

„Zmiany w strukturze taksonomicznej bakterii i genach lekooporności w glebie nawożonej osadem ściekowym - badania wstępne”

Liliana Serwecińska¹, Magdalena Urbaniak^{1,2}, Elżbieta Mierzejewska², Wojciech Tołoczko³

¹ Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii, Polska Akademia Nauk, ul. Tylna 3, 90-364 Łódź

² Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

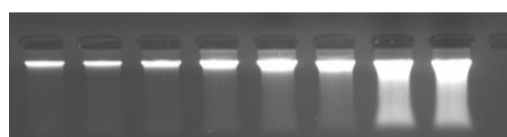
³ Katedra Geografii Fizycznej, Wydział Nauk Geograficznych, Uniwersytet Łódzki, ul. Narutowicza 88, 90-139 Łódź

WSTĘP

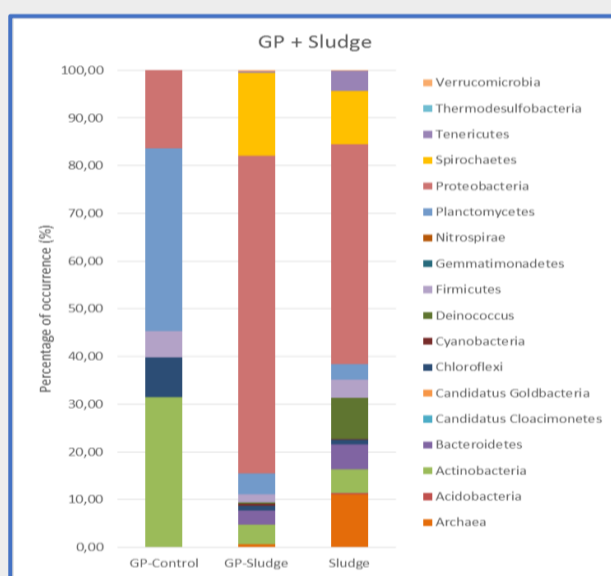
Rosnąca ilość wytwarzanych ścieków i jednocześnie osadów ściekowych sprawia, że zagadnienie prawidłowej gospodarki osadami stanowi ważny element badań środowiskowych. Jedną z zalecanych metod zagospodarowania osadów ściekowych jest wykorzystanie rolnicze, ze względu na obecność w nich biogenów poprawiających plony roślin. Mikroorganizmy glebowe zapewniają prawidłowe funkcjonowanie gleby, a wszelkie zmiany w populacji bakteryjnej mogą wpływać na istotne właściwości gleby, zatem charakterystykę mikrobiomu można wykorzystać jako wskaźnik biologiczny do oceny zmian zachodzących w glebie wzbogaconej osadami. Ponadto liczne badania wykazują, że proces oczyszczania ścieków powoduje wzrost liczby ARB (antibiotic resistant bacteria) i ARG (antibiotic resistant genes), z uwagi na jednoczesną obecność szeregu drobnoustrojów i mieszaniny antybiotyków oraz ich metabolitów w osadzie czynnym. Dlatego osady ściekowe wykorzystywane do nawożenia gleby, mogą stanowić zagrożenie dla środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt.

REZULTATY

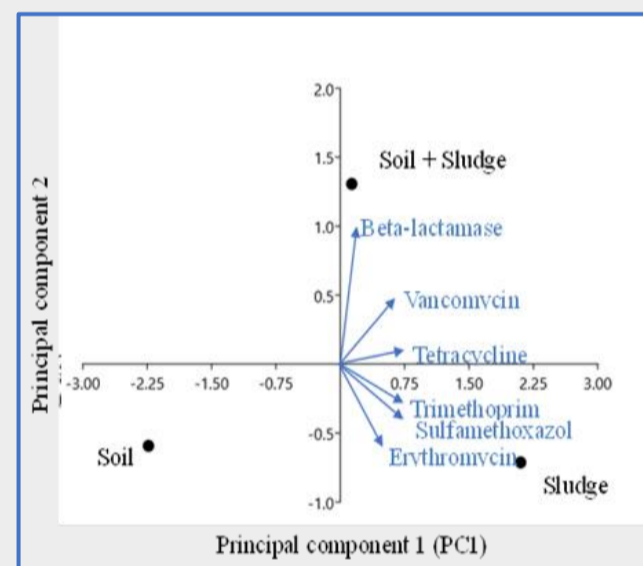
We wstępnych badaniach metagenomowych, stanowiących część szerszego projektu, stwierdzono znaczne zmiany w charakterystyce taksonomicznej gleby nawożonej osadami ściekowymi w porównaniu do próbek kontrolnych. Po upływie 6 tygodni od dodania osadów (w dawce 9 t/ha) utrzymywała się zmieniona struktura taksonomiczna mikrobiomu gleby wzbogaconej w porównaniu do gleby kontrolnej. Stwierdzono znaczny wzrost liczebności Proteobakterii, uważanych za tę grupę mikroorganizmów, wśród której występuje wiele patogenów ludzi i zwierząt. W glebie nawożonej wzrosła też znacznie liczebność Spirochaetes, a także Bacteroidetes będących głównym składnikiem flory jelitowej. Z kolei znacząco zmalała liczebność takich bakterii jak Planctomycetes, Actinobacteria i Chloroflexi, pełniących ważne funkcje biologiczne w środowisku glebowym. Wyniki Analizy Głównych Składowych (PCA) wskazują na różnice w zawartości niektórych genów kodujących oporność na leki antybakteryjne, takie jak tetracyklina, wankomycyna, erytromycyna, β-laktamy, sulfonamidy czy trimetoprim w glebie wzbogaconej osadami w porównaniu do próbki gleby



Ryc.1. DNA izolowane z próbek. (kanały: 1-3 gleba, 4-6 gleba +osad, 7-8 osad)



Ryc.2. Struktura taksonomiczna próbki gleby nawożonej osadem ściekowym – GP-sludge, w porównaniu do próbek kontrolnych (GP-Gleba, Sludge- osad)



Ryc.3. Analiza głównych składowych (PCA) wykazała różnice w zawartości genów kodujących oporność na wybrane grupy antybiotyków w badanych próbkach w porównaniu z kontrolą (gleba nienawożona) (wyniki uzyskane po 6 tygodniach stosowania osadu ściekowego do gleby)

METODY

Eksperyment polowy przeprowadzono w donicach zawierających po 1 kg gleby, którą nawożono osadem ściekowym w dawce 9 ton na hektar (zgodnie z polskimi i europejskimi normami). Próbkę do analiz pobierano na głębokości 10 cm, w czasie 0 i po upływie 6 tygodni, eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach. Izolacje genomowego DNA wykonano według procedury producenta FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Stężenie i czystość DNA oszacowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i absorbancji w ultrafiolecie (Multiscan Sky, Thermo Scientific Inc.). Analizy metagenomowe przeprowadzono według Arango-Argoty i in. 2018, Buckfink i in. 2015, Wood i in. 2014.

LITERATURA

- Arango-Argoty G, Garner E, Pruden A, et al. 2018. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome* 6 (23), 1–15
- Buckfink B, Xie C, Huson DH, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIA-MOND. *Nat. Methods* 12, 59–6
- Wood DE, Salzberg S, Kraken L, 2014. Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.*; 15(3):R46.Epub2014/03/04