę: *van A*, *van B*, *van C1* i *van C2/C3* metodą PCR. Wśród 202 oznaczonych izolatów należących do *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny 91 (45,0%) posiadało badane geny *van*. Liczba opornych izolatów na niskie stężenia wankomycyny ($6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) była większa i wynosiła 139 (68,8%) co wskazuje, że 48 szczepów posiadało inne determinanty oporności niż uwzględnione w obecnym badaniu.

W badanych izolatach z oznaczoną fenotypową opornością na wankomycynę (bez względu na miejsce ich pochodzenia) dominowały geny *vanB*, *vanC1* i *vanC2/C3*. Geny *van B* najczęściej występowały

wśród *E. faecium* (10 szczepów) i *E. faecalis* (12 szczepów). Stanowiły one odpowiednio 43,5 i 38,7 % wszystkich izolowanych szczepów z rzeki Łyny płynącej przez obszary zurbanizowane. W wodzie z terenów zurbanizowanych geny *vanB* oznaczano również u 1 szczepu *E. hirae* (100%), 1 szczepu *E. gallinarum* (11,7%), i 2 izolatów *Enterokoków* określanych jako inne (3,9%). Geny te identyfikowano również u 4 szczepów *E. faecium* (44,4%) i 6 szczepów *E. faecalis* (50,0%) izolowanych z wody płynącej przez obszary rolnicze. Geny *vanC1* oznaczano wśród *E. faecium*, *E. faecalis* i *E. gallinarum* izolowanych z próbek wody pochodzących z terenów leśnych, rolnych i zurbanizowanych. Dominację genów *vanC1* stwierdzono głównie u gatunków *E. gallinarum* izolowanych z Łyny z obszarów rolniczych (4 szczepy – 100%) i zurbanizowanych (6 szczepów – 66,7%). Geny *vanC2/C3* stwierdzano głównie u szczepów *E. casseliflavus* i *E. durans* i izolowanych z wody na obszarach rolnych i zurbanizowanych gdzie stanowiły odpowiednio 50,0% i 100% wśród wyodrębnionych tam izolatów. Spośród genów warunkujących oporność na wankomycynę, *vanA* został wykryty, w 2 szczepach *E. avium* i 3 szczepach enterokoków niezidentyfikowanych do gatunku izolowanych z próbek wody płynącej przez obszary rolne. Szczepy te stanowiły odpowiednio 100 i 21,4% wśród wszystkich oznaczonych szczepów na tym obszarze. Gen *vanA* wykryto również w 5 (55,5%) szczepach *E. gallinarum* izolowanych z wody płynącej przez obszary zurbanizowane (Rys. 29).



Rys. 29. Udział liczbowy i procentowy enterokoków z oznaczonymi genami *van* izolowanymi z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych

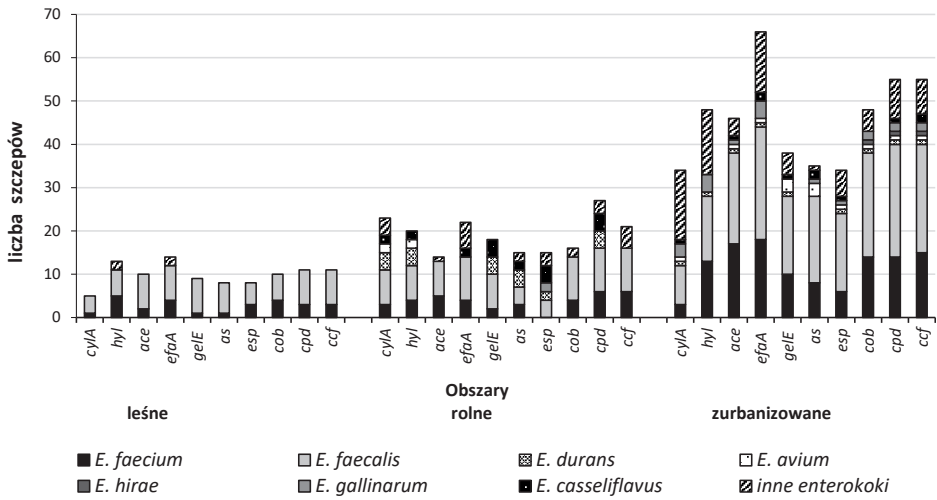
5.9. Identyfikacja genów kodujących czynniki wirulencji wśród enterokoków izolowanych z rzeki Łyny

DNA 202 szczepów enterokoków, analizowano w celu wykrycia obecności genów kodujących czynniki wirulencji warunkujące ich chorobotwórczość. Geny wirulencji, determinujące 10 najważniejszych czynników zjadliwości obejmowały: (*cytA*) - cytolizynę; (*hyl*) - hialuronidazę; (*ace*) - białko powierzchniowe wiążące kolagen; (*efaA*) – adhezyny ściany komórkowej; (*gelE*) – żelatynazę; (*as*) - substancję agregującą; *esp* – zewnątrzkomórkowe białko powierzchniowe oraz (*cpd*, *cob*, *ccf*) - feromony płciowe biorące udział w wymianie materiału genetycznego.

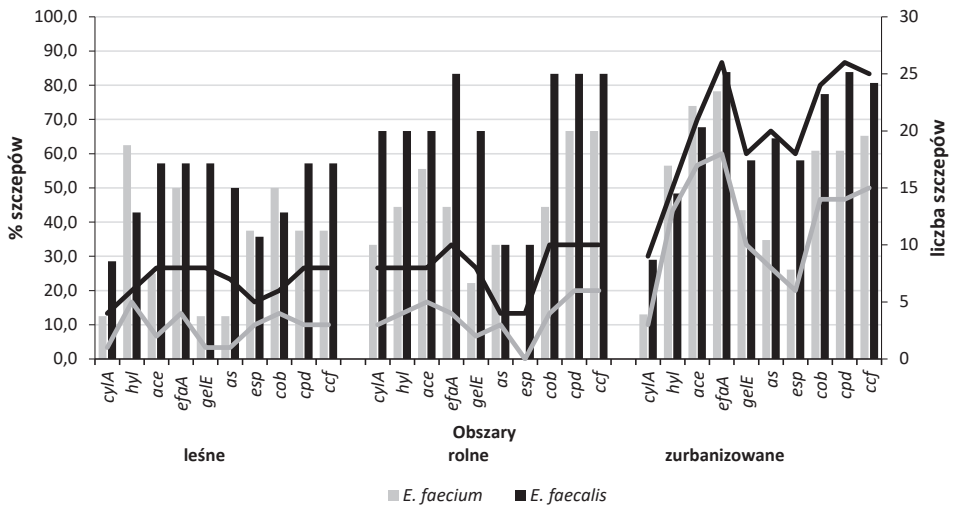
Łącznie 107 (53,0%) izolatów posiadało badane geny wirulencji. Najwięcej izolatów 102 (50,5%) posiadało gen *efaA* (14, 22, 66 z wody płynącej odpowiednio przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane). Pozytywnych dla genu *cpd* były 93 (46,0%) izolaty (11, 27, 55 z wody płynącej odpowiednio przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane). Suma szczepów z innymi oznaczanymi genami wirulencji wahała się od 57 (28,2%) w przypadku *esp* do 87 (43,1%) posiadających gen *ccf*. Najmniejszą liczbę szczepów posiadających geny wirulencji oznaczano w próbkach wody płynącej przez tereny leśne, natomiast więcej ich izolowano z wody pobieranej z terenów rolnych i zurbanizowanych (Tab. 26). Największy procentowy udział szczepów posiadających geny *hyl* (44,8%) i *esp* (27,6%) izolowano z rzeki na terenach zalesionych. Procentowy udział szczepów z genami *cytA* (46,9%), *gelE* (36,7%), *as* (30,6%), *esp* (30,6%) i *cpd* (55,1%) był największy w rzece na terenach rolnych, a geny *ace* (37,1%), *efaA* (53,2%), *cob* (38,7%) i *ccf* (44,4%) najczęściej oznaczano w szczepach izolowanych z rzeki płynącej przez obszary zurbanizowane. Procentowy udział czynników wirulencji wśród dwóch najczęściej oznaczanych gatunków *E. faecium* i *E. faecalis* w wodzie rzeki Łyny kształtował się na różnym poziomie w zależności od miejsca poboru badanych próbek i oznaczanego gatunku. Częściej geny wirulencji stwierdzano u *E. faecalis* (28,6 - 83%) niż u *E. faecium* (0 - 78,3%). *E. faecium* najczęściej posiadał geny *hyl* (62,5% szczepów izolowanych z wód płynących przez obszary zalesione), *cpd* i *ccf* (66,7% szczepów z wód płynących przez tereny rolne) oraz *efaA* (78,3% szczepów izolowanych z wód płynących przez tereny zurbanizowane). Wśród *E. faecalis* izolowanych z wód płynących przez lasy 57,1% szczepów miało geny *ace*, *efaA*, *as*, *cpd* i *ccf*, 83,3% szczepów z wód na obszarach rolnych było pozytywnych dla genów *efaA*, *cob*, *cpd*, *ccf*. U 83,9% izolowanych szczepów z rzeki na obszarach zurbanizowanych stwierdzono obecność genów *EfaA* i *cpd*. Obserwowano wpływ sposobu użytkowania zlewni na liczbę szczepów posiadających geny wirulencji. W rzece płynącej przez obszary zalesione udział procentowy *E. faecium* i *E. faecalis* zawierających geny wirulencji przeważnie nie przekraczał 60,0%, natomiast w wodzie z obszarów rolniczych i zurbanizowanych 90,0% (Tab. 26, Rys. 30, 31). W sezonach badawczych procentowy udział enterokoków posiadających geny wirulencji, był przeważnie największy wiosną i latem. W rzece płynącej przez obszary zalesione liczbę izolatów z genami wirulencji częściej oznaczano latem (6,9 - 20,7%), natomiast w wodzie z obszarów rolnych i zurbanizowanych przeważnie więcej ich było wiosną (0 - 21,8%). Najmniejsze liczebności i udział procentowy szczepów wirulentnych stwierdzano w sezonie zimowym (0 - 3,2%) i jedynie w wodzie z obszarów zurbanizowanych (Rys. 32).

Tab. 26. Liczba i procent występowania genów wirulencji u bakterii z rodziny *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny

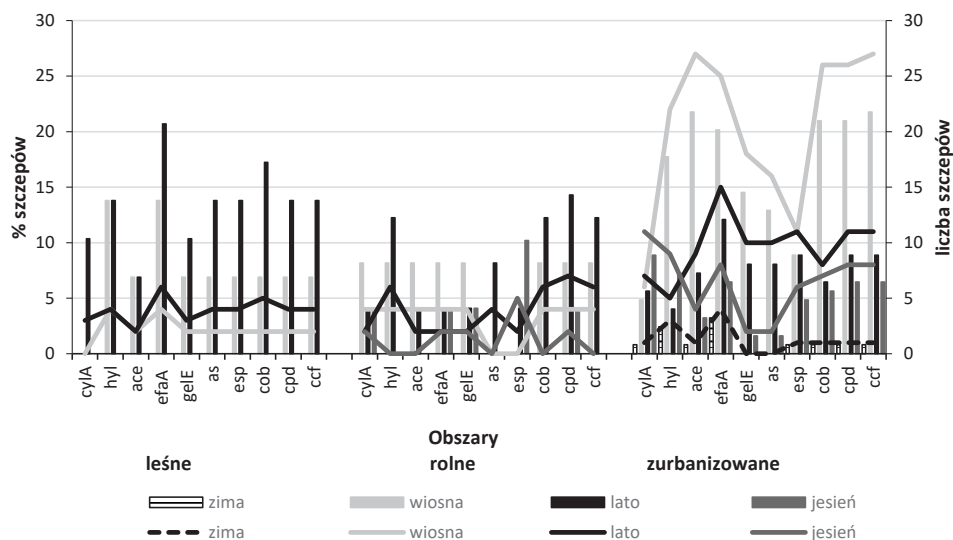
Gatunki	Liczba szcze- pów	Liczba i procent (%) izolatów z genami wirulencji:									
		<i>cylA</i>	<i>hyl</i>	<i>ace</i>	<i>efaA</i>	<i>gelE</i>	<i>as</i>	<i>esp</i>	<i>cob</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>
obszary leśne											
<i>E. faecium</i>	8	1(12,5)	5(62,5)	2(25,0)	4(50,0)	1(12,5)	1(12,5)	3(37,5)	4(50)	3(37,5)	3(37,5)
<i>E. faecalis</i>	14	4(28,6)	6(42,9)	8(57,1)	8(57,1)	8(57,1)	7(50,0)	5(35,7)	6(42,9)	8(57,1)	8(57,1)
<i>E. durans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
inne enterokoki	6	0	2(33,3)	0	2(33,3)	0	0	0	0	0	0
Suma (%)	29	5(17,2)	13(44,8)	10(34,5)	14(48,3)	9(31,0)	8(27,6)	8(27,6)	10(34,5)	11(37,9)	11(37,9)
obszary rolne											
<i>E. faecium</i>	9	3(33,3)	4(44,4)	5(55,6)	4(44,4)	2(22,2)	3(33,3)	0	4(44,4)	6(66,7)	6(66,7)
<i>E. faecalis</i>	12	8(66,7)	8(66,7)	8(66,7)	10(83,3)	8(66,7)	4(33,3)	4(33,3)	10(83,3)	10(83,3)	10(83,3)
<i>E. durans</i>	4	4(100)	4(100)	0	0	4(100)	4(100)	2(50,0)	0	4(100)	0
<i>E. avium</i>	2	2(100)	2(100)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	4	0	0	0	0	0	0	2(50,0)	0	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	4	2(50)	2(50)	0	2(50,0)	4(100)	2(50,0)	4(100)	0	4(100)	0
inne enterokoki	14	4(28,6)	0	1(7,1)	6(42,9)	0	2(14,3)	3(21,4)	2(14,3)	3(21,4)	5(35,7)
Suma (%)	49	23(46,9)	20(40,8)	14(28,6)	22(44,9)	18(36,7)	15(30,6)	15(30,6)	16(32,7)	27(55,1)	21(42,9)
obszary zurbanizowane											
<i>E. faecium</i>	23	3(13,0)	13(56,5)	17(73,9)	18(78,3)	10(43,5)	8(34,8)	6(26,1)	14(60,9)	14(60,9)	15(65,2)
<i>E. faecalis</i>	31	9(29,0)	15(48,4)	21(67,7)	26(83,9)	18(58,1)	20(64,5)	18(58,1)	24(77,4)	26(83,9)	25(65,2)
<i>E. durans</i>	1	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)
<i>E. avium</i>	5	1(20,0)	0	1(20,0)	1(20,0)	3(60)	3(20)	1(20)	1(20)	1(20)	1(20)
<i>E. hirae</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1(100)	1(100)	1(100)
<i>E. gallinarum</i>	9	3(33,3)	4(44,4)	1(11,1)	4(44,4)	0	1(11,1)	1(11,1)	2(22,2)	2(22,2)	2(22,2)
<i>E. casseliflavus</i>	3	1(33,3)	0	1(33,3)	2(66,7)	1(33,3)	2(66,7)	1(33,3)	0	1(33,3)	2(66,7)
inne enterokoki	51	16(31,4)	15(29,4)	4(7,8)	14(27,5)	5(9,8)	1(2,0)	6(11,8)	5(9,8)	9(17,6)	8(15,7)
Suma (%)	124	34(27,4)	48(38,7)	46(37,1)	66(53,2)	38(30,6)	35(28,2)	34(27,4)	48(38,7)	55(44,4)	55(44,4)



Rys. 30. Liczba szczepów poszczególnych gatunków enterokoków z genami wirulencji izolowanych z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych



Rys. 31. Udział procentowy i liczba wirulentnych *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z wód rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych



Rys. 32. Udział procentowy i liczba wirulentnych szczepów izolowanych z wód rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych w poszczególnych sezonach badawczych

5.10. Antybiotykooporność i wirulencja bakterii z rodziny *Enterococaceae* w ściekach

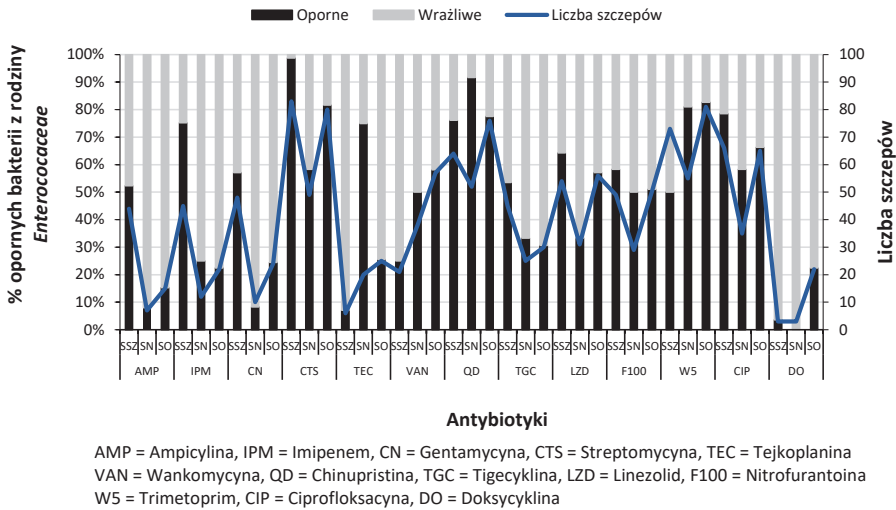
Szczepy wyizolowane ze ścieków szpitalnych (84), nieoczyszczonych (68) i oczyszczonych (98) poddano testom na antybiotykooporność uwzględniając 13 leków przeciwdrobnoustrojowych. Na tej podstawie klasyfikowano szczepy jako wielolekooporne MDR i o rozszerzonej oporności XDR. W ściekach szpitalnych zidentyfikowano 79 szczepów (94,0%) należących do MDR i 3(3,6%) do XDR. W ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych odpowiednio 66 (97,1%) i 91 (92,9%) szczepów było określonych jako MDR oraz 1 (1,5%) i 1 (1,0%) należało do XDR. MDR *E. faecium* dominował w ściekach szpitalnych 34 (94,4%) i nieoczyszczonych 27 (96,4%). Natomiast wielolekooporne *E. faecalis* częściej izolowano ze ścieków oczyszczonych 28 (96,6%). Pozostałe oznaczone gatunki (*E. durans*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus/flavescens*) izolowane z badanych ścieków były w 100 % zaliczane do MDR (Tab. 27).

Tab. 27. Liczba i procent wielolekoopornych (MDR) i o rozszerzonej oporności (XDR) enterokoków w ściekach

	<i>Enterococcus:</i>							
	<i>faecium</i>	<i>faecalis</i>	<i>durans</i>	<i>avium</i>	<i>hirae</i>	<i>gallinarum</i>	<i>casseliflavus/ flavescens</i>	inne entero- koki
	(n=102)	(n=75)	(n=4)	(n=13)	(n=7)	(n=5)	(n=1)	(n=43)
Ścieki szpitalne (n=84)								
szczepy	36	26	1	7	2	1	1	10
MDR*	34(94,4)	23(88,5)	1(100)	7(100)	2(100)	1(100)	1(100)	10(100)
XDR*	2(5,6)	1(3,8)	0	0	0	0	0	1(10,0)
Ścieki nieoczyszczone (n=68)								
szczepy	28	20	0	4	1	3	0	13
MDR	27(96,4)	19(95,0)	0	4(100)	1(100)	3(100)		13(100)
XDR	1(3,6)	0	0	0	0	0	0	0
Ścieki oczyszczone (n=98)								
szczepy	38	29	3	2	4	1	0	21
MDR	33(86,8)	28(96,6)	3(100)	2(100)	4(100)	1(100)	0	20(95,2)
XDR	1(2,6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

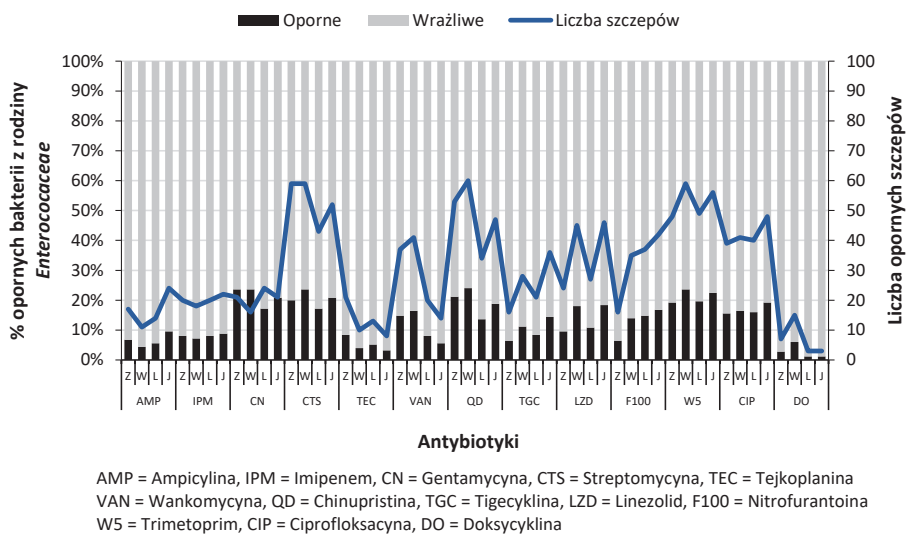
* Liczba i procent (%) wielolekoopornych szczepów MDR i XDR

Oporność izolowanych szczepów na 13 środków przeciwdrobnoustrojowych była różna w zależności od testowanego gatunku i źródła jego pochodzenia. W ściekach szpitalnych 83 szczepy (98,8%) były odporne na streptomycynę (CTS) i 66 (86,9%) na trimetoprim (W5). Przeważnie najmniej opornych (3,6 i 7,1%) szczepów było na doksycyklinę (DO) i tejkoplaninę (TEC). Wśród szczepów izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych obserwowano większą oporność na trimetoprim (W5) (81,0% i 82,7%) i qinupristinę (QD) (91,6% i 77,5%). Obserwowano również oporność na wankomycynę (VAN) (25,0 50,0 i 58,2 %) szczepów izolowanych odpowiednio ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych (Rys. 33).



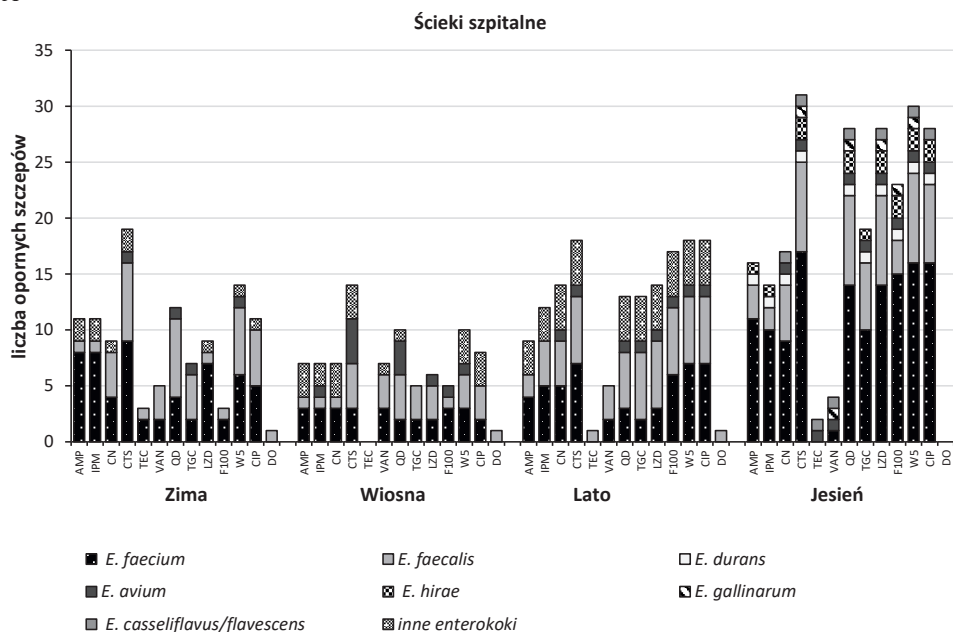
Rys. 33. Rozkład procentowy i liczba szczepów antybiotykoopornych bakterii z rodziny *Enterococaceae* izolowanych ze ścieków: SSZ – szpitalnych, SN –nieoczyszczonych, SO – oczyszczonych

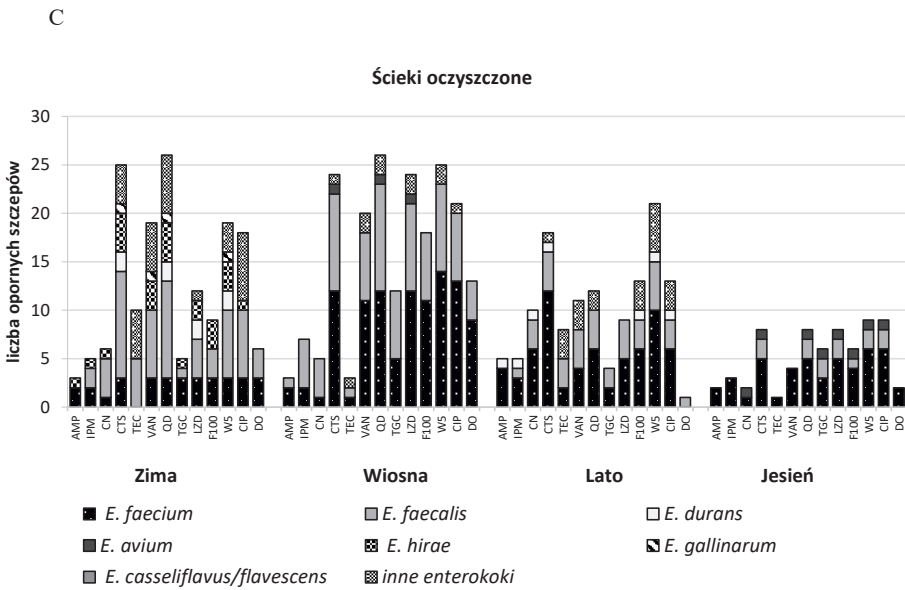
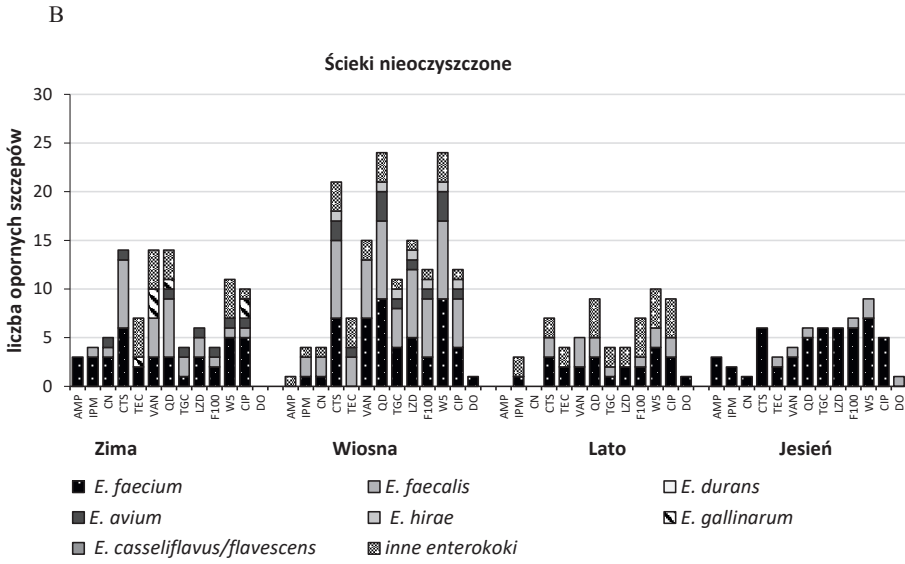
Identyfikowane gatunki wykazywały różnice w oporności na liczbę i rodzaj badanych antybiotyków w zależności od sezonu badań i źródła pochodzenia. W sezonach badawczych przeważnie najczęściej opornych izolatów wśród oznaczonych gatunków enterokoków identyfikowano jesienią w ściekach szpitalnych, natomiast zimą i wiosną w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych. Wśród dwóch najistotniejszych klinicznie gatunków *E. faecium* i *E. faecalis* najczęściej opornych izolatów oznaczano w ściekach szpitalnych jesienią (średnio 28% i 17% szczepów). W ściekach nieoczyszczonych oporne szczepy *E. faecium* występowały liczniej wiosną i jesienią (średnio 14% i 17% szczepów), a w oczyszczonych wiosną i latem (średnio 21 i 13% szczepów). Izolaty *E. faecalis* niewrażliwe na większą liczbę antybiotyków oznaczano częściej w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych zimą (średnio 10 i 17% szczepów) i wiosną (średnio 23 % szczepów) (Rys. 34, 35).



