

## PRZEŻYWALNOŚĆ SZCZEPU *ESCHERICHIA COLI* K12 J62-1 W WODZIE ZBIORNIKA DZIERŻNO DUŻE

ALEKSANDRA NADGÓRSKA<sup>1</sup>, ALEKSANDRA SMYŁŁA<sup>2</sup>,  
MACIEJ KOSTECKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Śląski, Katedra Ekologii, ul. Bankowa 9, 40-032 Katowice

<sup>2</sup>Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Zakład Ochrony Środowiska, ul. A. Krajowej 13/15,  
40-200 Częstochowa

<sup>3</sup>Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze

Keywords: microbial survival, anthropopresure, dam-reservoirs.

### THE SURVIVAL RATE OF *ESCHERICHIA COLI* K12 J62-1 IN THE WATER OF THE DZIERŻNO DUŻE DAM-RESERVOIR

The survival of *Escherichia coli* K12 J62-1, with and without antibiotic resistant plasmid R1, was compared in water microcosms. Microcosms were prepared using the dam-reservoir water from Dzierżno Duże: filtered water (0.5 µm – Synpor), water autoclaved at 117°C for 15 min., water autoclaved with addition of 1% of glucose. Water was inoculated with cells of strains obtained from Dr. P.J. McDermott from the University of Staffordshire.

The various rates of decline depended on the presence of biotic factors were observed. The elimination of bacteria in samples of filtered water was faster than in sterile water, the number of bacteria decreasing after 3-days. In the samples of water previously filtered we observed bacteriophages, characteristic for *E. coli* (R<sup>-</sup> – 10<sup>9</sup>) and *E. coli* (R<sup>+</sup> – 10<sup>7</sup>) were observed.

In the sterile water *E. coli* cells survived much longer; the number of bacteria slowly decreased after 7 days, taken after 28 days around 2–9 x 10<sup>6</sup> of c.f.u./cm<sup>3</sup>. The significant influence of plasmid R1 in bacteria cells on improvement of *E. coli* survival wasn't noticed, however the existence of plasmid after the period of 14 and 21 days of experiment was observed.

Supplementation of sterile water with glucose increased the number of bacteria, however, the survival level of these two strains of *E. coli* was very similar.

#### Streszczenie

Badania nad przeżywalnością bakterii w wodzie prowadzono na szczepach: *Escherichia coli* K12 J62-1 oraz *Escherichia coli* K12 J62-1 R1 otrzymanych od dr P.J. McDermott'a z Uniwersytetu w Staffordshire. W wodzie pobranej z 2 punktów zbiornika Dzierżno Duże: filtrowanej (0,5 µm – Synpor), sterylizowanej oraz po wprowadzeniu dodatkowego substratu odżywczego – glukozy, porównano przeżywalność plazmidowego i bezplazmidowego szczepu *E. coli*.

Wykazano, że liczba komórek bakteryjnych wprowadzonych do wody obniża się z różną szybkością zależnie od obecności czynników biotycznych. Obserwowano znaczący spadek liczebności bakterii w próbkach wody sączonej (92% i 46% w 3 dniu doświadczenia). Jest to prawdopodobnie wynikiem obecności w wodzie bakteriofagów charakterystycznych dla *E. coli* K12, których obecność, specyficzną zarówno dla szczepu plazmidowego jak i bezplazmidowego stwierdzono w użytej do badań wodzie. W próbkach wody

sterylnej, pozbawionej flory autochtonicznej, obserwowano powolny, niewielki spadek liczebności od 7 do 21 dnia. W zastosowanym układzie doświadczenia nie stwierdzono istotnego polepszenia przeżywalności w obecności plazmidu, a niekiedy lepiej przeżywał szczep bezplazmidowy. Wprowadzenie glukozy spowodowało, że mimo obciążenia metabolicznego jakim jest plazmid dla komórki, przeżywalność obydwu szczepów była zbliżona.

## WSTĘP

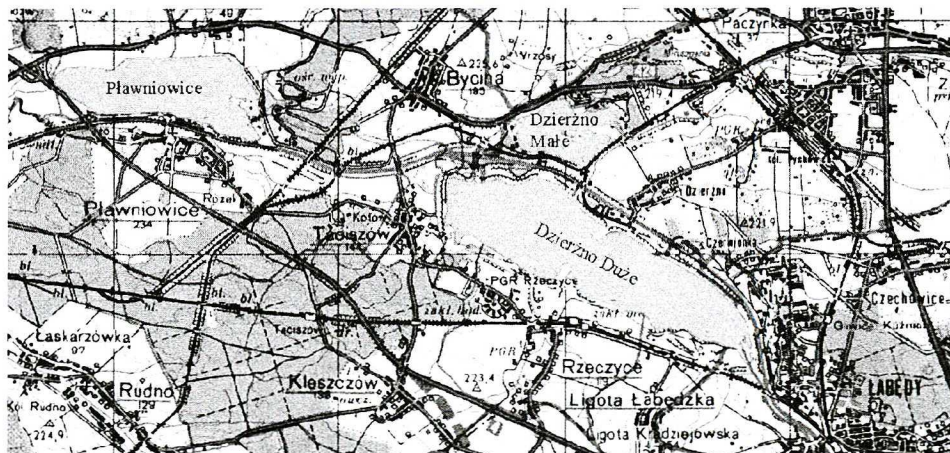
Do wód powierzchniowych wraz ze ściekami wprowadzane są liczne mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze, które w określonych warunkach mogą w wodzie przeżywać, wpływając negatywnie na stan sanitarny wód. Ich przeżywalność w wodzie zależy głównie od zawartości substancji odżywczych, temperatury i obecności zanieczyszczeń, np. toksycznych metali, czyli czynników abiotycznych. Na przeżywalność wpływają także czynniki biotyczne jak: obecność bakterii autochtonicznych i występowanie organizmów odżywiających się bakteriami, tzn. pierwotniaków, skorupiaków, wrotków, nicieni, skąposzczetów, mięczaków, larw owadów, jak również bakterii litycznych jak *Bdellovibrio bacteriovorus* oraz bakteriofagów [1, 5, 29].

