

Antybiotykooporność bakterii heterotroficznych jako skutek zanieczyszczenia środowiska

Resistance to antibiotics in heterotrophic bacteria as a result of environmental pollution

Maria Bartoszewicz^{1 (a, b, d)}, Małgorzata Michalska^{1 (a, b)}, Monika Cieszyńska^{2 (a, c, e)}

¹ Gdański Uniwersytet Medyczny, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Zakład Ochrony Środowiska i Higieny Transportu.
Dyrektor Instytutu: dr n. med. W. Nahorski; Kierownik Zakładu: dr hab. K. Zorena

² Gdański Uniwersytet Medyczny, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Zakład Toksykologii Środowiska.
Dyrektor Instytutu: dr n. med. W. Nahorski; Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. chem. L. Wolska

^(a) pobieranie próbek

^(b) analizy mikrobiologiczne

^(c) opracowanie graficzne wykresów i tabel

^(d) przygotowanie publikacji

^(e) redakcja publikacji

STRESZCZENIE

Wstęp. Celem pracy było badanie oporności na wybrane antybiotyki szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis* wyizolowanych z wód dziesięciu potoków płynących w granicach miasta Sopot. **Materiał i metody.** Zbadano 114 szczepów bakterii *E. coli* i 57 szczepów *E. faecalis*. Antybiotykooporność oznaczano metodą dyfuzyjno-krążkową, z zastosowaniem krążków nasączonych antybiotykiem. **Wyniki.** Wyizolowane szczepy bakterii *E. coli* były odporne na działanie chloramfenikolu (21%), cefepimu (51%), tetracykliny (41%), imipenemu (35%), cephazolinu (62%) i gentamycyny (90%). Wyizolowane szczepy bakterii *E. faecalis* były odporne na działanie: erytromycyny (75%) chloramfenikolu (21%) oraz imipenemu (33%). **Wnioski.** Na podstawie wyników badań stwierdzono występowanie w badanych wodach powierzchniowych wieloopornych szczepów bakterii *E. coli* i *E. faecalis*.

Słowa kluczowe: bakterie, antybiotykooporność, wody powierzchniowe

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study was to investigate resistance to selected antibiotics in *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* strains that were isolated from water collected from ten streams within the administrative boundaries of the city of Sopot. **Material and methods.** 114 *E. coli* strains and 57 *E. faecalis* strains were studied. Antibiotic resistance was determined by the disc diffusion method using antibiotic-impregnated discs. **Results.** The isolated *E. coli* strains were resistant to chloramphenicol (21%), cefepime (51%), tetracycline (41%), imipenem (35%), cephazoline (62%) and gentamicin (90%). *E. faecalis* isolates showed resistance to erythromycin (75%), chloramphenicol (21%) and imipenem (33%). The relationship between the level of antibiotic resistance, the origin of water sample and the level of water contamination with *E. coli* and *Enterococcus faecalis* bacteria in the investigated streams was analyzed.

Conclusions. Based on the obtained results, it was determined that multi-drug resistant bacterial strains of *E. coli* and *E. faecalis* are present in the investigated surface waters.

Key words: bacteria, antibiotic resistance, surface waters

Wstęp

Odkrycie antybiotyków to jedno z kluczowych odkryć w dziejach medycyny, a tym samym w dziejach ludzkości. Od tego momentu lekarze otrzymali, po raz pierwszy, skuteczne narzędzie pozwalające zwalczać zakażenia i choroby bakteryjne. Jednak dziesiątki lat stosowania antybiotyków nie tylko w medycynie ale i weterynarii, rolnictwie i hodowli zwierząt doprowadziło do powstania lekoopornych bakterii [1, 2]. Bakterie to organizmy, które z wielką łatwością adaptują się do zmieniających się warunków środowiska. Częścią tych adaptacji jest także możliwość obniżania efektywności działania antybiotyków używanych przeciwko bakteriom. Dzieje się tak ponieważ organizmy te cechuje ogromna plastyczność genetyczna, między innymi mogą one przyjmować geny lub ich fragmenty (ang. MGEs – *Mobile Genetic Elements*) od innych bakterii, tym samym zmieniając swoje cechy. Procesy takie zachodzą zarówno w środowisku naturalnym, jak i w organizmach ludzi i zwierząt, a w ich efekcie pojawiły się odporne na antybiotyki szczepy bakterii. Geny antybiotykkooporności są przekazywane w procesie horyzontalnego transferu genów (ang. HGT – *Horizontal Gen Transfer*) kolejnym pokoleniom bakterii, nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale także pomiędzy różnymi gatunkami bakterii [3, 4]. Jednakże wyniki wielu badań wskazują, że geny oporności są składnikiem genomu wielu bakterii, niezależnie od tego, czy zostały one poddane selekcyjnemu działaniu antybiotyków, czy nie [1, 5].