Rys. 34. Rozkład procentowy i liczba antybiotykoopornych szczepów bakterii z rodziny *Enterococaceae* izolowanych w poszczególnych sezonach badawczych ze ścieków

A





AMP = Ampicylina, IPM = Imipenem, CN = Gentamycyna, CTS = Streptomycyna, TEC = Tejkoplanina
 VAN = Wankomycyna, QD = Chinupristina, TGC = Tigecyklina, LZD = Linezolid, F100 = Nitrofurantoina
 W5 = Trimetoprim, CIP = Ciprofloksacyna, DO = Doksycyklina

Rys. 35. Rozkład procentowy antybiotykoopornych bakterii z rodziny *Enterococaceae* izolowanych ze ścieków: (A) szpitalnych, (B) nieoczyszczonych i (C) oczyszczonych w poszczególnych sezonach badawczych

Tab. 28. Profil oporności na antybiotyki gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków: szpitalnych (SSZ), nieoczyszczonych (SN) i oczyszczonych (SO)

Antybiotyk	Strefa (mm)	obszar	Liczba (%) opornych <i>Enterococcus</i> :							inne enterokoki
			<i>faecium</i>	<i>faecalis</i>	<i>durans</i>	<i>avium</i>	<i>hirae</i>	<i>gallinarum</i>	<i>casseli-flavus/flavescens</i>	
		SSZ	n=36	n=26	n=1	n=7	n=2	n=1	n=1	n=10
		SN	n=28	n=20	n=0	n=4	n=1	n=3	n=0	n=13
		SO	n=38	n=29	n=3	n=2	n=4	n=1	n=0	n=21
AMP	< 8	SSZ	26(72,2)	7(26,9)	1(100)	0	1(50)	0	0,0	9(90)
		SN	6(21,4)	0(0,0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1(8,3)
		SO	10(26,3)	1(3,4)	1(33,3)	0,0	1(25,0)	0,0	0,0	2(9,5)
IPM	18	SSZ	26(72,2)	8(30,8)	1(100)	1(14,3)	1(50)	0,0	0,0	8(80)
		SN	7(25,0)	3(15,0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3(25,0)
		SO	10(26,3)	8(27,6)	1(33,3)	0,0	1(25,0)	0,0	0,0	2(9,5)
CN	< 8	SSZ	22(61,1)	14(53,8)	1(100)	2(28,6)	0,0	0,0	1(100)	8(80)
		SN	5(17,8)	3(15,0)	0,0	1(25,0)	0,0	0,0	0,0	1(8,3)
		SO	9(23,7)	11(37,9)	1(33,3)	1(50)	1(25,0)	0,0	0,0	1(4,8)
CTS	< 19	SSZ	36(100)	25(96,2)	1(100)	7(100)	2(100)	1(100)	1(100)	10(100)
		SN	22(78,6)	17(85,0)	0,0	3(75,0)	1(100)	0,0	0,0	7(58,3)
		SO	33(86,8)	27(93,1)	3(100)	2(100)	4(100)	1(100)	0,0	10(47,6)
TEC	< 16	SSZ	2(5,6)	2(7,7)	0,0	1(14,3)	1(50)	0,0	1(100)	0,0
		SN	6(21,4)	4(20,0)	0,0	1(25,0)	0,0	1(33,3)	0,0	9(75,0)
		SO	4(10,5)	9(31)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11(52,4)
VAN	< 12	SSZ	8(22,2)	9(34,6)	0,0	1(14,3)	0,0	1(100)	1(100)	1(10)
		SN	15(53,6)	14(70,0)	0,0	0,0	0,0	3(100)	0,0	6(50,0)
		SO	22(57,9)	18(62,1)	0,0	0,0	3(75,0)	1(100)	0,0	13(61,9)
QD	< 20	SSZ	23(63,9)	24(92,3)	1(100)	6(85,7)	2(100)	1(100)	1(100)	6(60)
		SN	20(71,4)	17(85,0)	0,0	4(100)	1(100)	1(33,3)	0,0	11(91,7)
		SO	27(71,1)	27(93,1)	2(66,7)	2(100)	4(100)	1(100)	0,0	13(61,9)
TGC	< 15	SSZ	16(44,4)	19(73,1)	1(100)	3(42,9)	1(50)	0,0	0,0	5(50)
		SN	12(42,9)	7(35,0)	0,0	2(50,0)	1(100)	0,0	0,0	4(33,3)
		SO	13(34,2)	12(41,4)	0,0	1(50)	1(25,0)	0,0	0,0	3(14,3)
LZD	< 19	SSZ	23(63,9)	18(69,2)	1(100)	3(42,9)	2(100)	1(100)	1(100)	5(50)
		SN	16(57,1)	9(45,0)	0,0	2(50,0)	1(100)	0,0	0,0	4(33,3)
		SO	25(65,8)	19(65,5)	2(66,7)	2(100)	2(50)	1(100)	0,0	6(28,6)
F100	< 15	SSZ	26(72,2)	11(42,3)	1(100)	3(42,9)	2(100)	1(100)	0,0	5(50)
		SN	13(46,4)	9(45,0)	0,0	2(50,0)	1(100)	0,0	0,0	6(50,0)
		SO	24(63,2)	14(48,3)	3(100)	1(50)	3(75,0)	0,0	0,0	7(33,3)
W5	< 15	SSZ	32(88,9)	23(88,5)	1(100)	4(57,1)	2(100)	1(100)	1(100)	9(90)
		SN	25(89,3)	13(65,0)	0,0	4(100)	1(100)	0,0	0	12(100)
		SO	34(89,5)	23(79,3)	1(100)	1(50)	3(75,0)	1(100)	0,0	16(76,2)
CIP	≤15	SSZ	30(83,3)	21(80,8)	1(100)	2(28,6)	2(100)	0,0	1(100)	9(90)
		SN	17(60,7)	8(40,0)	0,0	2(50,0)	1(100)	2(66,7)	0,0	7(58,3)
		SO	28(73,7)	19(65,5)	1(33,3)	1(50)	1(25,0)	0,0	0,0	15(71,4)
DO	≤12	SSZ	0,0	3(11,5)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		SN	2(7,1)	1(5,0)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		SO	14(36,8)	8(27,6)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

AMP = Ampicylina, IPM = Imipenem, CN = Gentamycyna, CTS = Streptomycyna, TEC = Tejkoplanina
VAN = Wankomycyna, QD = Chinupristina, TGC = Tigecyklina, LZD = Linezolid, F100 = Nitrofurantoina,
W5 = Trimetoprim, CIP = Ciprofloksacyna, DO = Doksyacyklina

5.10.1. Oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wankomycyny i tejkoplaniny wobec szczepów enterokoków izolowanych ze ścieków

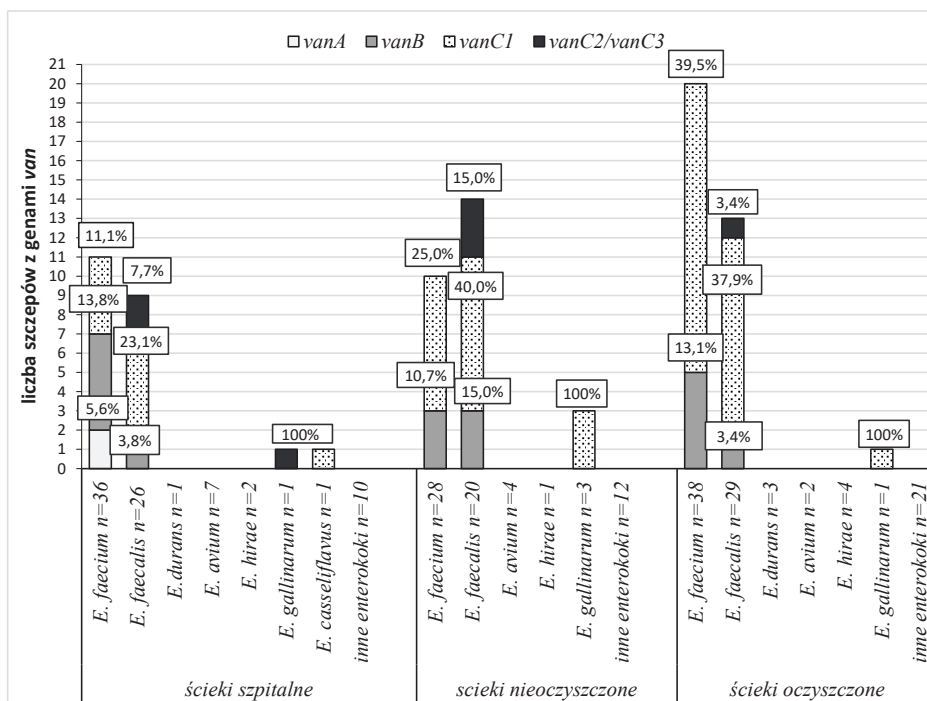
Największy średni procent oporności na wysokie stężenia wankomycyny i tejkoplaniny wśród zidentyfikowanych gatunków oznaczono dla *E. faecium* i *E. faecalis*. W ściekach szpitalnych identyfikowano odpowiednio średnio 3,7% i 1,3% szczepów, których MIC wankomycyny był $\geq 256 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. W ściekach nieoczyszczonych MIC $\geq 256 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ osiągało odpowiednio 3,6 i 5,6%, a w ściekach oczyszczonych 5,3 i 0% oznaczanych szczepów. Największy procent szczepów opornych (22,2–62,1%) stwierdzano w przypadku MIC = $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Gatunki *E. faecium* i *E. faecalis* wykazywały również oporność na tejkoplaninę o MIC = $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Procentowy udział szczepów tych gatunków w ściekach: szpitalnych wynosił 15,4 i 10,1%, nieoczyszczonych 10,7 i 10% i oczyszczonych 18,4 i 37,9%. Wyższe stężenia tejkoplaniny (od 16 do $256 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MIC) oznaczano dla szczepów enterokoków niezidentyfikowanych izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych (średnio 43,3% szczepów) i oczyszczonych (średnio 40% szczepów) (Tab. 29).

Tab. 29. Procentowy udział szczepów z określonymi wartościami MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) wankomycyny izolowanych ze ścieków

Gatunek	Liczba szczepów	Minimalne stężenie hamujące ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)					
		wankomycyny			tejkoplaniny		
		MIC ≥ 4	MIC ≥ 6 – ≥ 16	MIC ≥ 32 – ≥ 128	MIC ≥ 256	MIC ≥ 1	MIC ≥ 16 –256
ścieki szpitalne							
<i>E. faecium</i>	36	22,2%	21,3%	13,9%	3,7%	15,4%	0,0%
<i>E. faecalis</i>	26	34,6%	29,5%	12,8%	1,3%	10,7%	0,0%
<i>E. durans</i>	1	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. avium</i>	7	14,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. hirae</i>	2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. gallinarum</i>	1	100%	100%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. casseliflavus</i>	1	100%	66,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
inne enterokoki	10	10%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
ścieki nieoczyszczone							
<i>E. faecium</i>	28	53,6%	38,1%	9,5%	3,6%	10,7%	0,7%
<i>E. faecalis</i>	20	46,7%	45,6%	16,7%	5,6%	10,0%	0,7%
<i>E. avium</i>	4	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. hirae</i>	1	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. gallinarum</i>	3	100,0%	100,0%	33,3%	0,0%	100,0%	0,0%
inne enterokoki	12	50,0%	50,0%	50,0%	38,9%	50,0%	43,3%
ścieki oczyszczone							
<i>E. faecium</i>	38	57,9%	46,5%	17,5%	5,3%	18,4%	4,7%
<i>E. faecalis</i>	29	62,1%	39,1%	10,3%	0,0%	37,9%	3,4%
<i>E. durans</i>	3	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. avium</i>	2	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. hirae</i>	4	75,0%	58,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
<i>E. gallinarum</i>	1	100%	66,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
inne enterokoki	21	61,9%	50,8%	47,6%	36,5%	47,6%	40,0%

5.10.2. Wykrywanie genów oporności na wankomycynę (*van*) wśród oznaczonych ścieków szpitalnych

Wśród 250 szczepów różnych enterokoków wyizolowanych ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych geny oporności na wankomycynę *van* wykrywano głównie u *E. faecium* i *E. faecalis*. W ściekach szpitalnych oznaczono dwa szczepy (5,6%) *E. faecium* posiadające gen *vanA*, 5 szczepów (13,8%) z genami *vanB* i 4 szczepy (11,1%) z genami *vanC1*. W ściekach nieoczyszczonych udział procentowy genów *vanB* w oznaczanych izolatach był niższy i wynosił 10,7%, a genów *vanC1* wzrósł do 25,0%. Największą liczbę izolatów (20) *E. faecium* z genami oporności na wankomycynę (*vanB* – 13,1% i *vanC1* – 39,5% szczepów) oznaczono w ściekach oczyszczonych. W przypadku gatunku *E. faecalis* stwierdzono większy udział genów oporności na wankomycynę w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych. Oznaczono głównie występowanie genów *vanC1* (40,0% szczepów w ściekach nieoczyszczonych i 37,9% w ściekach oczyszczonych). Szczepy z oznaczonymi genami *vanB* u tych bakterii nie przekraczały 4,0% w ściekach szpitalnych i oczyszczonych oraz 14% w ściekach nieoczyszczonych. U wszystkich gatunków *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*, izolowanych z badanych ścieków wykryto geny *vanC1* i *vanC2/C3* warunkujące naturalną oporność tych bakterii na wankomycynę.



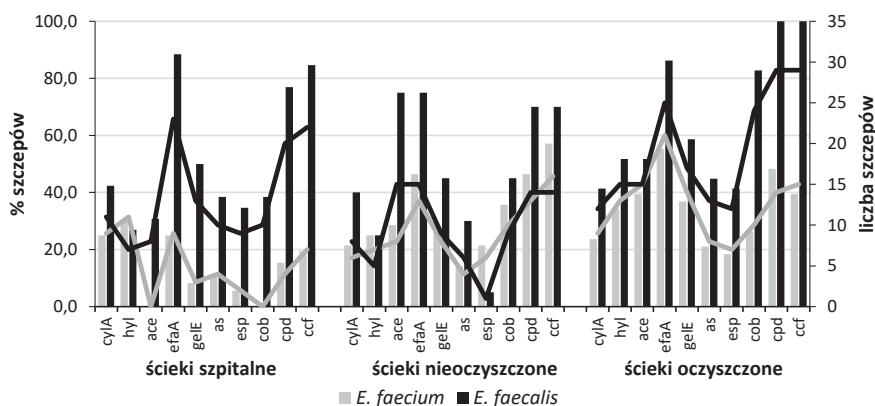
Rys. 36. Liczba genów *van* występujących wśród wszystkich izolowanych szczepów enterokoków fenotypowo wrażliwych i opornych na wankomycynę, izolowanych ze ścieków

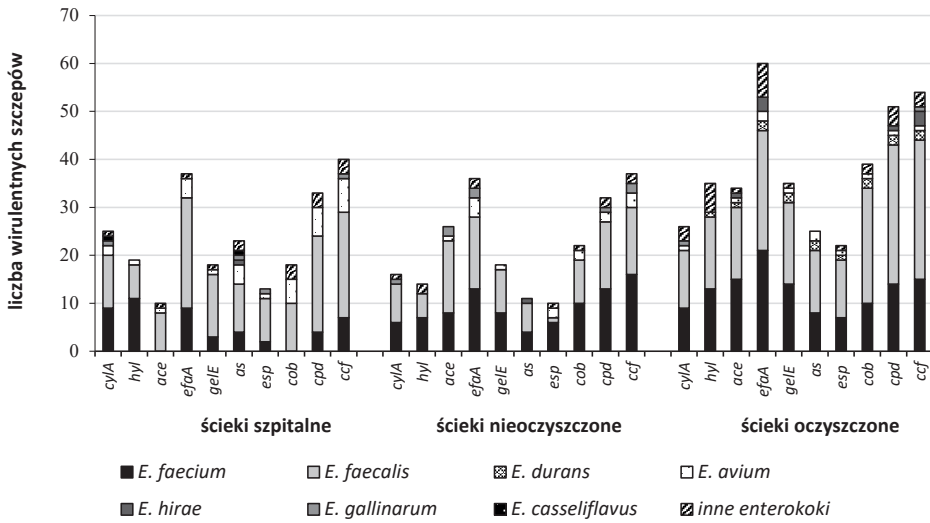
5.10.3. Identyfikacja czynników wirulencji wśród izolowanych enterokoków ze ścieków

Wśród 250 szczepów enterokoków izolowanych ze ścieków 188 (75,2%) szczepów posiadało różne geny wirulencji. Największy odsetek izolatów posiadał geny *efaA* i *ccf*. Geny te występowały odpowiednio u 44,6 i 48,2% szczepów izolowanych ze ścieków szpitalnych, u 51,5 i 52,9% szczepów izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych oraz u 55,3 i 39,5% szczepów izolowanych ze ścieków oczyszczonych. Najmniej oznaczono szczepów (12,0%) pozytywnych dla genów *ace* w ściekach szpitalnych oraz *esp* (13,2 % i 18,4 %) w ściekach nieoczyszczonych i oczyszczonych. Obserwowano wzrost składu procentowego (od kilku do około 10%) niektórych genów wirulencji (*hyl*, *ace*, *efaA*, *geIE*, *as*, *esp*) w ściekach oczyszczonych w stosunku do ich liczby oznaczanej w ściekach szpitalnych i nieoczyszczonych. Oznaczana różnorodność gatunków posiadających geny wirulencji również była największa w ściekach oczyszczonych (Tab. 30). Stwierdzono większą pulę genów wirulencji wśród szczepów *E. faecalis* niż u *E. faecium*. Procentowy udział szczepów *E. faecalis* z różnymi genami zjadliwości wahał się od 26,9% do 84,6% w ściekach szpitalnych, od 5,0 do 75,0% w ściekach nieoczyszczonych i od 41,4 do 100% w ściekach oczyszczonych (Tab. 30). Natomiast udział procentowy szczepów wirulentnych *E. faecium* w ściekach szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych mieścił się odpowiednio w przedziałach: 0 – 30,6%; 14,3 – 57,1% i 18,4 – 55,3%. Przeważnie największy odsetek (ponad 70%) szczepów *E. faecalis* i (od 40 do 60% szczepów) *E. faecium* (izolowanych z badanych ścieków) posiadało geny *efaA*, *cpd* i *ccf*. Jedynie w ściekach szpitalnych największy udział procentowy (ponad 20%) miały szczepy *E. faecium* posiadające geny *cyIA*, *hyl* i *ace* (Rys 37). Wśród gatunków *E. durans*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus/favescens* liczba szczepów wirulentnych i różnorodność oznaczonych genów wirulencji (średnio oznaczano 5 genów wirulencji) była przeważnie mniejsza niż u *E. faecium* i *E. faecalis* (średnio oznaczano 10 genów wirulencji) (Rys. 38). W sezonach badawczych większy procentowy udział enterokoków posiadających geny wirulencji oznaczano zimą (średnio 11,4%) i jesienią (średnio 7,7%) wśród szczepów pochodzących ze ścieków szpitalnych oraz zimą (średnio 12,6 %) i wiosną (średnio 15,9%) wśród szczepów izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych. Przeważnie najmniej szczepów wirulentnych (średnio 2,8% – 10,6%) oznaczano w próbkach ścieków latem (Rys. 39).

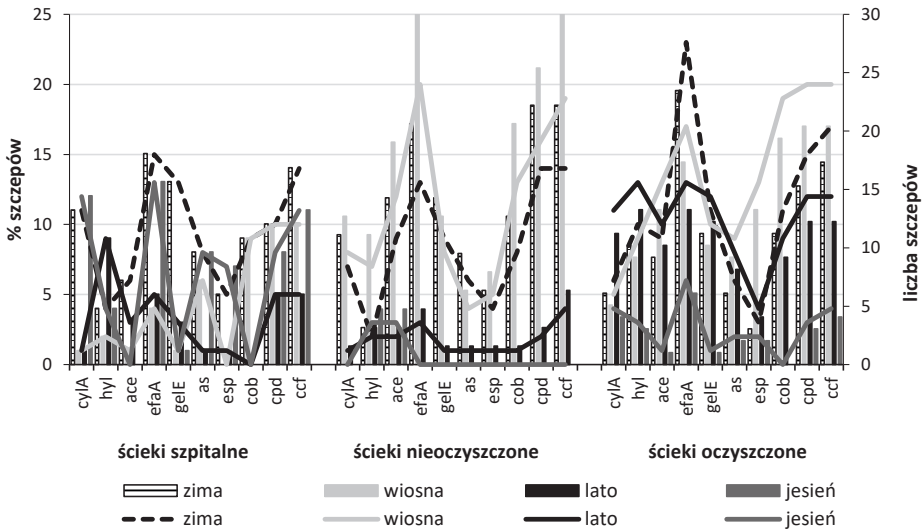
Tab. 30. Liczba i procent występowania genów wirulencji u bakterii *Enterococaceae* w ściekach szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny

Liczba i procent (%) izolatów z genami wirulencji:											
Gatunki	Liczba szczepów	<i>cytA</i>	<i>hyl</i>	<i>ace</i>	<i>efaA</i>	<i>gelE</i>	<i>as</i>	<i>esp</i>	<i>cob</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>
Ścieki szpitalne (SSZ)											
<i>E. faecium</i>	36	9(25,0)	11(30,6)	0	9(25,0)	3(8,3)	4(11,1)	2(5,6)	0	4(11,1)	7(19,4)
<i>E. faecalis</i>	26	11(42,3)	7(26,9)	8(30,8)	23(88,5)	13(50,0)	10(38,5)	9(34,6)	10(38,5)	20(76,9)	22(84,6)
<i>E. durans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. avium</i>	7	2(28,6)	1(14,3)	1(14,3)	4(57,1)	1(14,3)	4(57,1)	1(14,3)	5(71,4)	6(85,7)	7(100)
<i>E. hirae</i>	1	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	1	1(100)	0	0	0	0	1(100)	1(100)	0	0	1(100)
<i>E. casseliflavus</i>	1	1(100)	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	0
inne enterokoki	10	1(10)	0	1(10)	1(10)	1(10)	2(20)	0	3(30)	3(30)	3(30)
Suma (%)	83	25(30,1)	19(22,9)	10(12,0)	37(44,6)	18(21,7)	23(15,7)	13(15,7)	18(21,7)	33(39,8)	40(48,2)
Ścieki nieoczyszczone (SN)											
<i>E. faecium</i>	28	6(21,4)	7(25,0)	8(28,6)	13(46,4)	8(28,6)	4(14,3)	6(21,4)	10(35,7)	13(46,6)	16(57,1)
<i>E. faecalis</i>	20	8(40,0)	5(25,0)	15(75,0)	15(75,0)	9(45,0)	6(30,0)	1(5,0)	9(45,0)	14(70)	14(70,0)
<i>E. avium</i>	4	0	0	0	3(75,0)	0	0	1(25,0)	1(25,0)	1(25,0)	2(50,0)
<i>E. hirae</i>	1	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	0
<i>E. gallinarum</i>	3	1(33,3)	0	2(66,7)	2(66,7)	0	0	0	0	1(33,3)	2(66,7)
inne enterokoki	12	1(8,3)	2(16,7)	0	2(16,7)	0	0	1(8,3)	1(8,3)	2(16,7)	2(16,7)
Suma (%)	68	16(23,5)	14(20,6)	25(36,8)	35(51,5)	17(25,0)	11(16,2)	9(13,2)	21(30,9)	31(45,6)	36(52,9)
Ścieki oczyszczone (SO)											
<i>E. faecium</i>	38	9(23,7)	13(34,2)	15(39,5)	21(55,3)	14(36,8)	8(21,1)	7(18,4)	10(26,3)	14(36,8)	15(39,5)
<i>E. faecalis</i>	29	12(41,4)	15(51,7)	15(51,7)	25(86,2)	17(58,8)	13(44,8)	12(41,4)	24(82,8)	29(100)	29(100)
<i>E. durans</i>	3	0	1(33,3)	1(33,3)	2(66,7)	2(66,7)	2(66,7)	133,3)	2(66,7)	2(66,7)	2(66,7)
<i>E. avium</i>	2	1(50,0)	0	1(50,0)	2(100)	1(50,0)	2(100)	1(50,0)	1(50,0)	1(50,0)	1(50,0)
<i>E. hirae</i>	4	0	0	1(25,0)	3(75,0)	0	0	0	0	1(25,0)	3(75,0)
<i>E. gallinarum</i>	1	1(100)	0	0	0	0	0	0	0	0	1(100)
inne enterokoki	21	3(14,3)	6(28,6)	1(4,8)	7(33,3)	1(4,8)	0	1(4,8)	2(9,5)	4(19,0)	3(14,3)
Suma (%)	98	9(23,7)	13(34,2)	15(39,5)	21(55,3)	14(36,8)	8(21,1)	7(18,4)	10(26,3)	14(36,8)	15(39,5)

Rys. 37. Udział procentowy i liczba *E. faecium* i *E. faecalis* z genami wirulencji ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny



Rys. 38. Liczba szczepów poszczególnych gatunków enterokoków posiadających geny wirulencji izolowanych ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny



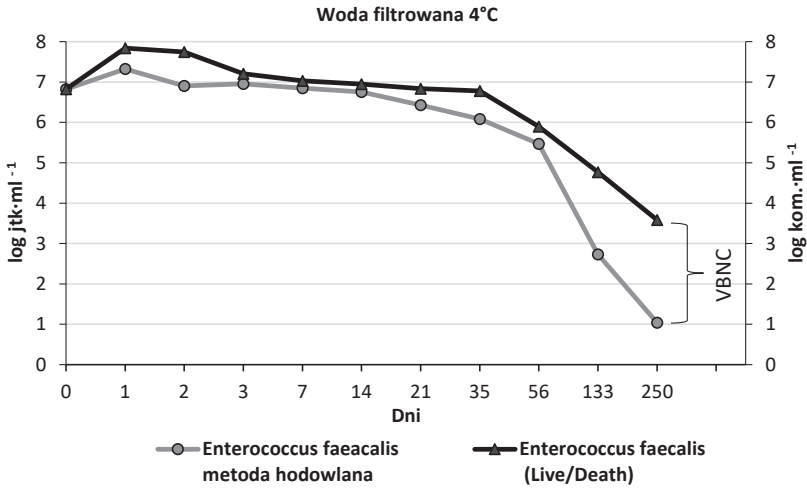
Rys. 39. Udział procentowy i liczba szczepów z genami wirulencji izolowana ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny w poszczególnych sezonach badawczych

5.10.4. Określenie przeżywalności ex situ antybiotykoopornego i wirulentnego szczepu *Enterococcus faecalis* izolowanego z wód rzeki Łyny

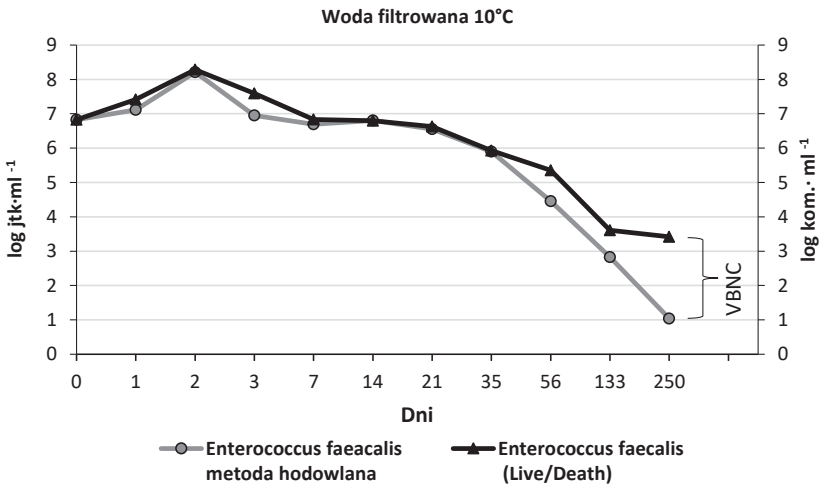
Ze względu na dominację szczepów *E. faecalis* (z potwierdzoną opornością MDR oraz genami wirulencji) wśród izolowanych bakterii w wodach rzeki Łyny określono jego przeżywalność. W badaniach uwzględniono dwie metody, klasyczną płytkową i metodę barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes). Testowano przeżywalność szczepu w filtrowanej i niefiltrowanej wodzie rzecznej w dwóch różnych temperaturach 4 i 10°C przez okres 250 dni. Obie metody uwzględniono przy ocenie przeżywalności *E. faecalis* w wodzie filtrowanej. Ze względu na mikrobiotę towarzyszącą w wodzie niefiltrowanej do określenia przeżywalności *E. faecalis* zastosowano tylko metodę hodowlaną na podłożu wybiórczym SB.

Bez względu na rodzaj wody i temperaturę przechowywania w pierwszych dniach inkubacji obserwowano wzrost liczebności *E. faecalis* oznaczanych zarówno metodą płytkową jak i LIVE/DEAD (woda filtrowana). W wodzie filtrowanej przechowywanej w 4 °C największy wzrost liczebności *E. faecalis* obserwowano w pierwszym dniu inkubacji. Populacja *E. faecalis* w wodzie filtrowanej przechowywanej w 4 °C zwiększała się od 6,8 do 7,3 log jtk·ml⁻¹ (metoda płytkowa) i 7,8 log kom·ml⁻¹ (metoda LIVE/DEAD). W filtrowanej wodzie przechowywanej w 10°C obserwowano wzrost populacji oznaczanych bakterii w 2 pierwszych dniach inkubacji a w niefiltrowanej ich liczba rosła do 3 dnia badań osiągając maksymalną wartość około 8 log kom·ml⁻¹. W następnych dniach przechowywania we wszystkich badanych próbkach liczba *E. faecalis* systematycznie spadała. Populacja *E. faecalis* osiągnęła około 6 log kom·ml⁻¹, (czyli o prawie 1 log kom·ml⁻¹ mniej niż dawka zaszczepiona) w wodzie filtrowanej przechowywanej w 4 i 10 °C w 35 dniu badań. Jedynie w przypadku oznaczeń prowadzonych LIVE/DEAD spadek ten był notowany w 56 dniu inkubacji w wodzie filtrowanej przechowywanej w 4 °C (Rys. 40 A, B). W wodzie niefiltrowanej przechowywanej w temp. 4 i 10 °C spadek oznaczanych bakterii do poziomu 6 log kom·ml⁻¹ oznaczono odpowiednio po 14 i 7 dniach inkubacji. W wodzie niefiltrowanej przechowywanej w 4 i 10 °C nie stwierdzano *E. faecalis* odpowiednio po 250 i 133 dniach inkubacji (Rys. 41) W wodzie filtrowanej przechowywanej w obu temperaturach inkubacji w ostatnim dniu inkubacji metodą płytkową oznaczono *E. faecalis* w ilości około log·ml⁻¹. Obumieranie populacji *E. faecalis* obserwowano również przy zastosowaniu metody fluorescencyjnego barwienia – LIVE/DEAD jednak oznaczane liczby żywych bakterii były większe niż w przypadku tych, które udało się wyhodować. Pod koniec eksperymentu badana liczba *E. faecalis* oznaczana w wodzie filtrowanej mieściła się pomiędzy 3 a 4 log·ml⁻¹. Różnice w liczebnościach *E. faecalis* oznaczone metodą płytkową a metodą LIVE/DEAD można określić jako stan niehodowalności, określanej jako VBNC (ang. *viable but nonculturable*).