W warunkach stresowych i głodowych, mikroorganizmy allochtoniczne mogą przechodzić w stan VBNC tzn. viable but not-culturable – żyjące, ale nie hodowlane bakterie [1, 26]. Zmniejszają wówczas swoją objętość, stają się bardziej hydrofobowe i zdolne do adhezji, w ich komórkach częściej zachodzą mutacje spontaniczne [1, 23]. Bakterie przebywając w wodzie w stanie VBNC, w krótkim okresie czasu tracą zdolność do formowania kolonii i nie można ich wyhodować na podłożach laboratoryjnych posługując się tradycyjnymi metodami. Powodem utraty zdolności do tworzenia kolonii jest najprawdopodobniej utrata przepuszczalności barier błony cytoplazmatycznej. Ważnym jest, że w stanie VBNC bakteriom pozostaje zdolność do wirulencji [1, 20]. Obecność zatem w systemach wodnych form VBNC bakterii takich jak *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio vulnificus* może być niebezpieczna dla zdrowia człowieka, mimo że bakterie te są nie wykrywane za pomocą standartowych metod hodowlanych [1, 20].

Szczególną cechą wpływającą na możliwość przeżycia w wodzie dla bakterii allochtonicznych jest posiadanie plazmidów z genami kodującymi białka oporności na czynniki środowiska [1]. Przedmiotem zainteresowania badaczy często są plazmidy R, kodujące oporność na antybiotyki, sole metali ciężkich i sulfonamidy, oraz ich wpływ na przeżywalność bakterii w środowisku naturalnym [16]. Plazmid R1 występujący w komórkach badanych szczepów, koduje oporność na ampicylinę i chloramfenikol, na kanamycynę, streptomycynę, spectinomycynę jak również na sulfonamidy. Posiada on wielkość około 100 kpz, zawiera system antytoksyna – toksyna (system genów cytotoksycznych). System ten zabija komórki, tracące plazmid podczas podziału [4, 10, 11, 17, 28]. W warunkach głodzenia plazmid może być również tracony [1]. Część badaczy uważa, że obecność plazmidu w komórce jest korzystna dla bakterii, pozwala im na przeżycie w obecności metali ciężkich czy antybiotyków i że szczepy plazmidowe przeżywają lepiej niż ich bezplazmidowe odpowiedniki [19]. Inni autorzy twierdzą, że posiadanie plazmidu w warunkach głodowych może być istotnym obciążeniem metabolizmu komórki [16, 22, 27].

## OBIEKT BADAŃ

Typowym przykładem zbiornika wodnego poddanego silnej antropopresji jest zbiornik Dzierżno Duże, największy i najgłębszy zbiornik w zachodniej części Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (Rys. 1).



Rys. 1. Zachodni Węzeł Wodny GOP  
The Kłodnica Hydrojunction

Zbiornik powstał w wyniku zalania wyrobisk popiaskowych, których eksploatację zakończono w 1964 roku. Jest akwenem o długości 6 km, szerokości około 1 km i głębokości dochodzącej przy wysokim stanie wody do 25 m. Powierzchnia zbiornika wynosi 650 ha, a pojemność całkowita 93,5 mln m<sup>3</sup>. Zbiornik zasilany jest wodą rzeki Kłodnicy, a z uwagi na wysoki stan jej zanieczyszczenia ściekami komunalnymi i przemysłowymi pełni rolę oczyszczalni rzecznej. Rzeka Kłodnica przepływająca przez najbardziej uprzemysłowiony region Polski jest zanieczyszczona ściekami komunalnymi oraz wodami kopalnianymi i ściekami przemysłowymi [12–14, 24].

## CEL PRACY I METODYKA BADAŃ

Celem pracy było porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* plazmidowego i bezplazmidowego w wodzie zbiornika Dzierżno Duże, zanieczyszczanego ściekami przemysłowymi, komunalnymi oraz wodami kopalnianymi, w warunkach sterylnych oraz w obecności form przesączalnych, a także po wprowadzeniu dodatkowego substratu odżywczego – glukozy.

Badania nad przeżywalnością bakterii w wodzie ze zbiornika Dzierżno Duże prowadzono na szczepach: *Escherichia coli* K12 J62-1 (R<sup>-</sup>), *Escherichia coli* K12 J62-1 R1 (R<sup>+</sup>) otrzymanych od dr P.J. McDermott'a z Uniwersytetu w Staffordshire. Próbkę wody pobierano u ujścia rzeki Kłodnicy do zbiornika Dzierżno Duże oraz 3 km od tego miejsca, w miesiącu październiku i listopadzie 2000 roku.

Hodowle bakteryjne zmywano 0,85% roztworem chlorku sodowego (NaCl) ze skosów agarowych, następnie wirowano. Otrzymane zawiesiny bakteryjne obu szczepów

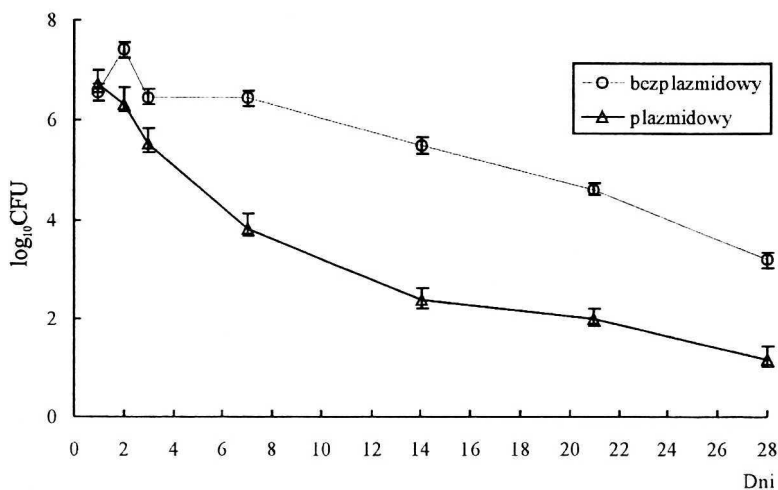
R<sup>+</sup> i R<sup>-</sup> doprowadzono do gęstości  $300 \times 10^6$  komórek bakteryjnych (co odpowiada około 1,5 wg skali McFarlanda) i przenoszono jałowo do kolbek z przygotowanymi próbkami wody w następującym układzie: 1. woda filtrowana przez filtr 0,5  $\mu\text{m}$ ; 2. woda sterylizowana w autoklawie; 3. woda sterylizowana z glukozą (1%). Hodowle prowadzono równolegle. Przeżywalność bakterii określano wysiewając powierzchniowo próbki na podłoża: „ $\frac{1}{2}$  agar odżywczy” oraz dla szczepu plazmidowego „ $\frac{1}{2}$  agar odżywczy” z ampicyliną i chloramfenikolem ( $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) [19], w dniu założenia doświadczenia, a następnie w 2, 3, 7, 14, 21 i 28 dniu jego trwania.

