

Załącznik 2. Autoreferat

Dr inż. Anna Lenart-Boroń

Kraków, 1 grudnia 2017

I. Dane osobowe

1. Imię i nazwisko: Anna Lenart-Boroń

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe– z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:

Uzyskany tytuł: magister inżynier

Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Międzywydziałowe Studium Biotechnologii

Kierunek: Biotechnologia stosowana

Specjalność: Biotechnologia roślin

Tytuł pracy magisterskiej: *„Działanie wybranych środków higienicznych na mikroflorę izolowaną ze skóry człowieka”*

Promotor: Dr inż. Maria J. Chmiel

Data obrony: lipiec 2006 r.

Uzyskany stopień: Doktor nauk rolniczych

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Dziedzina: agronomia

Specjalność: mikrobiologia

Temat pracy doktorskiej: *„Bioróżnorodność i wybrane właściwości fizjologiczne bakterii z rodzaju Azotobacter wyizolowanych z różnych gleb”*

Promotor: Prof. dr hab. inż. Wiesław Barabasz

Recenzenci: Prof. dr hab. inż. Stefan Martyniuk

Dr hab. inż. Krystyna Przybulewska

Data nadania stopnia doktora: 22 września 2010 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Październik 2010 – wrzesień 2012: asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Październik 2012 – obecnie: adiunkt w Katedrze Mikrobiologii, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

A) tytuł osiągnięcia naukowego

Analiza zagrożeń mikrobiologicznych wód powierzchniowych zlewni Jeziora Czorsztyńskiego z uwzględnieniem rozprzestrzeniania się lekoopornych szczepów *Escherichia coli*.

b) wykaz prac dokumentujący osiągnięcie naukowe (autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

1. **Lenart-Boroń A.**, Wolanin A., Jelonkiewicz Ł., Chmielewska-Błotnicka D., Żelazny M. Spatiotemporal variability in microbiological water quality of the Białka river and its relation to the selected physicochemical parameters of water. *Water Air and Soil Pollution* 2016. 227:22; DOI 10.1007/s11270-015-2725-7.

(25 pkt. MNiSW; 1,702 IF)

2. **Lenart-Boroń A.**, Wolanin A., Jelonkiewicz Ł., Żelazny M. Factors and mechanisms affecting seasonal changes in the prevalence of microbiological indicators of water quality and nutrient concentrations in waters of the Białka river catchment, Southern Poland. *Water Air and Soil Pollution* 2016. 227: 302; DOI 10.1007/s11270-016-2833.

(25 pkt. MNiSW; 1,702 IF)

3. **Lenart-Boroń A.**, Prajsnar J. Zmienność dobową liczebności bakteryjnych wskaźników zanieczyszczenia wód rzeki Białki w rejonie oczyszczalni ścieków komunalnych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 2015. (9), 331-333.

(11 pkt. MNiSW)

4. **Lenart-Boroń A.**, Prajsnar J., Krzesiwo K., Wolanin A., Jelonkiewicz Ł., Jelonkiewicz E., Żelazny M. Diurnal variation in the selected indicators of water contamination in the Białka river affected by a sewage treatment plant discharge. *Fresenius Environmental Bulletin* 2016. 25 (12): 5271-5279.

(15 pkt. MNiSW; 0,425 IF)

5. **Lenart-Boroń A.** Antimicrobial resistance and prevalence of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase genes in *Escherichia coli* from major rivers in Podhale, southern Poland. International Journal of Environmental Science and Technology 2017. DOI: 10.1007/s13762-016-1155.

(30 pkt. MNiSW; 1,915 IF)

6. **Lenart-Boroń A.**, Wolanin A., Jelonkiewicz E., Żelazny M. The effect of anthropogenic pressure shown by microbiological and chemical water quality indicators on the main rivers of Podhale, southern Poland. Environmental Science and Pollution Research 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-8826-7.

(30 pkt. MNiSW; 2,741 IF)

7. **Lenart-Boroń A.**, Prajsnar J., Boroń P. Survival and antibiotic resistance of bacteria in artificial snow produced from contaminated water. Water Environment Research. 2017. DOI: 10.2175/106143017X14902968254917.

(15 pkt. MNiSW; 0,910 IF)

sumarycznie IF 9,395; 151 pkt. MNiSW

Oświadczenia współautorów publikacji znajdują się w załączniku 6. Opis mojego udziału, w tym procentowego, w wykonaniu powyższych prac zawiera załącznik 4, p. I B. Kopie prac zostały zebrane w załączniku 5.

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

Wprowadzenie

Podhale jest regionem kulturowym, usytuowanym w południowej Polsce, na północ od Tatr. Główne miasta tego regionu to Nowy Targ, będący jego stolicą oraz Zakopane – cieszący się największą popularnością polski ośrodek turystyki zimowej (Chrobak 2014). Obszar ten charakteryzuje się ogromnym potencjałem turystycznym, wynikającym z unikalnych cech geologicznych i geomorfologicznych. Rozwój turystyki na Podhalu rozpoczął się w drugiej połowie XX wieku, natomiast po 1989 roku wskutek zachodzących przemian, które umożliwiły rozkwit przedsiębiorczości ludności Podhala, rozwój hoteli, pensjonatów i usług kwaterodawczych osiągnął skalę niespotykaną w innych częściach kraju (Ustupski 2007).

Pomimo szeregu korzyści społecznych i ekonomicznych, wynikających z ekspansji turystyki w regionach niezagospodarowanych przemysłowo, nadmierny jej rozwój może także wywołać negatywne skutki dla funkcjonowania środowiska przyrodniczego (Hełdak i Szczepański 2011). Wspomniany rozwój nie tylko turystyki, ale także osadnictwa i rolnictwa w badanym regionie wpłynął na wzrost antropopresji na różne elementy przyrodnicze, a w szczególności na jakość wód powierzchniowych – głównie rzek i potoków. Jest to spowodowane

przede wszystkim znacznym zwiększeniem poboru wody z rzek oraz zanieczyszczeniem rzek ściekami. Zwiększony pobór wody z rzek wynika z konieczności zaopatrzenia rozrastających się miejscowości w wodę pitną lub do celów gospodarczych, a także pobierania nieraz ogromnych ilości wody do celów sztucznego naśnieżania także rosnącej na Podhalu liczby stoków narciarskich (Kraż 2012). Z kolei zanieczyszczenie ściekami rzek spowodowane jest przede wszystkim zrzutami z oczyszczalni, których sieć (a przez to również wydajność) jest nieproporcjonalnie mała w stosunku do zwiększającej się z roku na rok ilości koniecznych do oczyszczenia ścieków. Wśród innych czynników wymienić należy nielegalne odprowadzanie ścieków z szamb w miejscowościach nieskanalizowanych, dopływ ścieków (przede wszystkim gnojowicy z hodowli zwierząt), wypływających ze źle uszczelnionych zbiorników lub celowo utylizowanych na użytkach rolniczych, spływy powierzchniowe zawierające nawozy z pól uprawnych oraz zanieczyszczenia z miejsc, w których mieszkańcy pozbywają się płynnych odpadów.

W ogólnym ujęciu, jakość wód powierzchniowych uwarunkowana jest szeregiem czynników, zarówno naturalnych i antropogenicznych. Występowanie wymienionych wcześniej punktowych, bądź powierzchniowych źródeł zanieczyszczeń uzależnione jest od sposobu użytkowania terenu. Czynniki naturalne natomiast obejmują strukturę geologiczną terenu, warunki pogodowe, wpływające z kolei na ilość spływów powierzchniowych oraz przepływy w rzekach i potokach, a także pokrycie terenu i cykl wegetacji (Bartram i Ballance 1996).

Coraz częstsze i silniejsze zanieczyszczenie wód powierzchniowych, a także rosnąca świadomość dotycząca konsekwencji z tym związanych sprawiła iż obecnie przykładą się większą wagę do oceny stopnia zanieczyszczenia wód, identyfikacji jego źródeł i badania potencjalnych następstw (Whitman i Nevers 2004). Identyfikacja źródeł i stopnia zanieczyszczenia wód powierzchniowych stanowi zatem bardzo ważny element badań środowiskowych, których ostatecznym celem jest zapewnienie skutecznych rozwiązań, mających zapobiec wspomnianemu zanieczyszczeniu oraz zniwelowaniu jego ewentualnych skutków. Jednym z wyzwań w tym aspekcie jest odpowiednie zaplanowanie programu badawczego, zarówno pod względem liczby i zagęszczenia punktów badawczych, jak i częstotliwości poboru prób do badań. Istnieje szereg warunków, mogących wpłynąć na obserwowaną liczebność drobnoustrojów wskaźnikowych, a w szczególności bakterii kałowych takich jak *Escherichia coli*. Najważniejsze spośród nich to lokalizacja i gęstość punktów badawczych, liczba powtórzeń i częstotliwość pobierania (Meays i in. 2006; Leecaster i Weisberg 2001), a także pora dnia, o której wykonywany jest pobór (Whitman i Nevers 2004).

Istnieją także doniesienia sugerujące, że niektóre rodzaje i gatunki bakterii, również tych chorobotwórczych, są w stanie przetrwać proces produkcji sztucznego śniegu, który polega na krótkotrwałym zamrożeniu wód (Parker i in. 2000). Zjawisko to może powodować realne zagrożenie dla użytkowników stoków i pracowników obsługi, w sytuacji gdy wody służące do

sztucznego śnieżenia są silnie zanieczyszczone. Wspomniane zagrożenie dla zdrowia ludzi mających kontakt z zanieczyszczonymi wodami powierzchniowymi i wyprodukowanego z nich sztucznego śniegu na stokach wynika z kilku czynników. Po pierwsze, pomimo iż niektóre bakteriologiczne wskaźniki zanieczyszczenia kałowego nie są patogenami, ich obecność może świadczyć o obecności mikroorganizmów bezwzględnie chorobotwórczych, takich jak *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp. czy *Shigella* spp. (Cabral 2010). Ponadto, niektóre mikroorganizmy typowo kałowe są jednocześnie potencjalnymi patogenami, jak np. wiele szczepów *Escherichia coli*, które mogą powodować zarówno niegroźne infekcje układu pokarmowego (np. biegunka) jak i moczowego (Kaper 2005), a wśród których wyróżnić można również szczególnie niebezpieczne serotypy (ETEC - enterotoksyczne, EHEC - enterokrwotoczne i EIEC - enteroinwazyjne) (Cabral 2010).

Ostatnim, jednak niemniej ważnym zjawiskiem, o którym warto wspomnieć, jest narastająca lekooporność mikroorganizmów – zarówno chorobotwórczych jak i potencjalnie chorobotwórczych oraz komensalnych, które mogą stanowić rezerwuar genów lekooporności dla bakterii bezwzględnie chorobotwórczych (Holvoet i in. 2013). Szybkie rozprzestrzenianie się genów lekooporności drogą horyzontalnego transferu genów, który może zachodzić również między gatunkami niespokrewnionymi ze sobą, skutkuje wzrostem częstości zachorowań i zgonów ludzi (Zabłotni i Jaworski 2014). Obecność lekoopornych bakterii w środowisku stanowi zatem bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia ludzi, przykładowo poprzez wykorzystywanie wód powierzchniowych do nawadniania pól uprawnych, jako źródeł wody pitnej czy w celach rekreacyjnych (WHO 2014). Wynika stąd wprost konieczność monitorowania rozprzestrzeniania się szczepów bakterii opornych w środowisku naturalnym człowieka. Udział lekoopornych bakterii komensalnych może stanowić jasne odzwierciedlenie presji selekcyjnej wywieranej na mikroorganizmy w środowisku. Sugeruje się, że poziom lekooporności u *Escherichia coli* może być łatwym do oszacowania i przydatnym wskaźnikiem skali oporności u bakterii bezwzględnie chorobotwórczych (van den Bogaard i Stobberingh 2000; Holvoet i in. 2013).