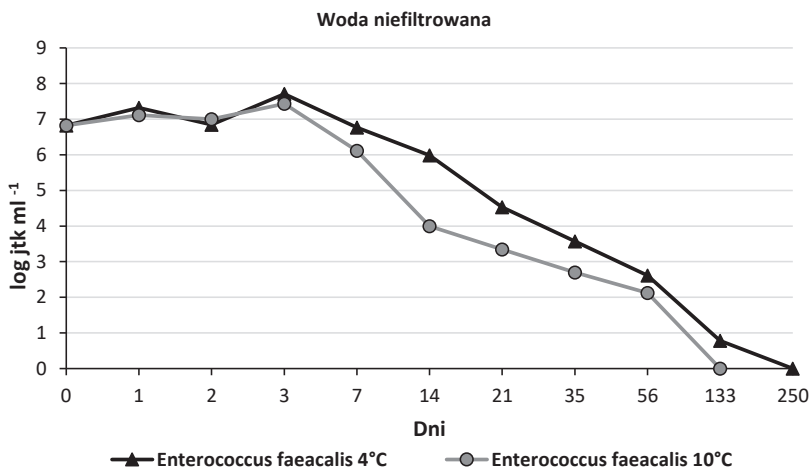
A



B



Rys. 40. Przeżywalność *ex situ* *Enterococcus faecalis* oznaczana w (A) filtrowanej i przechowywanej w 4 °C i (B) filtrowanej przechowywanej w 10 °C wodzie rzeki Łyny

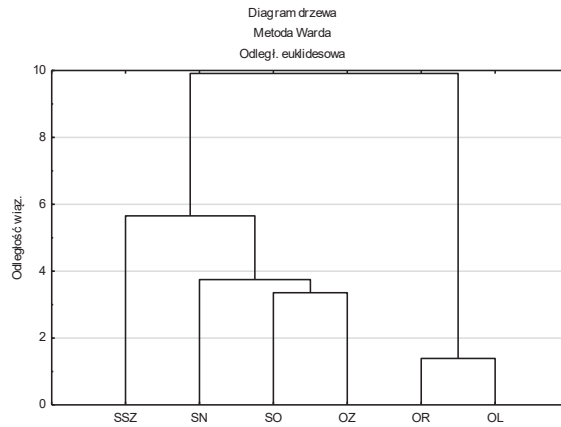


Rys. 41. Przeżywalność *ex situ* *Enterococcus faecalis* oznaczana w niefiltrowanej wodzie rzeki Łyny

5.10.5. Analiza podobieństwa występowania oporności fenotypowej i genotypowej oraz wirulencji szczepów enterokoków izolowanych z wody i ścieków

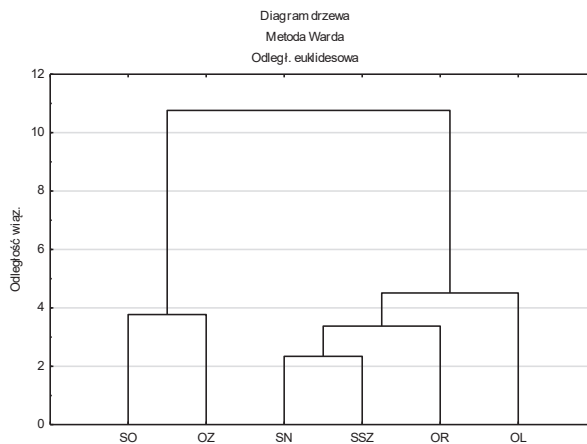
Wykonano analizę skupień metodą aglomeracji, która pozwoliła na określenie zróżnicowania badanych środowisk (rzeki Łyny, ścieków szpitalnych nieoczyszczonych i oczyszczonych) pod względem występowania antybiotykoopornych i wirulentnych szczepów bakterii należących do rodziny Enterococaceae. Wykazano, że pod względem występowania antybiotykoopornych i wirulentnych enterokoków utworzyły się dwa odrębne zgrupowania badanych środowisk (Rys. 42, 43).

Najbardziej powiązane środowiska pod względem występowania szczepów enterokoków z opornością na podobne grupy antybiotyków stanowiły wody z obszarów rolnych i leśnych, które znalazły się w jednym klastrze. Drugą grupę utworzyły pozostałe badane środowiska, z silniejszym powiązaniem między ściekami oczyszczonymi a wodą rzeki pochodząca z terenów zurbanizowanych (Rys. 42).



Rys. 42. Podobieństwo badanych środowisk: SSZ - ścieki szpitalne; SN - ścieki nieoczyszczone; SO - ścieki oczyszczone; OL - woda z obszarów leśnych; OR - woda z obszarów rolnych; OZ - woda z obszarów zurbanizowanych pod względem występowania antybiotykoopornych enterokoków

Analiza skupień dotycząca występowania genów *van* (oporność na wankomycynę) i czynników wirulencji wśród wyizolowanych szczepów enterokoków z badanych środowisk pokazała natomiast nieco inne rezultaty. Stwierdzono zbliżony profil genów *van* i czynników wirulencji enterokoków występujących w ściekach oczyszczonych i w wodzie rzeki Łyny z obszarów zurbanizowanych. Drugą grupę utworzyły pozostałe badane środowiska z zaznaczonym silniejszym powiązaniem między ściekami szpitalnymi i nieoczyszczonymi. (Rys. 43).



Rys. 43. Podobieństwo badanych środowisk: SSZ – ścieki szpitalne; SN – ścieki nieoczyszczone; SO – ścieki oczyszczone; OL – woda z obszarów leśnych; OR – woda z obszarów rolnych; OZ – woda z obszarów zurbanizowanych pod względem występowania enterokoków z genami *van* i czynnikami wirulencji

6. Dyskusja wyników

6.1. Charakterystyka jakości mikrobiologicznej wód rzeki Łyny

Czułym bioindykatorem informującym o zmianach zachodzących w zbiornikach wodnych są bakterie. Pozwalają one w szybki i wiarygodny sposób ocenić bieżący stan sanitarny badanego środowiska i dają szybką odpowiedź dotyczącą potencjalnych źródeł jego zanieczyszczenia. Do oceny stanu sanitarnego wód rzeki Łyny (od jej źródeł do granicy z Rosją) wykorzystano, bakterie z grupy coli (TC), bakterie coli typu fekalnego (FC), paciorkowce kałowe (enterokoki) (E), określane jako FIB (z ang. fecal indicator bacteria). Obecnie FIB są używane na całym świecie do monitorowania jakości wody pod względem ewentualnego zagrożenia sanitarno-epidemiologicznego. Ponadto pośrednio służą do oceny ryzyka związanego z występowaniem innych form patogennych, a tym samym są wskaźnikiem przenoszenia chorób drogą wodną (Boehm i Soller 2011, Cabral 2010, Islam i in. 2017, Olapade i Weage 2010, WHO 2006).

W badaniach własnych wód rzeki Łyny uwzględniono również heterotroficzne bakterie: psychrofilne (A₂₂) i mezofilne (A₃₇). Bakterie psychrofilne funkcjonują w wodzie jako mikrobiota autochtoniczna (tzw. tubylcza). Natomiast mezofile określane są jako formy allochtoniczne (tzw. obce), które przedostają się z zanieczyszczeniem zewnętrznym związanym ze spływami powierzchniowymi ze zlewni lub dopływem różnego typu ścieków. Ze względu na korelacje tych grup bakterii z zawartością substancji organicznej rozpuszczonej w wodzie rozpoznanie ich składu jakościowego i liczebności jest podstawową informacją w badaniach mikrobiologicznych wody. Wśród wielu rodzajów bakterii mezofilnych, szczególną rolę jako bioindykatory bezpieczeństwa epidemiologicznego środowisk wodnych pełnią paciorkowce kałowe. Wodę rzeki Łyny dodatkowo przebadano na obecność paciorkowców kałowych (enterokoków) opornych na niskie stężenia wankomycyny E_{VAN}. Uwzględnienie bakterii E_{VAN} w badaniach było podyktowane uzyskaniem niepokojących wyników związanych z obecnością tego typu bakterii we wcześniejszych pilotażowych badaniach wód rzeki w strefie oddziaływania miejskiej oczyszczalni ścieków w Olsztynie. Badania tego typu są rzadko prowadzone w środowisku przyrodniczym. Na podłożu z dodatkiem wankomycyny często wyrastają enterokoki zależne od wankomycyny VDE (vancomycin - dependent enterococci). Debata na temat szczepów VDE toczą się głównie na polu medycyny klinicznej, a według Wilksa (1997) bakterie te można wykryć tylko gdy się ich „specjalnie szuka”. Nie zmienia to jednak faktu, że są one obecne w środowiskach przyrodniczych i chociaż nie są zdolne do wzrostu bez obecności antybiotyków glikopeptydowych, istnieje niebezpieczeństwo ich powrotu do formy niezależnej od wankomycyny a tym samym uzyskaniu oporności na jej wysokie stężenia (Cetinkaya i in. 2000, Przybylski 2007b).

W wodzie rzeki Łyny obserwowano zróżnicowanie przestrzenne i czasowe wszystkich oznaczanych grup bakterii wynikające z lokalizacji stanowisk badawczych i sezonów poboru próbek wody oraz wpływu czynników środowiskowych i działalności antropogenicznej. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że oznaczone różnice pomiędzy liczebnościami badanych grup

bakterii w zależności od czasu i miejsca poboru próbek badanej wody były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Wykazano również, na podstawie korelacji Pearsona, różne zależności między liczebnościami oznaczanych w wodzie FIB a analizowanymi parametrami fizyko-chemicznymi.

Średnia liczba oznaczanych bakterii psychrofilnych utrzymywała się na poziomie od 3,12 log jtk·ml⁻¹ (woda z obszarów zalesionych) do 3,70 log jtk·ml⁻¹ (woda z terenów zurbanizowanych) i we wszystkich próbkach wody rzeki i była przeważnie o jeden rząd wielkości większa, niż liczba bakterii mezofilnych. Iloraz A₂₂ do A₃₂ był w ponad 60% próbek wód pobieranych z obszarów rolnych i zurbanizowanych niższy od 10, co może świadczyć o zanieczyszczeniu Łyny materią organiczną łatwo rozkładalną przedostającą się do rzeki ze spływów obszarowych i punktowych. W rzekach polskich dominację grupy bakterii psychrofilnych w stosunku do mezofilnych stwierdzali Bojarczuk i in. (2018) oraz Lenart-Boroń i in. (2016) w wodach rzeki Białki, Gołaś (2011) w wodzie rzeki Drwęcy, Donderski i Wilk (2002) w wodzie rzeki Wisły, czy Niewolak, Gotkowska-Płachta (1999) w wodach rzek Czarna Hańcza i Stara Hańcza, dopływających do jeziora Hańcza.

W badaniach własnych oznaczana liczba drobnoustrojów FIB w wodzie rzeki Łyny kształtowała się w zakresie od kilkunastu jtk·ml⁻¹ do kilku tysięcy jtk·ml⁻¹. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne badanej rzeki zmieniało się w zależności od sposobu użytkowania powierzchni zlewni, przez którą rzeka przepływała. Łyna płynąca przez obszary leśne z ograniczonym wpływem antropopresji charakteryzowała się najmniejszymi liczebnościami oznaczanych bioindykatorów stanu sanitarnego (TC, FC, E). Wartości tych drobnoustrojów kształtowały się na poziomie 0,001 - 1,28 log jtk·ml⁻¹ i były przeważnie kilkakrotnie mniejsze niż oznaczane w wodzie rzeki z terenów użytkowanych rolniczo i zurbanizowanych, gdzie średni poziom FIB wahał się od 0,06 do 2,44 log jtk·ml⁻¹. Zaobserwowano również zróżnicowanie liczebności większości oznaczanych wskaźników w poszczególnych sezonach badawczych. Stwierdzano spadek liczebności TC i FC w wodzie na wszystkich wyznaczonych stanowiskach zimą, kiedy to temperatura wody wahała się od 2°C do 11°C i wzrost latem z temperaturą w okolicach 22°C. Tendencja ta nie dotyczyła paciorkowców kałowych (E) i oznaczanych w wodzie bakterii E_{VAN}, których liczba utrzymywała się przeważnie na stałym poziomie w każdym z sezonów badawczych. Jedynie zimą (E) i jesienią (E_{VAN}) obserwowano wzrost liczby tych bakterii do kilkunastu jtk w ml wody. Podobne tendencje wzrostu liczebności paciorkowców kałowych zimą stwierdził Kacar (2011) badając 5 rzek w zlewni Morza Egejskiego w zachodniej części Turcji. Określone różnice między liczebnościami oznaczanych FIB w wodzie rzeki Łyny, w zależności od miejsca i sezonu pobierania próbek, odzwierciedlają przestrzenną zmienność wpływu czynników środowiskowych i antropogenicznych na te drobnoustroje. Rosnąca liczba testowanych mikroorganizmów od źródeł rzeki, przez tereny użytkowane rolniczo do zurbanizowanych pokazują wpływ różnych czynników związanych z oddziaływaniem punktowych (gospodarka ściekowa) i obszarowych (spływy z obszarów użytkowanych rolniczo) zanieczyszczeń przedostających się do tego ekosystemu głównie na skutek działalności antropogenicznej. Analiza głównych składowych (PCA) pozwoliła na rozróżnienie głównych czynników, wpływających na zmienność mikrobiologiczną FIB w wodzie rzeki Łyny. Bakterie A₃₇, TC i FC były powiązane istotnie z zawartością

ChZT, Pog, oraz temperaturą wody i sezonem letnim. Natomiast E, E_{VAN} korelowały głównie ze stężeniami TOC, P_{PO4}³⁻, N_{NO2}⁻ i obszarem zurbanizowanym. Skorelowane ujemnie były liczebności bakterii oznaczanych na obszarach zalesionych głównie zimą (Rys. 22). Uzyskane wyniki wskazują, że największe zanieczyszczenie wody rzeki badanymi bakteriami było latem oraz na obszarach zurbanizowanych. Natomiast obszary zalesione szczególnie zimą były zanieczyszczone mikrobiologicznie w najmniejszym stopniu. Dodatkowo korelacje między parametrami fizyko-chemicznymi a oznaczanymi FIB w wodzie potwierdziła również korelacja Pearsona. Wysoce istotną dodatnią korelację (p<0,01) obserwowano głównie między liczebnością większości oznaczanych FIB a temperaturą, koncentracjami: TOC, DOC, ChZT i P_{og}. W przypadku bakterii A₃₇ i TC również między ich liczebnością a zawartością N_{NO2}⁻ i P_{PO4}³⁻. Podobne korelacje między rodzajem użytkowania powierzchni gruntów w zlewni a parametrami fizyko-chemicznymi i/lub mikrobiologicznymi w wodzie rzecznej obserwowali także Economou i in. (2013), Nnane i in. (2011) i Wilkes i in. (2009, 2011). Zwiększone ładunki związków azotu, fosforu, węgla i FIB są często stwierdzane w wodach zanieczyszczonych i mogą być traktowane jako uniwersalne wskaźniki takich zanieczyszczeń (Hatt i in. 2004; Tryland i in. 2002). Tendencje pokazujące zależności między stopniem zanieczyszczenia badanego zbiornika a sposobem użytkowania zlewni, rodzajem zanieczyszczeń, sezonem badań i wpływem czynników fizyko-chemicznych były stwierdzane również w innych ekosystemach lotycznych. Na przykład Bojarczuk i in. (2018) oraz Lenart-Boroń i in. (2016) obserwowały w wodzie rzeki Białki niskie liczebności *E. coli* i *Enterococcus* w rejonie źródeł rzeki i na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego. Liczebności tych bakterii nie przekraczały poziomu kilku do kilkunastu jtk w 100 ml badanej wody z obszaru parku, rosły natomiast wraz z dopływem zanieczyszczeń związanych z gospodarką ściekową i ruchem turystycznym. Autorki (Bojarczuk i in. 2018 oraz Lenart-Boroń i in. 2016) wykazały również silne powiązanie między FIB, sezonami badawczymi a oznaczanymi parametrami fizyko-chemicznymi i zanieczyszczeniem wód rzeki. Servais i Passetat (2009) badając 7 rzek w dziale wodnym Sekwany wskazuje, że jakość mikrobiologiczna tych wód zależy od rodzaju dopływających do niej zanieczyszczeń. Największe zanieczyszczenia badanych rzek autorzy stwierdzali w wyniku punktowych dopływów ścieków szpitalnych i komunalnych, mniejsze natomiast w związku ze spływami obszarowymi z terenów zalesionych i rolnych. Również badania Savitchcheva i Okabe (2006) wykazały wzrost liczebności bakterii wskaźnikowych (od 10⁶ do 10⁸ jtk·100 ml⁻¹) w zanieczyszczonej ściekami rzecze Sekwanie we Francji.

Podczas prowadzonych badań własnych wody rzeki Łyny najwyższe średnie wartości oznaczanych FIB (utrzymujące się na poziomie pomiędzy 0,1 a 3,7 log jtk·ml⁻¹) notowano w próbkach pobieranych ze stanowisk zlokalizowanych za aglomeracjami miejskimi. Wśród 5 miast przez, które przepływa rzeka największym ośrodkiem miejskim jest stolica województwa warmińsko-mazurskiego Olsztyn. W próbkach wody płynącej przez to miasto jak i bezpośrednio poza jego granicami obserwowano wzrost liczebności wszystkich oznaczanych grup bakterii. Średnie maksymalne liczebności TC i *Escherichia coli* (FC) (3,69 i 2,08 log jtk·ml⁻¹) odnotowano w wodzie ze stanowiska zlokalizowanego 200 m za oczyszczalnią ścieków „Łyna” w Olsztynie (8Z). Enterokoki liczniej (0,4 – 0,8 log jtk·ml⁻¹)

występowały w próbkach wody pobieranych ze stanowisk usytuowanych poniżej Dobrego Miasta (10Z), Lidzbarka Warmińskiego (12Z) i Bartoszyce (13Z). Natomiast E_{VAN} w największych ilościach identyfikowano w próbkach wody pobieranych ze stanowiska usytuowanego w centrum Olsztyna na terenie parku miejskiego (6Z) oraz poniżej Lidzbarka Warmińskiego (12Z). Większe liczebności E_{VAN} oznaczane w wodzie pobieranej na terenie parku miejskiego w Olsztynie mogły być związane z przedostawianiem się do nich odchodów zwierząt dzikich i domowych, przebywających w tym rejonie. W odchodach zwierząt występują duże ilości paciorkowców kałowych, w tym szczepów opornych na antybiotyki glikopeptydowe (Nowakiewicz i in. 2014, Torres i in. 2018). Podwyższona liczba E_{VAN} w wodzie poniżej Lidzbarka Warmińskiego mogła wynikać z zanieczyszczenia tych wód przez zakład mleczarski zlokalizowany na terenie miasta. O fakcie tym informowały doniesienia prasowe (www⁴). Odprowadzane nielegalnie, nieoczyszczone ścieki mleczarskie mogły stymulować rozwój tych bakterii i/lub być ich źródłem. Występowanie bakterii wankomycynoopornych w produktach mleczarskich potwierdzają w swoich pracach Giraffa i in. (2000), Citak i in. (2005). Wzrost liczebności bakterii wskaźnikowych jest często obserwowany w wodach, do których przedostają się zanieczyszczenia z terenów zurbanizowanych związanych z gospodarką ściekową. Problem ten odnotowuje wielu autorów, badających różne zbiorniki wodne stanowiące odbiorniki ścieków poprodukcyjnych i komunalnych zarówno w Polsce (Giebułtowicz i in. 2018, Glińska-Lewczuk i in. 2016, Gołaś 2011, Gotkowska-Płachta i in. 2016, Korzeniewska i Harnisz 2012, Lenart-Boroń i in. 2016) jak i na świecie (Almeida i in. 2007, Olds i in. 2018, Olapade i in. 2011, Servais i in. 2007, Kirschner i in. 2009, Passerat i in. 2011).

W celu określenia czy ścieki komunalne odprowadzane do Łyny z miejskiej oczyszczalni ścieków w Olsztynie mogą stanowić zagrożenie sanitarne dla tego zbiornika badano je pod względem obecności FIB i antybiotykoopornych oraz wirulentnych szczepów enterokoków. W ściekach nieoczyszczonych liczebności bakterii wskaźnikowych osiągały wartości przeważnie o kilka rzędów wielkości większe niż stwierdzone w wodzie rzeki Łyny. Liczebności FIB w ściekach nieoczyszczonych mieściły się w przedziale między 4 a 6 log jtk·ml⁻¹. Mediana TC, FC i E wynosiła odpowiednio 5,64, 4,69 i 4,46 log jtk·ml⁻¹. Uzyskane wyniki były zbieżne z wynikami innych autorów (Budzińska i in. 2011, Filipkowska 2003, Łuczkiwicz i in. 2010a, Olańczuk-Neyman i in. 2001, Walczak i Donderski, 2007), którzy w ściekach nieoczyszczonych szacowali liczebności paciorkowców kałowych i bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* odpowiednio w granicach między 4, a 8 log kom·ml⁻¹. Efektem sprawnie funkcjonujących oczyszczalni, w procesie oczyszczania ścieków, jest usuwanie zanieczyszczeń organicznych i mikrobiologicznych na poziomie powyżej 90%. Wówczas liczebność wskaźników sanitarnych może spaść nawet do kilku rzędów wielkości w stosunku do ich liczby w ściekach nieoczyszczonych. Według Walczaka i Donderskiego (2007), w procesie mechaniczno-biologicznego oczyszczania ścieków eliminacja bakterii TC zachodzi na poziomie 97,28%, paciorkowców kałowych 85,97%, natomiast bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* usuwane są w 96,18%. Duże znaczenie w tym procesie ma rodzaj oczyszczanych ścieków i technologia ich oczyszczania. Szczególnie obiecujące wydaje się zastosowanie dezynfekcji ścieków oczyszczonych za pomocą promieniowania ultrafioletowego. Pilotażowe badania

przebadane przez Olańczuk-Neyman i in. (2001), wykazały, że dawki promieniowania UV w zakresie od 40 do 52 mWs/cm² spowodowały zmniejszenie liczebności *Escherichia coli* o 3,4 do 3,8 log i enterokoków od 3,1 do 3,3 log w badanych ściekach w stosunku do ich ilości oznaczanych w ściekach nieoczyszczonych. Średnia liczba bakterii TC, *E. coli* i enterokoków w oczyszczonych ściekach, które poddano dezynfekcji UV nie przekraczała wartości odpowiednio 50, 15 i 30 na 100 ml badanych ścieków. W procesie oczyszczania ścieków komunalnych w miejskiej mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków „Łyna” w Olsztynie wydajność usuwania oznaczanych drobnoustrojów była wysoka i wahała się od 97,0% (TC) do 99,6 % (E). Pomimo tego w ściekach oczyszczonych odprowadzanych do wód rzeki Łyna bakterie wskaźnikowe FIB nadal stanowiły znaczną pulę zanieczyszczeń mikrobiologicznych, a ich mediana wahała się od 1,97 (E) do 3,9 (TC) log jtk·ml⁻¹. Biorąc pod uwagę średniodobowy odpływ ścieków z oczyszczalni „Łyna” wynoszący około 32 tys m³ na dobę liczby odprowadzanych FIB do wody w ciągu jednego dnia są rzędu 10¹²-10¹⁴ komórek.

Należy podkreślić, że chociaż nie wszystkie bakterie należące do FIB są chorobotwórcze to wzrost ich liczebności koreluje z obniżeniem jakości wody i wskazuje na jej zanieczyszczenie kałowe pochodzące od ludzi i/lub zwierząt. W wyniku zanieczyszczenia fekaliami istnieje duże prawdopodobieństwo występowania równoległe z FIB bakterii potencjalnie chorobotwórczych czy patogennych, takich jak: *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., i *Yersinia* spp. (Lipp i in. 2001, Horman i in. 2004, Korzeniewska 2005, Fries i in. 2008, Wilkes i in. 2009, Rodrigues i in. 2011). Pomimo doniesień o zagrożeniach sanitarnych jakie niosą ze sobą odprowadzane do wód ścieki oczyszczone, według polskich przepisów nie ma obowiązku ich dezynfekcji przed wprowadzeniem do wód powierzchniowych (Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, 2014). Wykorzystanie takich wód może być niebezpieczne dla zdrowia tym bardziej istotnym wydaje się monitorowanie ich ze względu na obecność bakteriologicznych wskaźników sanitarnych (FIB), które często korelują z występowaniem chorób układu pokarmowego, obecnością genów wirulencji, czy oporności na różne antybiotyki (Lata i in. 2009, Sibanda i in. 2013, Griffin i in. 2003, Harnisz i Korzeniewska 2018). Badania tego typu mają duże znaczenie szczególnie w sytuacji gdy dostosowanie polskich norm prawnych do wytycznych Ramowej Dyrektywy Wodnej (2000/60/WE) spowodowało ograniczenie zakresu oznaczania bakterii wskaźnikowych do *E. coli* i paciorkowców kałowych, i tylko w przypadku wykorzystywania zbiorników wodnych do celów konsumpcyjnych i kąpielowych. Według RDW ocena wód opiera się głównie na określeniu składu ilościowego i jakościowego fitoplanktonu, fitobentosu, makrofitów, zoobentosu i ichtiofauny. Jednakże identyfikacja tych organizmów nie wskazuje bezpośrednio na zanieczyszczenie kałowe badanych zbiorników wodnych. Z tego względu monitoring jakości sanitarnej wód powierzchniowych na podstawie tzw. jelitowych bakterii wskaźnikowych (FIB) powinien być nadal podstawowym działaniem w ocenie tych ekosystemów. Rzeki płynące przez rozległe obszary o różnym stopniu antropopresji stanowią nośniki zanieczyszczeń mikrobiologicznych i powodują wzrost zagrożenia epidemiologicznego mórz, do których wpływają. Dlatego należy

podkreślić, że oznaczenie FIB w środowisku stanowi pierwszy krok do pełnej oceny fluktuacji drobnoustrojów w aspekcie ich zmian jakościowych i ilościowych na skutek dopływu zanieczyszczeń z zewnątrz.

6.2. Liczebność i aktywność metaboliczna ogólnej liczby bakterii (OLB) oraz bioróżnorodność bakterii z rodziny *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny płynącej przez analizowane obszary

Ocenę bioróżnorodności bakterii z rodziny *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny przeprowadzono wykorzystując oznaczenia bezpośrednie polegające na technice fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Klasyczne metody hodowlane pozwalają na identyfikację jedynie (0,3% w glebie i <0,1% w wodzie) niewielkiego udziału bakterii żyjących w danym środowisku (Amann i in. 1995, Janssen 2006; Rogers i in. 2007). Ponadto nie uwzględniają bakterii VBNC (ang. viable but not culturable), żywych ale niewyrastających na standardowych podłożach mikrobiologicznych. Może to prowadzić do niedoszacowania liczby bakterii oznaczanych w danym biotopie, a tym samym błędnej interpretacji wyników. Wykorzystanie znakowanych sond oligonukleotydowych komplementarnych do określonej sekwencji DNA w badanym materiale i mikroskopii fluorescencyjnej pozwoliły otrzymać rzetelne wyniki w czasie zbliżonym do rzeczywistego.

Wyniki liczebności ogólnej liczby bakterii (OLB), *Eubacteria* (EUB338), bakterii *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB158), bakterii z rodziny *Enterococaceae* (ENC38), z rodzaju *Enterococcus* (ENC176), *Enterococcus faecalis* (ENF191), *Enterococcus faecium* (ENU140) i *Enterococcus gallinarum* (EGAC183) w wodzie rzeki Łyny były przeważnie kilka razy większe niż określone przy użyciu metod hodowlanych. Oznacza to, że w rzece znajduje się duża pula bakterii z rodziny *Enterococaceae* w tym pochodzenia kałowego *E. faecalis* i *E. faecium* (ENF191, ENU140), które są niehodowlane. Podobne wyniki we wcześniejszych badaniach wód rzeki Łyny uzyskali Gotkowska-Płachta i in. (2016) oznaczając bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i *Escherichia coli* sondami ENT183 i ECO1167. Drobnoustroje jelitowe przedostające się do wód z kałem są szczególnie narażone na zmianę warunków bytowania i wpływ różnych czynników środowiskowych (jak, m.in. temperatura, pH, tlen, dostępność składników pokarmowych, czy światło). W wyniku zmiany środowiska mogą one przestać się dzielić i namnażać lub utracić zdolności wzrostu na podłożu hodowlanym. Ponadto patogenne lub oportunistyczne szczepy tych bakterii poddane warunkom stresogennym wykazują często większą wirulencję, co stanowi poważny problem zdrowotny (Rowan 2004). Oznaczane w wodzie Łyny liczebności bakterii hybrydyzowanych za pomocą sond LAB158, ENC38i, ENC176, ENF191, ENU140, EGAC183 oraz OLB oznaczanej metodą DAPI zmieniały się w zakresie kilku rzędów wielkości w zależności od miejsca poboru próbek do badań, sezonu badawczego, rodzaju oznaczanych bakterii oraz wpływu działalności antropogenicznej i czynników środowiskowych. Liczebności OLB i bakterii z rodziny *Enterococaceae* były przeważnie najmniejsze w wodzie pobieranej z obszarów zalesionych i zmieniały się w zakresie od 10^3 do 10^6 komórek w 1 ml. Podobnie jak w przypadku oznaczanych metodami klasycznymi FIB liczba oznaczanych bakterii metodami fluorescencyjnymi wzrastała w próbkach wody z terenów

rolniczych i zurbanizowanych. Liczebności OLB wraz z biegiem rzeki i wzrostem jej zanieczyszczenia osiągały poziom około $10,0 \cdot 10^6$ kom.·ml⁻¹. W innych Polskich rzekach jak Drwęca, Wisła czy Brda zmiany OLB oznaczane metodą DAPI mieściły się w podobnym zakresie jak w rzece Łynie. Wynosiły one od 10^5 – 10^7 komórek w 1 ml i były zbliżone lub różniły się nieznacznie od danych dostępnych w literaturze światowej (Gotkowska-Płachta i in. 2016; Gołaś 2011, Velimirov i in. 2011; Tiquia 2010, Freese i in. 2006, Małecka i Donderski 2006, Niewolak 1998). Zmiany liczebności i różnorodności gatunkowej oznaczanych OLB zawsze związane były z zanieczyszczeniem tych środowisk lotycznych, a tym samym zróżnicowaniem ich trofii.