Niebezpieczeństwo pojawienia się antybiotykkoopornych bakterii najczęściej jest związane z miejscem ich powszechnego stosowania – placówkami służby zdrowia [6]. Istnienie antybiotykkoopornych szczepów bakterii stwarza ogromne problemy terapeutyczne. Oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus* (ang. MRSA *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) jest także oporny na działanie niemal wszystkich znanych antybiotyków. W wyniku czego czas trwania terapii znacznie się wydłuża i wymaga ona stosowania kosztownych antybiotykowych „koktajli” [7]. „Złoty wiek” antybiotyków wydaje się dobiegać końca – o czym świadczy także fakt, że w ciągu ostatnich 40 lat nie pojawiła się żadna nowa klasa antybiotyków przeciwko Gram-ujemnym bakteriom takim jak *Escherichia coli* czy *Salmonella enteritidis* [8].

Do wód powierzchniowych antybiotyki i produkty ich metabolizmu przedostają się razem z odchodami ludzi i zwierząt oraz ze ściekami [9]. W porównaniu do naturalnych, syntetyczne antybiotyki są bardziej odporne na biodegradację, jednak w róż-

nym stopniu jej ulegają. Czas tego procesu, w zależności od antybiotyku, szacuje się w miesiącach [3]. Również oczyszczalnie ścieków przyczyniają się do obniżenia stężenia antybiotyków w ściekach, nie jest to biodegradacja, raczej fotodegradacja [10]. Pomimo to, w wodach i osadach dennych wykrywa się obecność wielu antybiotyków, które mają niewątpliwą wpływ na florę bakteryjną ekosystemów wodnych, są jedną z przyczyn lekooporności bakterii [11].

Bakterie *E. coli*, występują przede wszystkim w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. W związku z tym, powszechna jest także ich obecność w środowisku naturalnym zwłaszcza w wodzie, glebie i na roślinach. Oprócz źródeł naturalnych, rozprzestrzenianie się bakterii *E. coli* w środowisku jest wynikiem oddziaływania ścieków komunalnych odprowadzanych do wód powierzchniowych i gleby [12]. Bakterie *E. coli* w większości zaliczane są do potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi. Jednak w wyniku mutacji oraz wymiany genów powstało kilka szczepów, które mają zdolności chorobotwórcze. Od łagodnie chorobotwórczych, wywołujących jedynie lekkie zakażenia pokarmowe, do zjadliwych, powodujących groźne krwawe biegunki z powikłaniami groźącymi zakażeniem krwi. Tym ostatnim nadano nazwę enterokrwotocznych *E. coli* (ang. EHEC – *enterohemorrhagic Escherichia coli*) [13]. Jak dotychczas opisano dwa takie szczepy: O157:H7, który jako pierwszy wywołał zakażania u ludzi i O104:H4 odpowiedzialny za epidemię zachorowań w Niemczech w 2011 r.

Podobnie jak bakterie *E. coli* – *E. faecalis* stale występują w przewodzie pokarmowym i kale człowieka. Bakterie te mogą łatwo skolonizować błony śluzowe (np. w jamie ustnej), często zakażają rany, mogą wywoływać zapalenia dróg moczowych, pęcherzyka żółciowego czy nawet wsierdzia.