W wodzie filtrowanej oznaczano również liczebność bakteriofagów charakterystycznych dla *E. coli* K 12 J62-1 wg metodyki Basalik-Chabielskiej i wsp. [23]. Liczba łyselek na poszczególnych płytkach odpowiadała ilości bakteriofagów w 1  $\text{cm}^3$  wody.

Ze szczepu plazmidowego przeprowadzano izolację plazmidów w dniu założenia doświadczenia oraz po 14 i 21 dniach jego trwania metodą lizy alkalicznej wg Maniatis i wsp. [16].

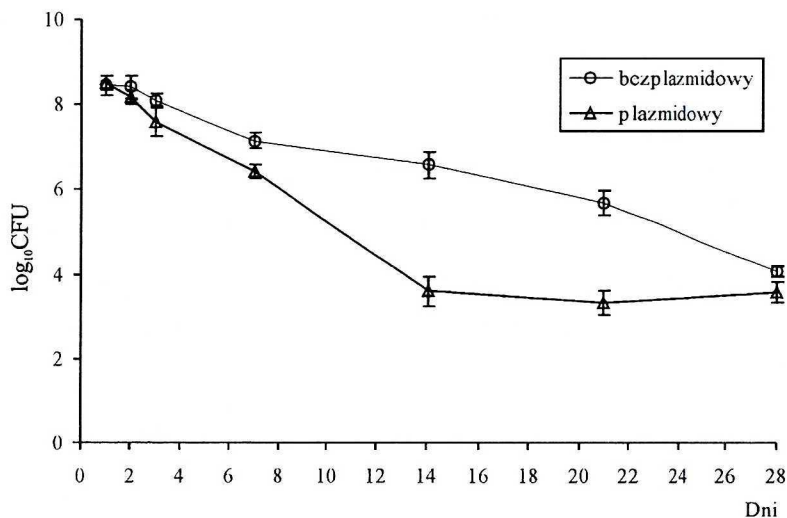
## WYNIKI

Zmiany liczebności badanych szczepów przedstawiono na wykresach jako  $\log_{10}$  CFU. W wodzie filtrowanej przez filtr o wielkości porów 0,5  $\mu\text{m}$  dużo dłużej przeżywał szczep bezplazmidowy zarówno w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy jak i 3 km od tego miejsca (Rys. 2–5), tylko w październiku w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy dłużej przeżywał szczep plazmidowy (Rys. 2). W wodzie tej obserwowano nieoczekiwany spadek liczebności komórek bakterii u szczepu bezplazmidowego. Czynnikiem obniżającym przeżywalność w wodzie filtrowanej była obecność bakteriofagów i innych mikroorganizmów zdolnych przejść przez wielkość por 0,5  $\mu\text{m}$ . Dużo większą przeżywalność obydwu szczepów stwierdzano w próbkach wody sterylizowanej niż w wodzie filtrowanej (Rys. 6–9).

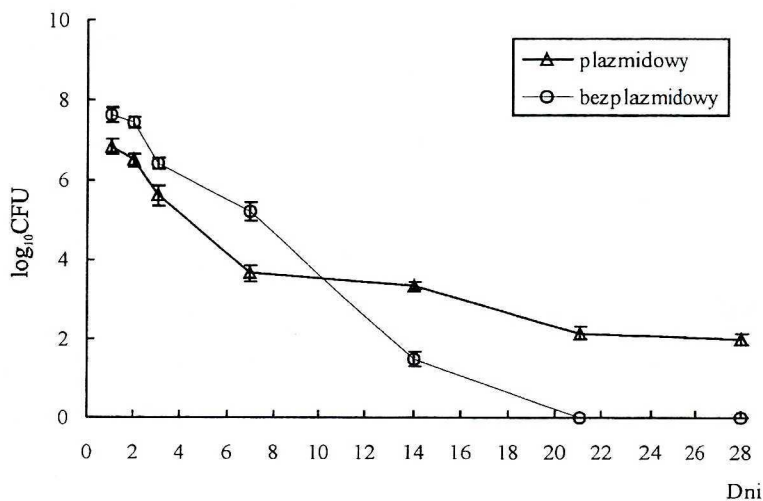


Rys. 2. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy, filtrowanej przez filtr o wielkości porów 0,5  $\mu\text{m}$ , w październiku

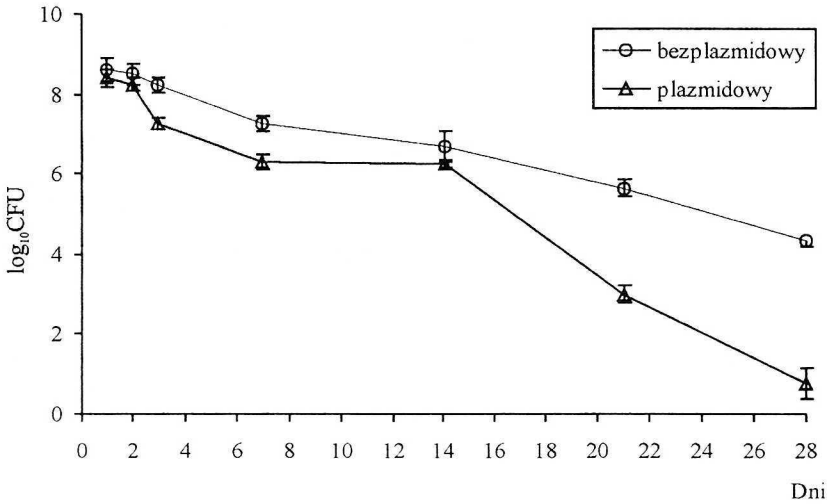
The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in October, water filtered on 0,5  $\mu\text{m}$  membranfilter



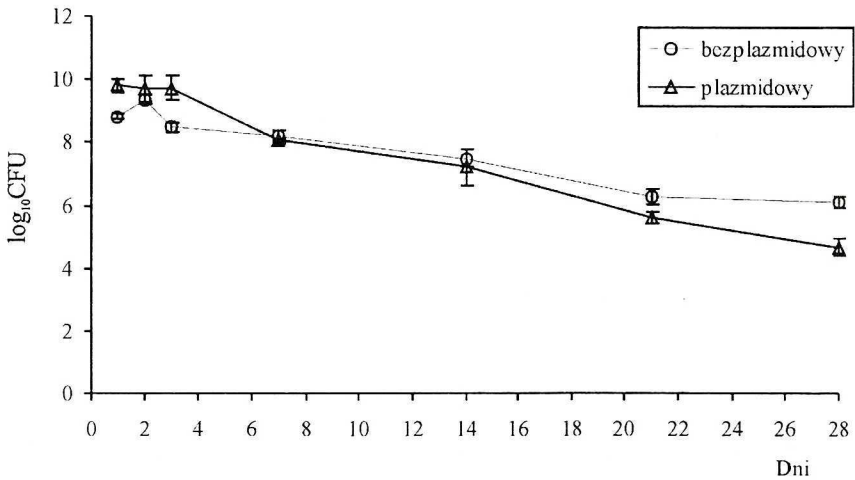
Rys. 3. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy, filtrowanej przez filtr o wielkości porów 0,5  $\mu$ m w listopadzie  
The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in November, water filtered on 0.5  $\mu$ m membranfilter