Oznaczane w badaniach własnych liczebności bakterii z rodziny *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny wahały się od 2,78 (EGAC183) do 5,94 (LAB158) log kom.·ml⁻¹. Przeważnie wzrost liczebności tych bakterii notowano na terenach zurbanizowanych i dotyczyły próbek wód pobieranych ze stanowisk zlokalizowanych za miastami i oczyszczalniami ścieków. Jedynie gatunki *Enterococcus faecalis* (ENF191) i *Enterococcus gallinarum* (EGAC183) liczniej występowały w wodzie płynącej przez tereny użytkowane rolniczo (stanowiska 14R i 15R). Rzeka w tym rejonie płynie przez liczne łąki, pastwiska i pola uprawne następnie kończy bieg w granicach Polski i przepływa na stronę Rosji, gdzie łączy się z rzeką Pregolą uchodzącą do Zalewu Wiślanego. Wielu autorów (Devriese i in. 1992, Hwang i in. 2009, Torres i in. 2018) podaje że *E. faecalis* jest dominującą mikrobiotą w przewodach pokarmowych bydła i trzody chlewnej. Natomiast *Enterococcus gallinarum* to gatunek, który izolowany jest przeważnie z przewodów pokarmowych ptaków takich, jak np. kurczaki, gęsi czy kaczki (Dolka i in. 2017). Większe liczebności tych gatunków w wodzie z obszarów rolniczych mogą więc wynikać z ich przedostawiania się ze spływami z łąk i pastwisk wraz odchodami zwierząt hodowlanych. W sezonach badawczych przeważnie najmniejsze średnie liczebności oznaczonych grup bakterii (OLB, EUB338, LAB158, ENC38i, ENC176, ENF191, ENU140, EGAC183) w wodzie Łyny stwierdzano zimą, kiedy temperatura zmieniła się od 2°C do 11°C. Liczby tych drobnoustrojów w analizowanym okresie utrzymywały się na poziomie od kilku lub kilkuset tysięcy komórek (bakterie z rodziny *Enterococaceae*) do kilku milionów komórek w 1 ml badanej wody (OLB, i EUB338). Wiosna, gdzie średnia temperatura wody oscylowała w okolicach 10°C była sezonem, w którym dominowały bakterie oznaczane sondami LAB158, ENC38i, ENC176, EGAC183. W przypadku OLB i bakterii *E. faecalis* i *E. faecium* większe ich liczebności oznaczono latem przy maksymalnych temp. wody do 26°C. W okresie tym obserwowano przeważnie dwukrotny wzrost liczebności tych drobnoustrojów w porównaniu do ich wartości notowanej zimą i jesienią. Statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) pomiędzy procentowym udziałem wszystkich oznaczanych (metodą FISH) bakterii między poszczególnymi obszarami (za wyjątkiem bakterii znakowanych sondą EUB338 i ENF191) i sezonami (za wyjątkiem bakterii znakowanych sondą ENF191) potwierdzono przy użyciu analizy wariancji ANOVA. Również analiza głównych składowych (PCA) wskazała na silne powiązania między rodzajem użytkowania zlewni, sezonem badawczym, czynnikami fizyko-chemicznymi a liczebnościami oznaczanych grup drobnoustrojów. Woda z obszarów rolnych i zurbanizowanych cechowała się największym zanieczyszczeniem mikrobiologicznym szczególnie w sezonie letnim.

Badania próbek wody pobieranych z obszarów leśnych wykazywały najmniejsze ich zanieczyszczenie zimą. Na podstawie korelacji Pearsona stwierdzono statystycznie istotne dodatnie powiązania ($p < 0,01$) przeważnie między większością oznaczanych bakterii metodami DAPI i FISH a stężeniem związków węgla: (TOC, DOC, POC), ChZT, $\text{N}_{\text{NO}_2^-}$, $\text{P}_{\text{PO}_4^{3-}}$ oraz P_{og} . Tego typu zależności potwierdzają wrażliwość oznaczanych drobnoustrojów na wszelkie zmiany zachodzące w środowisku związane z rodzajem i dostępnością materii organicznej. Mikrobiota środowisk lotycznych jest jednym z kluczowych uczestników cyklu biogeochemicznego w procesach przemiany materii organicznej i krążeniu składników odżywczych. Drobnoustroje te biorą również aktywny udział w przywracaniu i utrzymaniu stanu równowagi ekologicznej w środowisku (Kent i in. 2007). Zmiany bioróżnorodności mikrobiologicznej w rzekach w zależności od stopnia ich czystości, potwierdzają tezę, że zarówno mikroorganizmy allochtoniczne jak i natywne można zakwalifikować do jednych z najczulszych bioindykatorów jakości wód (Bacelar-Nicolau i in. 2003, Tiquia 2010, Ma i in. 2016).

W przeprowadzonych badaniach własnych wód rzeki Łyny określono powiązania pomiędzy oznaczanymi drobnoustrojami a ilością i rodzajem materii organicznej. Odpowiedź uzyskano na podstawie określenia korelacji wszystkich oznaczanych bakterii i różnych frakcji węgla. Stężenie związków węgla organicznego: całkowitego (TOC – Total Organic Carbon), cząsteczkowego (POC – Particulate Organic Carbon) i rozpuszczonego (DOC – Dissolved Organic Carbon) jest powiązane z zanieczyszczeniem wód materią łatwo i trudno rozkładalną (Mołczan i in. 2006). Pośrednio na podstawie POC można również wnioskować o intensywności produkcji i rozkładzie materii organicznej (Parszuto, Głażewski 2004). W wodach rzeki Łyny wszystkie grupy bakterii oznaczane metodą FISH i większość FIB korelowały statystycznie istotnie ($p < 0,01$) z różnymi frakcjami węgla. Najmniejsze stężenia różnych związków węgla notowano w wodzie z obszarów zalesionych zimą i jesienią, największe przeważnie w wodzie z obszarów rolnych: wiosną i latem. Jak podaje Dunalska (2009) stężenie DOC w wodach naturalnych może zmieniać się od < 1 do $> 50 \text{ mg C l}^{-1}$. W wodzie Łyny wartości DOC mieściły się w zakresie od $2,79 \text{ mg C l}^{-1}$ na obszarach zalesionych do $10,20 \text{ mg C l}^{-1}$ na obszarach rolnych. Powiązania pomiędzy trofią zbiornika wodnego, związkami biogennymi, liczebnością, biomasą i metabolizmem oznaczanych bakterii heterotroficznych są istotnym elementem pętli mikrobiologicznej decydującej o jego aktualnym stanie troficznym i podatności na zanieczyszczenia (Chróst i Siuda 2006, Chróst i in. 2000, Meyers 1994, Okuda i in. 2014).

W celu potwierdzenia, czy wzrost liczebności oznaczanych drobnoustrojów był tożsamy z ich aktywnością metaboliczną, zastosowano metodę barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD Bac-Light™. Oznaczana żywotność, a tym samym aktywność metaboliczna OLB w wodach rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych była podobna i wynosiła średnio około 60%. Nie obserwowano statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$) w przeżywalności oznaczanych bakterii w wodzie w zależności od miejsca poboru próbek do badań. Czynnikiem determinującym aktywność OLB w wodzie rzeki Łyna był sezon badań. Największy procent 77,6% bakterii żywych oznaczano wiosną przy temperaturach zbliżonych do 12°C , najmniejszy zimą 35,9% kiedy średnia temperatura badanej wody

wynosiła 8°C. Podobnie maksymalną aktywność w sezonie wiosennym (64%) i minimalną zimą (19,5%) obserwowała Jankowska (2018), w wodach Morza Bałtyckiego. Według różnych autorów (Choi i in. 1996, Berman i in. 2001, Lew 2003, Jankowska 2018) skład procentowy oznaczanych bakterii aktywnych metabolicznie (tzw. „żywych”) może zmieniać się od 20% do ponad 60% w zależności od badanego środowiska (jeziora, wody morskie, osady) i oddziaływania różnych czynników środowiskowych.

6.3. Charakterystyka lekoopornych i wirulentnych enterokoków izolowanych z rzeki Łyny i odprowadzanych ścieków

W badaniach własnych poświęcono szczególną uwagę enterokokom, ze względu na potencjalne zagrożenie epidemiologiczne jakie stwarzają dla środowiska. Ponadto silną przesłanką do rozszerzenia badań związanych z tą grupą drobnoustrojów były pierwsze wyniki analiz klasycznych wskazujące na obecność w wodzie rzeki enterokoków opornych na niskie stężenia wankomycyny EV_{AN} . Podjęto więc próbę identyfikacji gatunkowej enterokoków izolowanych z wód rzeki Łyny i z odprowadzanych do niej ścieków oraz określenie ich antybiotykooporności i czynników wirulencji.

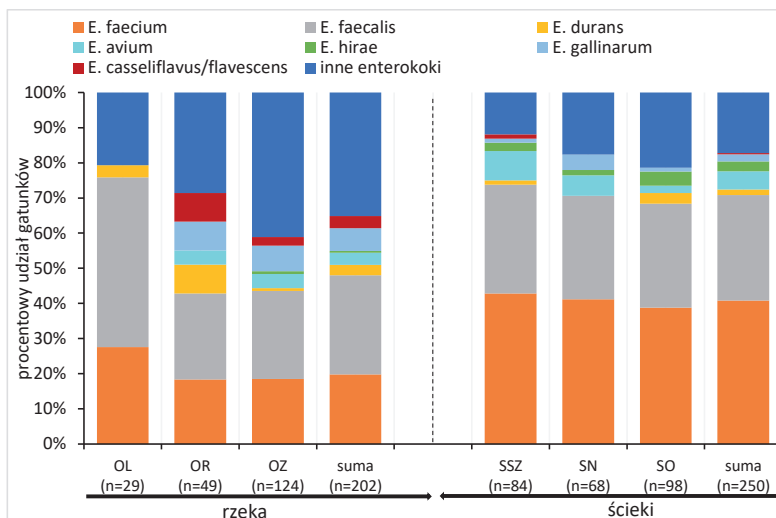
W wodzie rzeki Łyny (wśród 202 szczepów) oraz w analizowanych ściekach (wśród 250 szczepów) zidentyfikowano 7 różnych gatunków enterokoków: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*. Oznaczono również enterokoki do rodzaju *Enterococcus* (nie ustalono ich przynależności gatunkowej), które określono jako inne enterokoki (Rys. 44). Najmniej gatunków zidentyfikowano w próbkach wody z obszarów leśnych (3 gatunki), najwięcej z obszarów rolnych i zurbanizowanych (6 i 7 gatunków). W wodzie rzeki Łyny wśród zidentyfikowanych 131 szczepów przyporządkowanych do 7 gatunków dominowały *E. faecalis* – 57 szczepów (43,5%) i *E. faecium* – 40 szczepów (30,5%). Biorąc pod uwagę poszczególne obszary leśne, rolne i zurbanizowane procentowy udział obu gatunków wśród wszystkich zidentyfikowanych enterokoków był podobny i nie przekraczał 28%. Wyjątek stanowił *E. faecalis* oznaczany w wodzie na obszarach leśnych, którego skład procentowy był największy i wyniósł 48,3%. Liczba (0–9 szczepów) i udział procentowy (0,8–8,2%) pozostałych 5 gatunków w wodzie na wszystkich badanych obszarach był znacznie mniejszy (Rys 44). *E. faecalis* i *E. faecium* są to dwa najbardziej rozpowszechnione gatunki w ludzkim kale i ściekach (Boehm i Sas-soubre 2014, Leberton 2014, Ruoff i in. 1990, Manero i in. 2002). Znaczna liczba tych drobnoustrojów występuje też w odchodach zwierząt dzikich i hodowlanych (Aarestrup i in. 2002, Kühn i in. 2003, Layton i in. 2010, Wright i in. 2009, Nowakiewicz i in. 2014). Według Wrighta i in. (2009) u zwierząt udomowionych (koty i psy) występuje od 10^4 do 10^8 , a u dzikich ptaków (mewy, gołębie, kaczki, pelikany, czaple) od 10^3 do 10^5 komórek *E. faecalis* w 1 gramie fekaliiów. Podobne liczebności tych bakterii stwierdza się w odchodach zwierząt dzikich i hodowlanych (Leberton i in. 2014). Stąd też możliwe jest przedostawanie się tych drobnoustrojów do wód płynących w rejonach o niskiej jak i wysokiej antropopresji. Największym źródłem enterokoków w środowisku są jednak zanieczyszczenia kałowe przenikające do środowiska z dopływami punktowymi (ścieki miejskie, szpitalne, przemysłowe) oraz

obszarowymi (tereny użytkowane rolniczo). Potwierdzają to różne badania autorów (Ekwanzala i in. 2017, Ferguson i in. 2013, Lata i in. 2009) wskazujące, że *E. faecalis* i *E. faecium* są najczęściej izolowanymi enterokokami z wód rzecznych zanieczyszczonych kałem.

W badaniach własnych ścieków odprowadzanych do wód rzeki Łyny największą różnorodność gatunków oznaczono w ściekach szpitalnych (7 gatunków wśród 84 szczepów). W ściekach nieoczyszczonych zidentyfikowano 5 (wśród 68 szczepów), a w oczyszczonych 6 (wśród 98 izolatów) gatunków. Podobnie jak w wodach rzeki Łyny obserwowano dominację dwóch gatunków. Jednak w ściekach w przeciwieństwie do wód dominował *E. faecium* (102 szczepy, 40,8%), a następnie *E. faecalis* (75 szczepów, 30,0%). Natomiast udział procentowy pozostałych gatunków w badanych próbkach ścieków nie przekraczał 6% (Rys. 44). W sezonach badawczych największe liczebności i różnorodność gatunkową oznaczanych enterokoków stwierdzano wiosną i latem (rzeka Łyna) oraz wiosną i zimą (ścieki nieoczyszczone i oczyszczone). Jedynie *E. gallinarum* i inne gatunki liczniej oznaczano jesienią w ściekach szpitalnych. Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnego wpływu sezonu ($p > 0,05$) na liczebność większości oznaczanych gatunków enterokoków. Jedynie występowanie *E. gallinarum* było statystycznie istotnie skorelowane z porą roku zarówno w wodzie rzeki jak i w badanych ściekach. *E. gallinarum* to gatunek, który głównie występuje w przewodach pokarmowych ptaków (Dolka i in. 2017). Dlatego podczas ich migracji jesienią kiedy łączą się w większe grupy, mogą przedostawać się z ich odchodami do wód rzeki.

Większe liczebności i udział procentowy *E. faecium* w stosunku do liczebności *E. faecalis* w ściekach nieoczyszczonych jak i oczyszczonych oraz w pobliżu ich zrzutu do wód odbiorników stwierdzali również inni autorzy (Giebułtowicz i in. 2018, Sadowy i Łuczkiwicz 2014, Lanthier i in. 2011, Leclercq i in. 2013). Z drugiej strony w ściekach w Szwecji najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem był *E. faecalis* (Kühn i in., 2003), a *E. hirae* w ściekach w Portugalii i USA (Bonilla i in. 2006, Ferreira da Silva i in. 2007).

Uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają doniesienia Byappanahalli i in. (2012), że skład ilościowy i jakościowy enterokoków determinowany jest przez różnorodne czynniki antropogeniczne i środowiskowe. Według Sadowy i Łuczkiwicz (2014), dominacja *E. hirae* i *E. faecium* w rejonie ujścia rzeki do morza może wynikać z charakterystyki wód morskich i dopływu ścieków oczyszczonych z pobliskiej oczyszczalni ścieków. Lata i in. (2009) donosi natomiast, że w wodzie rzeki Ganga w Indiach również najczęściej dominował *E. faecalis*, którego skład procentowy wynosił 64%, a *E. faecium* 24% wśród wszystkich zidentyfikowanych enterokoków. Natomiast *E. hirae* (2%) izolowano tylko z miejsc, gdzie dopływały ścieki z oczyszczalni ścieków zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Występowanie *E. durans* (8%) wiązano natomiast z obecnością zanieczyszczeń pochodzących ze ścieków komunalnych.



Rys. 44. Skład procentowy oznaczanych gatunków enterokoków w wodzie rzeki Łyny na obszarach: OL – leśnych, OR – rolnych i OZ – zurbanizowanych oraz w ściekach: SSZ – szpitalnych, SN – nieoczyszczonych, SO – oczyszczonych

W badaniach własnych w rzece Łynie *E. hirae* izolowano jedynie z wody pobieranej ze stowiska zlokalizowanego na terenie zurbanizowanym (13Z), gdzie dopływały ścieki komunalne z oczyszczalni w Bartoszycach. Dopływające do tej oczyszczalni ścieki przemysłowe pochodzą z zakładów mięsnych „Pek-Bart” Sp. z o.o. Choć trudno jednoznacznie udowodnić ich wpływ na kształtowanie składu gatunkowego oznaczanych enterokoków, to badania Gotkowska-Płachta i in. (2013) wykazały, że generowane w procesie produkcji ścieki z przemysłu mięsnego mogą mieć istotny wpływ na skład mikrobioty ścieków oczyszczanych i powietrza w obrębie podzespółów do ich oczyszczania.

Ostatnio coraz więcej doniesień w literaturze światowej wskazuje na możliwość rozprzestrzeniania się wielolekoopornych i wirulentnych szczepów enterokoków w środowisku (Giebułtowicz i in. 2018, Ferguson i in. 2016, Sadowy i Łuczkiwicz 2014, Lata i in. 2016). Źródłem ich może być zarówno działalność antropogeniczna (ścieki, gospodarka rolna, turystyka) jak i oddziaływanie środowiskowe (dzikie ptactwo i zwierzęta).

W badaniach własnych podjęto próbę określenia największych źródeł zanieczyszczeń rzeki Łyny antybiotykoopornymi i wirulentnymi szczepami enterokoków. Uzyskano profil lekooporności (202 szczepów enterokoków izolowanych z wód Łyny i 250 ze ścieków) dla 13 leków przeciwdrobnoustrojowych należących do 10 różnych grup. Do badań wykorzystano leki reprezentujące: penicyliny, karbapenemy, aminoglikozydy, glikopeptydy, streptograminy, glicylcykliny, oksazolidynony, tetracykliny, fluorochinolony, chemioterapeutyki. Na podstawie reakcji na działanie leków klasyfikowano badane szczepy jako wielolekooporne (MDR) i o rozszerzonej oporności (XDR). Wśród 202 wyizolowanych szczepów enterokoków w wodzie rzeki Łyny 139 (68,8%) zakwalifikowano do MDR. Większy udział

procentowy (70,9%) i liczbę (88) szczepów MDR stwierdzano w wodzie z obszarów zurbanizowanych. Obszary leśne z minimalnym wpływem antropopresji i rolne nie były wolne od szczepów MDR. Jednak było ich mniej i charakteryzowały się opornością na mniejszą liczbę antybiotyków niż enterokoki izolowane z wody pobieranej z obszarów zurbanizowanych. Oporność na więcej niż 4 antybiotyki stwierdzono u 51,7, 57,1 i 67,7% szczepów odpowiednio w wodzie pochodzącej z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych. Dominującymi gatunkami MDR pod względem liczebności (50 i 33 szczepy) i udziału procentowego (87,7 i 82,5%) w wodzie rzeki Łyny bez względu na obszar izolacji były dwa gatunki *E. faecalis* i *E. faecium*.

W ściekach oczyszczonych odprowadzanych do wód rzeki Łyny wśród 98 wyizolowanych szczepów 91 (92,8%) zaklasyfikowano do MDR. Dużą liczbę (79 i 67) i udział procentowy (94,0% i 98,5%) szczepów MDR oznaczano też w ściekach szpitalnych i nieoczyszczonych. Niepokój wzbudza fakt, że w badanych ściekach izolowano szczepy o rozszerzonej oporności XDR u dwóch najistotniejszych klinicznie gatunków *E. faecalis* i *E. faecium*. Największą liczbę (2) i udział procentowy (5,6%) szczepów XDR stwierdzono w przypadku *E. faecium* w ściekach szpitalnych. Jeden szczep (2,6%) tego gatunku o rozszerzonej oporności izolowano również ze ścieków oczyszczonych. *E. faecium* jest najczęściej odpowiedzialny za duży odsetek zakażeń szpitalnych i charakteryzuje się największą opornością na badane antybiotyki (Szczypta i in. 2016, Byappanahalli i in. 2012).

Oporność izolatów na środki przeciwdrobnoustrojowe różniła się w zależności od testowanego gatunku i źródła jego pochodzenia. W wodzie rzeki Łyny na całej jej długości badane szczepy były najczęściej odporne na trimetoprim (ponad 70,0% szczepów), streptomycynę i niskie stężenia wankomycyny (powyżej 40% izolatów). Oznaczane enterokoki wykazywały największą wrażliwość na ampicylinę (od 0 do 4%) i na doksycyklinę (od 0 do około 10%). Podwyższona liczba wyizolowanych szczepów opornych na streptomycynę świadczy o rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki aminoglikozydowe wśród enterokoków w środowisku. Wysoka oporność na aminoglikozydy jest obserwowana wśród tych bakterii na całym świecie (Aarestrup i in. 2002, Lata i in. 2009) jak i w Polsce (Sadowy i Łuczkiwicz 2014). Wśród enterokoków izolowanych ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych, stwierdzano również podobną oporność na antybiotyki jak w przypadku enterokoków pochodzących z wody rzeki. Może to wskazywać na rozprzestrzenianie się lekoopornych enterokoków ze ściekami wzdłuż kontinuum rzeczno-Łyny. W badanych próbkach ścieków zidentyfikowano szczepy odporne na niskie stężenia wankomycyny, których udział procentowy zmieniał się od powyżej 20,0% (w ściekach szpitalnych) do około 60,0% (w ściekach oczyszczonych). Wśród dwóch sztandarowych gatunków *E. faecium* i *E. faecalis* określono obecność szczepów VRE opornych na wysokie stężenia wankomycyny (MIC od ≥ 32 do ≥ 256 mg·l⁻¹). Udział procentowy szczepów *E. faecalis* zaliczanych do VRE zmieniał się od 10,3% (ścieki oczyszczone) do 16,7% (ścieki nieoczyszczone). Natomiast *E. faecium* od 9,5% (ścieki nieoczyszczone) do 17,5% (ścieki oczyszczone). Podobny skład procentowy VRE (27,0%) w ściekach badanych z 4 różnych oczyszczalni w Stanach Zjednoczonych podaje Rosenberg Goldstein i in. (2014). Raporty na temat izolacji VRE ze ścieków w Europie pokazują że ich

liczebność jest zróżnicowana i waha się od 2 do 52% w zależności od użytej technologii, rodzaju ścieków i etapu ich oczyszczania (Rosenberg Goldstein i in. 2014, Kotzamanidis i in. 2009, Łuczkiwicz i in. 2010a, Morris i in. 2012).

Duże ilości antybiotykoopornych enterokoków w odprowadzanych ściekach oczyszczonych do wód Łyny mogły powodować wzbogacenie środowiska rzeki w te drobnoustroje i wpływać na ich rozprzestrzenianie się na znaczne odległości. Może świadczyć o tym fakt iż wśród szczepów izolowanych ze ścieków jak i z wody rzeki oznaczano oporność na podobne grupy antybiotyków. Ponadto w wodzie rzeki z obszarów zurbanizowanych (szczególnie w strefie zrzutu oczyszczanych ścieków) izolowano zaskakująco dużą liczbę enterokoków (około 70%) opornych na niskie stężenia ($6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) wankomycyny oraz około 20% szczepów enterokoków opornych na wysokie stężenia tego antybiotyku ($\text{MIC} \geq 256 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Może to wynikać z faktu, że wśród izolatów niewrażliwych na wankomycynę były gatunki *E. gallinarum* i *E. casseliflavus/flavescens* charakteryzujące się naturalną opornością na antybiotyki glikopeptydowe. Poza tym wśród enterokoków określonych jako inne 71 (35,1%) mogły być również szczepy wykazujące wrodzoną oporność na wankomycynę. Dodatkowo analizowane próbki posiewano bezpośrednio na podłoże SB z dodatkiem wankomycyny, co znacznie podnosi efektywność odzysku bakterii opornych na ten antybiotyk. W środowisku mogą występować enterokoki wankomycyno zależne (VDE z ang. vancomycin – dependent enterococci), których identyfikacja nie jest możliwa do wykrycia na podłożu bez dodatku wankomycyny. Iversen i in. (2002) podkreślają, że wysoki procent VRE (z ang. vancomycin resistant enterococci) w badanych próbkach wody i ścieków może wiązać się z zastosowaniem wzbogaconego podłoża w wankomycynę do bezpośrednich wysiewów próbek ze środowiska. Gambarotto i in. (2000) donosi, że 75% z 65 izolatów odzyskanych VRE z próbek kału zostałyby przeoczone, gdyby nie użyto wzbogaconego w wankomycynę podłoża do badań. Novais i in. (2005) zidentyfikował znaczny odsetek szczepów VRE (79%) w ściekach z placówek opieki zdrowotnej i 66,6% w ujściu rzeki Douro w Portugalii. Autor podaje, że VRE lepiej odzyskano z płytek zawierających wankomycynę (21/31 izolatów, 67,7%) niż z płytek Slanetza i Bartleya bez dodatku antybiotyku (1/31, 3,2%). Być może między innymi z tego powodu doniesienia o szczepach VRE pochodzących z próbek środowiskowych są raportowane rzadko (Sadowy i Łuczkiwicz 2014, Łuczkiwicz i in. 2010b). Niedoszacowanie związane z metodami izolacji tych drobnoustrojów może wynikać również z faktu, że część bakterii bytujących w danym biotopie określana jest jako VBNC (ang. viable but not culturable) i nie wyrasta na klasycznych podłożach hodowlanych. W badaniach własnych określono skład bakterii z rodziny *Enterococaceae in situ* metodą FISH. Eksperymentalnie *ex situ* określano również możliwość przeżywalności izolowanego z wody wielolekoopornego i wirulentnego szczepu *E. faecalis* metodą klasyczną i z zastosowaniem testu LIVE/DEAD BacLight™. Uzyskane wyniki wskazują na znaczną pulę bakterii VBNC w badanych próbkach wody, i długi czas ich przeżywalności (około ośmiu miesięcy) uzależniony od temperatury i warunków przechowywania. Baudišová (1997) donosi o porównawczym badaniu dotyczącym przeżycia bakterii z grupy coli, z grupy coli typu kałowego i *E. coli*, w sterylnej inie sterylnej wodzie rzecznej. W jałowej wodzie wszystkie bakterie przetrwały przez

wiele miesięcy. Jednak w warunkach niesterylnych (bliżej prawdziwych warunków środowiskowych) szybkość eliminacji wszystkich bakterii była znacznie szybsza. Wpływ różnych warunków fizyko-chemicznych (temperatura, nasłonecznienie, zasolenie) na przeżywalność bakterii kałowych potwierdzili również inni autorzy (Bordalo i in. 2002, Ishii i in. 2006, Olszewska i Łaniewska-Trokenheim 2013a, 2013b)

W wielu krajach w Europie (Szwecja, Hiszpania, Wielka Brytania) w wodach powierzchniowych stwierdzano enterokoki (7%), odporne na wyższe stężenia wankomycyny (20 mg·l⁻¹). Obecność tych bakterii oznaczano również w ściekach nieoczyszczonych (71,0%) i oczyszczonych (36,0%) Oporność ta była zidentyfikowana głównie wśród bakterii *E. faecalis*, które posiadały geny *vanA* (Kühn i in. 2005).

Wśród oznaczanych szczepów izolowanych z wody rzeki Łyny oraz ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych oznaczono przede wszystkim typy oporności *vanB* i *vanC*, (*vanC1* i *vanC2/C3*). Występowały one przeważnie (45% oznaczanych izolatów) u szczepów charakteryzujących się fenotypową opornością na wankomycynę (MIC \geq od 32 mg·l⁻¹). Jednak liczba izolatów opornych na niskie stężenia wankomycyny była większa i wynosiła 68,8%, co wskazuje, że część szczepów miała inne determinanty oporności niż uwzględnione w niniejszym badaniu. Przeważnie najwięcej szczepów i różnych gatunków posiadających badane geny *van* izolowano z wody na terenach zurbanizowanych i ze ścieków. Oporność *vanC1* i *vanC2/3* najczęściej oznaczano wśród *E. gallinarum*, i *E. casseliflavus*, charakterystyczną dla tych gatunków bakterii. Natomiast gen *vanA* wykryto jedynie u 2 szczepów *E. avium*, w 5 szczepach enterokoków określonych jako inne w wodzie rzeki Łyny oraz u 2 szczepów *E. faecium* izolowanych ze ścieków szpitalnych. Najwięcej izolatów posiadających geny *van* (od kilku do kilkunastu szczepów) oznaczano wśród *E. faecalis* i *E. faecium*. Zaskakująca była obecność genów *vanC1* u tych szczepów. Do niedawna uważano, że typ oporności VanC jest kodowany chromosomalnie i nie ulega transferowi horyzontalnemu. Jednak coraz częściej gen ten wykrywany jest wśród *E. faecium* i *E. faecalis*, co sugeruje, że może zostać nabyty od *E. gallinarum* i *E. casseliflavus* w wyniku poziomego transferu (Moura i in. 2013). Uzyskane wyniki badań własnych potwierdzają doniesienia o konieczności zachowania ostrożności przy stosowaniu genów *vanC1* i *vanC2/3* jako markerów specyficznych do wykrywania *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*. Z roku na rok epidemiolodzy biją na alarm w związku z szybkim wzrostem liczebności i rozprzestrzenianiem się enterokoków wielolekoopornych i VRE w różnych środowiskach zarówno szpitalnych jak i przyrodniczych. Źródła pochodzenia tych bakterii mogą być różne i nadal nie są do końca wyjaśnione. Kolejnym problemem terapeutycznym jest występowanie wśród enterokoków szczepów posiadających czynniki wirulencji, które są powiązane z ludzkimi infekcjami i coraz częściej proliferują środowisko (Ferguson i in. 2016, Hancock i in. 2014).

