

16. Report on microbiological and toxic cyanobacteria studies carried out within the framework of the project LIFERADOMKLIMA-PL

Projekt LIFE14CCA/PL/000101 Adaptacja do zmian klimatu poprzez zrównoważoną gospodarkę wodą w przestrzeni miejskiej Radomia jest współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Instrumentu Finansowego LIFE oraz Narodowy Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Warszawie



Raport z badań mikrobiologicznych i toksycznych sinic prowadzonych w ramach projektu LIFERADOMKLIMA-PL

Źródło finansowania: Projekt LIFE14 CCA/PL/000101 pn.: „Adaptacja do zmian klimatu poprzez zrównoważoną gospodarkę wodą w przestrzeni miejskiej Radomia

Opracowanie: dr Liliana Serwecińska, prof. dr hab. Joanna Mankiewicz-Boczek

Łódź, 2016



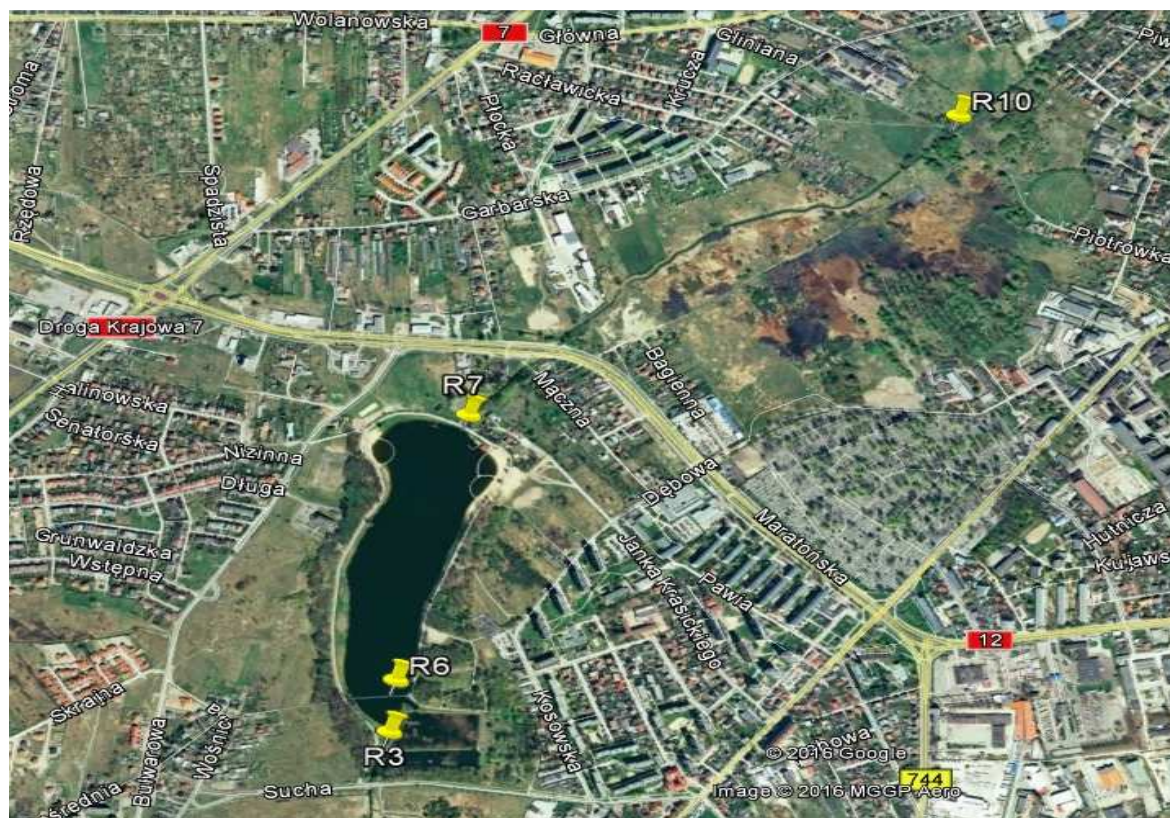
Badania Mikrobiologiczne

Badania jakościowe i ilościowe na czystość sanitarną wody w kierunku wykrywania bakterii wskaźnikowych zanieczyszczeń fekalnych, przeprowadzono metodą testów DST (Colilert 18 – PN-EN ISO 9308-2 i Enterolert E, IDEXX Laboratories, Inc. USA), za pomocą których oceniano najbardziej prawdopodobną liczbę (NPL) komórek bakterii grupy coli (*E.coli*) i paciorkowców kałowych (enterokoki) w 100 ml wody.

