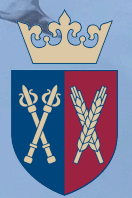


WPŁYW PRODUKCJI ŚNIEGU TECHNICZNEGO NA RÓŻNORODNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ – PORÓWNAWCZA ANALIZA METATAKSONOMICZNA ŚRODOWISK WODNYCH I ŚNIEGU

KLAUDIA STANKIEWICZ¹, ANNA LENART-BOROŃ¹

klaudia.kulik@student.urk.edu.pl

¹KATEDRA MIKROBIOLOGII I BIOMONITORINGU, UNIWERSYTET ROLNICZY IM. H. KOŁŁATAJA W KRAKOWIE



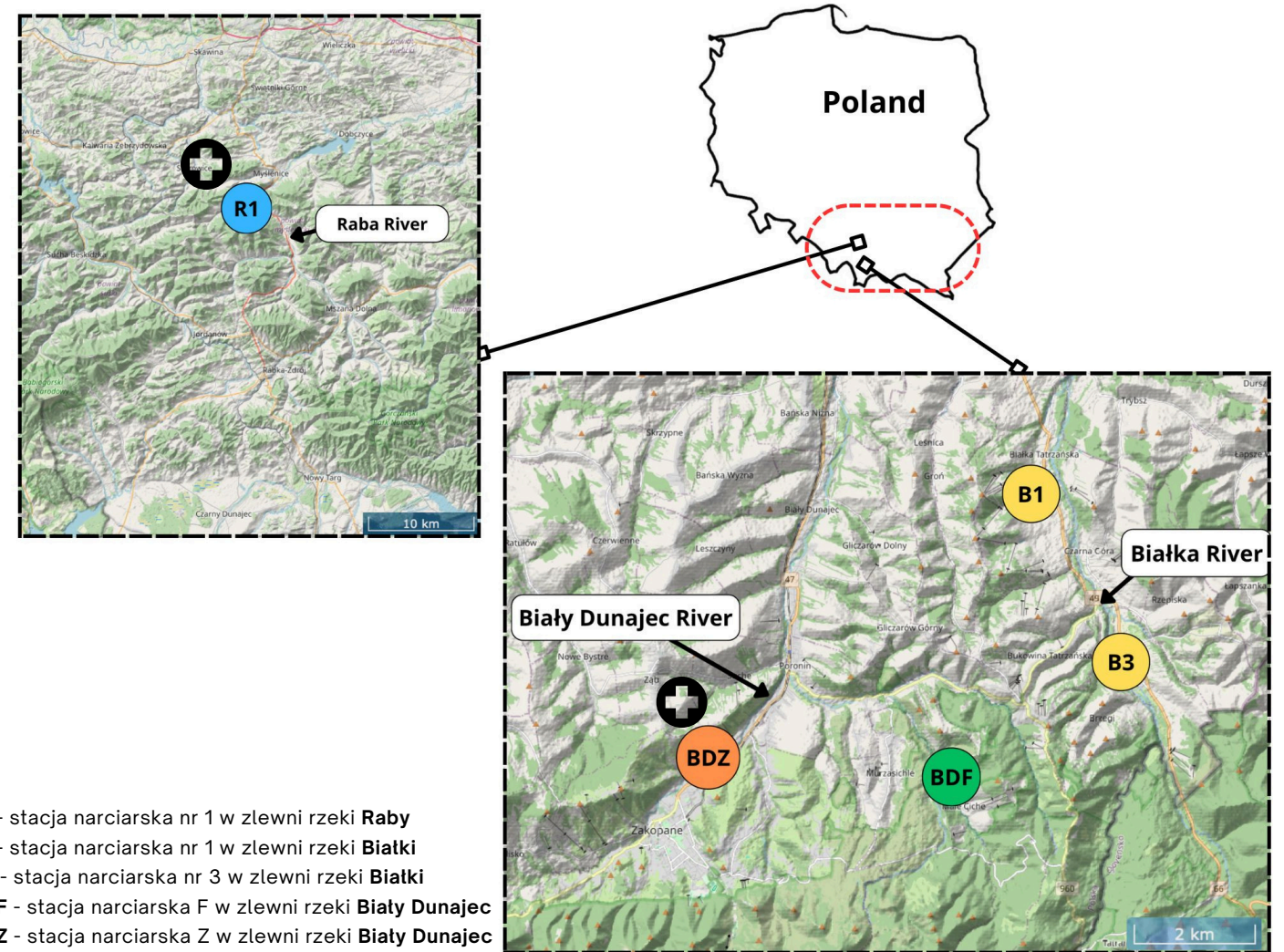
WSTĘP

Sztuczne naśnieżanie jest niezbędne dla ośrodków narciarskich zmagających się z niedoborem śniegu, ale budzi obawy dotyczące środowiska i zdrowia. W obszarach o dużym natężeniu ruchu turystycznego oczyszczalnie ścieków często nie usuwają w pełni antybiotyków, co prowadzi do ich obecności w rzekach. Te subinhibitorowe stężenia antybiotyków mogą przyczyniać się do rozwoju lekooporności oraz modyfikować skład społeczności bakteryjnych.