W badaniach własnych wśród 202 wyizolowanych szczepów enterokoków z rzeki Łyny 107 (53,0%) było zjadliwych. Większą wirulencją cechowały się szczepy izolowane z badanych ścieków wśród 250 szczepów 188 (75,2%) miało różne czynniki wirulencji. Zarówno w wodzie jak i w ściekach

najwięcej izolatów (bez względu na miejsce ich pochodzenia) posiadało czynnik wirulencji określane jako adhezyna ściany komórkowej – *efaA* (czynnik odpowiedzialny za zapalenie wsierdza), oraz feromony płciowe – *cob*, *cpd* i *ccf* biorące czynny udział w procesie wymiany materiału genetycznego, a tym samym indukowaniu wirulencji. Znaczny procent izolowanych szczepów (około 40,0%) z wody rzeki posiadało również hialuronidazę – *hyl*. Natomiast w ściekach dodatkowo dosyć licznie występowały szczepy posiadające cytolizynę – *cylA* (30,1%) (ścieki szpitalne), białko wiążące kolagen *ace* (36,8%) (ścieki nieoczyszczone) i żelatynazę – *gelE* (36,8%) (ścieki oczyszczone). Wśród zidentyfikowanych gatunków *E. faecalis* charakteryzował się większą liczbą szczepów posiadających różne czynniki wirulencji niż *E. faecium*. Podobne wyniki dotyczące rodzaju i częstości występowania czynników wirulencji wśród szczepów szpitalnych w Bułgarii uzyskała Strateva i in. (2016). Stwierdzono, że największym rezerwuarem zjadliwych enterokoków były głównie ścieki nieoczyszczone i oczyszczone odprowadzane do Łyny oraz woda rzeki z obszarów zurbanizowanych. Podobne cechy wirulencji wśród enterokoków izolowanych z rzeki Ganges w Indiach oznaczała również Lata i in. (2009). Geny wirulencji *asa* (substancja agregująca) i *cylA* (toksyna cytolityczna) dominują wśród różnych szczepów enterokoków izolowanych ze środowiska szpitalnego, naturalnego, zwierząt, czy ścieków (Creti i in. 2004, Ferguson i in. 2016). Obecnie obserwuje się szybkie rozprzestrzenianie markerów wirulencji, antybiootykoopornych bakterii (ARB – antibiotic resistant bacteria) i genów oporności na antybiotyki (ARGs – antibiotic resistance genes) w środowisku. Źródłem tych zagrożeń mikrobiologicznych są punktowe i nie punktowe zanieczyszczenia z terenów miejskich użytkowanych rolniczo, szpitali i ścieków. Wzrost puli ARB i ARG i w ściekach oczyszczonych i wodach, do których są odprowadzane związany jest z gromadzeniem i rozprzestrzenieniem genów oporności i wirulencji na skutek ich horyzontalnego transferu pomiędzy różnymi bakteriami co powoduje zagrożenie dla zdrowia publicznego (Korzeniewska i Harnisz 2018, Lekunberri i in. 2017, Niestępski i in. 2019, Osińska i in. 2017, Ziemińska–Buczyńska i in. 2015). Zagrożenie związane z rozprzestrzenianiem się wielolekoopornych i wirulentnych gatunków enterokoków w środowisku jest tym bardziej realne że nie ma idealnych metod do oszacowania całkowitej puli tych drobnoustrojów. Dopiero połączenie metod klasycznych i różnych metod molekularnych pozwala na bardziej pełną i wiarygodną ocenę oraz rozpoznanie rzeczywistej puli tych drobnoustrojów w badanym biotopie.

Rozpatrując wpływ sposobu użytkowania zlewni, własności fizykochemicznych, sezonu badań na liczebność i skład jakościowy oznaczanych drobnoustrojów oraz ich wzajemne zależności uwzględniono różne analizy statystyczne (PCA, analiza skupień WARDA, dwuczynnikowa ANOVA, korelacje Pearsona). Na ich podstawie stwierdzono, że wszystkie te czynniki przeważnie statystycznie istotne ($<0,05$) korelują z oznaczanymi bakteriami. Na podstawie analizy PCA wykazano, że liczebności oznaczanych bakterii metodą klasyczną i FISH oraz wartości określanych parametrów fizyko-chemicznych były największe wiosną i latem przede wszystkim na terenach zurbanizowanych, najniższe natomiast w wodzie na obszarach leśnych głównie zimą. Analiza skupień pozwoliła na określenie najbardziej powiązanych środowisk w aspekcie występowania antybiootykoopornych i wirulentnych enterokoków.

Najbardziej podobne pod względem profili antybiotykooporności oznaczanych enterokoków okazały się wody rzeki z terenów rolnych i leśnych. Drugą grupę stanowiły pozostałe środowiska (analizowane ścieki szpitalne, nieoczyszczone i oczyszczone oraz wody z terenów zurbanizowanych) z silniejszym powiazaniem ich występowania w wodzie z obszarów zurbanizowanych i w ściekach oczyszczonych. W przypadku identyfikowanych różnych genów wirulencji i oporności na wankomycynę (*van*) analiza skupień pozwoliła na wyodrębnienie również dwóch klastrów. Jeden łączył wodę z obszarów zurbanizowanych i ścieki oczyszczone, a drugi pozostałe badane środowiska z silniejszym powiazaniem między występowaniem enterokoków z podobnymi genami wirulencji i *van* w ściekach nieoczyszczonych i szpitalnych.

7. Podsumowanie i wnioski

W pracy przedstawiono wyniki analiz mikrobiologicznych i fizyko-chemicznych wód rzeki Łyny prowadzonych na ponad 190 kilometrowym odcinku (od źródeł do granicy kraju), na stanowiskach usytuowanych na obszarach leśnych, rolniczych i zurbanizowanych. W celu określenia jaki wpływ na jakość mikrobiologiczną wód rzeki Łyny mają punktowe zrzuty zanieczyszczeń, w badaniach uwzględniono ścieki szpitalne i komunalne wytwarzane na terenie miasta Olsztyn i odprowadzane z miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” do rzeki. Przeanalizowano liczebność, skład jakościowy, aktywność metaboliczną oraz zmienność sezonową wybranych wskaźników mikrobiologicznych. Ocenę jakości wód rzeki prowadzono metodami klasycznymi i molekularnymi. Szczególną uwagę zwrócono na enterokoki, które są bioindykatorami zanieczyszczeń fekalnych w ekosystemach wodnych. Bakterie te w związku z ich narastającą wielolekoopornością i wirulencją oraz rozprzestrzenianiem w środowiskach przyrodniczych mogą stanowić poważne zagrożenie epidemiologiczne.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono zróżnicowanie przestrzenne i czasowe wszystkich grup bakterii (oznaczanych zarówno metodami klasycznymi jak i molekularnymi), wynikające z lokalizacji stanowisk badawczych i sezonów poboru próbek wody oraz wpływu czynników środowiskowych i działalności antropogenicznej. Analiza wariancji ANOVA potwierdziła, że różnice pomiędzy oznaczanymi liczebnościami grup bakterii w zależności od czasu i miejsca poboru próbek badanej wody były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Wody rzeki Łyny były zróżnicowane pod względem własności fizyko-chemicznych w zależności od sezonu i miejsca poboru próbek do badań. Różnice te dla większości określanych właściwości były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Na podstawie wartości oznaczonych parametrów zaklasyfikowano wody rzeki Łyny jako wody I i II klasy czystości. Na obszarach rolnych zimą i latem oraz zurbanizowanych latem głównie w pobliżu zrzutu ścieków oczyszczonych stwierdzano również wartości tych wskaźników na poziomie właściwym dla wód pozaklasowych.

Stwierdzono statystycznie istotne dodatnie zależności ($p < 0,01$) między liczebnością większości oznaczanych grup bakterii a stężeniem związków węgla (TOC, DOC, POC), azotu (N_{NO_2}), fosforu ($P_{PO_4^{3-}}$ oraz P_{og}) oraz ChZT. Tego typu zależności potwierdzają wrażliwość analizowanych drobnoustrojów na wszelkie zmiany zachodzące w środowisku związane z rodzajem i dostępnością materii organicznej. Wskazują również, że oznaczane wskaźniki mikrobiologiczne są czułym bioindykatorem zanieczyszczeń wód rzeki Łyny.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły iż największe wartości parametrów fizyko-chemicznych oraz liczebności bakterii oznaczonych metodami molekularnymi (FISH) i klasycznymi występują na terenach zurbanizowanych, wiosną i latem, a najmniejsze na obszarach zalesionych przeważnie zimą.

Liczby oznaczanych bakterii w wodzie Łyny za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) były kilka tysięcy razy większe niż oznaczane metodami klasycznymi. Świadczy to o obecności w wodzie dużych liczebności bakterii VBNC (ang. viable but not culturable) żywych, ale niewyrastających na standardowych podłożach mikrobiologicznych. Stwierdzono również (przy użyciu metody

LIVE/DEAD BacLight™) dużą żywotność a tym samym aktywność metaboliczną ogólnej liczby bakterii (OLB), która wynosiła średnio około 60%. W sezonach badawczych najmniejszą liczbę żywych OLB odnotowano zimą 35,9%, a największą wiosną 77,6%.

Analizowana *ex situ* przeżywalność izolowanego z wody wielolekoopornego i wirulentnego szczepu *E. faecalis* metodą klasyczną i z zastosowaniem testu LIVE/DEAD BacLight™ była zróżnicowana. Uzyskane wyniki wskazują na znaczną pulę bakterii VBNC w badanych próbkach wody i długi czas ich przeżywalności (około ośmiu miesięcy) uzależniony od temperatury i warunków przechowywania.

W analizowanych ściekach komunalnych liczebności oznaczanych bakterii wskaźnikowych (FIB) były zwykle kilka rzędów wielkości większe niż oznaczane w wodzie rzeki Łyny. W procesie oczyszczania ścieków w miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” liczba tych bakterii ulegała obniżeniu o 96–98%. Jednakże, pomimo wysokiej skuteczności procesu oczyszczania, w ściekach oczyszczonych drobnoustroje te utrzymywały się na poziomie od poniżej 1 log jtk·ml⁻¹ (zimą, wiosną i latem) do około 3,5 log jtk·ml⁻¹ (jesienią).

W wodzie rzeki Łyny (wśród 202 szczepów) oraz w ściekach (szpitalne, oczyszczone i nieoczyszczone) (wśród 250 szczepów) zidentyfikowano 7 różnych gatunków enterokoków: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*. Najmniejszą liczebność (29 szczepów) i różnorodność gatunkową enterokoków (3 gatunki) izolowano z próbek wody płynącej przez tereny leśne. Z wody na terenie obszarów rolnych wyizolowano i zidentyfikowano 6 gatunków spośród 49 izolowanych szczepów. Największą liczbę szczepów (124) i gatunków (7) stwierdzono w wodzie pobieranej z terenów zurbanizowanych. W ściekach nieoczyszczonych zidentyfikowano 5 (wśród 68 szczepów), a w oczyszczonych odprowadzanych do wód Łyny 6 (wśród 98 szczepów) gatunków. Największą różnorodność gatunków oznaczono w ściekach szpitalnych (7 gatunków wśród 84 szczepów). W wodzie rzeki Łyny bez względu na miejsce poboru próbek wody dominował *E. faecalis*, natomiast w ściekach *E. faecium*.

Izolowane z wody rzeki Łyny enterokoki charakteryzowały się wielolekoopornością (MDR). Spośród 202 wyizolowanych szczepów do MDR zakwalifikowano 139 (stanowiły one 68,8%). Spośród szczepów wyizolowanych ze ścieków oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny 92,9% było szczepami wielolekoopornymi. Analizowane izolaty pochodzące z wody rzeki (bez względu na miejsce izolacji) były najczęściej odporne na trimetoprim (ponad 70,0% szczepów), streptomycynę i niskie stężenia wankomycyny (powyżej 40% izolatów). Największą wrażliwość (od 0 do około 10%) wykazywały natomiast na doksycyklinę i ampicylinę (0 – 4%). Enterokoki izolowane ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych miały podobną oporność na antybiotyki jak enterokoki izolowane z wody rzeki. Może to wskazywać na rozprzestrzenianie się lekoopornych enterokoków wraz ze ściekami wzdłuż kontinuum rzeczno-

Wśród *Enterococcus faecium* i *E. faecalis* stwierdzano obecność szczepów VRE opornych na wysokie stężenia wankomycyny (MIC od ≥ 32 do ≥ 1024 mg·l⁻¹). Więcej tych szczepów izolowano

z wody rzeki Łyny z obszarów użytkowanych rolniczo i zurbanizowanych. Wśród izolatów pozyskanych z wody płynącej przez obszary zalesione oznaczany MIC wankomycyny nie przekraczał $32 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. W badanych ściekach udział procentowy szczepów *E. faecalis* zaliczanych do VRE wahał się od 10,3% (ścieki oczyszczone) do 16,7% (ścieki nieoczyszczone). Natomiast udział *E. faecium* wahał się od 9,5% (ścieki nieoczyszczone) do 17,5% (ścieki oczyszczone).

Wśród 202 szczepów enterokoków wyizolowanych z wody rzeki Łyny 91 (45,0%) posiadało geny oporności na wankomycynę *van B*, *van C1* i *van C2/C3*. Jednak liczba izolatów opornych na niskie stężenia wankomycyny ($6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) była większa i wynosiła 139 (68,8%), co wskazuje że 48 szczepów miało inne geny *van* niż uwzględnione w obecnym badaniu.

Geny *van B* najczęściej występowały wśród *E. faecium* i *E. faecalis* stanowiły one odpowiednio 43,5 i 38,7% oraz 44,4 i 50,0% wszystkich izolowanych szczepów z rzeki Łyny płynącej przez obszary zurbanizowane oraz rolnicze. Geny te stwierdzano również u 1 szczepu *E. hirae* (100%), 1 szczepu *E. gallinarum* (11%) i 2 enterokoków określanych jako inne (4%) w wodzie z terenów zurbanizowanych.

Dominację genów *van C1* stwierdzono przede wszystkim u gatunków *E. gallinarum* izolowanych z rzeki Łyny z obszarów rolniczych (4 szczepy - 100%) i zurbanizowanych (6 szczepów - 67%). Oznaczano je również wśród *E. faecium*, *E. faecalis* i *E. gallinarum* izolowanych z próbek wody pochodzących z terenów leśnych, rolnych i zurbanizowanych. Geny *van C2/C3* stwierdzano głównie u szczepów *E. durans* i *E. casseliflavus* izolowanych z wody na obszarach rolnych i zurbanizowanych, gdzie stanowiły 100% wśród wyodrębnionych izolatów.

Wśród 202 wyizolowanych szczepów enterokoków z rzeki Łyny 107 (53%) miało różne czynniki wirulencji (*cylA*, *hyl*, *ace*, *ffaA*, *as*, *geIE*, *as*, *esp*, *cob*, *cpd*, *ccf*). Dużą zjadliwością charakteryzowały się też szczepy izolowane ze ścieków, spośród 250 szczepów 188 (75,2%) było zjadliwych. Zarówno w wodzie jak i w ściekach najwięcej izolatów (bez względu na miejsce ich pochodzenia) posiadało adhezyne ściany komórkowej - *efaA*, oraz feromony płciowe - *cob*, *cpd* i *ccf* biorące czynny udział w procesie wymiany materiału genetycznego, a tym samym indukowaniu wirulencji. Znaczny procent izolowanych szczepów (około 40%) z wody rzeki posiadało również hialuronidazę - *hyl*. Natomiast w ściekach dosyć licznie występowały szczepy posiadające cytolizynę - *cylA* (30%) (ścieki szpitalne), białko wiążące kolagen *ace* (36%) (ścieki nieoczyszczone) i żelatynazę - *geIE* (36%) (ścieki oczyszczone). Wśród zidentyfikowanych gatunków większy procent szczepów posiadających geny wirulencji stwierdzano u *E. faecalis* (28,6 - 83%) niż u *E. faecium* (0 - 78,3%).

Uzyskane wyniki pozwoliły na wyjaśnienie postawionych w pracy hipotez badawczych i sformułowanie następujących wniosków:

1. Sposób użytkowania zlewni jest jednym z głównych czynników wpływających na kształtowanie zmienności składu jakościowego i liczebności oznaczanych mikroorganizmów w wodzie rzeki. Najmniejsze liczebności oznaczanych bakterii stwierdzano w wodzie Łyny płynącej przez obszary leśne z ograniczonym wpływem antropopresji. W rzece przepływającej przez obszary

- użytkowane rolniczo i zurbanizowane liczba oznaczanych bakterii wzrastała kilkukrotnie w zależności od sezonu i miejsca poboru próbek do badań oraz rodzaju oznaczanych drobnoustrojów.
- Oznaczone wskaźniki mikrobiologiczne (FIB, E_{VAN} , bakterie oznaczane metodami fluorescencyjnymi) są czułym bioindykatorem zanieczyszczeń wód rzeki Łyny płynącej przez obszary o różnym sposobie użytkowania zlewni. Zależności między stopniem i rodzajem zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanej rzeki, a sposobem użytkowania zlewni, sezonem badań i wpływem czynników fizyko-chemicznych mogą stanowić uniwersalny wskaźnik w ocenie jakości tych ekosystemów.
 - Wyniki liczebności bakterii uzyskane metodami fluorescencyjnymi były przeważnie kilka razy większe niż przy użyciu metod hodowlanych. Oznacza to, że w rzece może znajdować się duża pula bakterii pochodzenia kałowego *E. faecalis* i *E. faecium* (ENF191, ENU140), które są zaliczane do bakterii VBNC, żyjących ale nie wyrastających na klasycznych podłożach hodowlanych. Uwzględnienie tylko metod klasycznych do ich identyfikacji może prowadzić do niedoszacowania liczebności tych bakterii w danym biotopie, a tym samym błędnej interpretacji wyników, co jest szczególnie niebezpieczne w przypadku form wielolekoopornych i wirulentnych.
 - Stwierdzono wpływ sposobu użytkowania zlewni na liczebność szczepów posiadających geny wirulencji. W rzece płynącej przez obszary zalesione udział procentowy *E. faecium* i *E. faecalis* zawierających geny wirulencji zazwyczaj nie przekraczał 60%, natomiast w wodzie z obszarów rolniczych i zurbanizowanych często wynosił około 90%.
 - Stwierdzone w wodach Łyny wirulentne i wielolekooporne szczepy enterokoków (w tym szczepy odporne na wankomycynę VRE) stanowią zagrożenie epidemiologiczne dla środowiska przyrodniczego i jego użytkowników. Enterokoki mogą przekazywać geny oporności na antybiotyki do zasiedlających te środowisko bakterii natywnych, przez co wzbogacają wody w bakterie wielolekooporne i geny wankomycynooporności.
 - Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie zróżnicowania anlizowaych środowisk (rzeka Łyna oraz ścieki szpitalne, nieoczyszczone i oczyszczone) ze względu na występowanie antybiotykoopornych i wirulentnych enterokoków. Stwierdzono zbliżony profil genów oporności *van* oraz czynników wirulencji w ściekach oczyszczonych i wodach rzeki Łyny z obszarów zurbanizowanych. Pozostałe badane środowiska z zaznaczonym silniejszym powiązaniem między ściekami szpitalnymi, ściekami nieoczyszczonymi i wodami pochodzącymi z terenów rolniczych, stanowiły odrębną grupę powiązanych ze sobą środowisk. W przypadku fenotypowej oporności oznaczanych izolatów na antybiotyki powiązane ze sobą były wody z obszarów rolnych i leśnych stanowiące jeden klaster, natomiast pozostałe badane środowiska (wody z obszarów zurbanizowanych oraz ścieki nieoczyszczone, oczyszczone i szpitalne), utworzyły odrębny klaster.
 - Uzyskane wyniki wskazują, że ścieki komunalne są jednym z głównych źródeł zanieczyszczeń rzeki Łyny wirulentnymi i wielolekoopornymi enterokokami. Bakterie te wraz ze ściekami odprowadzanymi do Łyny rozprzestrzeniają się wzdłuż kontinuum rzecznoego na znaczne

odległości. Na obszarach leśnych i rolnych drobnoustroje te mogą również pochodzić z innych źródeł. Należy jednak podkreślić, że nie ma idealnych metod do oszacowania całkowitej liczebności wielolekoopornych i wirulentnych gatunków enterokoków w środowisku. Jednak połączenie metod klasycznych i molekularnych pozwala na bardziej pełną i wiarygodną ocenę rzeczywistej puli tych drobnoustrojów w badanym biotopie.

8. Literatura

1. Aarestrup F.M., Butaye P., Witte, W., 2002. Nonhuman reservoirs of enterococci. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis. Molecular Biology and Antibiotic Resistance* 55-100.
2. Almeida C.A., Quintar S., González P., Mallea M.A., 2007. Influence of urbanization and tourist activities on the water quality of Potrero de los Funes River (San Luis – Argentina). *Environmental Monitoring and Assessment* 133, 459 - 465.
3. Amann R., Ludwig W., Schleifer K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1), 143 – 169.
4. Amann R., Snaidr J., Wagner M., Ludwig W., Schleifer K.H., 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *The Journal of Bacteriology* 178(12), 3496 – 3500.
5. Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6), 1919 – 1925.
6. Bacelar-Nicolau P., Nicolau L.B., Marques J.C., Morgado F., Pastorinho R., Azeiteiro U.M., 2003. Bacterioplankton dynamics in the Mondego eustary (Portugal). *Acta Oecologica* 24, 67-75.
7. Barra Caracciolo A., Grenni P., Ciccoli R., DI Landa G., Cremisini C., 2005. Simazine biodegradation in soil: analysis of bacterial community structure by in situ hybridization. *Pest Management Science*. 61, 863–869.
8. Bartley P.B., Schooneveldt J.M., Looke D.F.M., Morton A., Johnson D.W., Nimmo G.R., 2001. The relationship of a clonal outbreak of *Enterococcus faecium* vanA to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* incidence in a Australian hospital. *The Journal of Hospital Infection* 48, 43–54.
9. Baudišová I., 1997. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. *Water Science & Technology* 35(11–12), 333 – 336.
10. Berman T., Kaplan B., Chava S., Viner Y., Sherr B.F., Sherr E.B., 2001. Metabolically active bacteria in Lake Kinneret. *Aquatic Microbial Ecology* 23, 213 – 224.
11. Bertaux J., Gloger U., Schmid M., Hartmann A., Scheu S., 2007. Routine fluorescence *in situ* hybridization in soil. *The Journal of Microbiological Methods* 69, 451 – 460.
12. Boehm A. B., Fuhrman J.A., Mrše R.D., Grant S.B., 2003. Tiered Approach for Identification of a Human Fecal Pollution Source at a Recreational Beach: Case Study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environmental Science & Technology* 37(4), 673 – 680.
13. Boehm A.B., Sassoubre L.M., 2014. Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston.
14. Boehm A.B., Soller J.A., 2011. Risks associated with recreational waters: Pathogens and fecal indicators. In: Meyers R.A. (Ed.). *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer.
15. Bojarczuk A., Jelonekiewicz Ł., Lenart – Boroń A., 2018. The effect of anthropogenic and natural factors on the prevalence of physicochemical parameters of water and bacterial water quality indicators along the river Białka, southern Poland. *Environmental Science and Pollution Research* 25(10), 10102 – 10114.
16. Bonilla T.D., Nowosielski K., Esiobu N., McCorquodale D.S., Rogerson A., 2006. Species assemblages of *Enterococcus* indicate potential sources of fecal bacteria at a south Florida recreational beach. *Marine Pollution Bulletin* 52, 807 – 810.

17. Bordalo A.A., Onrassami R., Dechsakulwatana C., 2002. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakong River, Thailand). *Journal of Applied Microbiology* 93(5), 864 – 71.
18. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S. i in., 2009. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 48(1), 1 – 12.
19. Bouvier T., Del Giorgio P.A., 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 3 – 15.
20. Bruns A., Berthe – Corti L., 1998. In situ detection of bacteria in continuous-flow cultures of seawater sediment suspensions with fluorescently labelled rRNA – directed oligonucleotide probes. *Microbiology* 144, 2783 – 2790.
21. Budzińska K., Jurek A., Szejniuk B., Wroński G., 2011. Skuteczność usuwania zanieczyszczeń bakteriologicznych w procesach oczyszczania ścieków z zastosowaniem stawów biologicznych. *Rocznik Ochrony Środowiska* 13(2), 1519 – 1530.
22. Byappanahalli M., Fujioka R., 2004. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Science and technology* 50(1), 27 – 32.
23. Byappanahalli M.N., Nevers M.B., Korajkic A., Staley Z.R., Harwood V.J., 2012. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(4), 685 – 706.
24. Cabral J.P.S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public* 7(10), 3657 – 3703.
25. Carlet J., Rambaud C., Pulcini C., 2012. WAAR (World Alliance against Antibiotic Resistance): Safeguarding antibiotics. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.*; 1:25%U <https://doi.org/10.1186/2047-2994-1-25> PMID: 22958542.
26. Caruso C.C., Hitchcock E.M., Dick R.B., Russo J.M., Schmit J.M., Cincinatti O.H., 2004. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health. Overtime and extended work shifts: recent findings on illnesses, injuries, and health behaviors. DHHS (NIOSH) Publication No. 2004-143.
27. Cecchini M., Langer J., Sławomirski L., 2015. Antimicrobial resistance in G7 countries 441 and beyond: Economic Issues. *Policies and Options for Action*, OECD 442. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Antimicrobial-Resistance-in-G7-Countries-and-443-Beyond.pdf>
28. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G., 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 686 – 707.
29. Cheng S., McCleskey F.K., Gress M.J., Petroziello J.M., Liu R., Namdari H., Beninga K., Salmen A., DelVecchio V.G., 1997. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1248 – 1250.
30. Choi J.W., Sherr E.B., Sherr B.F., 1996. Relation between presence-absence of a visible nucleodand metabolic activity in bacterioplankton cells. *Limnology and Oceanography* 41, 1161 – 1168.
31. Christensen H., Hansen M., Sørensen J., 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 1753 – 1761.
32. Chróst R. J., Koton M., Siuda W. 2000. Bacterial secondary production and bacterial biomass in four mazurian lakes of differing trophic status. *Pol. J. Environ. Stud.*, 9(4): 255-266.

33. Chróst R.J., Siuda W., 2006. Microbial production, utilization, and enzymatic degradation of organic matter in the upper trophogenic layer in the pelagial zone of lakes along a eutrophication gradient. *Limnology and Oceanography* 51, 749 – 762.
34. Citak S., Yucel N., Mendi A., 2005. Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. *Journal of Food Processing and Preservation* 29, 183 – 195.
35. CLSI, Clinical and Laboratory Standards institute. (2012). In Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard (11 ed). Wayne, PA: Institute, C.a.L.s. CLSI document M02-A11.
36. Comerlato C.B., Resende M.C., Caierão J., d’Azevedo P.A., 2013. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108, 590 – 595.
37. Creti R., Imperi M., Bertuccini L., Fabretti F., Orefici G., Di Rosa R., Baldassarri L., 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology* 53, 13 – 20.
38. da Silva M.F., Vaz-Moreira I., Gonzalez-Pajuelo M., Nunes O.C., Manaia C.M., 2007. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 60,166 – 176.
39. De Graef E. M., Devriese L. A., Vancanneyt M., Baele M., Collins M. D., Lefebvre K., i in., 2003. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcicus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(4), 1069 – 1074.
40. Moura T.M., Cassenego A.P.V., Campos F.S., Ribeiro A.M.L., Franco A.C., d’Azevedo P.A., Frazzon J., Frazzon A.P.G., 2013. Detection of *vanC*₁ gene transcription in vancomycin-susceptible. *Enterococcus faecalis*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 108, 453 – 456.
41. de Vaux A., Laguerre G., Diviès C., Prévost H., 1998. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48(2), 383 – 387.
42. Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P., 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 510 – 522.
43. Devriese L.A., Collins M.D., Wirth R., 1992. The genus *Enterococcus*. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer 1465 – 1481.
44. Dolka B., Chrobak-Chmiel D., Czopowicz M., Szeleszczuk P., 2017. Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLOS One* 12(9), e0185199.
45. Donderski W., Wilk I., 2002. The sanitary state of water in the Vistula river between Wyszogród and Toruń. *Polish Journal of Environmental Studies* 11(5), 509 – 515.
46. Dunalska J., 2009. Zmienność form węgla organicznego w zróżnicowanych troficznie ekosystemach jeziorowych. Rozprawy i Monografie 145. *Wydawnictwo UWM*. Olsztyn.
47. Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 24 – 27.
48. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 2000/60/WE ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej Dz.U. L 327 z dnia 22 grudnia 2000 r.

49. Eaton T.J., Gasson M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1628 – 1635.
50. Economou V., Gousia P., Kansouzidou A., Sakkas H., Karanis P., Papadopoulou C., 2013. Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters within an agricultural landscape. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216(4), 435 – 444.
51. Edge T.A., Boehm A.B., 2010. Classical and Molecular Methods to Measure Fecal Bacteria. In M. J. Sadowsky, & R. L. Whitman (Eds.). *The Fecal Bacteria*. Washington D. C., ASM Press.
52. Ekwanzala M.D., King Abia A.L., Ubomba Jaswa E., Keshri J., Momba N.B.M., 2017. Genetic relatedness of faecal coliforms and enterococci bacteria isolated from water and sediments of the Apies River, Gauteng, South Africa. *AMB Express* 7, 20.
53. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2012. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v_2.0_120101.pdf.
54. Facklam R. R., Collins M.D., 1989. Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology* 27(4), 731 – 734.
55. Ferguson D.M., Talavera G.N., Hernández L.A., Weisberg S.B., Ambrose R.F., Jay J.A., 2016. Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in Southern California and Puerto Rico. *Journal of Pathogens*. DOI: 10.1155/2016/3437214.
56. Ferguson J.L., Chao W.C.H., Lee E., Friedman K.L., 2013. The anaphase promoting complex contributes to the degradation of the *S. cerevisiae* telomerase recruitment subunit Est1p. *PLoS One* 8(1), e55055.
57. Ferreira da Silva M., Tiago I., Verissimo A., Boaventura R.A., Nunes O.C., Manaia C.M., 2007. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 166 – 176.
58. Filipkowska Z., 2003. Sanitary and bacteriological aspects of sewage treatment. *Acta Microbiologica Polonica* 52, 57 – 66.
59. Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L., 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(5), 1717 – 1721.
60. Frahm E., Heiber I., Hoffmann S., Koob C., Meier H., Ludwig W., Amann R., Schleifer K.H., Obst U., 1998. Application of 23SrDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control System. *Applied Microbiology* 21, 450 – 453.
61. Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Galvez A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *The International Journal of Food Microbiology* 151, 125 – 140.
62. Freese H.M., Karsten U., Schumann R., 2006. Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic River Warnow, Northeast Germany. *Microbial Ecology* 51(1), 117 – 127.
63. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., Kikhney J., Hagen R.M., Stender H., Poppert S., 2017. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology* 43, 1.
64. Fries J.S., Characklis G.W., Noble R.T., 2008. Sediment–water exchange of *Vibrio* sp. and fecal indicator bacteria: Implications for persistence and transport in the Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Water Research* 42, 941 – 950.