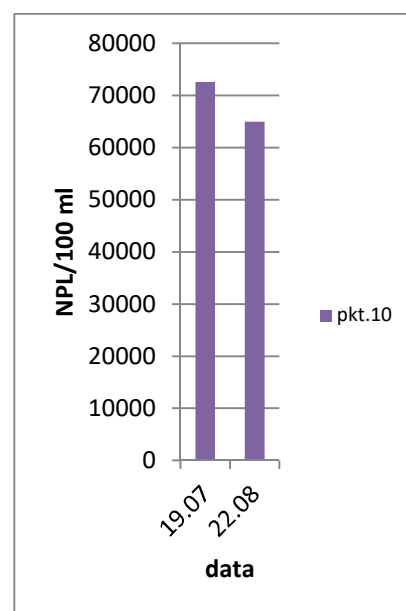
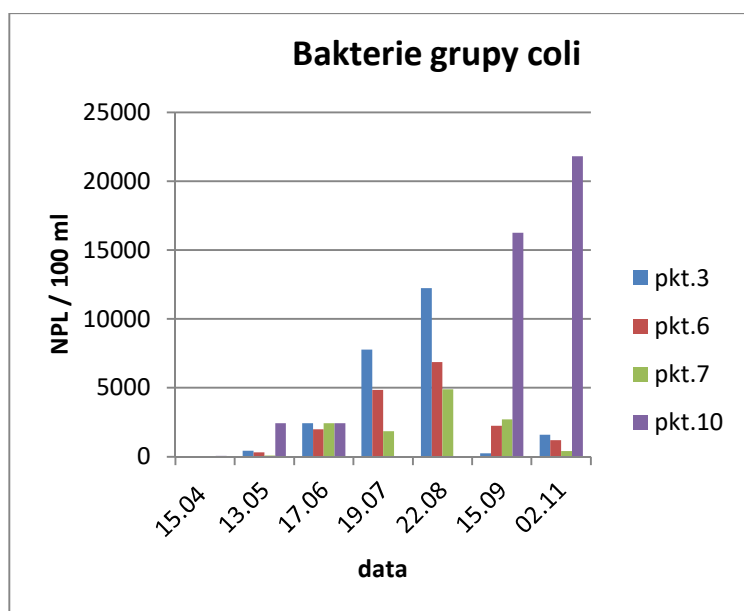
W ciągu całego okresu badawczego próbki wody pobierano z tych samych czterech stanowisk (R) oznaczonych jako: stanowisko 3 (Mleczna powyżej zbiornika Borki), stanowisko 6 (zbiornik Borki – dopływ), stanowisko 7 (zbiornik Borki – zapora) i stanowisko 10 (Mleczna poniżej zbiornika Borki). Lokalizację stanowisk przedstawiono na Ryc. 1.

Wyniki badań zaprezentowane na Ryc. 2, 3 i 4 wskazują, że w kwietniu w wodzie na wszystkich stanowiskach wykryto nieznaczne ilości tj. w granicach 1-64 komórek bakterii grupy coli /100 ml wody, 1-12 komórek *E.coli* /100 ml wody, 0-1 komórek enterokoków /100 ml wody i aż w dziewięciu próbkach od zera do zaledwie jednej komórki badanych bakterii wskaźnikowych. W maju nastąpił wzrost bakterii grupy coli (z wyjątkiem stanowiska 7), podczas gdy liczba *E.coli* i enterokoków w dalszym ciągu pozostawała na bardzo niskim poziomie. Począwszy od czerwca, liczebność wszystkich badanych grup bakterii rosła, osiągając maksimum w lipcu i w sierpniu, co przedstawiono na odrębnych rycinach z odpowiednimi wartościami – Ryc. 2B, 3B i 4B.