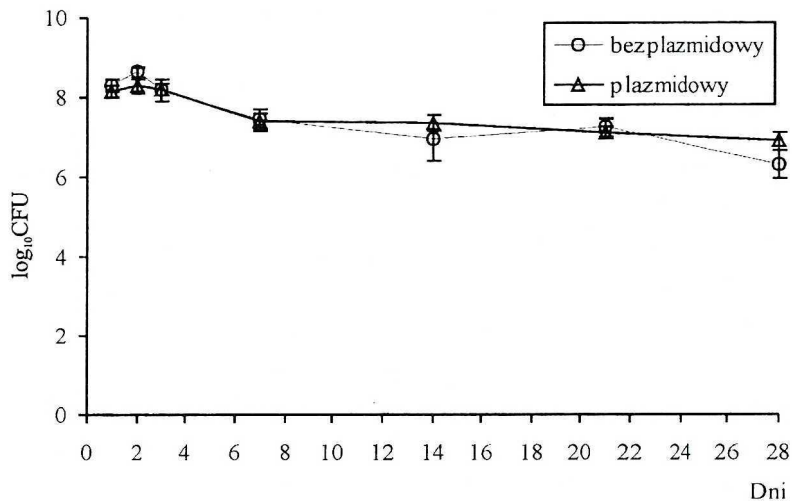
Rys. 4. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy, filtrowanej przez filtr o wielkości porów 0,5  $\mu$ m, w październiku  
The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in October, water filtered on 0.5  $\mu$ m membranfilter



Rys. 5. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy, filtrowanej przez filtr o wielkości porów 0,5  $\mu$ m, w listopadzie  
 The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in November, water filtered on 0.5  $\mu$ m membranfilter

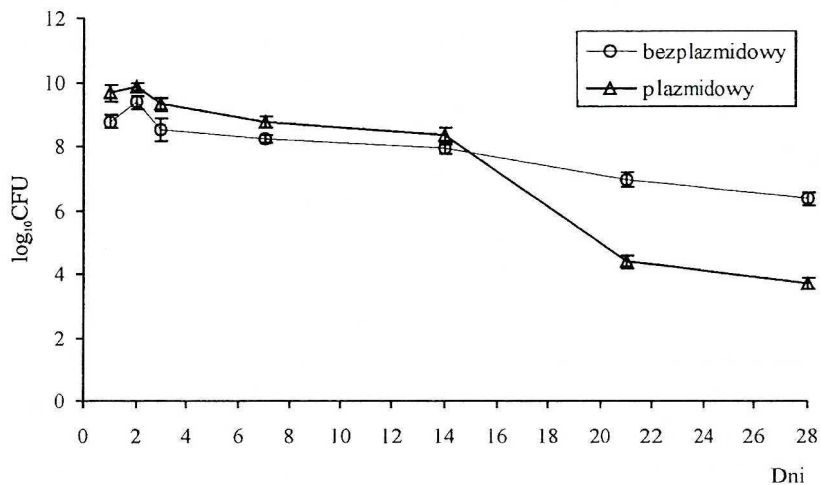


Rys. 6. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy, sterylizowanej w październiku  
 The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in October, water sterilized



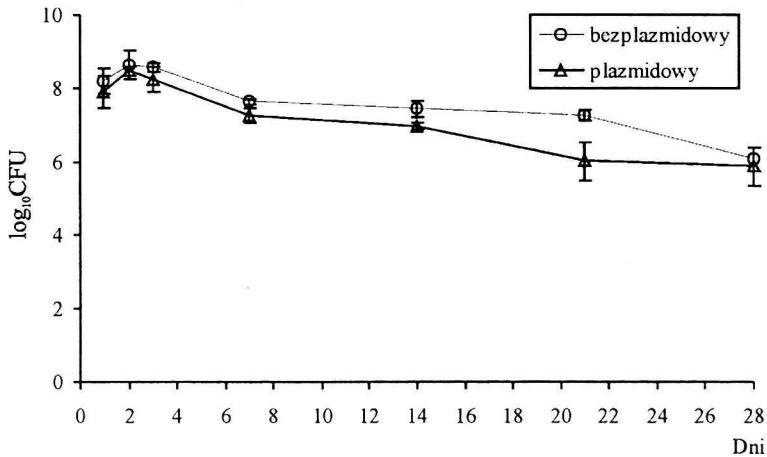
Rys. 7. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy, sterylizowanej w listopadzie

The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in November, water sterilized



Rys. 8. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy, sterylizowanej w październiku

The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in October, water sterilized



Rys. 9. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy, sterylizowanej, w listopadzie

The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in November, water sterilized

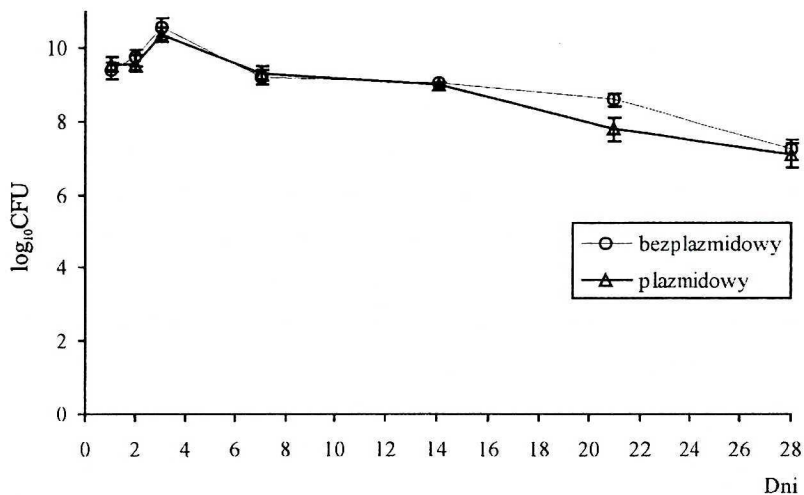
Większą liczebność bakteriofagów stwierdzono w wodzie u ujścia Kłodnicy niż 3 km od tego miejsca, przy czym zawsze ich liczba była większa dla szczepu bezplazmidowego. Porównując liczebność fagów w pierwszym i dwudziestym dniu doświadczenia stwierdzono obniżenie liczebności o 2 i 3 rzędy wielkości dla szczepu bezplazmidowego. Podobny spadek liczebności obserwowano dla fagów charakterystycznych dla szczepu plazmidowego.