Badania monitoringowe wód powierzchniowych pod kątem oceny ich stanu sanitarnego, polegają na oznaczaniu liczby bakterii – *E. coli* i enterokoków jelitowych, uznanych za wskaźniki zanieczyszczenia pochodzenia fekalnego. Wydaje się, że warto te podstawowe dane uzupełnić o dane odnośnie antybiotykkooporności szczepów *E. coli* i enterokoków jelitowych izolowanych z wód powierzchniowych. W świetle doniesień o zagrożeniach związanych z rozprzestrzenianiem się chorobotwórczych bakterii w środowisku wodnym, w tym także antybiotykkoopornych *E. coli* [14], mogłoby to ułatwiać szacownie ryzyka związanego z obecnością antybiotyków i ich metabolitów w wodzie. Obecność bakterii opornych na antybiotyki może być wskaźnikiem rozprzestrzeniania się w środowisku wodnym zanieczyszczeń

allochtonicznych, przydatnym zwłaszcza w badaniach monitoringowych.

Celem pracy było zbadanie antybiotykooporności szczepów bakterii *E. coli* i enterokoków jelitowych wyizolowanych z wód potoków płynących w granicach miasta Sopotu, które to potoki poddane są silnej antropopresji.

REJON BADAŃ

Badaniami mikrobiologicznymi objęto dziesięć cieków płynących w granicach administracyjnych miasta Sopotu. Było to sześć potoków: Potok Babidolski, Potok Kamienny, Potok Grodowy, Potok Karlikowski, Potok Haffnera, Swelina oraz cztery cieki oznaczone jako C1, C2, C6 i C7. Pierwszych sześć cieków to naturalne wody powierzchniowe, w przeważającej części płynące otwartym korytem. Jedynie ich ujściowe odcinki są ujęte w koryto zamknięte, ujścia tych cieków (z wyjątkiem Sweliny) są wyprowadzone głębokowodnymi kolektorami do Zatoki Gdańskiej. Odległość ujścia kolektorów od linii brzegowej wynosi około 200 m. Wymienione cieki są podłączone do kanalizacji deszczowej, w związku z tym objętość niesionych przez nie wód jest zmienna i zależy od intensywności opadów atmosferycznych. W czasie pogody bezdeszczowej wielkość przepływu ich wód waha się w dość szerokich granicach od około 0,001 do około 1,0 m³/s. Najwięcej wód niosą Potoki Karlikowski, Kamienny i Babidolski (średnio około 0,4 m³/s), mniej Potoki Haffnera, Grodowy i Swelina (średnio około 0,1 m³/s). W czasie deszczu wielkość przepływu może wzrosnąć nawet czterokrotnie w stosunku do średniej rocznej wartości tego parametru.

Cztery pozostałe cieki (C1, C2, C6 i C7) to cieki sztuczne, wybudowane jako kanały deszczowe. Trzy z nich: C1, C6 i C7 w całości płyną w korytach zamkniętych natomiast cieki C2 – tylko w odcinku ujściowym, wszystkie uchodzą do Zatoki Gdańskiej poprzez kolektory głębokowodne. Cieki te w czasie bezdeszczowej pogody charakteryzują się bardzo niskim przepływem (rzędu poniżej 0,001 m³/s), jednak podczas opadów przepływ ten wzrasta niekiedy sześciokrotnie.

Ocena poziomu zanieczyszczenia badanych cieków bakteriami *E. coli* oraz enterokokami jelitowymi

Omawiane cieki ze względu na swoje położenie (w granicach średniej wielkości miasta), są poddane silnej antropopresji. Liczba stałych mieszkańców Sopotu wynosi około 40 tysięcy i szczególnie w lecie