65. Galli D.A., Friesenegger A., Wirth R., 1992. Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPDI-encoded) aggregation substance. *Molecular Microbiology* 6, 1297 – 1308.
66. Gambarotto K., Ploy M.C., Turlure P., Grelaud C., Martin C., Bordessoule D., Denis F., 2000. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 620 – 624.
67. Gauthier F., Archibald F., 2001. The Ecology of —Faecal Indicator Bacteria Commonly Found in Pulp and Paper Mill Water Systems. *Water Research* 35, 2207 – 2218.
68. George I., Servais P., 2002. Sources et Dynamique des Coliformes dans le Bassin de la Seine; Rapport de Synthèse; Programme PIREN-Seine 1998–2001, Sources et dynamique des coliformes dans le bassin de la Seine. *Centre National de la Recherche Scientifique*.
69. Gescher D.M., Kovacevic D., Schmiedel D., Siemoneit S., Mallmann C., Halle E., Göbel U.B., Moter A., 2008. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) accelerates identification of Gram-positive cocci in positive blood cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32, 51 – 59.
70. Giebułtowicz J., Tyski S., Wolinowska R., Grzybowska W., Zaręba T., Drobnińska A., Wroczyński P., Nałęcz-Jawecki G., 2018. Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). *Environmental Science and Pollution Research* 25(6), 5788 – 5807.
71. Giraffa G., Olivari A.M., Neviani E., 2000. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiology* 17, 671 – 677.
72. Glińska-Lewczuk K., Burandt P., 2011. Effect of river straightening on the hydrochemical properties of floodplain lakes: Observations from the Łyna and Drwęca Rivers, N Poland. *Ecological Engineering* 37(5), 663 – 806.
73. Glińska-Lewczuk K., Gołaś I., Koc J., Gotkowska-Płachta A., Harnisz M., Rochwerger A., 2016. The impact of urban areas on the water quality gradient along a lowland river. *Environmental Monitoring and Assessment* 188, 624 – 638.
74. Glöckner F.O., Amann R., Alfreider A., Pernthaler J., Psenner R., Trebesius R., Schleifer K.H., 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 403 – 406.
75. Gołaś I., 2011. The effects of anthropogenic and environmental factors on the bacteriological quality of water in the upper reach of the Drwęca River. *Rozprawy i monografie* 163. UWM Olsztyn.
76. Gotkowska-Płachta A., Filipkowska Z., Korzeniewska Z., Janczukowicz W., Dixon B., Gołaś I., Szwalgin D., 2013. Airborne microorganisms emitted from wastewater treatment plant treating domestic wastewater and meat processing industry wastes. *CLEAN–Soil, Air, Water* 41(5), 429 – 436.
77. Gotkowska-Płachta A., Gołaś I., Korzeniewska E., Koc J., Rochwerger A., SolarSKI K., 2016. Evaluation of the distribution of fecal indicator bacteria in a river system depending on different types of land use in the southern watershed of the Baltic Sea. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4073 – 4085.
78. Goto D.K., Yan T., 2011. Effects of land uses on fecal indicator bacteria in the water and soil of a tropical watershed. *Microbes and Environments* 26(3), 254 – 260.
79. Griffin T.J., Lock C.M., Li X.J., i in. 2003. Abundance ratio-dependent proteomic analysis by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75(4), 867 – 874.
80. Gruden C.L., Fevig S., Abu-Dalo M., Hernandez M., 2003. 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) reduction in a mesophilic anaerobic digester: measuring redox behavior,

- differentiating abiotic reduction, and comparing FISH response as an activity indicator. *The Journal of Microbiological Methods* 52, 59 – 68.
81. Guzman Prieto A.M., van Schaik W., Rogers M.R.C., Coque T.M., Baquero F., Corander J., Willems R.J.L., 2016. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Frontiers in Microbiology* 7, 788.
 82. Haller L., Pote' J., Loizeau J-L., Wildi W., 2009. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Ecological Indicators* 9, 540 – 547.
 83. Halliday E., Gast R.J., 2011. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. *Environmental Science & Technology* 45(2), 370 – 379.
 84. Hancock L.E., Murray B.E., Sillanpää J., 2014. Enterococcal Cell Wall Components and Structures, Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. 503 – 546.
 85. Harmsen H.J.M., Elfferich P., Schut F., Welling G.W., 1999. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in fecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease* 11, 3 – 12.
 86. Harnisz M., Korzeniewska E., 2018. The prevalence of multidrug-resistant *Aeromonas* spp. in the municipal wastewater system and their dissemination in the environment. *Science of The Total Environment* 626, 377 – 383.
 87. Hatt B.E., Fletcher T.D., Walsh C.J., Taylor S.L., 2004. The influence of urban density and drainage infrastructure on the concentrations and loads of pollutants in small streams. *Environmental Management* 34, 112 – 124.
 88. Haugland R.A., Siefing S.C., Wymer L.J., Brenner K.P., Dufour A.P., 2005. Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Research* 39(4), 559 – 568.
 89. Heim S., Lleo M.D.M., Bonato B., Guzman C.A., Canepari P., 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *The Journal of Bacteriology* 184(23), 6739 – 6745.
 90. Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., 1999. Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. *Arkady*.
 91. Horman A., Rimhanen-Finne R., Maunula L., von Bonsdorff C-H., Torvela N., Heikinheimo A., Hanninen M-L., 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000–2001. *Applied Environmental Microbiology* 70, 87 – 95.
 92. Hou A., Laws E.A., Gambrell R.P., Bae H.S., Tan M., Delaune R.D., i in., 2006. Pathogen indicator microbes and heavy metals in Lake Pontchartrain following Hurricane Katrina. *Environmental Science & Technology*. 40(19), 5904 – 5910.
https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
 93. Huachang H., Jianwen Q., LiangY., 2010. Environmental factors influencing the distribution of total and fecal coliform bacteria in six water storage reservoirs in the Pearl River Delta Region. *Chin J. Environmental Science & Technology* 22(5), 663 – 668.
 94. Huycke M.M., Sahn D.F., Gilmore M.S., 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases* 4(2), 239 – 249.
 95. Hwang J.Y., Park J., Seo J.H., Cha M., Cho B.K., Kim J., Kim B.G., 2009. Simultaneous synthesis of 2-phenylethanol and L-homophenylalanine using aromatic transaminase with yeast Ehrlich pathway. *Biotechnology and Bioengineering* 102(5), 1323 – 1329.
 96. Ishii S., Ksoll W.B., Hicks R.E., Sadowsky M.J., 2006. Presence and Growth of Naturalized *Escherichia coli* in Temperate Soils from Lake Superior Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 612 – 621.

97. Islam M., Hofstra N., Islam A., 2017. The Impact of Environmental Variables on Faecal Indicator Bacteria in the Betna River Basin, Bangladesh. *Environ Process* 4, 319 – 332.
98. Iversen A., Kühn I., Franklin A., Möllby R., 2002. High Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci In Swedish Sewage. *Applied And Environmental Microbiology* 68(6), 2838 – 2842.
99. Iweriebor B.C., Gaqavu S., Obi L.C., Nwodo U.U., Okoh, A.I., 2015. Antibiotic susceptibilities of Enterococcus species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12, 4231 – 4246.
100. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *The Journal of Clinical Microbiology* 42, 3558 – 3565.
101. Jankowska K., 2018. Bakteriocenoza płytkiego litoralu Zatoki Puckiej w rejonie występowania podmorskiego drenażu wód podziemnych. *Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN* 141, 170.
102. Janssen P.H., 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology* 72, 1719 – 1728.
103. Juhna T., Birzniece D., Rubulis J., 2007. Effect of phosphorus on survival of Escherichia coli in drinking water biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 73(11), 3755 – 3758.
104. Kacar A., 2011. Analysis of spatial and temporal variation in the levels of microbial fecal indicators in the major rivers flowing into the Aegean Sea, Turkey. *Ecological indicators* 11, 1360 – 1365.
105. Kafil H.S., Mobarez A.M., Moghadam M.F., 2012. Multidrug resistant and most virulent *Enterococcus faecium* (strain 2653), isolated from hospitalized patient wound in Iran. *Scholarly Journal of Medicine* 2, 36 – 39.
106. Kalinowski A., 2011. The Issue of the Snowmelt Flooding on Post-Glacial Rivers Based on the Example of the Łyna River. Contemporary Problems of Management and Environmental Protection, No. 7, “Issues of Landscape Conservation and Water Management in Rural Areas”.
107. Kalinowski A., Glińska-Lewczuk K., Burandt P., Banaszek., 2012. Wpływ zjawisk lodowych na erozję brzegów koryta rzecznoego za przykładzie rzeki Łyny. *Inżynieria Ekologiczna* 31, 57– 71.
108. Kariyama R., Mitsuahata R., Chow J.W., Clewell D.B., Kumon H., 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycinresistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3092 – 3095.
109. Kay D., Ashbolt N., Wyer M.D., Fleisher J.M., Fewtrell L., Rogers A., Rees G., 2004. Derivation of numerical values for the World Health Organization guidelines for recreational waters. *Water Research* 38, 1296 – 1304.
110. Ke D., Picard F.J., Martineau F., Menard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3497 – 3503.
111. Kent A.D., Yannarell A.C., Rusak J.A., Triplett EW., McMahon K.D., 2007. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *The ISME Journal* 1, 38 – 47.
112. Kirschner A.K.T., Kavka G., Velimirov B., Mach R.L., Sommer R., Farnleitner A.H., 2009. Microbiological water quality along the Danube River: Integrating data from two whole-river surveys and a transnational monitoring network. *Water Research* 43(15), 3673 – 3684.
113. Koort J., Coenye T., Vandamme P., Sukura A., Björkroth J., 2004. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov. from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54(5), 1823 – 1827.
114. Korzeniewska E., 2005. Escherichia coli and other groups of opportunistically pathogenic and pathogenic bacteria in the offshore water of the Lake Wigry. *Archives of Environmental Protection* 31(2), 69 – 84.

115. Korzeniewska E., Harnisz M., 2012. Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of Enterobacteriaceae from sewage to the air and surface water. *Water, Air and Soil Pollution* 223 (7), 4039 – 4046.
116. Korzeniewska E., Korzeniewska A., Harnisz M., 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91, 96–102.
117. Korzeniewska E., Harnisz M., 2018. Relationship between modification of activated sludge wastewater treatment and changes in antibiotic resistance of bacteria. *Science of the Total Environment* 639, 304 – 315.
118. Kotzamanidis C., Zdragas A., Kourelis A., Moraitou E., Papa A., Yiantzi V., i in. 2009. Characterization of vanA-type *Enterococcus faecium* isolates from urban and hospital wastewater and pigs. *Journal of Applied Microbiology* 107, 997 – 1005.
119. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD), Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W. 2009. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp., 1-12.
120. Kühn I., Iversen A., Burman L.G., Olsson-Liljequist B., Franklin A., Finn M., Aarestrup F., Seyfarth A.M., Blanch A.R., Vilanova X., Taylor H., Caplin J., Moreno M.A., Dominguez L, Herrero I.A., Möllby R., 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *The International Journal of Food Microbiology* 88, 133 – 145.
121. Kühn K., Iversen A., Finn M., Greko CH., Burman L.G. Blanch A.R., Vilanova X., Manero A., Taylor H., Caplin J., Domínguez L., Herrero I.A., Moreno M.A., Möllby R., 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. *Applied Environmental Microbiology* 71(9), 5383–5390.
122. Landers T. F., Cohen B., Wittum T.E., Larson E.L., 2012. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports* 127(1), 4 – 22.
123. Lanthier M., Scott A., Zhang Y., Cloutier M., Durie D., Henderson V.C., Wilkes G., Lapen D.R., Topp E., 2011. Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. *Journal of Applied Microbiology* 110(2), 407 – 421.
124. Lata P., Ram S., Agrawal M., Shanker R., 2009. Enterococci in river Ganga surface waters: propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiology* 9, 140.
125. Lata P., Ram S., Shanker R., 2016. Multiplex PCR based genotypic characterization of pathogenic vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* recovered from an Indian river along a city landscape. *Springer Plus* 5(1), 1199.
126. Law-Brown J., Meyers P.R., 2003. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov. a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(3), 683 – 685.
127. Layton B.A., Walters S.P., Lam L.H., Boehm A.B., 2010. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology* 109(2), 539 – 547.
128. Lebreton F, Willems R.J.L., Gilmore M.S., 2014. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection. Edited by: Gilmore M.S, Clewell D.B, Ike Y, Shankar N., Boston.
129. Leclercq R., Oberlé K., Galopin S., Cattoir V., Budzinski H., Petit F., 2013. Changes in enterococcal populations and related antibiotic resistance along a medical center-wastewater treatment plant-river continuum. *Applied And Environmental Microbiology* 79(7), 2428 – 2434.

130. Lekunberri I., Villagrasa M., Balcázar J. L., Borrego C.M., 2017. Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Science of the Total Environment* 601 – 602, 206 – 209.
131. Lenart – Boroń A., Prajsnar J., Krzesiwo K., Wolanin A., Jelonkiewicz Ł., Jelonkiewicz E., Żelazny M., 2016. Diurnal variation in the selected indicators of water contamination in the Białka River affected by a sewage treatment plant discharge. *Fresenius Environmental Bulletin* 25(12), 5271 – 5279.
132. Lew S., 2003. Structural and functional characteristic of bacterioplankton of diverse lake ecosystems. PhD Thesis, University of Warmia and Mazury in Olsztyn (Poland).
133. Lew S., Lew M., Mieszczynski T., Szarek J., 2010. Selected fluorescent techniques for identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells—review. *Folia Microbiologica* 55(2), 107 – 118.
134. Lew S., Świętecki A., 2007. Using fluorescence techniques in identification of metabolically active bacteria. *Limnology Papers* 2, 9 – 19.
135. Lipp E.K., Farrah S.A., Rose J.B., 2001. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine Pollution Bulletin* 42, 286 – 293.
136. Liu C.W., Lin K.H., Kuo Y.M., 2003. Application of factor analysis in the assessment of ground-water quality in a blackfoot disease area in Taiwan. *The Science of the Total Environment* 313, 77 – 89.
137. Lleo M.D.M., Signoretto C., Canepari P., 2006. Gram-Positive bacteria in the marine environment. In: Colwell, R.R.; Belkin, S., editors. *Oceans and health: pathogens in the marine environment*. New York: Springer.
138. Lleò M.M., Bonato B., Benedetti D., Canepari P., 2005. Survival of enterococcal species in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology* 54(2), 189 – 196.
139. Loy A., Maixner F., Wagner M., Horn M., 2007. ProbeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features. *Nucleic Acids Research* 3(1), 00 – 804.
140. Lozano C., Gonzalez-Barrio D., Camacho M.C., Lima-Barbero J.F., de la Puente J., Höfle U., Torres C., 2016. Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microbial Ecology* 72(4), 813 – 820.
141. Łuczkiwicz A., Jankowska K., Bray R., Kulbat E., Quant B., Sokolowska A., i in. 2011. Antimicrobial resistance of fecal indicators in disinfected wastewater. *Water Science and Technology* 64, 2352 – 2361.
142. Łuczkiwicz A., Jankowska K., Fudala-Książek S., Olańczuk-Neyman K., 2010a. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research* 44, 5089 – 5097.
143. Łuczkiwicz A., Jankowska K., Kurlenda J., Olańczuk-Neyman K., 2010b. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Science & Technology* 20, 466 – 473.
144. Ludwig W., Schleifer K.H., 2000. How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Systematic and Applied Microbiology* 23(4), 556 – 562.
145. Ma L., Mao G., Liu J., Gao G., Zou C., Bartlam M.G., i in. 2016. Spatial-temporal changes of bacterioplankton community along an exorheic river. *Frontiers in Microbiology* 7, 250.
146. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18(3), 268 – 281.

147. Małecka M., Donderski W., 2006. Heterotrophic bacteria inhibiting water of the River Brda on the Bydgoszcz town. Baltic Coastal Zone. *Journal of Ecology and Protection of the Coast-line* 10, 31 – 46.
148. Mallon D.J., Corkill J.E., Hazel S.M., Wilson J.S., French N.P., Bennett M., Hart C.A., 2002. Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild mammals. *Emerg Infect Diseases* 8(6), 636 – 638.
149. Manero A., Vilanova X., Cerda-Cuellar M. Blanch A.R., 2002. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of enterococci. *Water Research* 36, 2831 – 2835.
150. Mannu L., Paba A., Daga E., Comunian R., Zanetti S., Duprè I., Sechi L.A., 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *The International Journal of Food Microbiology* 88(2-3), 291 – 304.
151. Medema G.J., Payment P., Dufour A., Robertson W., Waite M., Hunter P., Kirby, R., Anderson Y., 2003. Safe drinking water: an ongoing challenge. In *Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Method*. WHO & OECD, IWA Publishing, 11 – 45.
152. Meyers P.A., 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology* 114, 289 – 302.
153. Moellering R.C. Jr., 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 15, 58 – 62.
154. Mołczan M., Szlachta M., Karpińska A., Biłyk A., 2006. Zastosowanie absorbancji właściwej w nadfiolecie (SUVA) w ocenie jakości wody. *Ochrona środowiska* 29(2), 13 – 19.
155. Morandi S., Cremonesi P., Povolo M., Brasca M., 2012. *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(8), 1992 – 1996.
156. Morris D., Galvin S., Boyle F., Hickey P., Mulligan M., Cormican M., 2012. *Enterococcus faecium* of the *vanA* genotype in rural drinking water, effluent, and the aqueous environment. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 596 – 598.
157. Morrison D., Woodford N., Cookson B., 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans, p 89S–99S. In Andrew PW, Mitchell TJ (ed), *The biology of streptococci and enterococci*. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
158. Murray B.E., 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews* 3, 46 – 65.
159. Murray B.E., 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg. Infect Dis* 4, 37 – 47.
160. Napier M.D., Haugland R., Poole C., Dufour A.P., Stewart J.R., Weber D.J., i in., 2017. Exposure to human-associated fecal indicators and self-reported illness among swimmers at recreational beaches: A cohort study. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 16(1), 1 – 15.
161. Niemi R.M., Ollinkangas T., Paulin L., Švec P., Vandamme P., Karkman A., i in., 2012. *Enterococcus rivorum* sp. nov. from water of pristine brooks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(9), 2169 – 2173.
162. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Guadalupe M., Aguilera-Arreola G., Contreras-Rodríguez A., Filipkowska Z., Osińska A., 2019 The emergence of antimicrobial resistance in environmental strains of the *Bacteroides fragilis* group. *Environment International* 124, 408 – 419.
163. Niewolak S., 1998. The evaluation of the contamination degree and the sanitary and bacteriological state of the waters in the Czarna Hancza River in the region of Suwalki and the Wigry National Park. *Polish Journal of Environmental Studies* 7, 229.

164. Niewolak S., Gotkowska-Płachta A., 1999. Ocena stopnia zanieczyszczenia i stanu sanitarno-bakteriologicznego jeziora Hańcza. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2(3-4), 265 – 278.
165. Nilsson O., 2012. Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infection Ecology & Epidemiology* 2, 16959.
166. Nnane D.E., Ebdon J.E., Taylor H.D., 2011. Integrated analysis of water quality parameters for cost-effective faecal pollution management in river catchments. *Water Research* 45(6), 2235 – 2246.
167. Noble R. T., Moore D. F., Leecaster M. K., McGee C. D., Weisberg S. B., 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research* 37(7), 1637 – 1643.
168. Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Zięba P., Kostruba A., 2014. Undomesticated animals as a reservoir of multidrug resistant *Enterococcus* in Eastern Europe. *The Journal of Wildlife Diseases* 50(3), 645 – 650.
169. Novais C., Coque T. M., Ferreira H., Sousa J. C., Peixe, L. 2005. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3364–3368.
170. O'Neill J., 2014. The Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
171. O'Neill J., 2016. The Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
172. O'Driscoll T., Crank C.W., 2015, Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance* 8, 217 – 230.
173. Okuda N., Watanabe K., Fukumori K., Nakazawa T., 2014. Biodiversity Researches on Microbial Loop in Aquatic Systems. *In book Biodiversity in Aquatic Systems and Environments*. Springer.
174. Olańczuk-Neyman K., Stosik-Fleszar H., Mikołajski S., 2001. Evaluation of Indicator Bacteria Removal in Wastewater Treatment Processes. *Polish Journal of Environmental Studies* 10 (6), 457.
175. Olapade A.A, Aworh O.C., Oluwole O.B., 2011. Quality Attributes of Biscuit from Acha (*Digitaria exilis*) Flour Supplemented with Cowpea (*Vigna unguiculata*) Flour. *African Journal of Food Science and Technology* 2(9), 198 – 203.
176. Olapade O.A., Weage E.A., 2010. Comparison of fecal indicator bacterial populations in surface waters of the Kalamazoo River, USA. *Microbes Environ* 25(1), 41 – 44.
177. Olds H.T., Corsi S.R., Dila D.K., Halmo K.M., Bootsma M.J., McLellan S.L., 2018. High levels of sewage contamination released from urban areas after storm events: A quantitative survey with sewage specific bacterial indicators. *PLOS Medicine* 15(7), e1002614.
178. Oliver D.M., Fish R.D., Hodgson C.J., Heathwaite A.L., Chadwick D.R., Winter M., 2009. A cross-disciplinary toolkit to assess the risk of faecal indicator loss from grassland farm systems to surface waters. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 129(4), 401 – 412.
179. Oliver J. D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4), 415 – 425.
180. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł., 2013a. Metody fluorescencyjnego barwienia komórek w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. *Postępy Mikrobiologii* 52, 409 – 418.
181. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł., 2013b. Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium VBNC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 5 (90), 15 – 28.

182. Osińska A., Korzeniewska E., Harnisz M., Niestępski S., 2017. The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of The Total Environment* 577, 367 – 375.
183. Parszuto K., Głazewski R., 2004. The relationship between the contents of particulate(POC) and dissolved (DOC) organic carbon in the waters of Lake Długie and Lake Kortowskie recultivated with different methods. *Limnological Review* 4, 193 – 200.
184. Passerat J., Ouattara N.K., Mouchel J.M., Rocher V., Servais P., 2011. Impact of an intense combined sewer overflow event on the microbiological water quality of the Seine River. *Water Research* 45(2), 893 – 903.
185. Pernthaler J., Glöckner F.O., Schönhuber W., Amann R., 2001. Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology* 30, 207 – 226.
186. Polissi A., De Laurentis W., Zangrossi S., Briani F., Longhi V., Pesole G., Dehò G., 2003. Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. *Research in Microbiology* 154(8), 573 – 580.
187. Polska Norma PN-ISO 5667-6:2003. Jakość wody. Pobieranie próbek. Część 6: Wytyczne dotyczące pobierania próbek z rzek i strumieni. PKN, Warszawa 2003.
188. Polska Norma PN-ISO 5667-6:2016-12 Jakość wody – Pobieranie próbek -- Część 6: Wytyczne dotyczące pobierania próbek z rzek i strumieni, PKN, Warszawa 2016.
189. Polska Norma PN-EN ISO 19458:2007. Jakość wody – Pobieranie próbek do analiz mikrobiologicznych. PKN, Warszawa 2007.
190. Polska Norma PN-ISO 5667-10:1997. Jakość wody – Pobieranie próbek – Wytyczne pobierania próbek ścieków. PKN, Warszawa 1997.
191. Polska Norma PN-EN 1484-1999P. Analiza wody – Wytyczne oznaczania ogólnego węgla organicznego (OWO) i rozpuszczonego węgla organicznego (RWO). PKN, Warszawa 1999.
192. Polska Norma PN-EN ISO 6222:2004. Jakość wody – Oznaczanie ilościowe mikroorganizmów zdolnych do wzrostu – Określanie ogólnej liczby kolonii metodą posiewu na agarze odżywczym. Warszawa 2004.
193. Polska Norma PN-EN ISO 9308-1:2004. Jakość wody – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii z grupy coli – Część 1: Metoda filtracji membranowej. PKN, Warszawa 2004.
194. Polska Norma PN-EN ISO 9308-1:2014-12. Jakość wody – Oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii grupy coli - Część 1: Metoda filtracji membranowej do badania wód o małej ilości mikroflory towarzyszącej. PKN, Warszawa 2014.
195. Polska Norma PN-EN ISO 7899-2:2004. Jakość wody – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe enterokoków kałowych – Część 2: Metoda filtracji membranowej. PKN, Warszawa 2004.
196. Pommepuy M, Butin M, Derrien A, Gourmelon M, Colwell R.R, Cormier M., 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Applied and Environmental Microbiology* 62(12), 4621 – 4626.
197. Prazmo E., Godlewska R., Kwaśny M., Mielczarek A., 2016. Udział czynników wirulencji enterococcus faecalis w rozwoju chorób miazgii tkanek okołowierzchołkowych. *Postępy Mikrobiologii* 55(3), 247 – 254.
198. Przybylski M., 2007a. Enterokoki odporne na wankomycynę I. Chorobotwórczość. *Postępy Mikrobiologii* 46(4), 301 – 316.
199. Przybylski M., 2007b. Enterokoki odporne na wankomycynę II. Mechanizmy oporności, epidemiologia *Postępy Mikrobiologii* 46, 4, 317 – 334.
200. Rahkila R., Johansson P., Säde E., Björkroth J., 2011. Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 77(4), 1193 – 1203.

201. Raszka A., Ziemińska A., Wiechetek A., 2009. Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne. Środowisko* 106(2).
202. Rodrigues V., Ramaiah N., Kakti S., Samant D., 2011. Long-term variations in abundance and distribution of sewage pollution indicator and human pathogenic bacteria along the central west coast of India. *Ecological Indicators* 11, 318 – 327.
203. Rogers S.W., Moorman T.B., Ong S.K., 2007. Fluorescent in situ hybridization and micro-autoradiography applied to ecophysiology in soil. *Soil Science Society of America Journal* 71, 620 – 631.
204. Rosenberg Goldstein R.E., Micallef SA, Gibbs SG, George A, Claye E, Sapkota A, Joseph SW, Sapkota AR., 2014. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four U.S. wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *Science of The Total Environment* 1;466-467:404-11.
205. Rowan N.J., 2004. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology* 15, 462 – 467.
206. Ruoff K.L., de la Maza L., Murtagh M.J., Spargo J.D., Ferraro M.J., 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 28(3), 435 – 437.
207. Sadowy E., Łuczkiwicz A., 2014. Drug-resistant and hospital-associated *Enterococcus faecium* from wastewater, riverine estuary and anthropogenically impacted marine catchment basin. *BMC Microbiology* 14(1), 66.
208. Savichtcheva O., Okabe S., 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40, 2463 – 2476.
209. Schmidt H., Eickhorst T., 2013. Detection and quantification of native microbial populations on soil-grown rice roots by catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbiology Ecology* 87, 390 – 402.
210. Sedláček I., Holochová P., Mašlaňová I., Kosina M., Spröer C., Bryndová H., i in., 2013. *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov. two novel urease producing enterococci from the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(2), 502 – 510.
211. Servais P., Garcia-Armisen, George I., Billen G., 2007. Fecal bacteria in rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modeling. *Science of the Total Environment* 375, 152 – 167.
212. Servais P., Passerat J., 2009. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 408, 365 – 372.
213. Shah A.H., Abdelzaher A.M., Phillips M., Hernandez R., Solo-Gabriele H.M., Kish J., Scorzetti G., Fell J.W., Diaz M.R., Scott T.M., Lukasik J., Harwood V.J., McQuaig S., Sinigalliano C.D., Gidle M.L., Wanless D., Ager A., Lui J., Stewart J.R., Plano L.R.W., Fleming L.E., 2011. Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. *Journal of Applied Microbiology* 110(6), 1571 – 1583.
214. Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lindahl G., Gilmore M.S., 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* 67, 193 – 200.
215. Shuval H., 2003. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *Journal of Water and Health* 1(2), 53 – 64.
216. Sibanda Z., Amponsah-Dacosta F., Mhlongo S.E., 2013. Characterization and Evaluation of Magnesite Tailings for their Potential Utilization: A Case Study of Nyala Magnesite Mine, Limpopo Province of South Africa *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 8(8), 0 – 8.