Cel i zakres badań

Największym zbiornikiem wodnym na Podhalu i jednym z największych sztucznych jezior w Polsce jest Jezioro Czorszyńskie, powstałe w latach 1975-1997 dzięki spiętrzeniu wód Dunajca zaporą ziemną (Kozielska-Sroka i Chęć 2009). Rzeka Białka jest, obok Dunajca, drugim dopływem Jeziora Czorszyńskiego. Obydwie rzeki płyną przez tereny uznawane za jedne z najczystszych w Polsce, a zarazem jedne z najbardziej atrakcyjnych turystycznie regionów.

Biorąc pod uwagę wachlarz sposobów i skalę użytkowania wody na Podhalu, bardzo ważne jest uzyskanie jak najdokładniejszych informacji dotyczących jej jakości. Dotyczy to zmian sezonowych jakości wód, identyfikacji źródeł zanieczyszczenia, wpływu sposobów użytkowania terenu na stopień zanieczyszczenia wód, a także krążenia mikroorganizmów wskaźnikowych w wybranych elementach środowiska wskutek intensywnego użytkowania wody w celu

sztucznego naśnieżania stoków oraz identyfikacji związanych z tym potencjalnych zagrożeń dla zdrowia ludzi.

Główny cel badań obejmował ocenę zmian sezonowych i przestrzennych jakości mikrobiologicznej wód głównych rzek na terenie Podhala wraz z Jeziorem Czorszyńskim, biorąc także pod uwagę rozprzestrzenienie się w środowisku wodnym lekoopornych szczepów *Escherichia coli*. Kilkuletnie badania, polegające na analizie zmian sezonowych oraz przestrzennych stężenia mikroorganizmów będących wskaźnikami jakości wód, przeprowadzono na obszarze nieobjętym dotychczas tego typu badaniami - wzdłuż rzek Białki, Zakopianki, Czarnego i Białego Dunajca, Dunajca oraz przed i za Jeziorem Czorszyńskim. Umożliwiło to uzyskanie danych z zakresu mikrobiologii i hydrochemii dotyczących całego polskiego obszaru zlewni Jeziora Czorszyńskiego.

Przeprowadzono również ocenę rozpowszechnienia szczepów *Escherichia coli* opornych na antybiotyki, posiadających typ oporności ESBL (ang. *extended spectrum beta lactamases* – beta laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym) oraz geny kodujące te enzymy. Badania te wykonano w kilkunastu punktach wzdłuż rzek Podhala.

Badania liczebności mikroorganizmów wskaźnikowych oraz lekooporności *E. coli* przeprowadzono także dla próbek sztucznego śniegu wytworzonego na stacjach narciarskich, których ujęcia wody do śnieżenia zlokalizowane były zarówno w punktach mikrobiologicznie czystych jak i zanieczyszczonych.

Nadrzędnym celem wymienionych eksperymentów była ocena zagrożeń środowiskowych, a także zagrożeń zdrowotnych dla turystów i mieszkańców korzystających z zasobów wód powierzchniowych i stoków narciarskich w rejonie Podhala, oraz pracowników badanych stacji narciarskich. Opisywane badania nie były dotychczas prowadzone w takiej skali i dostarczą unikalnych wyników w zakresie biotechnologii środowiskowej i ekologii drobnoustrojów.

Opis uzyskanych wyników

Prace **B.1.** i **B.2.** powstały w efekcie kilkuletnich badań przeprowadzonych wzdłuż rzeki Białki oraz na jej dopływach (strumieniach Czerwinka oraz Bryjów) znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie jednego z największych ośrodków narciarskich na Podhalu. W pracy **B.1.**, w oparciu o dwuletnie badania, prześledzono zmienność przestrzenną i sezonową liczebności mikroorganizmów oraz wybranych parametrów fizykochemicznych wód powierzchniowych w ośmiu punktach wzdłuż rzeki Białki i na wspomnianych dopływach. Podjęto próbę identyfikacji źródeł zanieczyszczeń rzeki, której 25-km odcinek objęty jest programem Natura 2000, i która dotychczas postrzegana była jako jedna z najczystszych rzek w Polsce. Analizie poddano również zależności pomiędzy liczebnością mikrobiologicznych wskaźników jakości wód oraz ich wybranymi parametrami fizykochemicznymi. Analizę wyników

oparto m.in. o technikę PCA (ang. *Principal Component Analysis* – analiza składowych głównych) w celu zidentyfikowania dominujących czynników kształtujących jakość wód, oczekując iż metoda ta umożliwi dokładne zrozumienie złożonych procesów zachodzących w badanej zlewni. W badaniach przy użyciu filtracji membranowej oznaczono liczebność bakterii grupy coli, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Clostridium* redukujących siarczyny. Metodą seryjnych rozcieńczeń oznaczono liczbę bakterii mezofilnych, psychrofilnych, gronkowców, grzybów pleśniowych oraz *Salmonella* spp.. W Instytucie Geografii i Gospodarki Przestrzennej Uniwersytetu Jagiellońskiego oznaczono parametry fizykochemiczne – odczyn, przewodność elektryczną oraz wykorzystano metodę chromatografii jonowej w celu oznaczenia stężenia jonów NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- i PO_4^{3-} .

Liczebność mikroorganizmów w wodach wahała się znacznie, zarówno w ujęciu czasowym jak i przestrzennym. Najmniejsze stężenia mikrobiologicznych wskaźników zanieczyszczenia kałowego występowały w punktach: Bryjów źródło (w górnym biegu strumienia płynącego w bezpośrednim sąsiedztwie największego w rejonie ośrodka narciarskiego Kotelnica Białczańska), gdzie stwierdzono najmniejszą zawartość bakterii grupy coli, oraz w Łysej Polanie (Tatrzański Park Narodowy- TNP), w którym badane wskaźniki nie występowały, bądź ich średnia liczebność w 100 ml wody była niemal zaniedbywalna. W punkcie Łysa Polana stwierdzono ponadto najmniej bakterii psychrofilnych oraz grzybów; natomiast najmniej gronkowców i bakterii mezofilnych występowało w punkcie Bryjów źródło. W odniesieniu do fizykochemicznych parametrów jakości wód, najmniejsze wartości stwierdzano w punktach Łysa Polana (przewodność elektryczna), przed oczyszczalnią (before STP - NO_2^- , PO_4^{3-}), ujęcie (intake - NO_3^-) oraz Bryjów źródło (NO_2^-). Z kolei punkt znajdujący się w pobliżu zrzutu ścieków z gminnej oczyszczalni był najbardziej zanieczyszczony, zarówno pod względem mikrobiologicznym jak i fizykochemicznym. Biorąc pod uwagę zmienność sezonową badanych parametrów, wykazano iż liczba bakterii grupy coli, *E. coli* i *E. faecalis* znacznie wzrasta w dwóch okresach roku – zimą, w czasie tzw. „wysokiego sezonu narciarskiego” (luty-marzec) oraz w okresie wakacji letnich (lipiec – sierpień). Stwierdzono, iż zmiany natężenia ruchu turystycznego na badanym obszarze są jednym z najważniejszych czynników wpływających na jakość wód powierzchniowych. Jest to efektem znacznego wzrostu stężenia ładunku zanieczyszczeń – zarówno w oczyszczalni ścieków, której wydajność w niewłaściwych okresach jest niewystarczająca, jak i poprzez odprowadzanie ścieków z gospodarstw domowych - tzw. kwater prywatnych - bezpośrednio do rzeki Białki. Także parametry fizykochemiczne podlegają znacznym sezonowym zmianom, jednak zaobserwowane wahania nie są efektem jedynie czynników antropogenicznych, lecz związane są również z naturalnym cyklem zachodzącym w przyrodzie – m.in. zmianami temperatury wody wraz ze zmianami temperatury powietrza. Znaczny spadek przewodności elektrycznej w miesiącach wiosennych związany jest z rozcieńczaniem wód w efekcie dopływu wód z roztopów, a zmiany stężeń jonów wynikają z ich wymywania z pokrywy śnieżnej lub pobierania przez rośliny w sezonie wegetacyjnym.

Zastosowanie metody PCA pozwoliło podzielić badane punkty na trzy grupy, różniące się dominującymi czynnikami, kształtującymi jakość wód. W grupie pierwszej znalazły się punkty Łysa Polana (TPN), potok Bryjów oraz jego źródło, w których dominują czynniki związane ze zjawiskami naturalnymi takimi jak spływ powierzchniowy, dopływ zwiększonych stężeń jonów i bakterii glebowych w trakcie roztopów, czy dopływ bakterii znajdujących się w odchodach owiec wypasanych wiosną i latem na stokach Kotelnicy. Kolejne trzy punkty - oczyszczalnia ścieków, ujęcie oraz Trybsz stworzyły grupę, w której dominującymi czynnikami kształtującymi jakość wód są te związane z działaniem człowieka, w głównej mierze poprzez dopływ ścieków – zarówno zrzut niedostatecznie oczyszczonych z oczyszczalni, jak i ich odprowadzanie z niepodłączonych do sieci kanalizacyjnej gospodarstw domowych bezpośrednio do rzeki Białki. W ostatniej, trzeciej, grupie znalazły się dwa punkty: przed oczyszczalnią ścieków oraz potok Czerwotka. W grupie tej zidentyfikowano dwa równoważne czynniki: zmieniający się w ciągu roku dopływ ścieków związany z natężeniem ruchu turystycznego oraz zjawiska naturalne takie jak dopływ mikroorganizmów i jonów w trakcie roztopów, z wymywania gleb lub spływów powierzchniowych.

Podsumowując – badania opisane w pracy **B.1.** dostarczyły nieoczekiwanych wyników, na podstawie których stwierdzono, że wody rzeki Białki – uznawane dotychczas za jedne z najczystszych w Polsce, są w znacznym stopniu zanieczyszczone, głównie mikrobiologicznie. Rzeka ta płynie przez tereny objęte prawną ochroną, a szczegółowe badania mikrobiologiczne nie były wcześniej prowadzone w zakresie opisanym w pracy **B.1.** Stwierdzono, że głównym źródłem zanieczyszczeń są ścieki, pochodzące z niewystarczająco efektywnie działającej oczyszczalni oraz z gospodarstw domowych, służących jako kwatery prywatne dla licznie odwiedzających badany rejon turystów. Zaobserwowane zanieczyszczenie jest bardzo silne – najwyższa liczebność *Escherichia coli* (dane nieprzedstawione w pracy **B.1.**) przy oczyszczalni wyniosła prawie 1,2 mln jtk/100 ml wody, a średnia zawartość w tym punkcie to 250 tys. jtk/100 ml, co jest wartością 35-krotnie wyższą niż np. najwyższa średnia liczebność *E. coli* odnotowana przez Nnane i in. (2011) w pobliżu oczyszczalni ścieków przy rzece Ouse w południowo-wschodniej Anglii, płynącej przez tereny głównie zagospodarowane rolniczo, jednak wzdłuż której zlokalizowanych jest aż 20 oczyszczalni ścieków. Wskazano, że sezonowe wahania natężenia ruchu turystycznego są jednym z najważniejszych czynników wpływających na obniżenie jakości wody. Sezonowość zjawisk naturalnych jest drugim ważnym czynnikiem kształtującym obserwowane zmiany. Wyodrębnienie grup, w których czynniki te mają różny udział oraz wykazanie zależności pomiędzy mikrobiologicznymi wskaźnikami jakości i parametrami fizykochemicznymi było możliwe dzięki zastosowaniu metody statystycznej PCA. Istotnym osiągnięciem było również wykazanie dwóch problemów na badanym obszarze – braku wydajności gminnej oczyszczalni ścieków oraz niedostateczny stopień skanalizowania w gminie Bukowina Tatrzańska.