W wodzie sterylnej liczebność bakterii była wyższa niż w wodzie filtrowanej, również liczebność szczepu bezplazmidowego w drugim dniu trwania doświadczenia była wyraźnie wyższa w stosunku do liczebności szczepu plazmidowego.

Obydwa szczepy przeżywały najdłużej w próbkach wody sterylizowanej z dodatkiem glukozy w porównaniu z przeżywalnością w próbkach wody filtrowanej (Rys. 10–13). W pierwszych 3 dniach doświadczenia stwierdzono znaczne zwiększenie liczby bakterii, po czym następował spadek liczebności izolatów obydwu szczepów. Trzeciego dnia doświadczenia obserwowano zawsze większą liczebność szczepu bezplazmidowego.

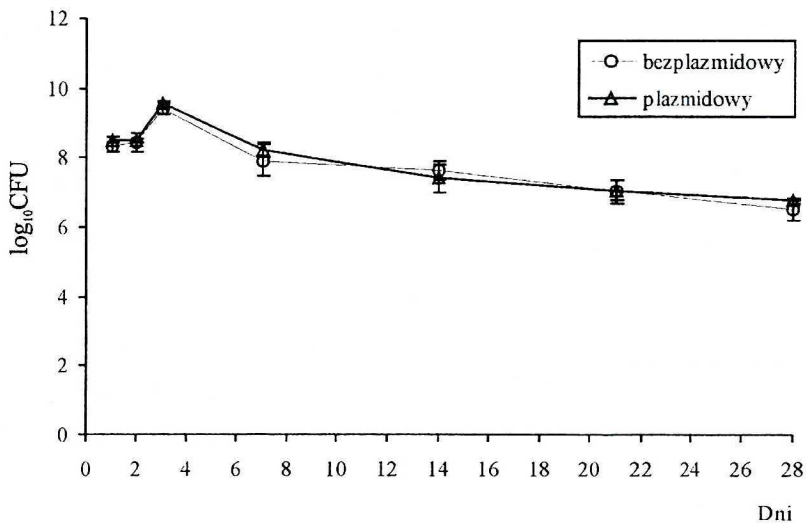
Zdjęcie (Rys. 14) przedstawia rozdział elektroforetyczny DNA plazmidowego, z komórek szczepu wzorcowego *E. coli* K12 J62-1 R1 w dniu założenia doświadczenia jak i tego samego szczepu inkubowanego w próbkach wody po 14 i 21 dniach trwania doświadczenia. Stwierdzono obecność plazmidu w komórkach zarówno po 14 jak 21 dniach trwania doświadczenia.





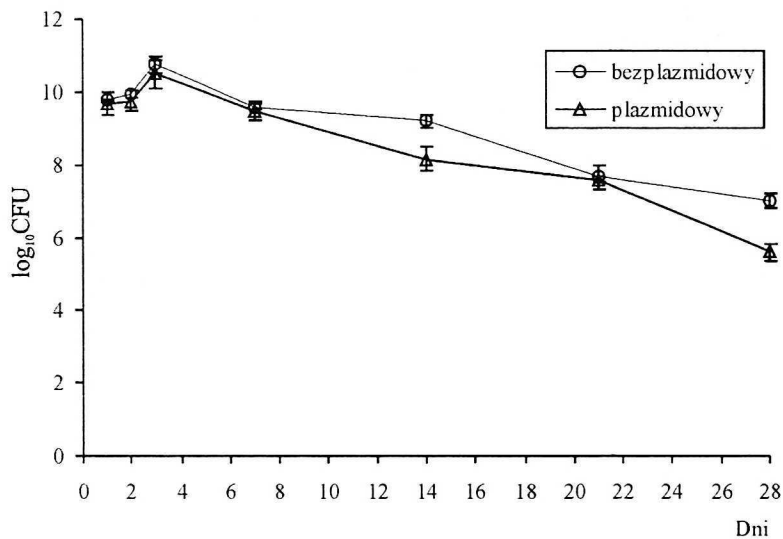
Rys. 10. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy sterylizowanej z dodatkiem glukozy (1%), w październiku

The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in October, water sterilized, with 1% glucose added

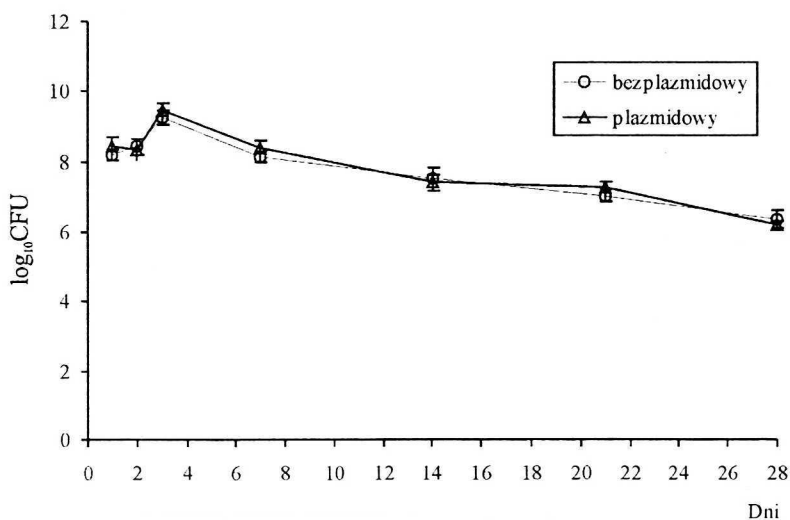


Rys. 11. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy, sterylizowanej z dodatkiem glukozy (1%) w listopadzie