METODYKA

Przeanalizowano zmiany różnorodności i składu populacji bakterii w procesie produkcji śniegu technicznego z uwzględnieniem wpływu antybiotyków obecnych w wodach. Przeprowadzono analizę metataksonomiczną opartą o sekwencjonowanie NGS regionu V3-V4 16S rRNA próbek wody rzecznej, wody ze zbiorników technologicznych oraz śniegu technicznego z pięciu górskich ośrodków narciarskich. Oceniono występowanie i stężenia 21 antybiotyków z wykorzystaniem techniki UHPLC-MS/MS poprzedzonej ekstrakcją antybiotyków do fazy stałej (SPE). Wyznaczono stężenia antybiotyków [ng/L] powyżej granicy oznaczalności LOQ.

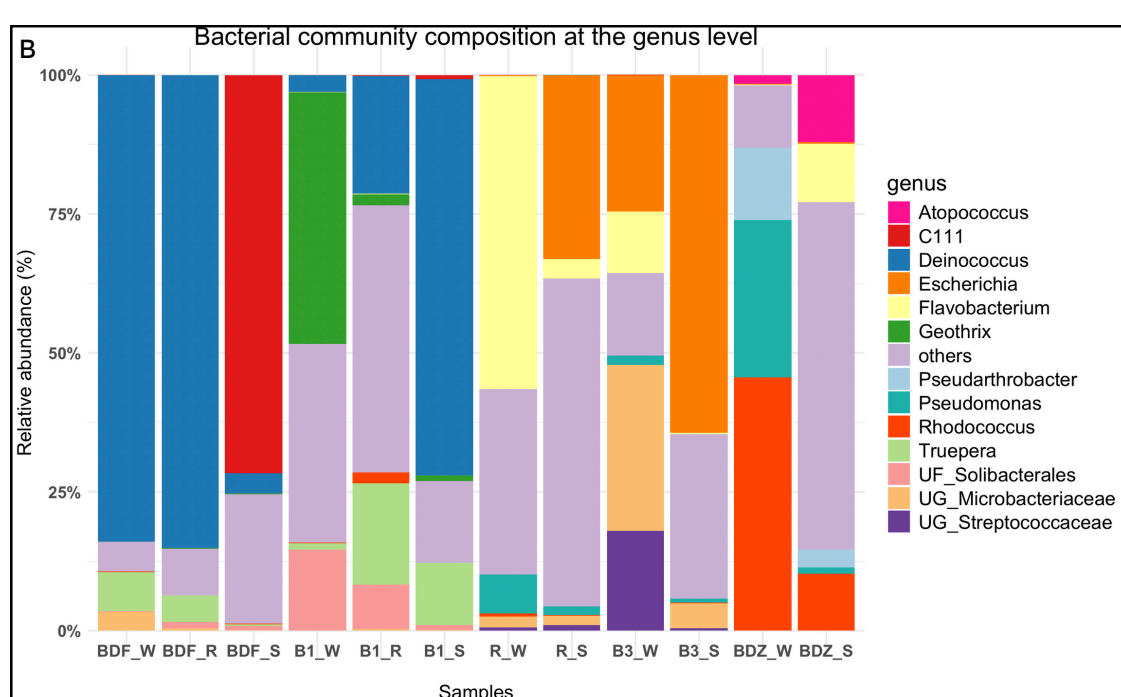
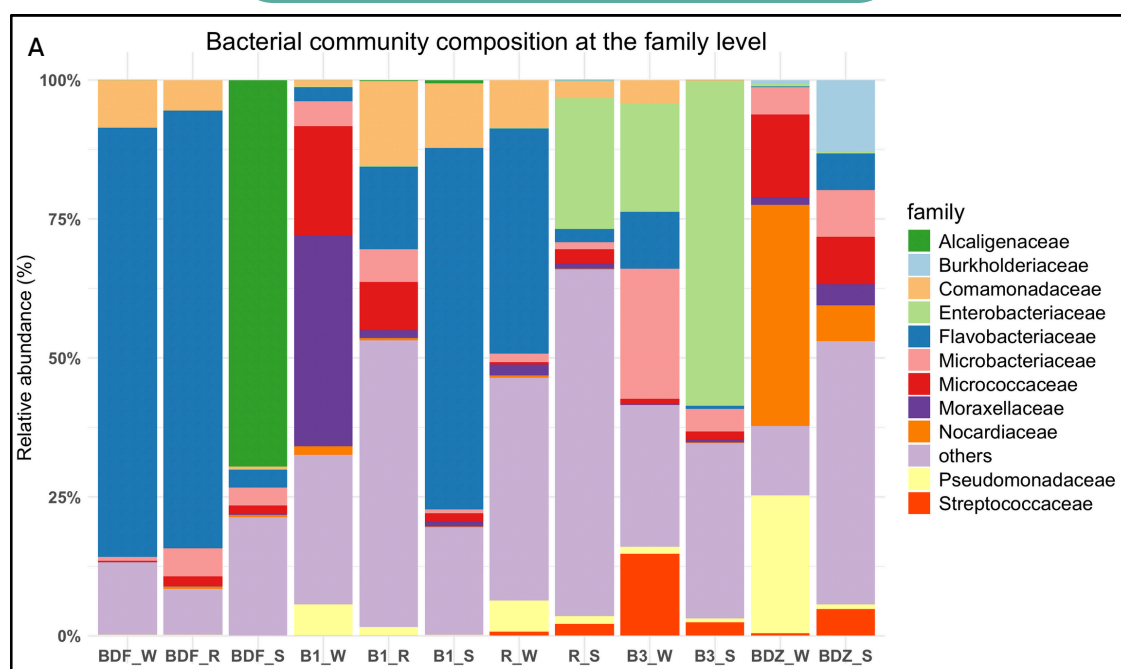
MIEJSCA POBORU PRÓBEK