Praca **B.2.** stanowi kontynuację badań przedstawionych w pracy **B.1.**, a zarazem dokładną analizę obserwacji czynników kształtujących zmienność jakości wód. Przedstawiono tu wyniki trzyletnich badań zmian stężeń mikrobiologicznych wskaźników jakości wód (bakterii grupy coli, *Escherichia coli*, bakterii mezofilnych i psychrofilnych) oraz biogenów (jonów NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ i PO_4^{3-}). Badania oparto na 35 seriach analiz prób pobranych w pięciu punktach zlewni rzeki Białki (na rzece – przed oczyszczalnią, ujęcie i Trybsz; oraz dopływy – Czerwonka i Bryjów). Wyniki poddano statystycznej eksploracji danych przy użyciu metod PCA oraz CA (ang. *Cluster Analysis* – analiza skupień). Ich celem była identyfikacja zjawisk naturalnych i antropogenicznych kształtujących sezonową zmienność jakości wód.

W badaniach stwierdzono znaczną zmienność badanych parametrów, a w szczególności wskaźników mikrobiologicznych, zarówno pomiędzy badanymi punktami jak i w przeciągu okresu badań, wspartą przez wysokie wartości współczynnika zmienności (CV). Na podstawie analizy skupień stwierdzono, iż w zależności od położenia punktu poboru, dominują odmienne czynniki kształtujące jakość wód. Przykładowo, w punktach przed oczyszczalnią, Trybsz i Czerwonka w miesiącach zimowych stwierdzono dominujący wpływ czynników związanych z obsługą ruchu turystycznego, tj. zwiększonego poboru wody do celów bytowych oraz sztucznego śnieżenia stoków w połączeniu z odprowadzaniem znacznej ilości ścieków. Drugim czynnikiem kształtującym jakość wód w wymienionych punktach jest sezonowość zjawisk naturalnych, wśród których obserwujemy rozcieńczanie wód przez topniejący śnieg (niskie wartości $\text{EC}_{25^\circ\text{C}}$ oraz niskie stężenia biogenów), niosący ze sobą znaczny ładunek bakterii, wypłukiwanych z wierzchniej warstwy pokrywy glebowej. Późną wiosną i latem (w czasie okresu wegetacyjnego) obserwowano niskie stężenia bakterii i biogenów oraz wysoką temperaturę wód. Wówczas rośliny pobierają znaczne ilości substancji biogennych, a mniejsza ilość opadów w okresie letnim oraz mniejsza liczba turystów sprzyja niskiej liczebności bakterii. Niskie zawartości bakterii, niską temperaturę i wyższe stężenia biogenów można z kolei obserwować jesienią (zmniejszona asymilacja składników przez rośliny, niższa temperatura otoczenia, zerowy ruch turystyczny). Nieco inną sytuację obserwujemy w punkcie ujęcie, zlokalizowanym na rzece Białce kilka kilometrów poniżej oczyszczalni ścieków, gdzie sezonowe zmiany jakości układają się w cztery grupy. Pierwsza z nich zawiera próbki, cechujące się największą liczbą bakterii, wysokimi stężeniami związków azotu i fosforu lecz niskim pH. Takie właściwości charakterystyczne są dla zimowego okresu największego ruchu turystycznego, gdy znajdująca się powyżej oczyszczalnia nie jest w stanie wystarczająco wydajnie oczyścić dopływających ścieków i odprowadza do pobliskiego strumienia wody o niezadowalającej jakości. Pod koniec sezonu zimowego stwierdzano wysokie stężenia bakterii, wysoką przewodność oraz dość wysokie stężenia biogenów. Jakość wód wówczas nadal nie jest zadowalająca, lecz ze względu na mniejsze obciążenie dla oczyszczalni związane z malejącym ruchem turystycznym, stężenia wskaźników złego stanu wód są zdecydowanie niższe niż w szczycie sezonu. W grupie 3 znajdują się wody o niskiej zawartości bakterii, niskiej przewodności, wysokiej temperaturze, lecz bardzo

niskich stężeniach związków azotu i fosforu. Takie próbki zbierane są latem, gdy niewielki ruch turystyczny oraz rzadkie opady skutkują małym ładunkiem zanieczyszczeń bakteryjnych, wysoka temperatura wód to efekt wysokich temperatur powietrza, a asymilacja związków biogenych przez rośliny skutkuje ich niskim stężeniem i przewodnością elektryczną. Ostatnia grupa obejmuje wody o niskich stężeniach bakterii, niskiej temperaturze, wysokiej przewodności oraz podwyższonych stężeniach jonów amonowych i azotanowych. Wody o takiej charakterystyce występują późną jesienią/wczesną zimą, przed rozpoczęciem sezonu turystycznego, gdy obciążenie dla oczyszczalni ścieków jest niewielkie, podobnie jak intensywność pobierania jonów biogenych przez rośliny.

Zastosowanie metody PCA potwierdziło obserwacje uzyskane na drodze analizy skupień i pozwoliło na uzyskanie dodatkowych informacji na temat procesów kształtujących zmiany sezonowe zachodzące w badanych miejscach. Ponownie na przykładzie punktu ujęcie, czynnik 1 wskazuje na istotną ujemną zależność pomiędzy odczynem wód a poziomami bakteryjnych wskaźników jakości. Zależność tą wyjaśnić można zjawiskiem spływów powierzchniowych, które mogą obniżać odczyn wody ze względu na fakt iż w bezpośrednim sąsiedztwie badanego punktu znajdują się strome stoki porośnięte lasami iglastymi. Dodatkowo, woda ze spływów powierzchniowych często zawiera wszystkie badane grupy bakterii, a w szczególności bakterie mezofilne i bakterie grupy coli. Czynnik 2 pokazuje ujemną zależność pomiędzy liczebnością bakterii mezofilnych, przewodnością elektryczną oraz stężeniem jonów NO_3^- a temperaturą wody. Również tą zależność można tłumaczyć sezonowością procesów zachodzących na badanym obszarze, tym razem jednak głównie sezonowością ruchu turystycznego. Niskie temperatury wód występują zimą (listopad – marzec), kiedy obserwuje się znacznie wzmożony ruch turystyczny, powodujący drastyczne zwiększenie ilości produkowanych ścieków, z których jedynie część odprowadzana jest do i tak niewystarczająco efektywnie działającej oczyszczalni, natomiast duża ich ilość dociera bezpośrednio do rzeki w postaci nieoczyszczonej.

W pracy **B.2.** w sposób niewątpliwy wykazano istnienie sezonowości w zmianach jakości wód w rzece Białce. Przeprowadzenie długoterminowych badań, a dzięki temu poznanie lokalnych uwarunkowań, pozwala na dokładniejsze zrozumienie mechanizmów zachodzących w zlewniach, a także zaproponowanie racjonalnych rozwiązań zidentyfikowanych problemów. Jednak tego typu badania (także przeprowadzone w opisywanej pracy) generują ogromną ilość danych, które wymagają odpowiedniego podejścia aby możliwa była ich poprawna interpretacja. Zastosowanie wielowymiarowych testów statystycznych - PCA i CA, pozwoliło na wiarygodną identyfikację czynników kształtujących obserwowaną zmienność. Analiza skupień (CA) wykazała w sposób ewidentny dominację odmiennych czynników kształtujących jakość wód w różnych porach roku, natomiast PCA wskazała na znaczący wpływ w tym względzie sposobu użytkowania terenu. Podobne podejście do bardzo dużego zbioru danych dotyczących jakości wód zastosowali Barakat i in. (2016) w badaniach rzeki Oum Er Rbia w Maroku, czy

Phung i in. (2015) w badaniach wód Deltę Mekongu (Wietnam). Podobnie jak w pracy B.2., zastosowanie wielowymiarowych metod statystycznych pozwoliło na identyfikację źródeł zanieczyszczeń wody i czynników wpływających na jej jakość, a także na ocenę przestrzennej i sezonowej zmienności jakości wód, co jest elementem niezbędnym aby zaproponować skuteczne rozwiązania.

W publikacjach **B.3.** i **B.4.** opisano wyniki eksperymentów dobowych przeprowadzonych w zlewni Białki, mających na celu precyzyjną ocenę zmian jakości wód w rzece w efekcie działania gminnej oczyszczalni ścieków. Badania przeprowadzono w okresie ferii zimowych, podczas których okolice Białki Tatrzańskiej odwiedzane są przez setki tysięcy turystów, co skutkuje znacznym pogorszeniem jakości wód w rzece, zwłaszcza w jej odcinkach położonych przy zrzucie ścieków z oczyszczalni oraz do kilku kilometrów w dół biegu rzeki. W obydwu pracach próby wód do badań pobierano w trzech punktach – przed oczyszczalnią, przy zrzucie ścieków z gminnej oczyszczalni oraz kilka kilometrów w dół biegu rzeki Białki, w miejscowości Białka Tatrzańska, w punkcie gdzie ujmowana jest woda do sztucznego śnieżenia stoków Kotelnicy.

W pracy **B.3.** próbki pobrano czterokrotnie w ciągu doby, w odstępach kilkugodzinnych. Analizie poddano łącznie 12 próbek, w których oznaczono liczebność podstawowych wskaźników stanu sanitarnego wód – *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i bakterii mezofilnych. W punkcie przed oczyszczalnią liczebność bakterii mezofilnych wahała się od 3 do ok. 160 jtk/ml, *E. coli* od 6 do ok. 90 jtk/100 ml, a *E. faecalis* nie stwierdzono, co pozwoliło zaklasyfikować wodę w tym punkcie jako niezanieczyszczoną (kategoria A1 lub A2). Obecność bakterii *E. faecalis* (15-70 jtk/ 100 ml) stwierdzono jedynie w punkcie przy oczyszczalni ścieków, w którym jakość wód jest bardzo słaba – liczba bakterii mezofilnych wahała się od ok. 13 tys. jtk/ml do ponad 3 mln jtk/ml, a *E. coli* od ok. 3 tys. jtk/100 ml do 590 tys. jtk/100 ml. W punkcie ujęcie wody rzeki Białki były dużo mniej zanieczyszczone, jednak stężenie bakterii wskaźnikowych było w nich wyższe niż przed oczyszczalnią. Liczba bakterii mezofilnych wahała się tam od 140 do ponad 1400 jtk/ml, a *E. coli* od ok. 60 do 250 jtk/100 ml. Na podstawie wyników badań stwierdzono, iż zanieczyszczenie wód w Białce podlega cyklicznym zmianom w ciągu doby, co uzależnione jest od rytmu pracy gminnej oczyszczalni ścieków. Trafiające do wód mikroorganizmy, pomimo iż ulegają rozcieńczaniu i sedymentacji, to nadal przyczyniają się do obniżenia jakości wody w obszarach położonych w dół biegu rzeki.

Badania opisane w publikacji **B.3.** stały się przyczynkiem do przeprowadzenia dokładniejszych i bardziej rozbudowanych oznaczeń, których wyniki przedstawiono w pracy **B.4.**. Próbkę pobrano w tych samych miejscach, natomiast w każdym punkcie próby zebrano 12-krotnie, w odstępach 2-4 godzinnych, w przeciągu 36 godzin. W trakcie poboru mierzono temperaturę wody, pH, przewodność elektryczną oraz zawartość tlenu rozpuszczonego. Następnie w laboratorium oznaczono liczebność *E. coli*, *E. faecalis* i bakterii mezofilnych, oraz

zbadano stężenie kilkunastu jonów, w tym biogenów. Interpretację danych przeprowadzono z użyciem narzędzi statystycznych, gdzie oprócz podstawowych testów (podstawowe statystyki opisowe, test T, ANOVA, korelacja Spearman'a) zastosowano analizę składowych głównych (PCA) w celu identyfikacji czynników kształtujących zmienność analizowanych parametrów chemicznych i mikrobiologicznych oraz ich wzajemne zależności w badanych punktach zlewni.