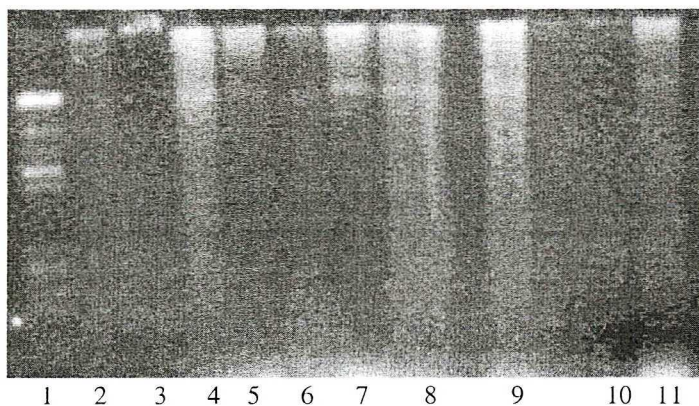
The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, on the Kłodnica estuary in November, water sterilized, with 1% glucose added



Rys. 12. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy sterylizowanej z dodatkiem glukozy (1%) w październiku  
 The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in October, water sterilized, with 1% glucose added



Rys. 13. Przeżywalność szczepu *E. coli* K12 J62-1 i *E. coli* K12 J62-1 R1 w wodzie pobranej 3 km od ujścia Kłodnicy, sterylizowanej z dodatkiem glukozy (1%) w listopadzie  
 The survival of *E. coli* K12 J62-1 and *E. coli* K12 J62-1 R1, 3 km from the Kłodnica estuary in November, water sterilized, with 1% glucose added



Rys. 14. Elektroforeza DNA plazmidowego, wyizolowanego z komórek szczepu wzorcowego *E. coli* K12 J62-1 R1 i tego samego szczepu inkubowanego w próbkach wody zbiornika Dzierżno przez 14 i 21 dni trwania doświadczenia

The electrophoresis of plasmids DNA of *E. coli* K12 J62 R1, and of the same vaccine, incubated for 14 and 21 days of experiment

- |            |   |
|------------|---|
| Kieszeń 1  | – DNA markerowy (DNA faga $\lambda$ pocięty za pomocą Hind III)   |
| Pocket 1   | – The marker DNA (The DNA of $\lambda$ -fags, cutted by Hind III)   |
| Kieszeń 2  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1  |
| Pocket 2   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1  |
| Kieszeń 3  | – <i>E. coli</i> K12 J62-1 (kontrola negatywna)   |
| Pocket 3   | – <i>E. coli</i> K12 J62-1 (negative-control)   |
| Kieszeń 4  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie czystej, sterylnej, 14 dzień inkubacji                          |
| Pocket 4   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “clean water”, 14 day of incubation                          |
| Kieszeń 5  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie brudnej, 14 dzień inkubacji                                     |
| Pocket 5   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “dirty-water”, 14 day of incubation                          |
| Kieszeń 6  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej, czystej z glukozą 1%, 14 dzień inkubacji             |
| Pocket 6   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “clean water” with added 1% of glucose, 14 day of incubation |
| Kieszeń 7  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej brudnej z glukozą 1%, 14 dzień inkubacji              |
| Pocket 7   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “dirty-water” with added 1% of glucose, 14 day of incubation |
| Kieszeń 8  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej, czystej, 21 dzień inkubacji                          |
| Pocket 8   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “clean water”, 21 day of incubation                          |
| Kieszeń 9  | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej, brudnej, 21 dzień inkubacji                          |
| Pocket 9   | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “dirty-water”, 21 day of incubation                          |
| Kieszeń 10 | – DNA plazmidowy <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej, czystej z glukozą 1%, 21 dzień inkubacji             |
| Pocket 10  | – The plasmid-DNA of <i>E. coli</i> K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “clean water” with added 1% of glucose, 21 day of incubation |

- Kieszzeń 11 – DNA plazmidowy *E. coli* K12 J62-1 R1, z komórek inkubowanych w wodzie sterylnej, brudnej z glukozą 1%, 21 dzień inkubacji
- Pocket 11 – The plasmid-DNA of *E. coli* K12 J62-1 R1, after incubation in sterilized “dirty-water” with added 1% of glucose, 21 day of incubation
- „czysta” – oznacza wodę pobraną 3 km od ujścia Kłodnicy
  - „brudna” – wodę pobraną u ujścia Kłodnicy
  - „clean water” – water was sampled 3 km fare from Kłodnica in-flow to the reservoir
  - “dirty water” – water was sampling on the in-flow of Kłodnica River to the reservoir

## DYSKUSJA WYNIKÓW

W przeprowadzonych badaniach nad przeżywalnością obydwu szczepów *E. coli* w wodzie zbiornika Dzierżno Duże wykazano, że liczba komórek bakteryjnych wprowadzonych do wody, w zastosowanym układzie doświadczenia, obniża się z różną szybkością.

Bardzo istotną rolę w przeżywalności odgrywają czynniki biotyczne jak obecność bakterii autochtonicznych i bakteriofagów.

W przeprowadzonych badaniach obserwowano szybsze zanikanie bakterii w próbkach wody sączonej niż w próbkach wody sterylnej, pozbawionej zarówno drapieżników jak i flory autochtonicznej. Jest to prawdopodobnie wynikiem obecności w używanej wodzie zbiornika Dzierżno Duże dużej ilości bakteriofagów charakterystycznych dla *E. coli* K12 zarówno dla szczepu plazmidowego jak i bezplazmidowego. Obecność tych fagów znacznie zmniejszała liczebność bakterii, co szczególnie widoczne jest przy porównaniu przeżywalności szczepów w wodzie filtrowanej do przeżywalności w wodzie sterylnej. W wodzie filtrowanej przez filtr 0,5  $\mu\text{m}$  już trzeciego dnia doświadczenia liczba komórek bakteryjnych obniżyła się o około 92% w październiku i 46% w listopadzie w wodzie pobranej u ujścia Kłodnicy dla obu szczepów. Zbliżone wyniki otrzymano dla próbek wody pobranej 3 km od tego miejsca.

Również wysoki spadek liczebności komórek bakteryjnych w próbkach wody filtrowanej zbiornika Zegrzyńskiego obserwowali Wcisło i Chróst [29], dla szczepu *E. coli* ATTC 35218.

Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być stwierdzany przez Gonzalesa [8] oraz Wcisło i Chrosta [30] fakt, że bakteriofagi atakują tylko żywe i aktywne komórki. Wcisło i Chróst [29] zwracają także uwagę na możliwość zmiany bądź utraty receptorów komórek bakterii, niezbędnych do fagowej adsorpcji. W próbkach wody ze zbiornika Dzierżno Duże, filtrowanej przez filtr 0,5  $\mu\text{m}$ , obok niewątpliwie przechodzących przez filtr bakteriofagów, przyczyniających się do obniżenia liczby komórek bakteryjnych, do próbki wody mogły przejść inne organizmy mniejsze niż wielkość porów – 0,5  $\mu\text{m}$ , być może także drapieżne bakterie *Bdellovibrio* sp. (0,2–0,5 x 0,5–1,4  $\mu\text{m}$  wg Singletona [24]. Nie stwierdzano jednak charakterystycznej, dla *Bdellovibrio* strefy przejścia na płytkach [25], natomiast występowały typowe dla bakteriofagów łysinki.

W wodzie sterylnej obserwowano znacznie lepszą przeżywalność bakterii, co najprawdopodobniej spowodowane było zabiciem wszelkiej mikroflory autochtonicznej. Niewielki spadek liczebności występował od 7 dnia i ilość izolowanych komórek utrzymywała się na zbliżonym poziomie do 21 dnia, po czym nieznacznie spadała. Podobne wyniki dla szczepu plazmidowego w wodzie sterylnej otrzymał McDermott [19].

W badaniach McDermott'a [19] nad przeżywalnością tych samych szczepów *E. coli* w próbach wody ze stawu, filtrowanej przez bibułę Whatman nr 1 i sterylizowanej lepiej przeżywał szczep plazmidowy. Lepszą przeżywalność szczepu R<sup>+</sup>, McDermott wyjaśniał nabytymi mutacjami, które polepszały możliwość przeżycia. Jednak rodzaj tych mutacji, które polepszają konkurencyjność i zdolność do życia, jak podaje autor, jest nadal w sferze badań.

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono istotnie lepszego przeżywania szczepu posiadającego plazmid, a niekiedy obserwowano lepszą przeżywalność szczepu bezplazmidowego. Może to być związane z różnicą w zawartości substancji odżywczych w wodzie, inną temperaturą hodowli lub też obecnością w wodzie jakichś innych, abiotycznych czynników.

Jak podaje Barcina [1] tylko w warunkach, w których plazmid koduje oporność w stosunku do parametrów środowiska, może on być czynnikiem polepszającym przeżywalność jego gospodarzy, natomiast obciążenie metabolizmu powodowane ekspresją i utrzymywaniem obcych genów było przyczyną gorszej przeżywalności bakterii posiadających plazmid [1, 27]. Plazmid jest istotnym obciążeniem metabolicznym dla komórki bakteryjnej [16, 22], dlatego niektórzy badacze uważają, że w warunkach niedoboru substancji pokarmowych plazmid może być tracony przez komórkę [1]. Jednak w przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono tracenia plazmidu przez komórki. Plazmid R1 był obecny w komórkach *E. coli* K12 J62-1 R1, wprowadzonych do wody sterylnej, zarówno po 14 jak i po 21 dniach trwania doświadczenia, bez dopływu nowych substancji organicznych.

Devanas i inni [6] stwierdzają, że duże plazmidy wydłużają czas generacji komórek gospodarzy. W przeprowadzonych badaniach szczep plazmidowy *E. coli* K12 J62-1 R1 wykazywał wydłużony czas generacji w porównaniu ze szczepem bezplazmidowym. Obserwowano, że kolonie szczepu z plazmidem R1 wyrastały na płytkach później niż szczepu bezplazmidowego, przy czym różnic tych nie obserwowano po dodaniu glukozy.

Wprowadzenie dodatkowego źródła węgla – glukozy do wody sterylnej powodowało znaczny przyrost komórek u obydwu szczepów do trzeciego dnia trwania doświadczenia, potem następował powolny spadek ich liczebności. Podobne wyniki uzyskali Weislo i Chróst [29] dodając ekstrakt drożdżowy do wody filtrowanej przez filtr < 0,3 μm, wynikiem czego było namnożenie liczby bakterii przez kolejne dni. Dodatek glukozy spowodował, że przeżywalność obydwu szczepów, w okresie badań, była bardzo zbliżona, mimo obciążenia metabolicznego jakim jest plazmid. Można więc przypuszczać, że glukoza wyrównała szanse w przeżywalności obydwu szczepów.

Bouma i Lenski [3] uważają, że koszty metaboliczne utrzymania plazmidu przez komórkę uniemożliwiają niezamierzone rozprzestrzenianie się bakterii w środowisku (zgodnie z teorią „nadmiaru bagażu” – *excess baggage*), wg nich bezpieczne jest nawet rozważne uwolnienie rekombinowanych organizmów do środowiska.

Jakkolwiek otrzymane wyniki potwierdzałyby tę teorię, jednak udzielenie jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy szczep plazmidowy ma szansę przeżycia w środowisku naturalnym, wymaga dalszych badań.

Tabela 1. Liczebność bakteriofagów w wodzie zbiornika Dzierżno Duże w miesiącach październiku i listopadzie  
The numerical force of bacteriophages in the Dzierżno Duże dam-reservoir, in October and November

Fagi specyficzne dla szczepu <i>E. coli</i> Specific phages for <i>E. coli</i>	Stanowiska poboru prób – październik sampling points – October		Stanowiska poboru prób – listopad sampling points – November	
	ujście Kłodnicy do zbiornika estuary of Kłodnica River	3 km od ujścia Kłodnicy 3 km from Kłodnica estuary	ujście Kłodnicy do zbiornika estuary of Kłodnica River	3 km od ujścia Kłodnicy 3 km from Kłodnica estuary
bezplazmidowego no-plasmid	$2,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	$9,2 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$
plazmidowego plasmid present	$2,5 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$

Tabela 2. Liczebność bakteriofagów w 1 i po 20 dniach trwania doświadczenia  
The numerical force of bacteriophages on the first day, and after 20 days of experiment

Fagi specyficzne dla szczepu <i>E. coli</i> Specific phages for <i>E. coli</i>	Ujście Kłodnicy do zbiornika estuary of Kłodnica River		3 km od ujścia Kłodnicy 3 km from Kłodnica estuary	
	w 1 dniu	po 20 dniach	w 1 dniu	po 20 dniach
bezplazmidowego no-plasmid	$9,2 \times 10^9$	$5,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$6 \times 10^5$
z plazmidem R1 plasmid R1 present	$8,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$5 \times 10^4$

## WNIOSKI

1. Bardzo istotną rolę w przeżywalności bakterii w wodzie odgrywają czynniki biotyczne.
2. Drobnoustroje wprowadzone do sterylnego środowiska wodnego mają szansę przetrwania przez jakiś czas, a posiadanie plazmidu R1 nie wpływa na wydłużenie przeżywalności bakterii.
3. Bakterie z plazmidem R1 wprowadzone do sterylnej wody, zachowują ten plazmid.
4. Wprowadzenie dodatkowej ilości węgla do sterylnej wody zwiększa liczebność bakterii, ale nie wydłuża ich przeżywalności.