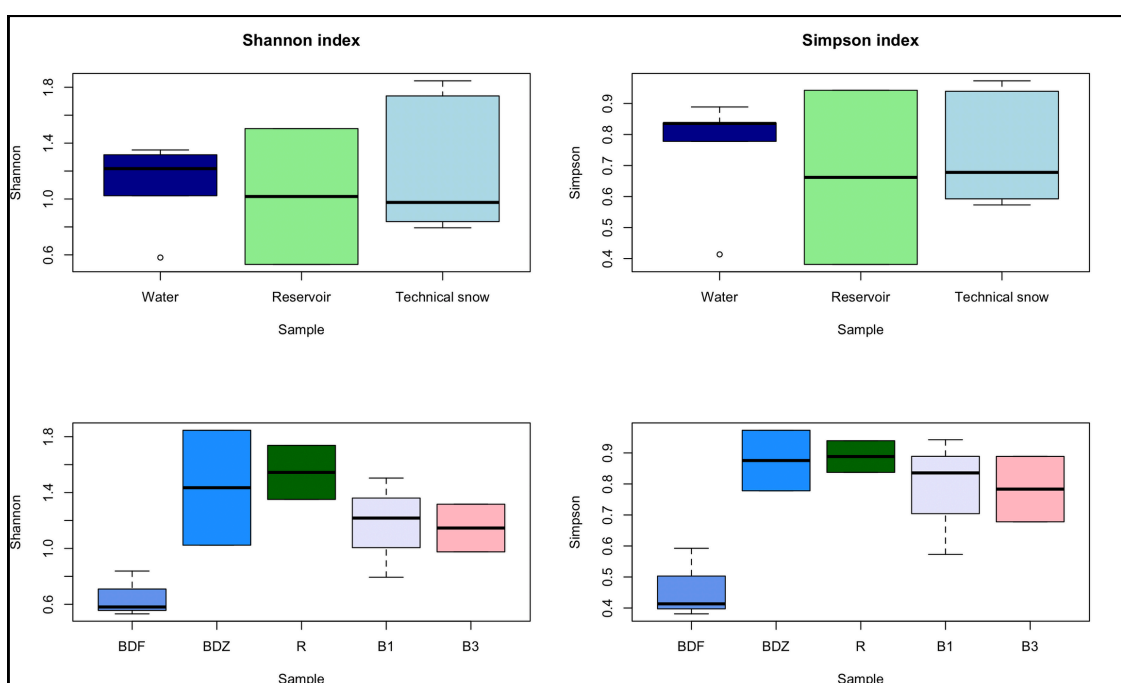
R1 - stacja narciarska nr 1 w zlewni rzeki Raby
 B1 - stacja narciarska nr 1 w zlewni rzeki Białki
 B3 - stacja narciarska nr 3 w zlewni rzeki Białki
 BDF - stacja narciarska F w zlewni rzeki Biały Dunajec
 BDZ - stacja narciarska Z w zlewni rzeki Biały Dunajec