W pracy **B.4.** w żadnej z próbek nie stwierdzono *E. faecalis*, natomiast *E. coli* występowały w każdej z badanych wód w znacznie wahających się stężeniach. Na tej podstawie stwierdzono, że zanieczyszczenie w badanych punktach jest najprawdopodobniej skutkiem dopływu ścieków zawierających ludzkie odchody. Wniosek ten oparto na badaniach świadczących o tym, że w ludzkich odchodach bakterie grupy coli i *E. coli* licznie znacznie przewyższają *E. faecalis* (Sinton i in. 1998), oraz że jeśli stosunek liczby bakterii grupy coli typu kałowego do *E. faecalis* jest większy niż 4, to mamy do czynienia z zanieczyszczeniem wód o pochodzeniu ludzkim; gdy stosunek ten wynosi 0,7 i mniej – zanieczyszczenie jest pochodzenia zwierzęcego (Cabral 2010). Podobnie jak w pracy **B.3.**, stężenie *E. coli* w wodach różniło się znacznie pomiędzy badanymi punktami, a także podlegało silnym wahaniom w poszczególnych godzinach. Najmniejszą zmienność stwierdzono w punkcie najczystszym, tj. przed oczyszczalnią, gdzie stężenie tych bakterii wahało się między 17 a 164 jtk/100 ml. Z kolei w punkcie przy oczyszczalni liczebność *E. coli* wynosiła od 71 tys. jtk/100 ml do nawet 1,5 mln jtk/100 ml. Dość znaczne wahania, tj. od 14 do niemal 2500 jtk/100 ml stwierdzono przy ujęciu wód do sztucznego śnieżenia stoków Kotelnicy. Podobnie kształtowała się zmienność liczebności bakterii mezofilnych w badanych próbkach wód – najmniejsze średnie stężenia i najmniejszą zmienność stwierdzono przed oczyszczalnią, podczas gdy punkt przy oczyszczalni charakteryzował się bardzo silnym zanieczyszczeniem, mając także wpływ na obniżenie jakości wód w punkcie ujęcia. Również stężenie jonów związanych z zanieczyszczeniem pochodzenia antropogenicznego (np. NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}) wahało się znacznie. Przykładowo w punkcie przy oczyszczalni zaobserwowano 10-krotne i 25-krotne różnice w stężeniu odpowiednio jonów NH_4^+ i PO_4^{3-} , natomiast w punkcie ujęcia różnice w stężeniu NH_4^+ były nawet 35-krotne.

Na podstawie analizy PCA wytypowano dominujące czynniki kształtujące jakość wód w badanych punktach. W punkcie przed oczyszczalnią silna zależność między liczbą bakterii mezofilnych, *E. coli* i NH_4^+ oraz NO_3^- wskazała na oddziaływanie czynników pochodzenia antropogenicznego, tj. dopływu ścieków do wód. Również przy oczyszczalni jasno wykazano wpływ dopływu świeżych, nieoczyszczonych ścieków na pogorszenie jakości wód. Na podstawie stosunku jonów NO_3^- i NH_4^+ stwierdzono iż ścieki te mogły zostać odprowadzone z oczyszczalni, w której proces nityfikacji nie zachodzi, bądź zachodzi niewydajnie (Bothe i in. 2000). W punkcie ujęcia stwierdzono istnienie dwóch czynników kształtujących jakość wód, tj. stały dopływ ścieków pochodzenia antropogenicznego do rzeki Białki oraz różnice w aktywności dobowej ludności skutkującej zmniejszonym dopływem ścieków w nocy. Pozwala to na

zwiększenie efektywności działania oczyszczalni obserwowanej m.in. jako zwiększenie efektywności procesu nitryfikacji (wyższe stężenia NO_3^-).

Wyniki uzyskane w badaniach zaprezentowanych w pracach **B.3.** i **B.4.** wskazują na ogromne zróżnicowanie poziomów wskaźników jakości wód, zarówno na przestrzeni kilku kilometrów (odległość punktu przed oczyszczalnią do punktu ujęcie nie przekracza 3 km wzdłuż biegu rzeki) jak i w przeciągu mniej niż dwóch dni (21-krotne różnice w liczebności *E. coli* przy oczyszczalni ścieków w odstępie maksymalnie 4 godzin). Podobnie Meays i in. (2006) w badaniach zmienności dobowej liczebności i źródeł pochodzenia *E. coli* w trzech strumieniach w Kolumbii Brytyjskiej, a także Whitman i Nevers (2004) w badaniach przeprowadzonych na jednej z plaż w Chicago wykazali, że liczebność *E. coli* może podlegać znacznym wahaniom, zarówno na niewielkiej przestrzeni jak i w krótkich odstępach czasu. Na podstawie opisanych badań stwierdzono, że uzyskanie wiarygodnych wyników, koniecznych do zaproponowania skutecznych rozwiązań, wymaga bardzo dokładnego poznania zlewni i szczegółowego zaplanowania analiz, co często jest ogromnym wyzwaniem. Po raz kolejny wykazano, że stężenie badanych mikroorganizmów wskazuje na dużo wyższe zanieczyszczenie wód niż to, które można stwierdzić na podstawie parametrów chemicznych.

W pracy **B.5.** przedstawiono wyniki badań, w których oceniono częstość występowania lekoopornych szczepów *Escherichia coli* w wodach rzek Białki i Zakopianki. Próbkę pobrano w jedenastu punktach – sześciu wzdłuż Białki i pięciu – wzdłuż Zakopianki. Wyizolowane z wód szczepy, których przynależność gatunkową potwierdzono techniką MALDI-TOF, poddano badaniu lekooporności metodą dyfuzyjno-krążkową. Wykonano antybiogram podstawowy i rozszerzony (Gniadkowski i in. 2009; EUCAST 2016), a także zbadano obecność mechanizmu ESBL (beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ang. *extended-spectrum beta lactamases*) metodą dwóch krążków (Drieux i in. 2008). Przeprowadzono także testy PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla genów *blaCTXM3*, *blaCTXM9*, *blaOXA*, *blaSHV* i *blaTEM* kodujących enzymy mechanizmu oporności ESBL.

Bakterie *E. coli* występowały w każdym z badanych punktów, jednak w różnej liczbie (średnie wartości dla rzeki Białki - od 3 jtk/ 100 ml w punkcie Łysa Polana/TPN do ponad 2 mln jtk/100 ml przy zrzucie ścieków z oczyszczalni w Bukowinie Tatrzańskiej oraz dla rzeki Zakopianki – od 910 jtk/100 ml w Nowym Targu do prawie 48 tys. jtk/100 ml przy zrzucie ścieków z oczyszczalni ścieków w Zakopanem), co znalazło odzwierciedlenie w liczbie izolatów poddanych dalszym testom. W ogólnej ocenie jakości mikrobiologicznej wód w badanych punktach, opartej na liczebności bakterii *Escherichia coli* i porównanej z wartościami zawartymi w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dn. 11 lutego 2004, stwierdzono że woda w pięciu (Białka – oczyszczalnia oraz ujęcie; Zakopianka – przed szpitalem, za oczyszczalnią oraz most w Poroninie) spośród jedenastu badanych punktów należy do 4 i 5 klasy jakości. Oznacza to, że wody w wymienionych punktach są niezadowolającej i złej jakości i nie nadają się do spożycia

przez ludzi. Natomiast porównanie liczebności *E. coli* z Dyrektywą PE dot. Zarządzania jakością wody w kąpieliskach (2006) wykazało, że jedynie wody w punkcie za oczyszczalnią w Bukowinie Tatrzańskiej (rz. Białka) są niedostatecznej jakości, wody w punktach za oczyszczalnią w Zakopanem i w Poroninie są jakości dostatecznej, a pozostałe charakteryzują się jakością doskonałą. Do badań lekooporności wybrano 196 izolatów *E. coli* (po 98 z każdej rzeki). Najczęściej stwierdzano oporność na ampicylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym i tikarcylinę (antybiotyki β -laktamowe). Największą skutecznością w stosunku do *E. coli* wyizolowanych z rzeki Białki odznaczała się tobramycyna (1% szczepów opornych), a ciprofloksacyna wykazała najskuteczniejsze działanie na szczepy z rzeki Zakopianki (5% opornych). Mechanizm ESBL wykryto u 11 i 12% szczepów *E. coli* odpowiednio z Białki i Zakopianki, natomiast szczepy wielooporne (MDR – ang. *multidrug resistant*) stanowiły 16% i 25% izolatów z Białki i Zakopianki. Co również istotne, cztery szczepy z rzeki Białki i dziesięć z Zakopianki były oporne na ponad 10 antybiotyków jednocześnie. Dwa z nich, oporne na 14 i 15 antybiotyków, wyizolowano z punktu za oczyszczalnią w Zakopanem, jednak pozostałe występowały we wszystkich badanych punktach, co wskazuje na znaczne rozprzestrzenienie szczepów wieloopornych w wodach powierzchniowych, a także na duże ryzyko transmisji bakterii lekoopornych na ludzi. Ma to szczególne znaczenie ze względu na sposób wykorzystywania wód badanych rzek, tj. w celach rekreacyjnych i do produkcji sztucznego śniegu na okolicznych stokach narciarskich, cieszących się ogromną popularnością. W badaniach PCR najczęściej stwierdzanym genem ESBL był *blaTEM* (43% izolatów z rz. Białki i 48% z rz. Zakopianki). Obserwacja ta jest zgodna z wnioskami Bradford (2001), wg której TEM-1 jest najczęściej spotykanym typem β -laktamazy u bakterii Gram-ujemnych. Spośród pozostałych genów wykryto jedynie *blaCTXM3* i *blaCTXM9* – w jednym szczepie, wyizolowanym za szpitalem w Zakopanem. Na co warto zwrócić uwagę, to że o wiele częściej stwierdzano obecność genów odpowiadających za wystąpienie mechanizmu ESBL niż wykrywano jego obecność w testach fenotypowych. Oznacza to, że oprócz testów fenotypowych warto również przeprowadzać testy PCR, które pozwolą wykryć szczepy, które mimo iż nie stanowią bezpośredniego zagrożenia epidemiologicznego, to mogą przenosić geny ESBL na pozostałe środowiskowe szczepy *E. coli* lub inne gatunki *Enterobacteriaceae*.

W opisanych badaniach wykazano, że oprócz stwierdzonego już wcześniej znacznego zanieczyszczenia mikrobiologicznego, wody badanych rzek Podhala zawierają liczne lekooporne i wielooporne szczepy powszechnie występującej bakterii *E. coli*. Podobnie jak w badaniach Blaak i in. (2015), tak liczne występowanie lekoopornych *E. coli* najprawdopodobniej wynika z dopływu ścieków zawierających te mikroorganizmy. Oznacza to istotne zagrożenie dla środowiska, zwłaszcza że szczepy takie izolowane były również w punktach na obszarach chronionych. Istnieje również niebezpieczeństwo przeniesienia genów oporności na inne szczepy bakterii – na zasadzie horyzontalnego transferu genów. Także biorąc pod uwagę fakt, że wody Białki i Zakopianki wykorzystywane są w celach rekreacyjnych oraz do sztucznego

śnieżenia stoków narciarskich, tak liczna obecność bakterii lekoopornych, wieloopornych i posiadających mechanizm ESBL stanowi zagrożenie dla zdrowia ludzi mających kontakt z zanieczyszczonymi wodami i śniegiem. Oznacza to, że podjęcie działań mających na celu zmniejszenie stężenia zanieczyszczeń w rzekach, staje się nagłą koniecznością.