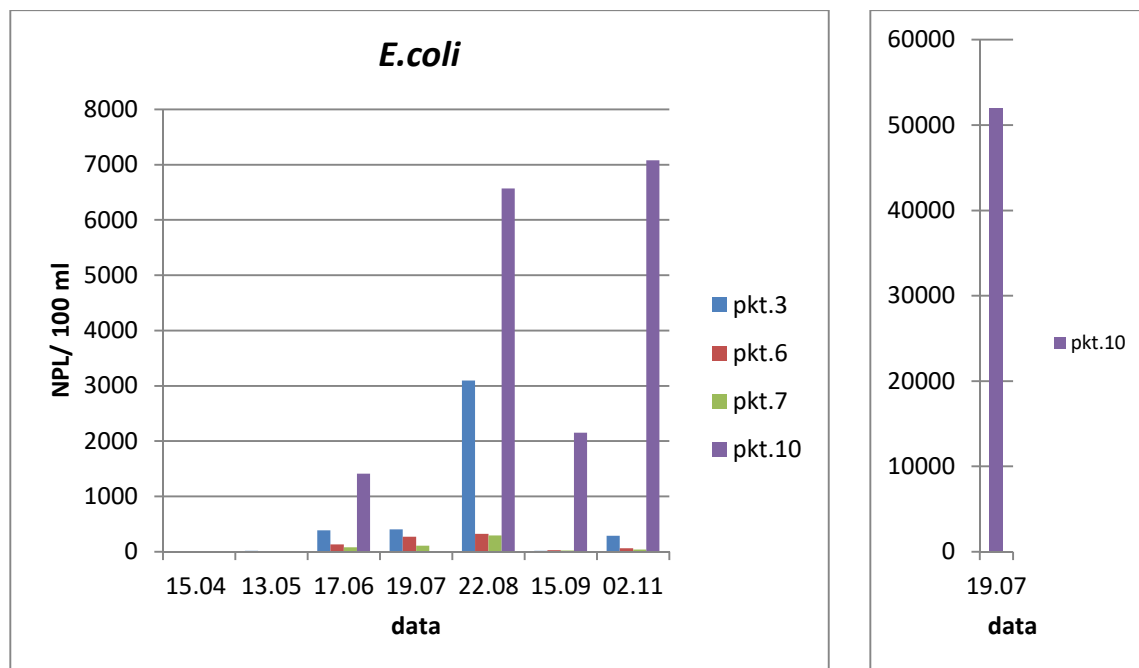
We wrześniu i listopadzie liczba komórek wszystkich grup bakterii na trzech stanowiskach (3, 6 i 7) była wyraźnie mniejsza w porównaniu do miesięcy letnich oraz ciągle wysoka w próbkach pobranych na stanowisku 10.