217. Sistek V., Maheux A.F., Boissinot M., Bernard K.A., Cantin P., Cleenwerck I., i in., 2012. *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov. isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(6), 1314 – 1320.
218. Skowrońska A., Zmysłowska I., 2006. Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH). *Postępy Mikrobiologii* 45, 183 – 193.
219. Soller J.A., Schoen M., Steele J.A., Griffith J.F., Schiff K.C., 2017. Incidence of gastrointestinal illness following wet weather recreational exposures: Harmonization of quantitative microbial risk assessment with an epidemiologic investigation of surfers. *Water Research* 121, 280 – 289.
220. Strateva T., Atanasova D., Savov E., Petrova G., Mitov I., 2016. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 20(2), 127 – 133.
221. Sukontasing S., Tanasupawat S., Moonmangmee S., Lee J.S., Suzuki K., 2007. *Enterococcus camelliae* sp. nov. isolated from fermented tea leaves in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(9), 2151 – 2154.
222. Švec P., Vancanneyt M., Devriese L. A., Naser S. M., Snauwaert C., Lefebvre K., i in., 2005. *Enterococcus aquamarinus* sp. nov. isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2183 – 2187.
223. Švec P., Vandamme P., Bryndová H., Holochova P., Kosina M., Maslanova I., i in., 2011. *Enterococcus plantarum* sp. nov. isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(7), 1499 – 1505.
224. Szczypta A., Talaga K., Bulanda M., 2016. Vancomycin-resistant enterococci as etiologic agents in healthcare-associated infections – pathogenicity and control methods. *Hygeia Public Health* 51(2), 134 – 140.
225. Tacconelli E. 2009. Antimicrobial use: risk driver of multidrug resistant microorganisms in healthcare settings. *Current Opinion in Infectious Diseases* 22(4), 352 – 358.
226. Talaga-Ćwiertnia K., Bulanda M., 2018a. Lekooporność rodzaju enterococcus aktualny problem wśród ludzi i zwierząt. *Postępy Mikrobiologii* 57(3), 244 – 250.
227. Talaga-Ćwiertnia K., Bulanda M., 2018b. Analiza sytuacji epidemiologicznej zakażeń wankomycynoopornymi enterococcus faecium na świecie, z uwzględnieniem obecnej sytuacji w Polsce. *Przegląd Epidemiologiczny* 72(1), 3 – 15.
228. Talebi M., Sadeghi J., Rahimi F., Pourshafie M.R., 2015. Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese. *Department of Jundishapur Journal Microbiology* 8(4), 15815.
229. Tanasupawat S., Sukontasing S., Lee J. S., 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov. isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(7), 1630 – 1634.
230. Tendolkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N., 2003. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60, 2622 – 2636.
231. Tiquia S.M., 2010. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. *Environmental Pollution* 158(5), 1435 – 1443.
232. Torres C., Alonso C.A., Ruiz-Ripa L., León-Sampedro R., Del Campo R., Coque T.M., 2018. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology Spectrum* 6, ARBA-0032-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0032-2018.
233. Tryland I., Surman S., Berg J.D., 2002. Monitoring faecal contamination of the Thames estuary using semi automated early warning system. *Water Science and Technology* 46(3), 25 – 31.
234. US Environmental Protection Agency. 1986. Ambient water quality criteria for bacteria 1986. EPA 440/5-84-002. Office of Water Regulations and Standards, US Environmental Protection

- Agency, Washington D.C., Byappanahalli i in. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Downloaded from <http://mmbr.asm.org/> on March 8, 2014 by guest
235. US Environmental Protection Agency. 2002. Method 1600 – enterococci in water by membrane filtration using membrane-Enterococcus indoxyl-B-D-glucoside agar (mEI). EPA-821-R-02-022. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
 236. US Environmental Protection Agency. 2004. Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria. EPA-823-B-04-002. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
 237. US Environmental Protection Agency. 2005. Microbial source tracking guide document. EPA/600/R-05/064. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
 238. Varela A.R., Ferro G., Vredenburg J., Yanik M., Vieira L., Rizzo L., Lameiras C., Manaia C.M., 2013. Vancomycin resistant enterococci: from the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment* 450 – 451, 155 – 161.
 239. Van de Klundert J.A.M., Vliegenthart J.S., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., editors. *Diagnostic molecular microbiology*. Washington, D.C.: *American Society for Microbiology* 547 – 552.
 240. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D., Goossens H., 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *The Journal of Clinical Microbiology* 42(10), 4473 – 4479.
 241. Velimirov B., Milosevic N., Kavka G.G., Farnleitner A.H., Kirschner A.K.T., 2011. Development of the bacterial compartment along the Danube River: a continuum despite local influences. *Microbial Ecology* 61(4), 955 – 967.
 242. Waar K., Degener J.E., van Luyn M.J., Harmsen H.J., 2005. Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology* 54(10), 937 – 944.
 243. Wade T.J., Calderon R.L., Sams E., Beach M., Brenner K.P., Williams A.H., i in., 2006. Rapidly measured indicators of recreational water quality are predictive of swimming-associated gastrointestinal illness. *Environmental Health Perspectives* 114(1), 24 – 28.
 244. Wade T.J., Pai N., Eisenberg J.N., Colford J.M Jr., 2003. Do US EPA water quality guidelines for recreational waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives* 111(8), 1102 – 1109.
 245. Walczak M., Donderski W., 2007. Elimination of Indicators (TC, FC, FS) and Enterobacteriaceae family bacteria during the sewage treatment process. *Polish Journal of Natura Science* 22(2), 294 – 304.
 246. Wallner G., Amann R., Beisker W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136 – 143.
 247. Webb H.E., Angulo F.J., Granier S.A., Scott H.M, Loneragan G.H., 2017. Illustrative examples of probable transfer of resistance determinants from food animals to humans: Streptothricins, glycopeptides, and colistin. *F1000Research* 6, 1805.
 248. Wellinghausen N., Bartel M., Essig A., Poppert S., 2007. Rapid identification of clinically relevant *Enterococcus* species by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3424 – 3426.
 249. Wellington E.M.H., Boxall A.B.A., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H., Hawkey P.M., Johnson-Rollings A.S., Jones D.L., Lee N.M., Otten W., Thomas C.M., Williams A.P., 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis* 13, 155 – 165.

250. Wilkes G., Edge T., Gannon V., Jokinen Lyautey C.E., Medeiros D., Neumann N., Ruecker N., Topp E., Lapen D.R., 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. *Water Research* 43, 2209 – 2223.
251. Wilkes G., Edge T.A., Gannon V.P.J., Jokinen C., Lyautey E., Neumann N.F., Ruecker N., Scott A., Sunohara M., Topp E., Lapen D.R., 2011. Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds. *Water Research* 45(18), 5807 – 5825.
252. Wilks M., 1997. Vancomycin-dependent enterococcus. *The Lancet* 349, 429.
253. World Health Organization (WHO) 2017. Antimicrobial Resistance. Global report on surveillance 2014. Accessed 26 Oct. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
254. World Health Organization (WHO) 2008. Guidelines for Drinking-water Quality, Incorporating 1st and 2nd Addenda, Volume 1, Recommendations, 3rd ed.; WHO: Geneva, Switzerland
255. World Health Organization (WHO), 2006. Wastewater and excreta use in aquaculture. Geneva, Switzerland.
256. Wright J.S., Sobel A.H., Schmidt G.A., 2009. Influence of condensate evaporation on water vapor and its stable isotopes in a GCM. *Geophysical Research Letters*, 36, L12804.
257. Żabicka D., 2018. Oporność na antybiotyki w Polsce w 2017 roku – dane sieci EARS-Net. Biuletyn Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków Nr 3/2018.
258. Żabicka D., Literacka E., Bojarska K., 2012. MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Aktualności narodowego programu ochrony antybiotyków., Biuletyn 3. http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/biuletyn/biuletyn_npoa_3-2012.pdf
259. Zhu X., Wang J.D., Solo-Gabriele H.M., Fleming L.E., 2011. A water quality modeling study of non-point sources at recreational marine beaches. *Water Research* 45(9), 2985 – 2995.
260. Ziemińska-Buczyńska A., Felis E., Folkert J., Meresta A., Stawicka D., Gnida A., Surmacz-Górska J., 2015. Detection of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant – molecular and classical approach. *Archives of Environmental Protection* 41(4) 23 – 32.

9. Źródła internetowe:

[www¹] <http://www.szpital.olsztyn.pl/>, (dostęp: 15.03.2019)

[www²] https://pl.wikipedia.org/wiki/Miejski_Szpital_Zespolony_w_Olsztynie, (dostęp: 15. 03. 2019)

[www³] https://pl.wikipedia.org/wiki/Szpital_Pulmonologiczny_w_Olsztynie, (dostęp: 15.03. 2019)

[www⁴] Komorowski M., Mleko się rozlało, miasto nie chce firmy, która zatrzyma Łynę, <http://olsztyn.wyborcza.pl/olsztyn/7,48726,24357519,mleko-sie-rozlo-miasto-nie-chce-firmy-ktora-zatrzyma-lyne.html>, (dostęp: 15.03.2019)

10. Spis tabel

Tab. 1. Charakterystyka stanowisk badawczych wyznaczonych na rzece Łynie.....	18
Tab. 2. Sondy oligonukleotydowe i warunki hybrydacji uwzględnione w badaniach	23
Tab. 3. Sekwencje oligonukleotydów i rozmiary produktów starterów zastosowanych w identyfikacji enterokoków	26
Tab. 4. Sekwencje oligonukleotydów i starterów zastosowanych w identyfikacji genów oporności na wankomycynę u enterokoków.....	29
Tab. 5. Sekwencje oligonukleotydów i starterów zastosowanych w identyfikacji wirulencji enterokoków	29
Tab. 6. Właściwości fizyko-chemiczne oznaczone w wodzie rzeki Łyny na obszarach zalesionych, rolnych, i zurbanizowanych w sezonach badawczych.....	34
Tab. 7. Właściwości fizyko-chemiczne oznaczone w wodzie rzeki Łyny na obszarach zalesionych, rolnych, i zurbanizowanych.....	35
Tab. 8. Średnia liczba, zakres i odchylenie standardowe (SD) oznaczanych bakterii wskaźnikowych (log jtk·ml ⁻¹) w wodzie rzeki Łyny	36
Tab. 9. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA.....	38
Tab. 10. Liczba (log jtk·ml ⁻¹) oznaczanych bakterii wskaźnikowych (średnia, zakres i ± SD) w poszczególnych sezonach badawczych w wodzie rzeki Łyny.....	39
Tab. 11. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA sprawdzającej wpływ pory roku na liczebność bakterii w wodzie rzeki Łyny	41
Tab. 12. Średnia liczba, zakres i odchylenie standardowe (SD) bakterii wskaźnikowych (log jtk·ml ⁻¹) oznaczane w całym okresie badawczym w nieoczyszczonych i oczyszczonych ściekach komunalnych	44
Tab. 13. Ogólna liczba (OLB) i procentowy udział oznaczanych grup bakterii w wodzie rzeki Łyny.....	45
Tab. 14. Wyniki PCA dla właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych oznaczanych metodą FISH w wodach rzeki Łyny.....	55
Tab. 15. Wyniki PCA dla właściwości fizykochemicznych i mikrobiologicznych (metody klasyczne hodowlane) wód rzeki Łyny	57
Tab. 16. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami wskaźnikowymi (log jtk·ml ⁻¹) a parametrami fizyko-chemicznymi oznaczonymi w rzece Łynie	58
Tab. 17. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami oznaczonymi metodami fluorescencyjnymi (DAPI, FISH) (log kom.·ml ⁻¹) i parametrami fizyko-chemicznymi w rzece Łynie.....	58
Tab. 18. Macierz współczynników korelacji prostej (Pearsona) (r) pomiędzy bakteriami oznaczonymi metodami fluorescencyjnymi (log kom.·ml ⁻¹) a bakteriami oznaczonymi metodami klasycznymi (log jtk·ml ⁻¹) w wodzie rzeki Łyny.....	59
Tab. 19. Statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji Pearsona (p<0,05) między liczebnościami poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny a właściwościami fizyko-chemicznymi.....	62
Tab. 20. Statystycznie istotne wartości współczynnika korelacji Pearsona (p<0,05) między liczebnościami poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków nieoczyszczonych i oczyszczonych a właściwościami fizyko-chemicznymi.....	64
Tab. 21. Enterokoki zidentyfikowane w wodzie rzeki Łyny, ściekach komunalnych i szpitalnych w latach 2009-2015	65
Tab. 22. Liczba i procent wielolekoopornych szczepów (MDR) enterokoków w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary leśne, rolne i zurbanizowane.....	67

Tab. 23. Profil oporności na antybiotyki gatunków enterokoków izolowanych z wody rzeki Łyny płynącej przez obszary :L – leśne, R – rolne, Z – zurbanizowane.....	69
Tab. 24. Liczba szczepów z określonymi wartościami MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) wankomycyny izolowanych z wody rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych	71
Tab. 25. Liczba szczepów z określonymi wartościami MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) tejkoplaniny izolowanych z wody rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych	72
Tab. 26. Liczba i procent występowania genów wirulencji u bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> w wodzie rzeki Łyny	75
Tab. 27. Liczba i procent wielolekoopornych (MDR) i o rozszerzonej oporności (XDR) enterokoków w ściekach.....	78
Tab. 28. Profil oporności na antybiotyki gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków: szpitalnych (SSZ), nieoczyszczonych (SN) i oczyszczonych (SO)	82
Tab. 29. Procentowy udział szczepów z określonymi wartościami MIC ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) wankomycyny izolowanych ze ścieków	83
Tab. 30. Liczba i procent występowania genów wirulencji u bakterii <i>Enterococaceae</i> w ściekach szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny	86

11. Spis rysunków

Rys.1. <i>Enterococcus faecium</i> : odsetek izolatów z zakażeń inwazyjnych opornych na wankomycynę w krajach Unii Europejskiej (UE) i Europejskiego Obszaru Gospodarczego (EOG) w latach 2012 i 2016 (opracowanie własne na podst. interaktywnej bazy danych ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases (http://atlas.ecdc.europa.eu/public/)).....	12
Rys. 2. Schemat lokalizacji stanowisk badawczych na rzece Łynie od źródeł do granicy z Rosją (L – obszary leśne, R – obszary rolne, Z – obszary zurbanizowane).....	18
Rys. 3. Rzeką Łyna płynąca przez obszary zalesione (źródło: www.google.pl/maps).....	19
Rys. 4. Rzeką Łyna płynąca przez obszary użytkowane rolniczo (źródło : www.google.pl/maps).....	19
Rys. 5. Rzeką Łyna płynąca przez obszary zurbanizowane (źródło : www.google.pl/maps).....	20
Rys. 6. A) Źródła rzeki Łyny, B) Rzeką Łyna płynąca przez obszary rolne i C) Rzeką Łyna płynąca przez obszary zurbanizowanie (fot. A. Gotkowska-Płachta).....	20
Rys. 7. Ścieki oczyszczone odprowadzane z miejskiej oczyszczalni „Łyna” w Olsztynie do wód rzeki Łyny, A) kolektor odprowadzający ścieki, B) bezpośredni wpływ ścieków do Łyny (Fot. A. Gotkowska-Płachta).....	21
Rys. 8. Bakterie <i>Enterococcus faecalis</i> żywe (zielone) i martwe (czerwone) oznaczane w filtrowanej wodzie rzecznej za pomocą metody barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Molecular Probes), (mikroskop epifluorescencyjny Olympus BX51, powiększenie x 1000) (Fot. A. Gotkowska-Płachta).....	31
Rys. 9. Liczebności (log jtk ⁻¹) bakterii wskaźnikowych: A – psychofilnych A ₂₂ , B – mezofilnych A ₃₇ , C – grupy coli TC, D – coli typu fekalnego FC, E – paciorkowców kałowych E i F – paciorkowców kałowych wankomycynoopornych E _{VAN} w wodzie rzeki Łyny na obszarach o zróżnicowanym użytkowaniu zlewni.....	38
Rys. 10. Sezonowe zmiany liczebności (log jtk ⁻¹) bakterii wskaźnikowych: A – psychofilnych A ₂₂ , B – mezofilnych A ₃₇ , C – grupy coli TC, D – coli typu fekalnego FC, E – paciorkowców kałowych E i F – enterokoków wankomycynoopornych E _{VAN} w wodzie rzeki Łyny na obszarach o zróżnicowanym użytkowaniu zlewni.....	40
Rys. 11. Średnia liczba enterokoków – E (log jtk·ml ⁻¹) w ściekach w latach 2009- 2010.....	42
Rys. 12. Sezonowe zmiany średniej liczby enterokoków – E (log jtk·ml ⁻¹) w ściekach w latach 2009 – 2010.....	42
Rys. 13. Średnia liczba bakterii: A) A ₃₇ i A ₂₂ B) TC, FC, E i E _{VAN} oznaczana w ściekach w latach 2011-2012 i 2015.....	43
Rys. 14. Średnia liczba (log kom. ·ml ⁻¹) oznaczanych bakterii: A) <i>Lactobacillus/Enterococcus</i> (sonda LAB158); B) z rodziny <i>Enterococaceae</i> (sonda ENC38i); C) z rodzaju <i>Enterococcus</i> (sonda ENC176); D) <i>Enterococcus faecium</i> (ENU140); E) <i>Enterococcus faecalis</i> (sonda ENF191); F) <i>Enterococcus gallinarum</i> (sonda EGAC183) oznaczanych metodą <i>in situ</i> FISH w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary: L - leśne, R - rolne i Z – zurbanizowane.....	47
Rys. 15. Bakterie <i>Enterococcus faecalis</i> (ENF191) i B) <i>Enterococcus faecium</i> (ENU140) zidentyfikowane w wodzie rzeki Łyny metodą <i>in situ</i> (FISH).....	48
Rys. 16. Sezonowe zmiany średnich liczebności (kom. ·ml ⁻¹) oznaczanych bakterii: A) <i>Lactobacillus/Enterococcus</i> (LAB158); B) z rodziny <i>Enterococaceae</i> (ENC38i); C) z rodzaju <i>Enterococcus</i> (ENC176); D) <i>Enterococcus faecium</i> (ENU140); E) <i>Enterococcus faecalis</i> (ENF191); F) <i>Enterococcus gallinarum</i> (EGAC183) w stosunku do średnich liczebności OLB w wodzie rzeki Łyny płynącej przez obszary: L - leśne, R – rolne i Z – zurbanizowane.....	50
Rys. 17. Żywotność ogólnej liczby bakterii (OLB) w wodzie rzeki Łyna A) w poszczególnych sezonach badawczych B) bakterie żywe - zielone (oznaczone SYTO 9), bakterie martwe - czerwone (wybarwione za pomocą PI), (Fot. A. Gotkowska-Płachta).....	51

Rys. 18. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji właściwości fizykochemicznych oznaczanych w wodach rzeki Łyny.....	52
Rys. 19. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji liczebności oznaczonych mikroorganizmów metodą <i>in situ</i> FISH w wodach rzeki Łyny.....	53
Rys. 20. Hierarchiczny wykres drzewa aglomeracji liczebności oznaczanych mikroorganizmów metodami hodowlanymi w wodzie rzeki Łyny.....	53
Rys. 21. Diagram rozrzutu punktów symbolizujących właściwości fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne (FISH) wód rzeki Łyny uwzględniający sezony i obszary na płaszczyznę czynników 1 i 2.....	56
Rys. 22. Diagram rozrzutu punktów symbolizujących parametry fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne (metody klasyczne hodowlane) wód rzeki Łyna uwzględniający sezony i obszary na płaszczyznę czynników 1 i 2.....	56
Rys. 23. Liczba i skład procentowy poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych.....	61
Rys. 24. Liczba i skład procentowy poszczególnych gatunków enterokoków izolowanych ze ścieków.....	63
Rys. 25. Liczba i różnorodność gatunkowa enterokoków izolowanych ze ścieków szpitalnych, surowych i oczyszczonych w poszczególnych sezonach badawczych.....	63
Rys. 26. Rozkład procentowy antybiotykoopornych bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> izolowanych z wody rzeki Łyny płynącej przez obszary: L – leśne, R – rolne, Z – zurbanizowane.....	68
Rys. 27. Procentowe występowanie antybiotykoopornych bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> izolowanych z wody rzeki Łyny w poszczególnych sezonach badawczych: Z – zima, W – wiosna, L- lato, J -jesień.....	68
Rys. 28. Liczba antybiotykoopornych szczepów enterokoków izolowanych z wody rzeki w poszczególnych sezonach badawczych.....	70
Rys. 29. Udział liczbowy i procentowy enterokoków z oznaczonymi genami <i>van</i> izolowanymi z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych.....	73
Rys. 30. Liczba szczepów poszczególnych gatunków enterokoków z genami wirulencji izolowanych z rzeki Łyny na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych.....	76
Rys. 31. Udział procentowy i liczba wirulentnych <i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> izolowanych z wód rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych.....	76
Rys. 32. Udział procentowy i liczba wirulentnych szczepów izolowanych z wód rzeki Łyny z obszarów leśnych, rolnych i zurbanizowanych w poszczególnych sezonach badawczych...77	77
Rys. 33. Rozkład procentowy i liczba szczepów antybiotykoopornych bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> izolowanych ze ścieków: SSZ – szpitalnych, SN –nieoczyszczonych, SO – oczyszczonych.....	79
Rys. 34. Rozkład procentowy i liczba antybiotykoopornych szczepów bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> izolowanych w poszczególnych sezonach badawczych ze ścieków.....	80
Rys. 35. Rozkład procentowy antybiotykoopornych bakterii z rodziny <i>Enterococaceae</i> izolowanych ze ścieków: (A) szpitalnych, (B) nieoczyszczonych i (C) oczyszczonych w poszczególnych sezonach badawczych.....	81
Rys. 36. Liczba genów <i>van</i> występujących wśród wszystkich izolowanych szczepów enterokoków fenotypowo wrażliwych i opornych na wankomycynę, izolowanych ze ścieków.....	84
Rys. 37. Udział procentowy i liczba <i>E. faecium</i> i <i>E. faecalis</i> z genami wirulencji ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny.....	86
Rys. 38. Liczba szczepów poszczególnych gatunków enterokoków posiadających geny wirulencji izolowanych ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny.....	87

Rys. 39. Udział procentowy i liczba szczepów z genami wirulencji izolowana ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych odprowadzanych do rzeki Łyny w poszczególnych sezonach badawczych.....	87
Rys. 40. Przeżywalność <i>ex situ</i> <i>Enterococcus faecalis</i> oznaczana w (A) filtrowanej i przechowywanej w 4 °C i (B) filtrowanej przechowywanej w 10 °C wodzie rzeki Łyny.....	89
Rys. 41. Przeżywalność <i>ex situ</i> <i>Enterococcus faecalis</i> oznaczana w niefiltrowanej wodzie rzeki Łyny.....	90
Rys. 42. Podobieństwo badanych środowisk: SSZ - ścieki szpitalne; SN - ścieki nieoczyszczone; SO - ścieki oczyszczone; OL - woda z obszarów leśnych; OR - woda z obszarów rolnych; OZ - woda z obszarów zurbanizowanych pod względem występowania antybiotykoopornych enterokoków.....	91
Rys. 43. Podobieństwo badanych środowisk: SSZ – ścieki szpitalne; SN – ścieki nieoczyszczone; SO – ścieki oczyszczone; OL – woda z obszarów leśnych; OR – woda z obszarów rolnych; OZ – woda z obszarów zurbanizowanych pod względem występowania enterokoków z genami <i>van</i> i czynnikami wirulencji.....	91
Rys. 44. Skład procentowy oznaczanych gatunków enterokoków w wodzie rzeki Łyny na obszarach: OL–leśnych, OR –rolnych i OZ – zurbanizowanych oraz w ściekach: SSZ – szpitalnych, SN – nieoczyszczonych, SO – oczyszczonych.....	102

STRESZCZENIE

Źródła zanieczyszczeń mikrobiologicznych wód rzeki Łyny

Anna Gotkowska-Płachta
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Wydział Nauk o Środowisku
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Słowa kluczowe: rzeka, zlewnia, obszary leśne, rolne, zurbanizowane, ścieki, bakterie, enterokoki, lekooporność, wirulencja, DAPI, FISH, LIVE/DEAD BacLight™, metody hodowlane, metody molekularne

Celem naukowym niniejszej pracy było określenie wpływu źródeł środowiskowych i antropogenicznych na mikrobiologiczną jakość wód rzeki Łyny, ze szczególnym uwzględnieniem występowania antybiotykoopornych i wirulentnych enterokoków. Badania mikrobiologiczne i chemiczne prowadzono na ponad 190 kilometrowym odcinku rzeki Łyny płynącej przez północno-wschodnie tereny Polski. Próbkę wód pobierano w nurcie rzeki z 15 stanowisk podzielonych na trzy grupy (leśne, rolne i zurbanizowane) zgodnie z dominującym charakterem użytkowania obszaru zlewni, przez który przepływa rzeka. Badania miały na celu określenie wpływu na jakość mikrobiologiczną wód rzeki Łyny punktowego zrzutu zanieczyszczeń. W związku z tym do badań wytypowano również ścieki (szpitalne, nieoczyszczone i oczyszczone) powstające na terenie miasta Olsztyn i odprowadzane z miejskiej oczyszczalni ścieków „Łyna” do wód rzeki.

Na podstawie określonych właściwości fizyko-chemicznych wody, rzeki Łyny zaliczono do I i II klasy czystości. Wody pozaklasowe zaś stwierdzano na obszarach rolnych zimą i latem, oraz na terenach zurbanizowanych w pobliżu zrzutu ścieków oczyszczonych. Zmienność składu jakościowego i liczebności oznaczanych mikroorganizmów wskaźnikowych (FIB), ogólnej liczby bakterii (OLB) i bakterii z rodziny *Enterococaceae* w wodzie rzeki Łyny wiązała się ze sposobem użytkowania zlewni. Najmniejsze liczebności oznaczanych bakterii stwierdzano w wodzie płynącej przez obszary leśne z ograniczonym wpływem antropopresji, większe natomiast w wodzie z terenów rolnych i zurbanizowanych. Przeżywalność *in situ* ogólnej liczby bakterii (OLB) oznaczana metodą LIVE/DEAD BacLight™ w wodach rzeki na obszarach leśnych, rolnych i zurbanizowanych była zbliżona i wynosiła średnio około 60%. Liczba oznaczanych enterokoków w wodzie Łyny za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) była kilka tysięcy razy większa niż oznaczana metodami klasycznymi. W badanych ściekach (szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych) liczebności oznaczanych bakterii wskaźnikowych (FIB) były z reguły kilka rzędów wielkości większe niż oznaczane w wodzie rzeki. W wodzie rzeki Łyny (wśród 202 szczepów) oraz w ściekach (szpitalnych, oczyszczonych i nieoczyszczonych) (wśród 250 szczepów) zidentyfikowano 7 różnych gatunków enterokoków: *Enterococcus*

faecalis, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus/flavescens*. W wodzie bez względu na miejsce izolacji dominował *E. faecalis*, natomiast w ściekach *E. faecium*. Izolowane z wody rzeki Łyny enterokoki charakteryzowały się wielolekoopornością (MDR). Enterokoki izolowane ze ścieków szpitalnych, nieoczyszczonych i oczyszczonych, miały podobne wzory oporności na antybiotyki jak enterokoki izolowane z wody rzeki. Może to wskazywać na rozprzestrzenianie się lekoopornych enterokoków ze ściekami wzdłuż kontinuum rzecznoego. Wśród *Enterococcus faecium* i *E. faecalis* określono obecność szczepów VRE opornych na wysokie stężenia wankomycyny (MIC od ≥ 32 do $\geq 1024 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Więcej tych izolatów oznaczano w wodzie rzeki Łyny z obszarów użytkowanych rolniczo dla *E. faecium*, i w wodzie z obszarów zurbanizowanych dla *E. faecalis*. W analizowanych ściekach udział procentowy szczepów *E. faecalis* zaliczanych do VRE wahał się od 10,3% (ścieki oczyszczone) do 16,7% (ścieki nieoczyszczone). Natomiast udział *E. faecium* zaliczanych do VRE zmieniał się od 9,5% (ścieki nieoczyszczone) do 17,5% (ścieki oczyszczone).

Wśród 202 szczepów enterokoków wyizolowanych z wody rzeki Łyny 91 (45,0%) posiadało geny oporności na wankomycynę *van A*, *van B*, *van C1* i *van C2/C3*. Wśród 202 wyizolowanych szczepów enterokoków z rzeki Łyny 107 (53%) miało różne czynniki wirulencji (*cylA*, *hyl*, *ace*, *ffaA*, *gelE*, *as*, *esp*, *cob*, *cpd*, *ccf*). Dużą zjadliwością charakteryzowały się też szczepy izolowane ze ścieków, ponieważ spośród 250 szczepów u 188 (75,2%) oznaczono geny wirulencji. Stwierdzano również wpływ sposobu użytkowania zlewni na rodzaj szczepów posiadających geny wirulencji. W rzece płynącej przez obszary zalesione udział procentowy *E. faecium* i *E. faecalis* posiadających geny wirulencji z reguły nie przekraczał 60%, natomiast w wodzie z obszarów rolniczych i zurbanizowanych wynosił on około 90%. Uzyskane wyniki wskazują iż ścieki komunalne są jednym z głównych źródeł zanieczyszczeń rzeki Łyny wirulentnymi i antybiootykoopornymi enterokokami. Na obszarach leśnych i rolnych bakterie te mogą również pochodzić z innych źródeł. Należy także podkreślić, że nie ma idealnych metod do oszacowania całkowitej puli wielolekoopornych i wirulentnych gatunków enterokoków w środowisku. Połączenie metod klasycznych i metod molekularnych pozwala na bardziej pełną i wiarygodną ocenę rzeczywistej puli tych drobnoustrojów w badanym biotopie.