Praca **B.6.** dokumentuje wyniki rocznych badań, przeprowadzonych w 21 punktach zlokalizowanych wzdłuż głównych rzek Podhala – Białki, Białego Dunajca, Czarnego Dunajca i Dunajca, tworzących zlewnię Jeziora Czorsztyńskiego. Punkty badawcze rozmieszczono w taki sposób, aby jak najpełniej przedstawić zmienność jakości wód powierzchniowych na badanym obszarze, a także uchwycić zjawiska mające wpływ na jakość wody w analizowanych punktach. Przeprowadzono badania mikrobiologiczne (oznaczenie bakterii grupy coli i *Escherichia coli* – ogólnej liczby i form kałowych, a także bakterii mezo- i psychrofilnych) i fizykochemiczne wód (pH, temperatura, przewodność elektryczna - $EC_{25^{\circ}C}$ oraz jony Na^{+} , K^{+} , NH_4^{+} , Cl^{-} , NO_3^{-} , PO_4^{3-}). Podjęto również próbę oceny wpływu sposobu użytkowania terenu w poszczególnych zlewniach na jakość wód w badanych rzekach.

Podobnie jak we wcześniejszych badaniach, stwierdzono że jakość wód ustalona na podstawie wskaźników mikrobiologicznych jest dużo niższa niż wskazywałyby parametry fizykochemiczne. Spośród trzech zlewni cząstkowych (Białka, Czarny Dunajec i Biały Dunajec) najwyższą wartość wszystkich badanych wskaźników stwierdzono w zlewni Białego Dunajca, której wody w większości badanych punktów zaklasyfikowano jako niedostatecznej jakości na podstawie zaleceń zawartych w Dyrektywie 2006/7/WE Parlamentu Europejskiego (2006). Zaobserwowano również znaczne różnice przestrzenne wartości badanych parametrów fizykochemicznych wód i mikrobiologicznych wskaźników jakości. Co oczywiste, najniższe stężenia większości badanych parametrów obserwowano w górnym biegu rzek, wartości te znacznie rosły w pobliżu dużych miejscowości oraz oczyszczalni ścieków i w różnym stopniu opadały w dalszym biegu rzek. Stwierdzono także statystycznie istotne zależności pomiędzy wartościami stężeń parametrów fizykochemicznych i mikrobiologicznych a sposobem użytkowania terenu. W tym jednak przypadku wykazano, iż zróżnicowanie parametrów fizykochemicznych jest w dużo większym stopniu zależne od użytkowania terenu niż stężenia mikroorganizmów wskaźnikowych. Także Tong i Chen (2002) w badaniach polegających na modelowaniu związków pomiędzy jakością wód powierzchniowych a sposobem użytkowania terenu, jednoznacznie wykazali istnienie takiego związku, w szczególności dla liczebności bakterii grupy coli typu kałowego i stężenia azotanów oraz fosforanów. Również St. Laurent i Mazumder (2012), na podstawie statystycznej analizy danych dotyczących liczebności bakterii grupy coli typu kałowego oraz sposobu użytkowania terenu w 42 punktach na rzekach Kolumbii Brytyjskiej, stwierdzili znaczny wzrost liczebności tych bakterii na obszarach zagospodarowanych rolniczo oraz na terenach miejskich. W pracy **B.6.** podjęto się także oceny różnic wartości badanych parametrów przed i za Jeziorem Czorsztyńskim. Wykazano, że wody

wpływające do Jeziora charakteryzują się dużo większym zanieczyszczeniem mikrobiologicznym niż w punkcie za Jez. Czorszyńskim. Także stężenia wskaźników fizykochemicznych ulegają znacznemu zmniejszeniu, najprawdopodobniej na drodze sedimentacji.

W badaniach **B.6.** wykazano, że na terenie badanej zlewni dominującymi źródłami zanieczyszczeń wód w rzekach są źródła punktowe, tj. zrzuty ścieków z oczyszczalni oraz ścieki nielegalnie odprowadzane z gospodarstw domowych. Do takich samych wniosków, choć opartych na badaniach prowadzonych w zlewni gdzie znaczny udział ma działalność przemysłowa i intensywne rolnictwo, doszli Servais i in. (2007). Wykazano także, iż badane zlewnie cząstkowe różnią się między sobą stężeniami poszczególnych wskaźników zanieczyszczenia wód, a różnice te uzależnione są od sposobu użytkowania terenu i intensywności ruchu turystycznego.

W publikacji **B.7.** przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych w czterech stacjach narciarskich na Podhalu, dokumentujące jakość mikrobiologiczną sztucznego śniegu, produkowanego z wód rzek Białki i Zakopianki. Próbkę do badań pobrano podczas dwóch sezonów narciarskich na stacjach Jurgów (S1, S2), Kotelnica (S3, S4) Bania (S5) (gm. Bukowina Tatrzańska, rz. Białka) i Harenda (S6, S7) (Zakopane, rz. Zakopianka). W pracy nie ujawniono nazw ośrodków narciarskich. Przebadano próbki wód w wybranych punktach na rzekach (m.in. ujęcia do sztucznego śnieżenia) oraz śniegu naturalnego i świeżo wytworzonego sztucznego. Oprócz znacznego zanieczyszczenia mikrobiologicznego wód przy ujęciach do sztucznego śnieżenia stoków Kotelnicy, Bani i Harendy, stwierdzono występowanie bakteryjnych wskaźników zanieczyszczenia kałowego w próbkach sztucznego śniegu Kotelnicy i Harendy. Co ciekawe, sztuczny śnieg wyprodukowany na stokach stacji Bania był mikrobiologicznie niezanieczyszczony, pomimo tego iż Bania i Kotelnica korzystają z tego samego ujęcia. Okazało się jednak, że stacja Kotelnica korzysta z wody bezpośrednio pompowanej z ujęcia na rzece Białce, podczas gdy Bania posiada zbiornik, do którego woda jest wcześniej pompowana i wykorzystywana po pewnym czasie. Sugeruje to, że pomimo znacznej kontaminacji wód na ujęciu w rzece Białce, zanieczyszczenia osadzają się w zbiorniku, co skutkuje produkcją czystego śniegu, nie stanowiącego zagrożenia dla zdrowia pracowników obsługi i turystów. Wyniki te zostały wykorzystane przez zarząd stacji narciarskiej Kotelnica podczas budowy kolejnego stoku – Remiaszów, oddanego do użytku w grudniu 2015 r. Produkcja sztucznego śniegu w nowo wybudowanym systemie poprzedzona jest zebraniem wody do zbiornika pośredniego o poj. 50000 m³, gdzie zanieczyszczenia osadzają się, nie przechodząc do śniegu.

W wyniku analiz zebrano 31 szczepów *Escherichia coli*, pochodzących ze stoków Kotelnica (23 izolaty ze śniegu sztucznego i 2 ze śniegu naturalnego) i Harenda (6 izolatów ze śniegu sztucznego). Bakterie te, których przynależność gatunkową potwierdzono techniką MALDI-TOF, poddano testom oporności na 20 antybiotyków antybiogramu podstawowego i rozszerzonego, metodą dyfuzji krążkowej. Najczęściej stwierdzano oporność na antybiotyki,

które są jednocześnie najczęściej zalecane przez lekarzy pierwszego kontaktu – ampicylinę (74,19% szczepów opornych) i amoksycylinę z kwasem klawulanowym (51,61% szczepów). Obecność mechanizmu ESBL stwierdzono u trzech szczepów, wyizolowanych ze śniegu z Kotelnicy. Wykonano także test PCR w celu wykrycia obecności genów kodujących enzymy ESBL, w wyniku którego wykryto jedynie gen *blaTEM* – tylko u trzech szczepów, u których stwierdzono ten typ oporności w testach fenotypowych.

Ostatni etap badań polegał na przeprowadzeniu różnicowania genetycznego w oparciu o technikę Rep-PCR (primer BOXA1R). Uzyskane wyniki interpretowano przy użyciu analizy haplotypów zakończonej konstrukcją *Minimum Spanning Tree* (minimalnego drzewa rozpinającego) w celu przedstawienia zależności/pokrewieństwa pomiędzy haplotypami oraz ich polimorfizmu. Wykreślono dwa drzewa MST, dla każdego z dwóch lat analiz, przy czym obrazy obydwu drzew różnią się. W pierwszym roku stwierdzono większe całkowite zróżnicowanie izolatów pochodzących ze śniegu, jednak drzewo zdominowane jest przez jeden haplotyp (8 izolatów), do którego zbliżone są dwa inne – wszystkie pochodzące ze sztucznego śniegu stacji Kotelnica. W drugim roku natomiast zróżnicowanie jest mniejsze, lecz nie zaobserwowano na drzewie dominującej grupy haplotypów. Największa grupa złożona jest z trzech izolatów - dwa pochodzą ze stacji Kotelnica, a jeden z Harendy. Najbardziej oddalone od nich są szczepy wyizolowane z wód. Wyniki wskazują, że sztuczny śnieg może zawierać liczne szczepy *E. coli*, jednak pewna ich grupa posiada większą zdolność przetrwania procesu mrożenia. Wskazuje na to obecność dominującej grupy 8 klonalnych izolatów, z którymi blisko spokrewnione były dwa inne. Niestety efektu tego nie można uznać za przewidywalny, gdyż nie został on potwierdzony w drugim roku analiz. Aczkolwiek, w drugim roku eksperymentu wykryto haplotyp obecny u izolatów pochodzących z obydwu oddalonych od siebie stacji narciarskich, których śnieg produkowany jest z dwóch różnych rzek. Świadczy to o szerokim rozpowszechnieniu szczepu posiadającego ten haplotyp.

Obserwacje zawarte w powyższej pracy wskazują, że mikrobiologiczne zanieczyszczenie wód w rzekach Podhala skutkuje zanieczyszczeniem sztucznego śniegu, gdy jest on produkowany z wód bezpośrednio pobieranych z rzek. Stwierdzono, że nie wszystkie szczepy *E. coli* są zdolne do przetrwania procesu produkcji sztucznego śniegu, jednak te które go przetrwają mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia osób mających z nim kontakt. Wynika to też ze specyfiki niektórych stacji narciarskich na Podhalu, które odwiedzane są przez rodziny z małymi dziećmi, które wchodzi w bardzo bezpośredni kontakt ze śniegiem. Ponadto wiele niedużych restauracji i barów przy stokach nie posiada łazienek, przez co ich klienci nie mają możliwości umycia rąk. Niebezpieczeństwo związane jest również z tym, że wiele szczepów *E. coli* krążących w badanym środowisku jest wieloopornych i posiada mechanizm ESBL. Geny kodujące ESBL mogą być łatwo przenoszone pomiędzy bakteriami środowiskowymi i

chorobotwórczymi. Co ważne, stwierdzono że lekooporne szczepy już są w niebezpiecznym stopniu rozprzestrzenione w ekosystemach wodnych Podhala.