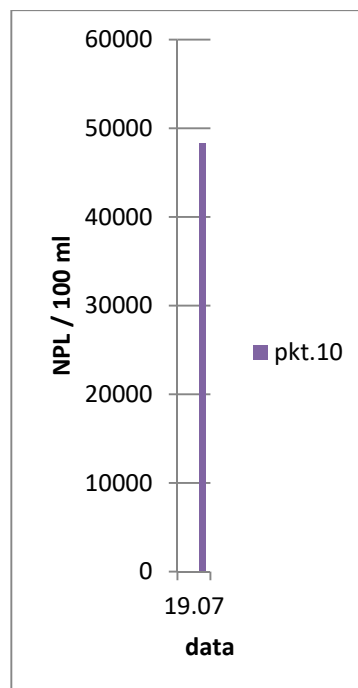
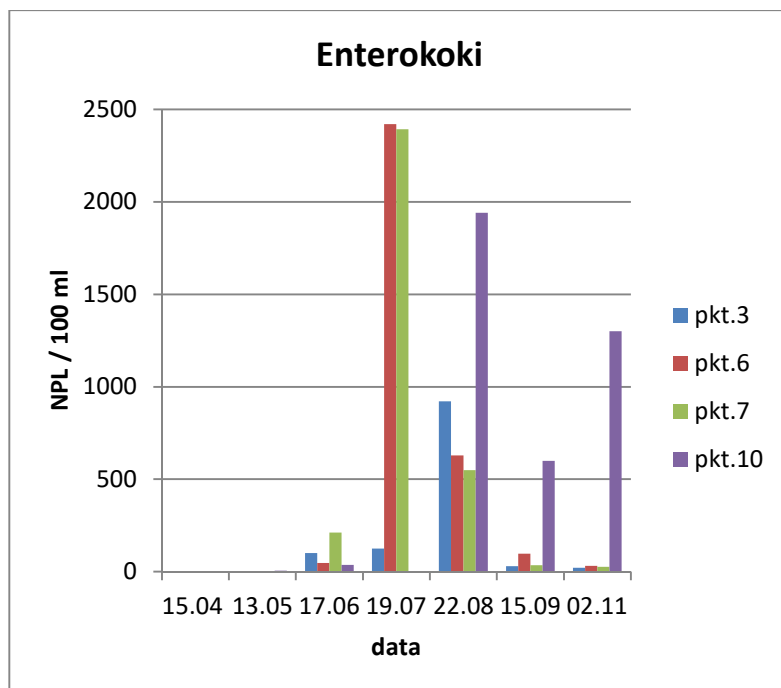
Ryc. 1. Lokalizacja punktów poboru próbek wody R3, R6, R7 i R10 do badań mikrobiologicznych i toksykologicznych.



Ryc. 2 A, B. Zmienność liczebności bakterii z grupy coli na poszczególnych stanowiskach poboru próbek wody w okresie badawczym kwiecień-listopad 2016 (stanowisko 3 – Mleczna powyżej zbiornika Borki, stanowisko 6 – zbiornik Borki – dopływ, stanowisko 7 – zbiornik Borki - zapora, stanowisko 10 – Mleczna poniżej Zbiornika Borki).



Ryc. 3 A, B. Zmienność liczebności komórek *E.coli* na poszczególnych stanowiskach poboru próbek wody w okresie badawczym kwiecień-listopad 2016 (stanowisko 3 – Mleczna powyżej zbiornika Borki, stanowisko 6 – zbiornik Borki – dopływ, stanowisko 7 – zbiornik Borki - zapora, stanowisko 10 – Mleczna poniżej Zbiornika Borki).



Ryc. 4 A, B. Zmienność liczebności Enterokoków na poszczególnych stanowiskach poboru próbek wody w okresie badawczym kwiecień-listopad 2016 (stanowisko 3 – Mleczna powyżej zbiornika Borki, stanowisko 6 – zbiornik Borki – dopływ, stanowisko 7 – zbiornik Borki - zapora, stanowisko 10 – Mleczna poniżej Zbiornika Borki).



Podsumowanie

W kwietniu i w maju wykrywano bardzo nieznaczne liczby komórek badanych bakterii, co świadczy o czystości sanitarnej badanych wód. **Najwięcej komórek wszystkich trzech grup bakterii wykrywano przez cały okres badawczy na stanowisku 10 (Mleczna poniżej zbiornika Borki).** Zwraca uwagę duża ilość enterokoków w lipcu na stanowiskach 6 (Bo zbiornik Borki – dopływ) i 7 (zbiornik Borki – zaporą) – odpowiednio 2420 i 2393/100 ml wody, i aż 20-krotnie wyższa na stanowisku 10 (Mleczna poniżej zbiornika Borki) tj. 48400 komórek/100 ml wody. Bardzo wysoka liczebność enterokoków w lipcu mogła mieć związek z zanieczyszczeniem wody odchodami zwierzęcymi w czasie nieodległym od dnia pobrania próbek do badań.