Ryc. 1. lokalizacja miejsc poboru próbek. Każde miejsce jest kodowane skrótem nazwy rzeki (B – Białka; BD – Biały Dunajec; R – Raba; W – Wisła) i numerem/literą. Dodatkowo ikoną krzyża zaznaczono położenie szpitali w pobliżu stacji narciarskich.

WYNIKI



Ryc. 2. Skład społeczności bakteryjnych w próbkach wody rzecznej, wody zbiornikowej i wody z topniejącego śniegu (A) na poziomie rodziny i (B) na poziomie rodzaju.



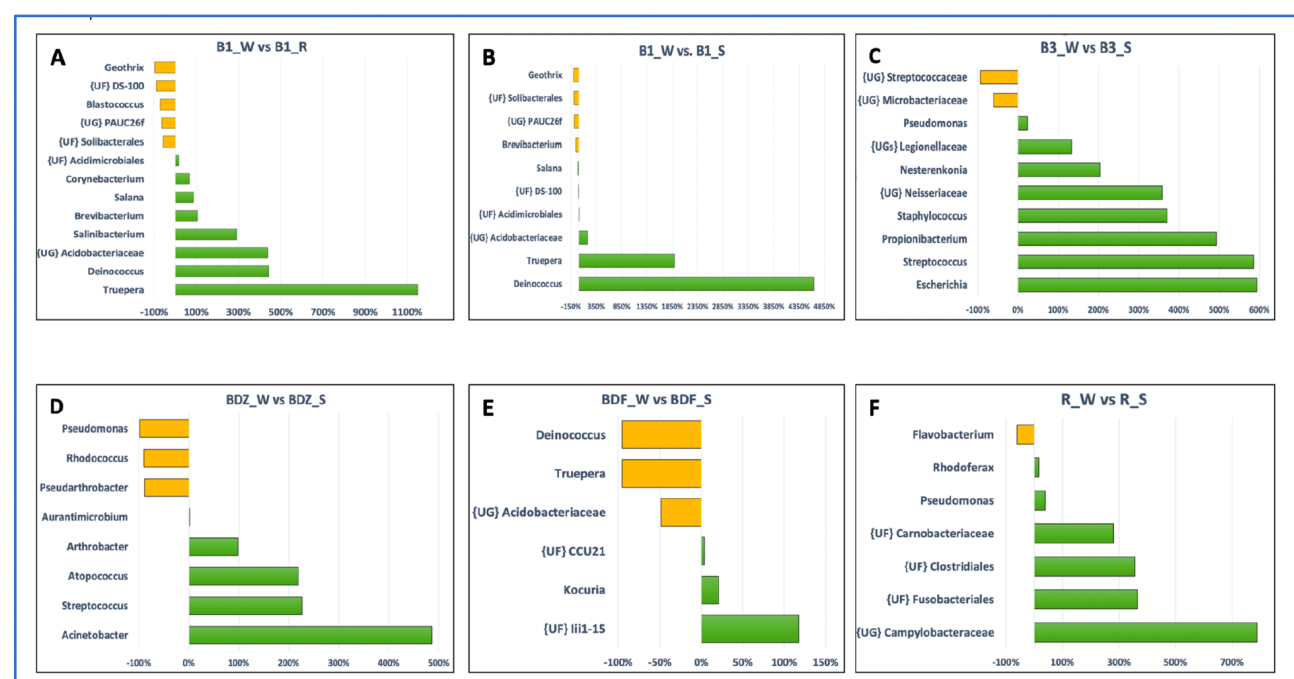
Ryc. 3. Różnice w indeksach różnorodności alfa pomiędzy rodzajami próbek (woda rzeczna, woda zbiornikowa i śnieg techniczny) oraz pomiędzy badanymi miejscami.