Podsumowanie

Badania opisane w przedstawionych publikacjach pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Wody rzeki Białki w dużej części są silnie zanieczyszczone, przede wszystkim mikrobiologicznie. Wniosek płynący z przeprowadzonych badań stoi w sprzeczności z panującym dotychczas przekonaniem o wysokiej czystości wód tej rzeki. Przekonanie to wynika z faktu iż większa część doliny Białki jest obszarem podlegającym prawnej ochronie (Tatrzański Park Narodowy, Natura 2000), a także z braku najnowszych badań, prowadzonych w czasie i po okresie intensywnego rozwoju ruchu turystycznego na Podhalu, co miało istotny wpływ na zwiększenie zanieczyszczenia wód. Stwierdzone zanieczyszczenie mikrobiologiczne wód rzeki Białki podlega znacznym wahaniom sezonowym, a także różni się w zależności od lokalizacji.
2. Wahania sezonowe zanieczyszczenia mikrobiologicznego i zmieniające się stężenia biogenów w wodach Białki są skutkiem tego, że w różnych okresach roku dominują odmienne czynniki kształtujące jakość wód. Wymienić wśród nich należy szeroko rozumianą antropopresję oraz czynniki ściśle związane z rytmem rocznym zmian zachodzących w przyrodzie. Spośród czynników antropogenicznych dominująca jest fluktuacja ruchu turystycznego i wynikająca z niej zmienna w czasie efektywność działania gminnej oczyszczalni ścieków, wskutek czego odprowadzane przez nią do strumienia zasilającego rzekę Białkę ścieki są często niedostatecznie oczyszczone. Wśród czynników naturalnych wymienić należy roztopy, przyswajanie składników chemicznych przez rośliny w trakcie okresu wegetacyjnego oraz spływy powierzchniowe niosące ze sobą mikroorganizmy występujące w glebach oraz odchodach owiec wypasanych na łąkach porastających okoliczne stoki.
3. W zlewni Jeziora Czorszyńskiego dominują punktowe źródła zanieczyszczeń wód – przede wszystkim zrzuty ścieków z oczyszczalni i nielegalnie odprowadzane ścieki z gospodarstw domowych. Z kolei zmienność przestrzenna jakości wód na Podhalu jest w głównej mierze efektem różnic w użytkowaniu terenu, co także wpływa na zróżnicowanie głównych czynników kształtujących jakość wód w różnych fragmentach zlewni badanych rzek, a w efekcie wpływa na stężenia wskaźników jakości wód.
4. Wykazano, iż w badaniach środowiskowych uzyskanie wiarygodnych rezultatów uzależnione jest od wielu zmiennych. Przeprowadzenie badań długoterminowych pozwoli na wyeliminowanie przypadkowości obserwacji, a także na dokładniejsze zaplanowanie strategii poboru prób do analiz, zarówno mając na uwadze ich rozmieszczenie przestrzenne jak i wybranie odpowiedniej pory w ciągu doby. Połączenie powyżej wymienionych elementów prawidłowo przeprowadzonych badań z zastosowaniem szczegółowych metod statystycznych

pozwoili na dokładne zrozumienie lokalnych uwarunkowań i procesów zachodzących w zlewniach, w efekcie umożliwiając ich analizę i opracowanie planu postępowania w celu zredukowania zanieczyszczeń i ograniczenia ich wpływu na funkcjonowanie zlewni.

5. Stwierdzone w przedstawionych badaniach liczne lekooporne, a także wielooporne szczepy *E. coli* stanowią zagrożenie dla środowiska naturalnego. Ich znaczne rozprzestrzenienie może także skutkować przeniesieniem genów oporności na zasadzie horyzontalnego transferu genów na inne bakterie środowiskowe oraz chorobotwórcze. Stwarza to poważne zagrożenie również dla zdrowia ludzi – turystów tak chętnie odwiedzających tereny Podhala oraz pracowników obsługi infrastruktury turystycznej stacji narciarskich.

6. Przeprowadzone badania w zlewni Jeziora Czorsztyńskiego pozwoliły na identyfikację głównych źródeł zanieczyszczenia rzek i czynników na nie wpływających. Wykazano m.in. brak wydajności gminnej oczyszczalni ścieków i niedostateczny stopień skanalizowania w gminie Bukowina Tatrzańska. Z kolei identyfikacja głównych problemów i zagrożeń dla jakości wód wykazała konieczność przeprowadzenia modernizacji jednej z oczyszczalni ścieków w badanym rejonie. Zmodernizowana oczyszczalnia została oddana do użytku w czerwcu 2015 roku. Skutkiem tego wiele parametrów badanych wód uległo stopniowej poprawie (dane nadal gromadzone)

7. Wykazano, iż pewna pula szczepów *Escherichia coli* oraz gronkowców jest w stanie przetrwać proces produkcji sztucznego śniegu, w przypadku gdy jest on produkowany z wody bezpośrednio tłocznej rurociągiem z rzek. Wiele spośród szczepów *E. coli* skażających sztuczny śnieg jest opornych na powszechnie stosowane antybiotyki, a niektóre z nich posiadają mechanizm oporności ESBL.

8. Realne niebezpieczeństwo wynikające z przedostawania się zanieczyszczeń mikrobiologicznych do sztucznego śniegu na stokach narciarskich można jednak znacząco ograniczyć poprzez odpowiednie postępowanie z wodą przeznaczoną do śnieżenia. Zgromadzenie wody w zbiornikach pośrednich (umożliwiające efektywną sedymentację zanieczyszczeń) pozwala na produkcję czystego mikrobiologicznie śniegu ze znacznie nawet zanieczyszczonych wód powierzchniowych. System przygotowania wody do śnieżenia zaprojektowany w oparciu o uzyskane wyniki został zastosowany w otwartym w grudniu 2015 r. stoku narciarskim Remiaszów w Białce Tatrzańskiej. Zastosowano tu zbiornik retencyjny o pojemności 50000 m³, służący do magazynowania wody do celów technologicznych. Zgromadzona w nim woda, po przetworzeniu przez instalację złożoną m.in. z ok. 40 armatek wentylatorowych, służy do naśnieżania stoku narciarskiego.

Literatura

- Barakat A., El Baghdadi M., Rais J. i in. 2016. Assessment of spatial and seasonal water quality variation of Oum Er Rbia River (Morocco) using multivariate statistical techniques. *International Soil and Water Conservation Research* 4: 284-292.
- Bartram J., Ballance R. 1996. Water quality monitoring – a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. UNEP/WHO.
- Blaak H., Lynch G., Italiaander R. i in. 2015. Multidrug-resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater. *PLoS ONE* 10:e0127752.
- Bothe H., Jost G., Schlöter M. i in. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 673-690.
- Bradford P.A. 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 933-951.
- Cabral J.P.S. 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (10): 3657-3703.
- Chrobak A. 2014. Geotourism in the Podhale region as an opportunity to reduce the tourist overpopulation in the Polish part of the Tatra Mountains. GEOTOUR & IRSE conference proceedings (Štrba L., red.). Technical University of Košice, Slovakia.
- Drieux L., Brossier F., Sougakoff W., Jarlier V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (suppl. 1):90–103
- Dyrektywa 2006/7/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 15 lutego 2006 r. dotycząca zarządzania jakością wody w kąpieliskach i uchylająca dyrektywę 76/160/EWG.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2016. Clinical breakpoints – bacteria (v. 6.0)
- Gniadkowski M., Żabicka D., Hryniewicz W. 2009. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)
- Hełdak M., Szczepański J. 2011. Wpływ rozwoju turystyki na transformację krajobrazu wsi Białka Tatrzańska. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 1: 151-161.
- Holvoet K., Samplers I., Callens B. i in. 2013. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water and soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (21): 6677-6683.
- Kaper J.B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295 (6-7): 355-356.
- Kozińska-Sroka E., Chęć M. 2009. Właściwości osadów dennych Jeziora Czorszyńskiego w aspekcie ich wykorzystania w budownictwie ziemnym. *Górnictwo i Geoinżynieria* 33 (1): 369-376.
- Krąż P. 2012. Antropogeniczne zagrożenia środowiska przyrodniczego Doliny Białki. *Prace Geograficzne*, 128: 45-54.

- Leecaster M.K., Weisberg S.B. 2001. Effect of sampling frequency on shoreline microbiology assessments. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 1150-1154.
- Meays C.L., Broersma K., Nordin R. i in.. 2006. Diurnal variability in concentrations and sources of *Escherichia coli* in three streams. *Canadian Journal of Microbiology*, 52: 1130-1135.
- 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: 2235-2246.
- Parker L.V., Yushak M.L., Martel J., Reynolds C.M., 2000. Bacterial Survival in Snow Made from Wastewater. Technical Report ERDC/CRREL TR-00-9. US Army Corps of Engineers, Cold Regions Research & Engineering Laboratory.
- Phung D., Huang C., Rutherford S. i in. 2015. Temporal and spatial assessment of river surface water quality using multivariate statistical techniques: a study in Can Tho City, a Mekong Delta area, Vietnam. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 229.
- Servais P., Garcia-Armisen T., George I., Billen G. 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment* 375: 152-167.
- Sinton L.W., Finlay R.K., Hannah D.J. 1998. Distinguishing human from faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research* 32: 323-348.
- St. Laurent J., Mazumder A. 2012. The influence of land-use composition on fecal contamination of riverine source water in southern British Columbia. *Water Resources Research* 48: doi:10.1029/2012WR012455.
- Tong S.T.Y., Chen W. 2002. Modeling the relationship between land use and surface water quality. *Journal of Environmental Management* 66: 377-393.
- Ustupski J. 2007. Przemiany w turystyce na Podhalu w warunkach gospodarki wolnorynkowej. *Studia nad turystyką. Prace ekonomiczne i społeczne* (Kurek W., Pawlusiński R., red). Wyd. Instytut Geografii i Gospodarki Przestrzennej UJ: 243-251.
- van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics—links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:327–335
- Whitman R.L., Nevers M.B. 2004. *Escherichia coli* sampling reliability at a frequently closed Chicago beach: monitoring and management implications. *Environmental Science and Technology*, 38, 4241-4246
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial Resistance: an emerging water, sanitation and hygiene issue. WHO Press, Geneva Switzerland.
- Zabłotni A., Jaworski A. 2014. Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 68: 1040-1049.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. przed uzyskaniem stopnia doktora (2006-2010)

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora, główna część mojej działalności naukowej związana była z problematyką występowania i znaczenia bakterii z rodzaju *Azotobacter* w różnych typach gleb południowej Polski. Skupiałam się wówczas na możliwie najdokładniejszym poznaniu właściwości tych mikroorganizmów. Efektem mojej pracy badawczej w tym zakresie był udział w konferencjach naukowych, gdzie zaprezentowałam poster będący efektem pracy przeglądowej, dotyczącej znaczenia tych bakterii w środowisku glebowym (III.B.1), a także postery, na których przedstawiłam wyniki moich badań związanych z *Azotobacter*. Dotyczyły one produkcji biologicznie istotnych związków przez te bakterie (III.B.2 i III.B.3), ich reakcji na działanie różnych substancji chemicznych, a przede wszystkim pestycydów i metali ciężkich (III.B.4 i III.B.5). W tym czasie napisałam dwie publikacje naukowe (II.D.2 i II.D.3), w których przedstawiłam wyniki badań nad oddziaływaniem różnych substancji chemicznych (wybielacz, płyn do mycia naczyń, pestycydy i nawozy oraz metale ciężkie) na wzrost *Azotobacter* spp.. Z kolei w referacie (II.K.1), wygłoszonym podczas Warsztatów Biotechnologicznych, organizowanych w 2008 r. przez Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, scharakteryzowałam występowanie bakterii z rodzaju *Azotobacter* w glebach południowej Polski. W trakcie studiów doktoranckich wzięłam udział w szkoleniach i kursach z zakresu biologii molekularnej (III.Q.1A-C), które odbyły się w Poznaniu (XIX Szkoła Letnia – Postępy Biologii Molekularnej) oraz na Politechnice Gdańskiej (Techniki PCR, Genotypowanie, Genotypowanie II). Wiedzę i umiejętności zdobyte w trakcie tych kursów wykorzystałam m.in. do przeprowadzenia badań molekularnych nad zróżnicowaniem genetycznym (bioróżnorodnością) bakterii *Azotobacter*, pochodzących z różnych gleb na terenie Polski południowej. Badania te umożliwiły zdobycie finansowania w postaci projektu Innogrant (II.I.1), w którym byłam kierownikiem oraz grantu promotorskiego, w którym byłam wykonawcą (II.I.2. - Nr N N310 081836 „Bioróżnorodność i wybrane właściwości fizjologiczne bakterii z rodzaju *Azotobacter* wyizolowanych z różnych gleb”). Wyniki uzyskane w toku badań nad występowaniem, zróżnicowaniem molekularnym, reakcjami tych bakterii na różnego rodzaju substancje ksenobiotyczne oraz korzystnym oddziaływaniem *Azotobacter* na rośliny uprawne opublikowałam już po obronie pracy doktorskiej – w czasopiśmie z listy A (II.A.1, II.A.2) i B (II.D.4), a ich część dotyczącą wpływu inokulacji na wzrost roślin uprawnych zaprezentowałam na Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej organizowanej przez UWM w Olsztynie (III.B.9.C).