Wskazanim byłoby wyjaśnienie przyczyn znacznie wyższej, w porównaniu do stanowisk 3, 6 i 7 liczebności bakterii wskaźnikowych w końcowym odcinku systemu tj. na stanowisku 10 i podjęcie działań zmierzających do ograniczenia zanieczyszczenia tego odcinka bakteriami pochodzenia fekalnego, a tym samym poprawy stanu czystości sanitarnej wody. Przyczyną wysokiej liczebności bakterii pochodzenia fekalnego na stanowisku 10 może być:

- dopływ zanieczyszczeń rzeką Cerekwianką
- dopływ zanieczyszczeń kanałem A0
- dopływ zanieczyszczeń z wylotów kanalizacji opadowo-drenażowej znajdujących się pomiędzy stanowiskami 7 i 10.



Toksyczne sinice (cyjanobakterie) odpowiedzialne za produkcję hepatotoksyn – mikrocytyn

Na podstawie podsumowania analiz genetycznych (gen 16S rRNA) sinice wykryto w 3 punktach poboru, na stanowisku (dopływ do zbiornika Borki – R1w, środek zbiornika – R2ś i stanowisko przy zaporze – R3t) (Tab.1).

Wykorzystanie dwóch fragmentów genu 16S rRNA (specyficznego dla sinic – 258 pz oraz specyficznego tylko dla rodzaju *Microcystis* – 250 pz) umożliwiło prześledzenie obecności sinic, w tym sinic z rodzaju *Microcystis* (Gągała i in., 2014) od kwietnia do listopada 2016 r. (Tab. 1). **Sinice, w tym rodzaj *Microcystis*, były obecne w zbiorniku niemalże podczas całego okresu monitoringowego (od kwietnia do września), wyjątkiem był ostatni termin poboru (listopad) kiedy to nie wykryto cyjanobakterii. Stanowiskiem, w którym najczęściej wykrywano sinice był środek zbiornika – R2ś.**

Jeśli chodzi o genotypy toksynogenne sinic o potencjale do produkcji mikrocytyn to ich obecność przeanalizowano przy użyciu dwóch fragmentów genów uczestniczących w syntezie w/w cyjanotoksyn (*mcyE* – specyficznego dla sinic o potencjale do produkcji mikrocytyn niezależnie od ich rodzaju oraz *mcyA* – fragmentu genu specyficznego dla genotypów toksynogennych rodzaju *Microcystis*) (Gągała i in., 2014; Mankiewicz-Boczek i in., 2015). **Genotypy toksynogenne o potencjale do produkcji mikrocytyn wykryto od kwietnia do września** (Tab. 1). Ponadto, wykrywano częściej gen *mcyE* co mogłoby wskazywać, że **rodzaj *Microcystis* może być dominujący w produkcji wspomnianych hepatotoksyn sinicowych.** Toksynogennych genotypów nie zanotowano, w żadnym z punktów poboru w listopadzie (02.11.16). **Nie było możliwym wyznaczenie jednego miejsca szczególnie narażanego na występowanie genotypów toksynogennych odpowiedzialnych za produkcję mikrocytyn.**

Biorąc pod uwagę **wyniki oceny toksyczności mikrocytyn** (aktywność biologiczna oceniona na podstawie hamowania aktywności enzymu - fosfatazy białkowej, metoda – PPIA (Zeulab, Spain) zaobserwowano, że **ich największa aktywność pojawiła się w lipcu** (19.07.16), kiedy to oznaczone stężenie wykroczyło poza czułość testu (do 2,5 µg/l mikrocytyn) w punktach R2ś i R3t. Stężenie powyżej 2 µg/l mikrocytyn odnotowano jeszcze w czerwcu w punkcie R1w. **Generalnie aktywność biologiczną mikrocytyn**

zanotowano dla próbek pobranych w okresie kwiecień-sierpień 2016 (wtedy odnotowano ilość mikrocytyn w zakresie wykrywalnym dla użytego testu PPIA – 0,25-2,5 µg/l, lub powyżej wspomnianego zakresu).