MONOGRAFIE KOMITETU INŻYNIERII ŚRODOWISKA POLSKIEJ AKADEMII NAUK

- Nr 1 MIKROORGANIZMY W KSZTAŁTOWANIU JAKOŚCI I UZDATNIANIU WÓD
 PODZIEMNYCH
 Krystyna Olańczuk-Neyman
 Gdańsk 2001
- Nr 2 METODY OCENY I PODNOSZENIA NIEZAWODNOŚCI DZIAŁANIA
 KOMUNALNYCH SYSTEMÓW ZAOPATRZENIA W WODĘ
 Artur Wiczysty
 Kraków 2001
- Nr 3 UTYLIZACJA ZUŻYTYCH JONITÓW DO REKULTYWACJI
 ZDEGRADOWANYCH UTWORÓW PIASZCZYSTYCH – BADANIA MODELOWE
 Mariola Chomczyńska
 Lublin 2001
- Nr 4 POJEZIERZE ŁĘCZYŃSKO-WŁODAWSKIE PRZEKSZTAŁCENIE STRUKTURY
 EKOLOGICZNEJ KRAJOBRAZU I UWARUNKOWANIA
 ZAGOSPODAROWANIA PRZESTRZENNEGO
 Tadeusz J. Chmielewski
 Lublin 2001
- Nr 5 DEGRADACJA ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH ZAWARTYCH
 W ODCIEKACH Z WYSYPISK
 Joanna Surmacz-Górska
 Lublin 2001
- Nr 6 POLICHLOROWANE DIBENZO(P)DIOKSYNY I DIBENZOFURANY –
 WŁAŚCIWOŚCI I ODDZIAŁYWANIE NA ŚRODOWISKO
 Zdzisław Kozak, Marzenna R. Dudzińska
 Lublin 2001
- Nr 7 PESTYCYDY W ŚRODOWISKU I ICH OZNACZENIE METODĄ
 CHROMATOGRFII GAZOWEJ
 Krystyna Pomorska
 Lublin 2001
- Nr 8 ENERGETYCZNE ASPEKTY WYTWARZANIA OZONU DLA POTRZEB
 INŻYNIERII ŚRODOWISKA
 Janusz Ozonek
 Lublin 2002
- Nr 9 INŻYNIERIA ŚRODOWISKA STAN OBECNY I PERSPEKTYWY
 ROZWOJU (MATERIAŁY NA KONGRES)
 Lublin 2002
- Nr 10 I KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKA
 MATERIAŁY
 Lublin 2002
- Nr 11 I KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKA
 MATERIAŁY
 Lublin 2002
- Nr 12 I KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKARERERATY PROBLEMOWE
 Lublin 2002

- Nr 13 ANALIZA PROCESÓW WYTWARZANIA OZONU DLA POTRZEB
OCHRONY ŚRODOWISKA
Janusz Ozonek
Lublin 2003
- Nr 14 WYSTĘPOWANIE I PRZEMIANY POLICHLOROWANYCH
DIBENZO-P-DIOKSYN I DIBENZOFURANÓW W UKŁADACH:
OSADY ŚCIEKOWE - GLEBA
Marzenna R. Dudzińska
Lublin 2003
- Nr 15 I KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKA
MATERIAŁY - SUPLEMENT
Lublin 2003
- NR 16 FILOZOFICZNE I SPOŁECZNE UWARUNKOWANIA ZRÓWNOWAŻONEGO
ROZWOJU
Artur Pawłowski
Lublin 2003
- NR 17 INŻYNIERSKIE, PRZYRODNICZE I EKONOMICZNE UWARUNKOWANIA
ZRÓWNOWAŻONEGO ROZWOJU
Zdzisław Ciećko
Lublin 2003
- NR 18 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA - INFORMATOR
Anna Maria Anielak
Lublin 2003
- NR 19 UTLENIANIE METANU W WARUNKACH BIOLOGICZNEJ REKULTYWACJI
SKŁADOWISK KOMUNALNYCH PRZYWĘGŁOWEJ SKAŁY PŁONNEJ
Witold Stępniewski
Lublin 2003
- NR 20 SPECJACJA W OCHRONIE I INŻYNIERII ŚRODOWISKA
Elżbieta Bezak-Mazur
Lublin 2004
- NR 21 NEW MATERIALS AND TECHNOLOGIES FOR ENVIRONMENTAL
ENGINEERING
PART I. SYNTHESSES AND STRUCTURE OF ION EXCHANGE FIBERS
Vladimir Soldatov, Lucjan Pawłowski, Aleksander Shunkevich, Henryk Wasąg
Lublin 2004
- NR 22 V KONFERENCJA NAUKOWA
MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA
Gliwice 2004
- NR 23 HODOWLA SYNCHRONICZNA *CHLORELLA VULGARIS*
W KONTROLI JAKOŚCI WÓD
Anna Czaplicka-Kotas
Kraków 2004
- NR 24 PROFESOR TOMASZ WINNICKI W NAUCE I ŻYCIU SPOŁECZNYM
Lublin 2004
- NR 25 OCHRONA I INŻYNIERIA ŚRODOWISKA ZRÓWNOWAŻONY ROZWÓJ
SZKOŁA OCHRONY I INŻYNIERII ŚRODOWISKA IM. WALEREGO GOETLA
Kraków 2004

- NR 26 FILOZOFICZNE, SPOŁECZNE I EKONOMICZNE UWARUNKOWANIA
ZRÓWNOWAŻONEGO ROZWOJU
Artur Pawłowski
Lublin 2004
- NR 26 SUPLEMENT PRZYRODNICZE UWARUNKOWANIA ZRÓWNOWAŻONEGO
ROZWOJU
Zdzisław Ciećko
Lublin 2004
- NR 27 PATHWAYS OF POLLUTANTS AND MITIGATION STRATEGIES
OF THEIR IMPACT ON THE ECOSYSTEMS
Marzenna R. Dudzińska, Małgorzata Pawłowska
Lublin 2004
- NR 28 PODSTAWY BEZPIECZEŃSTWA SYSTEMÓW ZAOPATRZENIA W WODĘ
Janusz Rak
Lublin 2005
- NR 29 TECHNOLOGICZNE PODSTAWY MODERNIZACJI MAŁYCH
OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW
Lech Dzieńis
Białystok 2005
- NR 30 XII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWO-TECHNICZNA Z CYKLU
PROBLEMY GOSPODARKI WODNO-ŚCIEKOWEJ W REGIONACH
ROLNICZO-PRZEMYSŁOWYCH
MATERIAŁY
Lech Dzieńis
Białystok 2005
- NR 31 PROFESOR ANDRZEJ KRÓLIKOWSKI. JUBILEUSZ 50-LECIA PRACY
ZAWODOWEJ, BADAWCZEJ I NAUKOWO-DYDAKTYCZNEJ
MATERIAŁY
Izabela Bartkowska, Lech Dzieńis
Białystok 2005
- NR 32 II KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKA
MATERIAŁY, TOM I
Lublin 2005
- NR 33 II KONGRES INŻYNIERII ŚRODOWISKA
MATERIAŁY, TOM II
Lublin 2005
- NR 34 Development of Insulation with Specially Designer Properties for Building Renovation
JOHN GRUNEWALD, HENRYK SOBCZUK
Lublin 2005
- NR 35 OSADY POWSTAJĄCE W OBIEKTACH SYSTEMU KANALIZACJI DESZCZOWEJ
A. Królikowski, K. Garbarczyk, J. Gwoździej-Mazur, A. Butarewicz
Białystok 2005
- NR 36 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA
Gliwice 2006
- NR 37 PODSTAWY MODELOWANIA SYSTEMÓW EKSPLOATACJI WODOCIĄGÓW
I KANALIZACJI
Sławczo Danczew
Lublin 2006

-
- NR 38 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA INFORMATOR
Anna Maria Anielak
Lublin 2007
- NR 39 TIME DOMAIN REFLECTOMETRY METHOD IN ENVIRONMENTAL MEASUREMENTS
Henryk Sobczuk, Rudolph Plagge
Lublin 2007
- NR 41 ZINTEGROWANE SYSTEMY ZARZĄDZANIA ENERGIĄ W BUDYNKACH BIUROWYCH
Jan Syposz, Piotr Jadwiszczak
Lublin 2007
- NR 42 Badania doświadczalne w rozwoju technologii uzdatniania wody
Marek M. Sozański, Peter M. Huck
Lublin 2007
- NR 43 OCENA WPŁYWU ZABEZPIECZEŃ PRZECIWEROZYOJNYCH NA WARUNKI WILGOTNOŚCIOWE W PROFILU GLEBOWYM
Marcin K. Widomski
Lublin 2007
- NR 44 PROGNOSTYCZNY MODEL URUCHAMIANIA BIOGENNYCH ZWIĄZKÓW AZOTU I FOSFORU W ERODOWANYCH GLABACH MAŁEJ ZLEWNI LESSOWEJ
Piotr Gliński
Lublin 2007
- NR 45 BADANIA POLA CIEPLNEGO W HALACH OGRZEWANYCH PROMIENNIKAMI CERAMICZNYMI
Edyta Dudkiewicz, Janusz Jeżowiecki
Lublin 2007
- NR 46 VI ZJAZD KANALIZATORÓW POLSKICH POLKAN'07 MATERIAŁY
M. Zawilski, G. Sakson, G. Mozolewska
Lublin 2007
- NR 47 ENERGETYCZNE I PROCESOWE ASPEKTY PRODUKCJI I ZASTOSOWAŃ OZONU W TECHNICIE
J. Ozonek, S. Fijałkowski
Lublin 2007
- NR 48 OPTOELECTRONIC DIAGNOSTICS OF COMBUSTION PROCESSES. INSTRUMENTS METHODS OF APPLICATIONS
Waldemar Wójcik
Lublin 2008
- NR 49 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA
Krystyna Konieczny, Michał Bodzek
Gliwice 2008
- NR 50 WYBRANE ZAGADNIENIA Z MODELOWANIA MATEMATYCZNEGO PROCESU OSADU CZYNNEGO
Z. Dymaczewski
Poznań 2008
- NR 51 ROZWÓJ ZRÓWNOWAŻONY – IDEA, FILOZOFIA, PRAKTYKA
A. Pawłowski
Lublin 2008

- NR 52 ULTRASŁABA LUMINESCENCJA GLONÓW CHARACEAE JAKO METODA OCENY ŚRODOWISKA WODNEGO
Anna Jaškowska
Lublin 2008
- NR 53 PODSTAWY REOLOGII I TRANSPORTU RUROWEGO ZAWIESIN I OSADÓW Z OCZYSZCZANIA WODY I ŚCIEKÓW
Zbysław Dymaczewski, Joanna Jeż-Walkowiak, Adam Marlewski, Marek Sozański
Poznań 2008
- NR 54 PRZYDATNOŚĆ WYBRANYCH BIOINDYKATORÓW DO OCENY EFEKTYWNOŚCI BIOREMEDIACJI GRUNTÓW ZANIECZYSZCZONYCH WĘGLOWODORAMI
A. Małachowska-Jutsz, K. Miksch
Gliwice 2008
- NR 55 MECHANIZMY TWORZENIA SIĘ I ROZPRZESTRZENIANIA ZWIĄZKÓW DIOK-SYNOPOCHODNYCH W ŚRODOWISKU
Jacek Czerwiński
Lublin 2008
- NR 56 OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA NAUKOWA. INŻYNIERIA EKOLOGICZNA
Hanna Obarska-Pempkowiak
Lublin 2009
- NR 57 RETENCJA ZBIRONIKOWA I STEROWANIE DOPŁYWEM ŚCIEKÓW DO OCZYSZCZALNI
Daniel Słyś
Lublin, 2009
- NR 58 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA PIĘĆ LAT PO WSTĄPIENIU DO UNII EUROPEJSKIEJ TOM 1
Janusz Ozonek, Małgorzata Pawłowska
Lublin 2009
- NR 59 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA PIĘĆ LAT PO WSTĄPIENIU DO UNII EUROPEJSKIEJ TOM 2
Janusz Ozonek, Artur Pawłowski
Lublin 2009
- NR 60 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA PIĘĆ LAT PO WSTĄPIENIU DO UNII EUROPEJSKIEJ TOM 3
Marzenna Dudzińska, Lucjan Pawłowski
Lublin 2009
- NR 61 NOWE METODY REDUKCJI EMISJI ZANIECZYSZCZEŃ I WYKORZYSTANIA PRODUKTÓW UBOCZNYCH OCZYSZCZALNI ŚCIEKÓW
Hanna Obarska – Pempkowiak, Lucjan Pawłowski
Lublin 2009
- NR 62 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W PRACY NAUKOWEJ PROF. DR HAB. INŻ. MICHAŁA BODZKA
Krystyna Konieczny
Gliwice 2009
- NR 63 MIKROBIOLOGICZNE METODY OGRANICZANIA EMISJI METANU ZE SKŁADOWISK ODPADÓW
Małgorzata Pawłowska
Lublin 2010

-
- NR 64 MICROORGANISMS IN THE ENVIRONMENT AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING FROM ECOLOGY AND TECHNOLOGY
Krystyna Olańczuk-Neyman
Hanna Mazur-Marzec
Gdańsk- Gdynia 2010
- NR 65 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKATOM 1
Krystyna Koniczny
Gliwice 2010
- NR 66 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA TOM 2
Krystyna Koniczny
Gliwice 2010
- NR 67 ENERGETYKA-DZIŚ I JUTRO
Tomasz Cholewa
Alicja Siuta-Olcha
Lublin 2010
- NR 68 HYDROLOGIA W INŻYNIERII I GOSPODARCE WODNEJ TOM 1
Beniamin Więzik
Warszawa 2010
- NR 69 HYDROLOGIA W INŻYNIERII I GOSPODARCE WODNEJ TOM 2
Artur Magnuszewski
Warszawa 2010
- NR 70 PROFESOR LUCJAN PAWŁOWSKI W DRODZE PRZEZ ŻYCIE
Henryk Wasąg
Lublin 2010
- NR 71 KOMPUTEROWE WSPOMAGANIE PROJEKTOWANIA
Zbigniew Suchorab, Agnieszka Jedut, Grzegorz Łagód, Andrzej Raczkowski
Lublin 2010
- NR 72 MODELOWANIE PRZEPIŹYWÓW ORAZ TRANSPORTU I BIODEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ
Grzegorz Łagód, Zbigniew Suchorab, Marcin Widomski, Katarzyna Wróbel
Lublin 2010
- NR 73 MODELOWANIE RUCHU WODY I TRANSPORT ZANIECZYSZCZEŃ W OŚRODKU POROWATYM
Marcin Widomski, Dariusz Kowalski, Grzegorz Łagód
Lublin 2010
- NR 74 MODELOWANIE SYSTEMU OCZYSZCZANIA I ŚCIEKÓW
Agnieszka Montusiewicz, Grzegorz Łagód, Adam Piotrowicz
Lublin 2010
- NR 75 JĘZYKI PROGRAMOWANIA KOMPUTERÓW
Grzegorz Łagód, Henryk Sobczuk, Zbigniew Suchorab
Lublin 2010
- NR 76 SYSTEMY GRZEWCZE
Tomasz Cholewa, Alicja Siuta-Olcha
Lublin 2010
- NR 77 UKŁADY WENTYLACJI, KLIMATYZACJI I CHŁODNICTWA
Andrzej Raczkowski, Sławomira Dumala, Mariusz Skwarczyński
Lublin 2010

- NR 78 NITRYFIKACJA W PROCESACH OCZYSZCZANIA WYBRANYCH WÓD ODPADOWYCH I ŚCIEKÓW
Joanna Surmacz-Górska
Gliwice 2010
- NR 79 TECHNOLOGIE ENERGII ODNAWIALNEJ
K. Nalewaj, J. Diatczyk, R. Jaroszyńska
Lublin 2010
- NR 80 NOWOCZESNE TECHNOLOGIE PALIW I SPALANIA
P. Komoda
Lublin 2010
- NR 81 UKŁADY ELEKTRONICZNE W NOWOCZESNYCH TECHNOLOGIACH ENERGETYCZNYCH
W. Surtel, P. Komoda
Lublin 2010
- NR 82 INŻYNIERIA ELEKTRYCZNA I TECHNOLOGIE INFORMATYCZNE W UKŁADACH ENERGOELEKTRONICZNYCH W NOWOCZESNYCH TECHNOLOGIACH ENERGETYCZNYCH
P. Kacejko, S. Adamek
Lublin 2010
- NR 83 ENERGOOSZCZEDNY BUDYNEK
M. Horyński
Lublin 2010
- NR 84 SIECI KOMPUTEROWE
K. Gromaszek, T. Ławicki
Lublin 2010
- NR 85 ARCHITEKTURA KOMPUTERÓW I SYSTEMY GIER
W. Surtel, P. Kisała
Lublin 2010
- NR 86 ARCHITEKTURA KOMPUTERÓW I SYSTEMY OPERACYJNE
W. Surtel, P. Kisała
Lublin 2010
- NR 87 ZASTOSOWANIE ZJAWISKA KAWITACJI HYDRODYNAMICZNEJ W INŻYNIERII ŚRODOWISKA
Janusz Ozonek
Lublin 2010
- NR 88 NOWE METODY OPISU STRUKTURY SIECI WODOCIĄGOWYCH DO ROZWIĄZANIA PROBLEMÓW ZWIĄZANYCH Z ICH PROJEKTOWANIEM I EKSPLOATACJĄ
Dariusz Kowalski
Lublin 2010
- NR 89 JAKUB KAZIMIERZ SIEMEK- PROFESOR HONOROWY POLITECHNIKI LUBELSKIEJ
Lublin 2010
- NR 90 TOMASZ WINNICKI- PROFESOR HONOROWY POLITECHNIKI LUBELSKIEJ
Lublin 2010
- NR 91 WYKORZYSTANIE WŁAŚCIWOŚCI ADSORPCYJNYCH MATERIAŁÓW ODPADOWYCH DO USUWANIA BARWNIKÓW Z ROZTWORÓW WODNYCH
Urszula Filipkowska
Lublin 2011

-
- NR 92 ZAAWANSOWANE METODY USUWANIA NATURALNYCH SUBSTANCJI
M. Kabsch-Korbutowicz
Lublin 2012
- NR 93 INŻYNIERIA ŚRODOWISKA – STAN OBECNY I PERSPEKTYWY ROZOWJU
Cz. Rosik-Dulewska, M. Kostecki
Lublin 2011
- NR 94 BADANIA NAD ZWIĘKSZENIEM WYDAJNOŚCI BARWNIKOWYCH OGNIW
SŁONECZNYCH
A. Zdyb
Lublin 2012
- NR 95 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA TOM 1
K. Konieczny, I. Korus
Gliwice 2012
- NR 96 MEMBRANY I PROCESY MEMBRANOWE W OCHRONIE ŚRODOWISKA TOM 2
M. Bodzek, J. Pelczara
Gliwice 2012
- Nr 97 PROFESOR JANUARY BIEŃ CZTERDZIEŚCI LAT W DYDAKTYCE I NAUCE
L. Pawłowski
Lublin 2012
- Nr 98 WSPÓLFERMENTACJA OSADÓW ŚCIEKOWYCH I WYBRANYCH KOSUBSTRATÓW JAKO METODA EFEKTYWNEJ BIOMETANIZACJI
A. Montusiewicz
Lublin 2012
- Nr 99 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA. PRACE. TOM I
M.R. Dudzińska, A. Pawłowski
Lublin 2012
- Nr 100 POLSKA INŻYNIERIA ŚRODOWISKA. PRACE. TOM II
M.R. Dudzińska, A. Pawłowski
Lublin 2012
- Nr 101 KOMPOSTOWANIE KOMUNALNYCH OSADÓW ŚCIEKOWYCH JAKO FORMA RECYKLINGU ORGANICZNEGO
D. Kulikowska
Lublin 2012
- Nr 102 ZASTOSOWANIE ZEOLITÓW WYTWORZONYCH Z POPIOŁÓW LOTNYCH DO USUWANIA ZANIECZYSZCZEŃ Z WODY I ŚCIEKÓW
W. Franus
Lublin 2012
- Nr 103 BADANIA EKSPERYMENTALNE I TEORETYCZNE ZASOBNIKA CIEPŁEJ WODY ZE STRATYFIKACJĄ TERMICZNĄ WSPÓŁPRACUJĄCEGO Z INSTALACJĄ NISKOTEMPERATUROWĄ
A. Siuta-Olcha
Lublin 2012
- Nr 104 WYBRANE MIKROZANIECZYSZCZENIA ORGANICZNE W WODACH I GLEBACH
M. Włodarczyk-Makuła
Lublin 2012

- Nr 105 TOKSYCZNOŚĆ W PROCESIE BEZTLENOWEJ STABILIZACJI KOMUNYNYCH OSADÓW ŚCIEKOWYCH
Z. Sadecka
Lublin 2013
- Nr 106 PROCESY I EFEKTYWNOŚĆ USUWANIA ZANIECZYSZCZEŃ Z ODCIEKÓW ZE SKŁADOWISKA ODPADÓW KOMUNALNYCH W OCZYSZCZALNIACH HYDROFI-
TOWYCH
E. Wojciechowska
Gdańsk 2013
- NR 107 ZASTOSOWANIE JONITÓW WŁÓKNISTYCH W PROCESACH DEZODORYZACJI I KONTROLI JAKOŚCI POWIETRZA
H. Wasąg
Lublin 2013
- NR 108 ROZKŁAD BIOMIMETYKÓW HORMONALNYCH ZA POMOCĄ ZAAWANSOWA-
NYCH PROCESÓW UTLENIANIA
E. Flis
Gliwice 2013
- NR 109 DEGRADACJA PESTYCYDÓW WYBRANYMI METODAMI
I. Skoczko
Białystok 2013
- NR 110 WYKORZYSTANIE SYNTETYCZNYCH ŻYWIC JONOWYMIENNYCH W REKUL-
TYWACJI TERENÓW ZDEGRADOWANYCH
M. Chomczyńska
Lublin 2013
- NR 111 COMPUTER AIDED DESIGNING – 3D MODELING
G. Łagód, Z. Suchorab
Lublin 2013
- NR 112 AEROZOLE W POWIETRZU WEWNĘTRZNYM: ŹRÓDŁA - POZIOMY - PROBLEMY
M. Dudzińska
Lublin 2013
- NR 113 SEPARACJA UCIAŹLIWYCH ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH Z WYKORZY-
STANIEM TECHNIK MEMBRANOWYCH
K. Majewska-Nowak
Wrocław 2013
- NR 114 ŹRÓDŁA WĘGLA W PROCESACH BIOLOGICZNEGO USUWANIA AZOTU
I FOSFORU
W. Janczukowicz, J. Rodziewicz
Lublin 2013
- NR 115 WSKAŹNIKI JAKOŚCIOWE SUBSTANCJI ORGANICZNEJ GLEB ZRÓŻNICOWA-
NYM NAWOŻENIEM I ZMIANOWANIEM
G. Żukowska
Lublin 2013
- NR 116 ZANIECZYSZCZENIA A JAKOŚĆ POWIETRZA WEWNĘTRZNEGO W WYBRA-
NYCH POMIĘSZCZENIACH
B. Południk
Lublin 2013

-
- NR 117 BIOSURFACTANTS: GREEN SURFACTANTS
G. Płaza
Lublin 2014
- NR 118 MEMBRANES AND MEMBRANE PROCESSES IN ENVIRONMENTAL PROTECTION
VOL. 1
K Konieczny, I. Korus
Lublin 2014
- NR 119 MEMBRANES AND MEMBRANE PROCESSES IN ENVIRONMENTAL PROTECTION
VOL. II
M. Bodzek, J. Pelczar
Lublin 2014
- NR 120 ZASTOSOWANIE ZEOLITÓW DO SEPARACJI CO₂ I Hg Z GAZÓW ODLOTOWYCH
W PROCESACH WYCHWYTYWANIA I SKŁADOWANIA DITLENKU WĘGLA
M. Wdowin
Lublin 2015
- NR 121 WYKORZYSTANIE TUFÓW ZEOLITOWYCH W INŻYNIERII ŚRODOWISKA
W. Franus, A. Pawłowski
Lublin 2015
- NR 122 OBIEG WYBRANYCH MAKROPIERWIASTKÓW I ZWIĄZKÓW BIOGENNYCH W
SYSTEMIE RZECZNO - JEZIORNYM NA PRZYKŁADZIE GÓRNEJ PASŁĘKI
J. Grochowska
Lublin 2015
- NR 123 INCINERATION OF WASTE IN A ROTARY KILN
J. W. Bujak
Lublin 2015
- NR 124 PIENIĄDZE I ZRÓWNOWAŻONY ROZWÓJ: BRAKUJĄCE OGNIWO
Lublin 2016
- NR 125 OCENA ZRÓWNOWAŻONOŚCI SYSTEMÓW SOLARNYCH OPARTA NA ANALIZIE
CYKLU ŻYCIA
A. Żelazna
Lublin 2016
- NR 126 NEW MATERIAL SOLUTIONS FOR PLASMA REACTOR
S. Gnapowski
LUBLIN 2017
- NR 127 SUSTAINABILITY OF COMPACTED CLAY LINERS AND SELECTED PROPERTIES
OF CLAY
M. Widomski
Lublin 2016
- NR 128 DROGA PRZEZ ŻYCIE PROFESORA TADEUSZA PIECUCHA: 70 ROCZNICA URO-
DZIN 4.06.2016R.
Lublin 2016
- NR 129 INFORMATOR INŻYNIERII ŚRODOWISKA
A. Anielak, M. Cimochoicz-Rybicka
Lublin 2016
- NR 130 METODY POMIARU GĘSTOŚCI STRUMIENIA CIEPŁA I STRAT CIEPŁA W BU-
DOWNICTWIE I CIEPŁOWNICTWIE
K. Wojdyga
Warszawa 2016

- NR 131 OKREŚLENIE POZIOMU AKTYWNOŚCI SZTUCZNEGO ^{137}Cs I NATURLANEGO ^{40}K ORAZ WYBRANYCH METALI CIĘŻKICH W GLEBACH, NIEKTÓRYCH ROŚLINACH I W OSADACH DENNYCH AKWENÓW WODNYCH NA OBSZARACH POLSKI POŁUDNIOWEJ
B. Kubica
Lublin 2016
- NR 132 UTYLIZACJA WYBRANYCH ODPADÓW W PRODUKCJI SPIEKANYCH KRUSZYW LEKKICH
M. Franus
Lublin 2016
- NR 133 ZASTOSOWANIE TECHNIKI REFLAKTOMETRII W DOMENIE CZASU DO OCENY STANU ZAWILGOCENIA PRZEGRÓD BUDOWLANYCH
Z. Suchorab
Lublin 2016
- NR 134 DEPOZYCJA PM10 PODCZAS OPADÓW ATMOSFERYCZNYCH
T. Olszowski
Lublin 2017
- NR 135 Zastosowanie zeolitów syntetycznych z popiołów lotnych w inżynierii środowiska
W. Franus
Lublin 2017
- NR 136 BIOINDYKACJA W KONTROLI PROCESU OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW
G. Łagód
Lublin 2017
- NR 137 ANALIZA OPADÓW ATMOSFERYCZNYCH DLA POTRZEB PROJEKTOWANIA SYSTEMÓW ODWODNIENIA
P. Licznar
Lublin 2018
- NR 138 METALE CIĘŻKIE W ODCIEKACH I ŚCIEKACH TECHNOLOGICZNYCH ZE SKŁADOWISK ODPADÓW KOMUNALNYCH W ASPEKTCIE ZMIAN SPOSOBÓW ICH ZAGOSPODAROWANIA
E. Kulbat
Gdańsk 2018
- NR 139 EFEKTYWNOŚĆ EKONOMICZNA I ENERGETYCZNA W BUDOWNICTWIE JEDNORODZINNYM
J. Danielewicz
Lublin 2018
- NR 140 FOSFOR W INTERFAZIE WODA-OSADY DENNE JEZIOR ZMIENIONYCH ANTROPOGENICZNIE NA TLE WYBRANYCH FIZYKO-CHEMICZNYCH I MIKROBIOLOGICZNYCH CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH KSZTAŁTUJĄCYCH PROCESY JEGO WYMIANY POMIĘDZY OSADAMI A WODĄ
R. Augustyniak
Lublin 2018
- NR 141 BAKTERIOCENOZA PŁYTKIEGO LITORALU ZATOKI PUCKIEJ W REJONIE WYSTĘPOWANIA PODMORSKIEGO DRENAŻU WÓD PODZIEMNYCH
K. Jankowska
Gdańsk 2018

- NR 142 ZDOLNOŚCI SORPCYJNE WYBRANYCH SUBSTANCJI BOGATYCH W MATERIE ORGANICZNĄ W STOSUNKU DO BARWNIKÓW
A. Dzieniszewska, J. Kyzioł-Komosińska
Lublin 2018
- NR 143 ZANIECZYSZCZENIE OSADÓW DENNYCH METALAMI CIĘŻKIMI - METODY OCENY
E. Kulbat, A. Sokołowska
Lublin 2018
- NR 144 ZANIECZYSZCZENIA POWIETRZA W POLSCE: STAN, PRZYCZYNY, SKUTKI
L. Pawłowski
Lublin 2018
- NR 145 ZASTOSOWANIE ZIELONEJ INFRASTRUKTURY DO OGRANICZANIA ZANIECZYSZCZEŃ POWIERZCHNIOWYCH W ZLEWNI MIEJSKIEJ
E. Wojciechowska
Lublin 2018
- NR 146 METODY WYZNACZANIA ZASIĘGU STREF ZAGROŻENIA POWODOWANEGO PRZEZ ROZSZCZELNIENIE PODZIEMNYCH PRZEWODÓW WODOCIĄGOWYCH
M. Iwanek
Lublin 2018
- NR 147 ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII IR W INŻYNIERII ŚRODOWISKA
S. Pasieczna-Padkowska
Lublin 2019
- NR 148 REKULTYWACJA JEZIOR – TEORIA I PRAKTYKA
Julita A. Dunalska
Olsztyn 2019
- NR 149 USUWANIE ZANIECZYSZCZEŃ I STABILIZACJA OSADÓW ŚCIEKOWYCH W SYSTEMACH TRZCINOWYCH
Katarzyna Kolečka
Gdańsk 2019
- NR 150 ZŁOŻA HYDROFITOWE Z PIONOWYM PRZEPIYWEM ŚCIEKÓW. CHARAKTERYSTYKA PROCESÓW I ZASTOSOWAŃ
Magdalena Gajewska
Gdańsk 2019
- NR 151 FILTRACJA WODY W TEORII I PRAKTYCE
Iwona Skoczko
Warszawa 2019
- NR 152 OPERATION FLEXIBILITY OF HEAT PUMPS IN SMART DISTRICT HEATING
Marderos Ara Sayegh
Lublin 2019
- NR 153 ANALIZA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA PO FERMENTU JAKO ŹRÓDŁA BIODOSTĘPNEGO FOSFORU
Agnieszka Tuszyńska
Warszawa 2019
- NR 154 ANALIZA TERMICZNEJ PRZERÓBKI BIOMASY
Paweł Komada
Warszawa 2019

- NR 155 ANALIZA I ZASTOSOWANIE MODELU ADM1 DO SYMULACJI FERMENTACJI I WSPÓLFERMENTACJI KISZONEK ROŚLINNYCH I WYBRANYCH KOSUBSTRATÓW
Katarzyna Bułkowska
Warszawa 2019
- NR 156 DIFFERENT MATERIAL SOLUTIONS FOR THE REACTOR ELECTRODES
Sebastian Gnapowski
Warszawa 2019
- NR 157 NASTĘPCZY WPŁYW KOMPOSTÓW Z OSADU I OSADOWO-POPIOŁOWYCH NA KSZTAŁTOWANIE WŁAŚCIWOŚCI REKULTYWOWANEJ GLEBY INDUSTRIO-ZIEMNEJ
Marta Bik-Małodzińska
Warszawa 2019
- NR 158 MATERIAL-RELATED IMPACT OF THERMOPLASTIC PIPES ON QUALITY OF DISTRIBUTED WATER
Beata Kowalska
Warszawa 2019
- NR 159 STEROWANIE PROGNOZOWE DOSTAWĄ CIEPŁA NA POTRZEBY OGRZEWANIA
Tomasz Cholewa
Warszawa 2019
- NR 160 DYNAMIKA ZMIAN WYBRANYCH GRUP BAKTERII AKTYWNYCH W OCZYSZCZANIU ODCIEKÓW SKŁADOWISKOWYCH W REAKTORZE SBR
Łukasz Jurczyk
Warszawa 2019