W okresie studiów doktoranckich wzięłam także udział w eksperymentach, mających na celu ocenę stężenia składników aerozolu mikrobiologicznego w powietrzu wybranych pomieszczeń Uniwersytetu Rolniczego. Efekty tych badań zostały przedstawione w postaci posterów na konferencjach: Ogólnopolskiej Młodzieżowej Konferencji Naukowej w Iwoniczu

(III.B.6.) oraz na Warsztatach Biotechnologicznych, organizowanych w 2010 r. przez Uniwersytet Rolniczy w Krakowie (III.B.7).

5.2. po uzyskaniu stopnia doktora (2010-2017)

Znaczna część mojej aktywności naukowej w okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora skupiona była wokół badań nad jakością wód i rozprzestrzenieniem lekoopornych szczepów bakterii na terenie Podhala, czego efektem było powstanie wyżej opisanego osiągnięcia naukowego. Oprócz przedstawionych do oceny publikacji, moje działania w tym zakresie obejmowały uczestnictwo jako członek główny Komitetu Zarządzającego (Management Committee) akcji COST ES1307 Sewage biomarker analysis for community health assessment (II.I.5) oraz udział w grupie roboczej „Working Group Two – Innovative techniques for community health assessment” tej samej akcji (II.I.6). W ramach udziału w tej akcji uczestniczyłam w szkoleniach i spotkaniach grup roboczych oraz Management Committee (III.A.7; III.A.9; III.A.15). Jako członek Management Committee i grupy roboczej zorganizowałam spotkanie grupy roboczej Working Group 2, które odbyło się w dniach 10-12 lutego 2016 na Wydziale Rolniczo-Ekonomicznym Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie (III.C.2). Wygłosiłam na nim również referat, gdzie przedstawiłam część wyników badań prowadzonych nad mikrobiologicznym zanieczyszczeniem rzek na Podhalu – „Bacterial indicators of fecal contamination of surface water – southern Poland” (II.K.6). Z kolei wyniki badań nad występowaniem lekoopornych szczepów bakterii w ściekach i ich dalszymi losami w zlewni rzeki Białki przedstawiłam podczas spotkania akcji COST ES1307 na Malcie (II.K.4). Część uzyskanych przeze mnie wyników badań nad przeżywalnością procesu sztucznego naśnieżania przez *E. coli* i ich lekoopornością w wybranych ośrodkach narciarskich przedstawiłam na posterze podczas 50 Jubileuszowej Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Mikroorganizmy w Ochronie Środowiska i Biotechnologii”, organizowanej w 2016 r. przez Katedrę Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (III.B.21.B). Badania dotyczące lekooporności i genów ESBL u *E. coli* izolowanych z rzek Podhala przedstawiłam w formie posteru na konferencji Biomillennium, organizowanej we wrześniu 2017 przez Politechnikę Gdańską (III.B.23.A)

Należy wspomnieć, że opisywane badania powstały we współpracy naukowej z dr hab. Mirosławem Żelaznym, kierownikiem Zakładu Hydrologii, Instytutu Geografii i Gospodarki Przestrzennej Uniwersytetu Jagiellońskiego i pozostałymi pracownikami Zakładu Hydrologii (III.Q.2). Przeprowadzenie części badań było ponadto możliwe dzięki uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej w ramach projektu „Ocena czasowo-przestrzennej zmienności liczebności drobnoustrojów w wodach zlewni Białki w rejonie ośrodka narciarskiego Kotelnica Białczańska” (III.Q.10.C). Także uzyskanie dokładnych informacji na temat położenia ujęcia wód do sztucznego naśnieżania stoków oraz zbadanie zanieczyszczenia mikrobiologicznego sztucznego śniegu było możliwe dzięki współpracy z Ośrodkiem Narciarskim Kotelnica Białczańska (III.Q.5). W ramach tej współpracy uzyskałam wyniki dotyczące jakości wód w

okolicy stacji narciarskiej, a także zanieczyszczenia mikrobiologicznego sztucznego śniegu. Zwróciły one uwagę kierownictwa Ośrodka oraz pozwoliły na wspólne opracowanie rozwiązania problemu (**I.B.7**).

W okresie 2010-2017 moje pozostałe zainteresowania naukowe, a przez to tematyka badań, w głównej mierze skupiały się wokół kilku zagadnień:

- a) Występowanie, reakcja na ksenobiotyki i różnorodność molekularna bakterii należących do rodzaju *Azotobacter* izolowanych z gleb południowej Polski;
- b) Efekt antropopresji (np. przemysł metalurgiczny, składowiska odpadów komunalnych, odprowadzanie ścieków do środowiska) na mikroorganizmy występujące w glebach i wodach powierzchniowych;
- c) Lekooporność bakterii pochodzących z różnych środowisk.

Po obronie pracy doktorskiej kontynuowałam badania nad zagadnieniami związanymi z szeroko pojętą ekologią bakterii *Azotobacter* spp. (**ad a**). Zainspirowana ciekawymi wynikami uzyskanymi w pracy doktorskiej, podjęłam się izolacji tych mikroorganizmów z gleb zanieczyszczonych – z terenu krakowskiej huty stali oraz z gleb uprawnych (pola bezpośrednio przyległe do huty) i ich charakterystyki w oparciu o markery molekularne. Wyniki tych badań przedstawiłam w ramach posteru na międzynarodowej konferencji organizowanej przez AGH (**III.B.13**) oraz opisałam w publikacji **II.A.8** (lista A), natomiast wyniki badań wstępnych, polegających na oznaczeniu częstotliwości występowania, izolacji i identyfikacji gatunkowej *Azotobacter* spp. przedstawiłam w formie posteru na Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej, organizowanej przez UWM w Olsztynie (**II.B.9.B**) i opisałam w publikacji **II.D.5** (lista B). Badania te zostały częściowo sfinansowane z funduszy na działalność statutową Katedry Mikrobiologii UR w Krakowie, a częściowo dzięki uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.10.A**).

Prowadząc badania nad występowaniem i charakterystyką bakterii z rodzaju *Azotobacter* pochodzących z gleb na terenach krakowskiej huty stali ArcelorMittal, zainteresowałam się tematyką pokrewną, lecz szerzej ujętą, mianowicie wpływem zanieczyszczeń środowiska pochodzenia antropogenicznego (początkowo był to przemysł metalurgiczny, lecz później również składowiska odpadów komunalnych oraz odprowadzanie ścieków do wód) na występowanie i właściwości różnych grup mikroorganizmów środowiskowych (**ad. b**). Najczęściej skupiałam się na ocenie ich potencjalnej niewrażliwości na działanie szkodliwych czynników w badanych przeze mnie środowiskach – przede wszystkim podwyższonym stężeniu metali ciężkich. Badania nad występowaniem drobnoustrojów w glebach skażonych metalami ciężkimi na terenie huty w głównej mierze były efektem współpracy naukowej nawiązanej z zakładem ArcelorMittal Poland, dzięki otwartości na moje pomysły Pani Jolanty Zawitkowskiej, która jest Eko-Ambasadorem zakładu (**III.Q.3**). Badania w

ramach tej współpracy zostały w części sfinansowane dzięki uzyskanej przeze mnie Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.10.B**), a wyniki których opublikowałam w kilku opracowaniach. Badania wstępne przeprowadzono w kilku punktach na terenie i w najbliższym sąsiedztwie huty (hałdy żużla i walcownia oraz pola pszenicy bezpośrednio przylegające do granic zakładu), gdzie oznaczono liczebność różnych drobnoustrojów glebowych, m.in. ogólną liczbę bakterii, *Azotobacter* spp., promieniowców, grzybów. Uzyskane wyniki (przedstawione na konferencji organizowanej przez UTP w Bydgoszczy – **III.B.12.A** i na konferencji organizowanej przez IUNG w Puławach – **III.B.14.F** oraz opublikowane w 2015 r. w czasopiśmie *Ekologia i Technika* – **II.D.19**) wskazywały na to, iż zanieczyszczenie gleb spowodowane działalnością huty ma mniejszy wpływ na obniżenie bioróżnorodności populacji drobnoustrojów glebowych, niż się tego początkowo spodziewano. Rezultaty te były na tyle obiecujące, że badania poszerzono o kolejne punkty na terenie i w okolicach huty. Zbliżone rezultaty uzyskano w badaniach przeprowadzonych w 20 punktach na terenie zakładu w Krakowie, gdzie oznaczono zawartość metali ciężkich (Fe, Zn, Cd, Pb, Cu, Cr, Mn) oraz liczebność bakterii mezofilnych, grzybów, promieniowców oraz *Azotobacter* spp (**II.A.4**). W niektórych punktach stwierdzono znaczne przekroczenie stężeń metali ciężkich zalecanych dla gleb terenów przemysłowych, jednak wykazano iż w większości gleb liczebność badanych drobnoustrojów uległa jedynie nieznacznemu zmniejszeniu. Badania o tym samym zakresie, których wyniki wskazywały na podobne zależności, przeprowadzono również na terenie oddziału huty w Dąbrowie Górniczej (**II.A.13**). Wyniki uzyskane w tych badaniach udostępniono kierownictwu odpowiednich działów zakładu w postaci ekspertyzy (**III.M.1**). Obserwacje wskazujące na to, że drobnoustroje żyjące w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi mogą charakteryzować się niewrażliwością na podwyższone ich stężenia stały się przyczynkiem do podjęcia badań nad występowaniem i opornością na metale ciężkie promieniowców z rodzaju *Streptomyces*, izolowanych z gleb. Ich wyniki przedstawiono w postaci posteru na konferencji organizowanej w 2013 r. przez Politechnikę Częstochowską (**III.B.15.B**) oraz w publikacjach **II.D.9** i **II.D.11**. Dzięki powyższym badaniom zgromadziłam doświadczenia i wiedzę, którą podzieliłam się ze słuchaczami Technicznego Uniwersytetu Otwartego AGH, prezentując wykład „Wpływ przemysłowych skażeń gleb na mikroorganizmy” (**III.I.5**), a także opracowując przeglądowy rozdział w anglojęzycznej monografii „Environmental Risk Assessment of Soil Contamination” (**II.D.16**).

Kolejnym elementem mojej pracy naukowej, wpisującym się w tematykę oddziaływania antropopresji na drobnoustroje (**ad. b**) był współudział w eksperymentach prowadzonych na składowisku odpadów komunalnych. Wyniki tych analiz zostały zaprezentowane w postaci posterów na konferencjach (**III.B.12.B**; **III.B.15.A**; **III.B.18**), gdzie przedstawiono różne aspekty zanieczyszczenia środowiska naturalnego (wody i gleby) w efekcie oddziaływania składowiska odpadów komunalnych Barycz w Krakowie. Z kolei wyniki badań nad oddziaływaniem składowiska odpadów na jakość gleb (stężenie metali ciężkich, WWA, liczebność drobnoustrojów: bakterii mezofilnych, pleśni, promieniowców, *Salmonella*, *Staphylococcus*,

Clostridium perfringens) przedstawiono w publikacji **II.A.5**. Uzyskane wyniki wskazywały na niewielkie skażenie gleb na terenie i w otoczeniu składowiska oraz na stosunkowo wysoką liczebność drobnoustrojów glebowych. Z kolei badania nad zanieczyszczeniem ziaren pszenicy na uprawach zlokalizowanych w otoczeniu składowiska (**II.D.20**) wskazały na możliwość skażenia metalami ciężkimi oraz na zależność stopnia skażenia od odległości upraw od granic składowiska. W publikacji **II.D.22** przedstawiono wyniki oznaczenia oporności *Escherichia coli*, izolowanych z wód na terenie składowiska, na różne stężenia metali ciężkich, potencjalnie mogących zanieczyszczać wody i gleby na terenie składowiska. W porównaniu z reakcjami szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922, nie stwierdzono podwyższonej oporności badanych izolatów środowiskowych na metale ciężkie w podłożu. Najsilniejsze zahamowanie wzrostu stwierdzono w przypadku oddziaływania chromu i rtęci, choć pozostałe z badanych metali (Cd, Cu, Pb, Zn) także powodowały spowolnienie namnażania badanych izolatów.