Tabela 1. Charakterystyka występowania oraz toksyczności sinic (cyjanobakterie) na podstawie analiz genetycznych oraz biochemicznych, ocena zagrożenia dla człowieka pod kątem produkcji hepatotoksyn sinicowych – mikrocytyn.

| Data poboru | Oznaczenia próbek | Geny sinicowe | | | | Toksyczność mikrocytyn (met. PPIA) [µg/L] |
|-------------|-------------------|---------------------------|--|--|---|--|
| | | 16S rRNA | 16S rRNA | <i>mcyE</i> | <i>mcyA</i> | |
| | | Spec. dla sinic 258 pz | Spec. dla sinic z rodzaju <i>Microcystis</i> 250 pz | Spec. dla genotypów toksynogennych zdolnych do produkcji MCs 405 pz | Spec. dla genotypów toksynogennych z rodzaju <i>Microcystis</i> zdolnych do produkcji MCs 395 pz | |
| 15.04.16 | R1w150416 | + | + | - | - | na |
| | R2ś150416 | + | + | + | + | 1,16 |
| | R3t150416 | + | + | - | + | 1,20 |
| 13.05.16 | R1w130516 | + | + | - | - | na |
| | R2ś130516 | + | + | - | - | na |
| | R3t130516 | + | + | - | + | 1,63 |
| 17.06.16 | R1w170616 | + | + | - | + | 2,39 |
| | R2ś170616 | + | - | - | + | 1,68 |
| | R3t170616 | - | - | - | - | na |
| 19.07.16 | R1w190716 | + | + | - | - | na |
| | R2ś190716 | + | + | + | + | 2,96 |
| | R3t190716 | + | + | + | + | 2,91 |
| 22.08.16 | R1w220816 | - | - | - | - | na |
| | R2ś220816 | + | + | + | + | 0,31 |
| | R3t220816 | + | + | - | - | na |
| 15.09.16 | R1w150916 | + | + | + | + | 0,18 |
| | R2ś150916 | + | + | + | + | 0,19 |
| | R3t150916 | + | + | + | + | 0,18 |
| 02.11.16 | R1w021116 | - | - | - | - | na |
| | R2ś021016 | - | - | - | - | na |
| | R3t021016 | - | - | - | - | na |

na – nie analizowano z powodu braku amplifikacji genów *mcyE* i/lub *mcyA*; „+” – badany gen obecny; „-” – badany gen nieobecny; kolor czerwony oznacza wyniki powyżej zakresu testu

Podsumowanie

W okresie monitoringowym w badanym zbiorniku wykryto toksyczne sinice, w tym rodzaj *Microcystis*, zdolne do produkcji hepatotoksyn sinicowych – mikrocytyn. Problem pojawił się już w kwietniu i trwał do września. Dyrektywa europejska dotycząca zarządzania jakością wody w kąpieliskach i uchylająca dyrektywę 76/160/EWG (DIRECTIVE 2006/7/EC) narzuca potrzebę monitorowania występowania i zagrożenia ze strony sinic, jeżeli zostaną one wykryte w wodach rekreacyjnych.



Literatura:

DIRECTIVE 2006/7/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC,.

Gągała I., Izydorczyk K., Jurczak T., Pawełczyk J., Dziadek J., Wojtal-Frankiewicz A., Józwiak A., Jaskulska A., Mankiewicz-Boczek J. 2014. Role of environmental factors and toxic genotypes in the regulation of microcystins-producing cyanobacterial blooms. *Microbial Ecology* 67(2):465–479.

Mankiewicz-Boczek, J., Gągała I., Jurczak T., Jaskulska A., Pawełczyk J., Dziadek J. 2015. Bacteria homologous to *Aeromonas* capable of microcystin degradation. *Open Life Sciences formerly Central European Journal of Biology* 10: 106–116.