WYNIKI

Chemical Group	Antibiotic	BDF_W	BDF_R	BDF_S	B1_W	B1_R	B1_S	R_W	R_S	B3_W	B3_S	BDZ_W	BDZ_S
2nd gen. cephalosporins	cefoxitin	0.00	0.00	112.59	0.00	0.00	73.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
fluoroquinolones	ciprofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	65.20	24.31	0.00	0.00	0.00	15.37
	ofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	626.28	34.95	3.38	0.95	2.94	0.00
lincosamids	clindamycin	0.51	0.00	0.00	1.83	<LOQ**	2.47	37.66	9.96	5.80	0.00	15.59	11.18
	erythromycin	0.10	0.00	0.00	0.07	0.00	0.05	0.30	0.24	0.00	0.00	0.30	0.20
macrolides	tylosin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	56.59	10.23	0.00	0.00	0.00	0.00
	doxycycline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	68.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
tetracyclines	oxytetracycline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	tetracycline	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
sulphonamids	sulfamethoxazole	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.56	20.90	4.69	1.48	0.00	34.05	8.83
antifolates	trimethoprim	0.00	0.00	0.00	1.10	0.00	0.18	38.57	7.70	2.59	0.00	8.61	4.93
glycopeptides	vancomycin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	142.66	21.84	0.00	0.00	4.23	0.00
oxazolidinones	linezolid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.33	17.40	1.48	1.63	0.00	3.99	1.55
number of antibiotics detected		2	0	1	5	2	7	13	10	5	1	8	8
total concentration of antibiotics		1.21	0	225.19	15.45	12.17	328.40	359.06	431.37	29.77	1.90	230.14	329.10

Ryc. 4. Średnie stężenia [ng/L] środków przeciwdrobnoustrojowych w badanych miejscach (wartości przedstawiono jako średnie wszystkich pomiarów) oraz suma stężeń środków przeciwdrobnoustrojowych w badanych miejscach.

** <LOQ - Limit Of Quantification



Ryc. 5. Wykresy słupkowe przedstawiające istotne różnice w liczbie odczytów pomiędzy próbkami wody i śniegu lub wody ze zbiornika na poziomie rodzaju (analiza przeprowadzona dla jednostek OTU > 100 odczytów). Litery (A-F) odnoszą się do poszczególnych stanowisk. Zielone słupki oznaczają taksony, których liczba wzrosła, a żółte słupki oznaczają taksony, których liczba spadła pomiędzy dwoma typami próbek (tj. woda rzeczna kontra woda ze zbiornika lub woda rzeczna kontra woda z topniejącego śniegu).

PODSUMOWANIE

- Na poziomie rodziny dominowały **Flavobacteriaceae** — zarówno w próbkach z najbardziej dziewiczych miejsc (BDF, B1_S), jak i z najbardziej dotkniętych antropopresją (R). **Enterobacteriaceae** przeważały w dwóch próbkach śniegu: jednej z miejsca silnie przekształconego (R) i jednej z relatywnie dziewiczego (B3).
- Na poziomie rodzaju **Deinococcus** wyraźnie dominował w trzech próbkach (BDF_W, BDF_R, B1_S). Gatunki z rodzaju *Deinococcus* są znane ze swojej odporności na wiele czynników stresogennych (promieniowanie jonizujące, ksenobiotyki, stres oksydacyjny itp.). Drugą najliczniejszą grupą była grupa **Escherichia-Shigella**, która dominowała w tych samych próbkach co rodzina *Enterobacteriaceae*.
- Analiza różnorodności alfa wykazała najwyższe wartości wskaźników Shannon i Simpson dla wody rzecznej, a najniższe dla śniegu technicznego. W odniesieniu do różnych zlewni, zarówno wskaźniki Shannona, jak i Simpsona zmniejszają się w następującej kolejności: **R > BDZ > B1 > B3 > BDF**, co odpowiada antropopresji wywieranej na te miejsca.
- Liczebność **Deinococcus** i **Truepera** w miejscu B1 wzrosła istotnie w wodzie zbiornikowej i śniegu technicznym (nawet ponad 4000%), natomiast w miejscu BDF spadła o 96%. Różnice te mogą wynikać z wpływu ścieków, obecności antybiotyków oraz lokalnych interakcji ekologicznych między bakteriami.
- Analiza PCA i korelacji wykazała, że **ciprofloksacyna, erytromycyna, klindamycyna, ofloksacyna i trimetoprim** najsilniej wpływają na skład mikrobiomu. Dodatkowo stwierdzono pozytywną korelację między stężeniem **wankomycyny** a obecnością *Rhodococcus*, *Glutamicibacter*, *Pseudarthrobacter* i *Pseudomonas*.