Pozostałe badania, nawiązujące do tematyki wpływu czynników antropogenicznych na zmiany w jakości środowiska naturalnego i drobnoustroje środowiskowe (**ad. b**), obejmowały analizę zróżnicowania genetycznego i morfologicznego porostów *Cladonia rei* kolonizujących hałdy żużla na terenie Górnego Śląska (**II.A.6** i **II.A.19**), badanie zawartości metali ciężkich w wodach i osadach małych zbiorników wodnych (**II.A.7**) oraz ocenę zanieczyszczenia mikrobiologicznego wybranych dopływów rzeki Wisły, jako czynnika mogącego zagrozić jej jakości (**II.A.10**).

Istotną część mojej pracy stanowią eksperymenty dotyczące występowania i rozprzestrzenienia lekoopornych drobnoustrojów w środowisku – wodzie i powietrzu (**ad. c**). Uzyskanie w 2015 r. Wydziałowej Dotacji Celowej dla Młodych Naukowców (**III.Q.10.D**) umożliwiło mi przeprowadzenie badań nad lekoopornością i wykrywaniem molekularnych mechanizmów oporności na antybiotyki z grupy fluorochinolonów (najczęściej stosowanych antybiotyków weterynaryjnych) u *Escherichia coli* izolowanych z odchodów kur. Wyniki przedstawiono w postaci publikacji w *Veterinarni Medicina* (2016 r. – **II.A.15**), a także ich część została przedstawiona przez Współautorkę badań – mgr inż. Katarzynę Augustyniak na sesji referatowej Warsztatów Biotechnologicznych organizowanych w czerwcu 2014 r. w Spytkowicach przez Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie (**III.J.2**). Prezentacja ta zajęła III miejsce w Sesji Referatowej. W badaniach oznaczano liczebność *E. coli* w odchodach kur hodowanych w 5 fermach – czterech w systemie konwencjonalnym i jednej „ekologicznej” – w wolnym wybiegu. Nieoficjalnie uzyskano informacje, iż w fermach konwencjonalnych zwierzętom podawano antybiotyki w celach profilaktycznych oraz jako stymulatory wzrostu. Lekooporność oznaczono dla 98 izolatów *E. coli* metodą dyfuzji krążkowej, oznaczając antybiogram podstawowy dla *Enterobacteriaceae* oraz oporność na dwa fluorochinolony – enrofloksacynę i ciprofloksacynę. Zgodnie z oczekiwaniami, najmniejszą częstotliwość lekoopornych szczepów stwierdzono w fermie „ekologicznej”, lecz także w jednej z

konwencjonalnych. Najczęściej obserwowano oporność na antybiotyki z grupy β -laktamów, cefalosporyn i fluorochinolonów. Przeprowadzono także analizy molekularne w celu wykrycia najczęściej występujących mechanizmów warunkujących oporność na fluorochinolony. Przeprowadzono sekwencjonowanie regionów QRDR – *gyrA* i *parC* (genów, w których mutacje punktowe warunkują oporność na chinolony) i reakcje PCR w celu wykrycia horyzontalnie przenoszonych genów oporności na chinolony: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* i *qepA*. W badaniach bardzo często stwierdzano obecność genów *qnrB* i *qnrS*, także u izolatów, które fenotypowo były wrażliwe na antybiotyki z grupy chinolonów. Często wykrywaną mutacją punktową w rejonach QRDR była substytucja Ser-83 w *gyrA*, która powoduje zmiany konformacji w enzymie gyraza, tym samym uniemożliwiając przyłączenie się chinolonów. U niektórych izolatów wykrywano obecność kilku różnych mechanizmów oporności, tj. zarówno obecność horyzontalnie przenoszonych genów jak i mutacje punktowe w rejonach QRDR.

W zakresie badań nad lekoopornością bakterii w różnych środowiskach (**ad. c**) uczestniczyłam także w eksperymentach nad występowaniem lekoopornych szczepów gronkowców w powietrzu domów studenckich (wyniki przedstawiono w postaci posterów na konferencjach w 2011 r. w Warszawie (**III.B.11**) i w 2013 r. w Puławach (**III.B.14.G**), oraz w publikacji, która ukazała się w Polish Journal of Agronomy w 2014 r. – **II.D.13**). Jestem ponadto współautorką badań nad fenotypowym i molekularnym obrazem metycylinyoporności gronkowców izolowanych z powietrza różnych pomieszczeń użyteczności publicznej w Krakowie (**II.A.9**), lekooporności gronkowców izolowanych z krakowskich mieszkań (**II.A.18**), a także oznaczeń lekooporności i molekularnych mechanizmów odpowiadających za oporność na antybiotyki z grupy makrolidów, linkozamidów i streptogramin u koagulazo-ujemnych gronkowców izolowanych z powietrza ośrodków zdrowia i szpitali na terenie południowej Polski (**II.A.16**). Współuczestniczyłam w badaniu lekooporności *Escherichia coli* izolowanych z wód Zalewu Nowohuckiego (**II.A.17**) i wybranych rzek w południowej Polsce (postery na konferencjach – **III.B.14C**; **III.B.16**). Jestem również współautorką i autorem korespondencyjnym w publikacji przedstawiającej wyniki badań nad lekoopornością i molekularnym oznaczeniem polisacharydów otoczkowych u szczepów *Streptococcus agalactiae* (GBS) izolowanych od kobiet w wieku reprodukcyjnym (**II.D.21**). Badania opisane w publikacjach **II.A.9**, **II.A.16**, **II.D.13** i **II.D.21** wykonano we współpracy z dr Andrzejem Kasproviczem i dr Anną Białecką z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek w Krakowie.

Część mojego dorobku naukowego dotyczy także zagadnień bardzo różnorodnych, przede wszystkim związanych z szeroko pojętą mikrobiologią środowiskową i jej znaczeniem w higienie codziennego życia człowieka (publikacje **II.D.7**; **II.D.10**; **II.D.15**; **II.D.18** i poster na Warsztatach Biotechnologicznych **III.B.8**), mikrobiologiczną jakością powietrza (publikacje **II.D.8**; **II.D.12**; **II.D.17**; **II.D.23**; **II.D.24** i postery na konferencjach **III.B.14.E**; **III.B.21.A**; **III.B.21.C**; **III.B.23.B** i **III.B.24**) oraz występowaniem, znaczeniem i bioróżnorodnością patogenów

grzybowych roślin uprawnych. W ramach tego ostatniego zagadnienia w kilkuletnim eksperymencie przeprowadzałam badania nad porażeniem ziarniaków kukurydzy przez grzyby pleśniowe, w szczególności *Fusarium*. Wykonywałam oznaczenia przynależności systematycznej izolowanych grzybów – metodami klasycznymi i molekularnymi (PCR i sekwencjonowanie rejonu Elongation Factor) oraz oznaczenia potencjału toksynotwórczego tych grzybów. W efekcie tych prac powstały publikacje – z listy A (II.A.3) i B (II.D.6; II.D.14) oraz doniesienia konferencyjne – na konferencjach ogólnopolskich (III.B.9.A; III.B.14.A; III.B.14.B) i międzynarodowym kongresie biotechnologicznym EUROBIOTECH (III.B.10). Uczestniczyłam również w badaniach nad porażeniem kłosów pszenicy przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, ich identyfikacją gatunkową i toksynotwórczością. Wyniki badań opisano w publikacji, której jestem współautorką (II.A.12) oraz przedstawiono w formie posteru na konferencji organizowanej przez IUNG w Puławach (III.B.14.D). W zakres ten wpisuje się również przeprowadzona przeze mnie ekspertyza dla firmy Ekoplon S.A. na temat skuteczności działania produkowanego przez nich preparatu na wybrane grzyby porażające rośliny uprawne (m.in. *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride*) – III.M.6.

Uczestniczyłam również w pracach badawczych nad rozprzestrzenieniem, udziałem typów koniugacyjnych i molekularnym zróżnicowaniem grzyba *Dothistroma* – jednego z groźniejszych patogenów sosen, jako członek zastępczy w Komitecie Zarządzającym (Management Committee) oraz członek grupy roboczej (Working Group One) akcji COST nr FP1102: Determining Invasiveness And Risk Of Dothistroma (DIAROD) – II.I.3-4. Dzięki udziałowi w tej akcji COST uczestniczyłam w zebraniach Management Committee i spotkaniach roboczych (III.A.2-4; III.A.6, III.A.8; III.A.11). Wzięłam także udział w szkoleniach z zakresu izolacji, identyfikacji i technik stosowanych w różnicowaniu molekularnym grzybów *Dothistroma* (III.A.1; III.A.13), przy czym w jednym z nich uczestniczyłam jako trener technik izolacji DNA, PCR i interpretacji wyników elektroforezy w celu identyfikacji typów koniugacyjnych *Dothistroma* (III.A.5).

Swoje umiejętności w zakresie badań molekularnych nad zmiennością genetyczną grzybów z rodzaju *Dothistroma* przy użyciu markerków mikrosatelitarnych poszerzyłam w ramach udziału w trzech stażach naukowych, które odbyłam w Forest Research, Alice Holt Research Station - Centre for Ecosystems, Society and Biosecurity, w Farnham (Wielka Brytania):

- ❖ 7.10. – 1.11.2013: miesięczny pobyt naukowy Short Term Scientific Mission (COST) “Microsatellite markers practice” (III.L.1),
- ❖ 21.07-16.08.2014: miesięczny pobyt naukowy Short Term Scientific Mission (COST) “Microsatellite analysis of *Dothistroma*” (III.L.2),
- ❖ 6.07-4.09.2015: dwumiesięczny staż naukowy w ramach Stypendium z Własnego Funduszu Stypendialnego dla Pracowników Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie

Załącznik 2. Autoreferat

„Ocena zmienności genetycznej izolatów grzyba z gatunku *Dothistroma septosporum*, w skali Europy” (III.L.3).

Wyniki badań przeprowadzonych dzięki udziałowi w akcji przedstawiłam jako jedyny autor, bądź współautor: na spotkaniu grupy roboczej i Management Committee w Estoril, Portugalii (III.A.8) oraz na spotkaniu podsumowującym działania akcji, które odbyło się na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, i którego także byłam współorganizatorem (III.A.14; III.C.1). Efektem prac wykonanych w ramach akcji były także badania, opisane w publikacji II.A.14.

W ramach mojej pracy naukowej brałam również udział w badaniach nad wpływem stosowania mikrokapsułowanych olejków eterycznych na mikroorganizmy glebowe (prezentacje na międzynarodowych konferencjach naukowych – III.B.17; III.B.19-20, III.B.22), zastosowaniem różnych szczepionek bakteryjnych w uprawie roślin (prezentacja na międzynarodowej konferencji naukowej - II.K.2), czy zróżnicowaniem molekularnym czosnku niedźwiedziego (współautor w publikacji II.A.11).

Podsumowanie dorobku naukowego

Zestawienie publikacji

- A) Liczba publikacji naukowych (w tym publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie JCR): 49
- B) Sumaryczny impact factor, zgodnie z rokiem opublikowania: 32,804
- C) Rozdziały w monografiach: 2
- D) Liczba cytowań (bez autocytowań) wg bazy Web of Science: 33
- E) Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: 4
- F) Liczba cytowań wg bazy Google Scholar: 120
- G) h-indeks wg bazy Google Scholar: 6
- H) Liczba punktów MNiSW: 702

Anna Lenas-Bacini