## LITERATURA

- [1] Barcina I., P. Lebaron, J. Vives-Rego: *Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach*, FEMS Microbiology Ecology, **23**, 1–9 (1997).
- [2] Basalik-Chabielska L., K. Kotełko, T.M. Lachowicz, Z. Lorkiewicz: *Ćwiczenia z mikrobiologii*, PWN, Warszawa 1971.
- [3] Bouma J.E., R.E. Lenski: *Evolution of bacterial plasmid association*, Nature, **335**, 351–352 (1988).
- [4] Cooper T.F., J.A. Heinemann: *Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids*, [in:] Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 97/23, 12643–12648 (2000).
- [5] Davies Ch.M., J.A.H. Long, M. Donald, J. Ashbolt: *Survival of Fecal Organisms in Marine Environments and Freshwater Sediments*, Applied and Environmental Microbiology, **61**, 5, 1888–1896 (1995).
- [6] Devanas M.A., D. Rafaeli-Eshkol, G. Stotzky: *Survival of Plasmid-containing Strains of Escherichia coli in Soil: Effect of Plasmid Size and Nutrients on Survival of Hosts and Maintenance of Plasmid*, Current Microbiology, **13**, 269–277 (1986).

- [7] Garcia-Lara J., J. Martinez, M. Vilamu, J. Vives-Rego: *Effect of previous growth conditions on the starvation-survival of Escherichia coli in seawater*, Journal of General Microbiology, **139**, 1425–1431 (1993).
- [8] Gonzales J.M., E.B. Sherr, B.F. Sherr: *Size - Selective Grazing on Bacteria by Natural Assemblages of Estuarine Flagellates and Ciliates*, Applied and Environmental Microbiology, **56**, 3, 583–589 (1990).
- [9] Gonzales J.M., J. Iriberry, L. Egea, I. Barcina: *Differential Rates of Digestion of Bacteria by Freshwater and Marine Phagotrophic Protozoa*, Applied and Environmental Microbiology, **56**, 6, 1851–1857 (1990).
- [10] Jensen R.B., R. Lurz, K. Gerdes: *Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: Replicon pairing by parC of plasmid R1*, [in:] Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 95/15, 8550–8555 (1998).
- [11] Kołodyński J. *Podstawy bakteriologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego. Wrocław 1998.
- [12] Kostecki M., E. Kowalski, M. Czaplicka, J. Kozłowski, B. Zych, Ł. Rychlewska, M. Korona: *Limnologiczne Badania Zbiornika Zaporowego „Dzierżno Duże” w Rzeczycach Śląskich Gmina Rudziniec – Województwo Śląskie. „Ocena Stopnia Skażenia Środowiska Wodnego i Osadów Dennyh w Aspekcie Procesów Samooczyszczania*, Prace IPIŚ PAN w Zabrze. Raport – maszynopis, Zabrze 2000.
- [13] Kostecki M., A. Smyła, A. Starczewska: *Ocena stanu sanitarnego zbiornika zaporowego Dzierżno Duże*, Archiwum Ochrony Środowiska, 4, 57–73 (2000).
- [14] Kostecki M.: *Zawiesina jako element zanieczyszczeń antropogenicznego ekosystemu wodnego na przykładzie zbiornika zaporowego Dzierżno Duże*, Archiwum Ochrony Środowiska, 4, 75–94 (2000).
- [15] Kotełko K., L. Sedlaczek, T.M. Lachowicz: *Biologia bakterii*, PWN, Warszawa 1977.
- [16] Kozdrój J.: *Przenoszenie bakteryjnych genów w środowisku*, Postępy Mikrobiologii, **35**, 157–175 (1996).
- [17] Malmgren Ch.E., G.H. Wagner, Ch. Ehresmann, B. Ehresmann, P. Romby: *Antisense RNA control of plasmid R1 replication the dominant product of the antisense RNA-m-RNA binding is not a full RNA duplex*, Journal of Biological Chemistry, **19**, 9, 12508–12512 (1997).
- [18] Maniatis T., E.F. Fritsch, J. Sambrook: *Molecular cloning a laboratory manual*, CSH Cloud Spring Harbor Laboratory 1982.
- [19] McDermott P.J., E.A. Winterman, P. Gowland, P.C. Gowland: *Enhanced survival of plasmid containing Escherichia coli in aquatic microcosms*, Word Journal Microbiology & Biotechnology, **13**, 159–161 (1997).
- [20] McDougald S., A. Rice, D. Weichart, S. Kjellerberg: *Nonculturability adaptation or debilitation? FEMS Microbiology Ecology*, 25, 1–9 (1998).
- [21] Parks L.C.: *Handbook of Microbial Media*, CRC Press, New York 1997.
- [22] Pettibone G.W., S.A. Sullivan, M.P. Shiaris: *Comparative Survival of Antibiotic-Resistant and Sensitive Fecal Indicator Bacteria in Estuarine Water*, Applied and Environmental Microbiology, **53**, 6, 1241–1245 (1987).
- [23] Roszak D.B., R.R. Colwell: *Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment*, Microbiological Reviews, **51**, 3, 365–379 (1987).
- [24] Rzętała M.: *Bilans wodny oraz dynamika zmian wybranych zanieczyszczeń zbiornika Dzierżno Duże w warunkach silnej antropopresji*, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2000.
- [25] Schlegel H.: *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa 1996.
- [26] Singleton P.: *Bakterie w biotechnologii i medycynie*, PWN, Warszawa 2000.
- [27] Sobecky P.A., M.A. Schell, M.A. Moran, R.E. Hodson: *Adaptation of Model Genetically Engineered Microorganisms to Lake Water: Growth Rate Enhancements and Plasmid Loss*, Applied and Environmental Microbiology, **58**, 1, 3630–3637 (1992).
- [28] Soderbom F., U. Binnie, M. Masters, E.G. Wagner: *Regulation of plasmid R1: PcnB and Rnase E expedite the decay of the antisense RNA, CopA*, Molecular Microbiology, **26**, 3, 493–504 (1997).
- [29] Weisło R., R.J. Chróst: *Survival of Escherichia coli in Freshwater*, Polish Journal of Environmental Studies, **9**, 3, 215–222 (2000).