wzrasta wraz z napływem turystów. Sopot jest miastem w większości skanalizowanym, jednak do tej pory nie wszystkie posesje korzystają z ogólnospławnej kanalizacji. Na podstawie wyników badań prowadzonych w latach 1996–2012 można stwierdzić, że liczba bakterii *E. coli* (wyrażona jako NPL/100 ml) w wodach badanych potoków i cieków jest bardzo zmienna i mieści się w granicach od <3 do 23000 jtk (jednostki tworzące kolonie) *E. coli*/100 ml. Analizując wyniki oznaczania średniej rocznej liczby *E. coli* w wodach sopockich potoków i cieków w okresie 1996–2012 można zaobserwować stopniowy spadek liczby tych bakterii. W związku z tym zmniejszało się również ryzyko związane z obecnością zanieczyszczeń typu fekalnego. Poprawa jakości wód cieków jest wynikiem ograniczenia źródeł zanieczyszczenia – przede wszystkim poprzez wyeliminowanie nielegalnych zrzutów ścieków z gospodarstw domowych do kanalizacji deszczowej.

Wyjątkiem są wody Potoku Grodowego i Sweliny, w których liczba bakterii *E. coli* z reguły jest niższa, niż 1000 jtk/100 ml. Wody potoków Kamiennego, Babidolskiego, Haffnera i Karlikowskiego są bardziej zanieczyszczone, w próbkach wody tych potoków niejednokrotnie notowano wartości liczby *E. coli* rzędu 2300 jtk/100 ml, a nawet 23.000 jtk/100 ml.

Poziom zanieczyszczenia bakteriami *E. coli* wód w ciekach C1, C2, C6 i C7 pomyślanych jako odbiorniki wód deszczowych, obciążonych zanieczyszczeniami spłukiwanymi z ulic, charakteryzuje się dużą zmiennością. Najczęściej liczba bakterii *E. coli* przekracza wartość 1000 jtk/100 ml, nierzadko notowano wartości rzędu 23000 jtk/100 ml.

Wody badanych potoków i cieków są także zanieczyszczone enterokokami jelitowymi. Liczba tych bakterii była w badanych wodach niższa w porównaniu do liczby *E. coli*, najczęściej nie przekraczała wartości 400 jtk/100 ml, jednak w wielu przypadkach zwłaszcza w sezonie letnim i wczesno jesiennym ich liczba była wyższa, niż 400 jtk/100 ml.

MATERIAŁ I METODY

Próbki do badań mikrobiologicznych pobierano do sterylnych butelek, które przewożono do laboratorium w izotermicznych pojemnikach. W pobranych próbkach wody oznaczano najbardziej prawdopodobną liczbę bakterii *E. coli* metodą kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń wg PN-ISO 9308-3:2002; oraz liczbę enterokoków jelitowych (paciorkowców jelitowych) w 100 ml badanej próbki wody,

metodą filtracji membranowej z zastosowaniem podłoża stałego Slanetz-Bartley. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24–48 godzin, po czasie inkubacji liczono charakterystyczne kolonie według normy PN-EN ISO 7899-2.

W celu izolacji i dalszej identyfikacji bakterii *E. coli* próbki wody (1 ml) posiewano na podłoże Chromocult coliform Agar (Merck). Bakterie *E. faecalis* do identyfikacji pobierano z hodowli na podłożu Slanetz-Bartley'a (Merck). Typowe kolonie bakterii *E. coli* i *E. faecalis* identyfikowano w oparciu o testy biochemiczne dla *Enterobacteriaceae* API 20 E BioMerieux (ang. analytical profile index).

Badanie lekooporności

Badania antybiotykooporności bakterii prowadzono w okresie od 24.04.2013 do 22.07.2013 roku. Oporność na antybiotyki szczepów heterotroficznych bakterii określano metodą dyfuzyjno-krążkową, z zastosowaniem krążków nasycanych antybiotykiem. Bakterie *E. coli* i *E. faecalis* wyizolowane z wody, były sterylnie umieszczane w bulionie odżywczym. Roztwór był rozcieńczany do uzyskania mętności równej 0,5 w skali McFarlanda, która odpowiada liczbie 10^6 bakterii w 1 ml. Następnie 0,1 ml otrzymanej zawiesiny bakterii wysiewano murawą na podłoże Mullera-Hintona (MHA), na powierzchni podłoża układano bibułowe krążki nasycane antybiotykami. Krążki (o średnicy 6 mm) zostały wyprodukowane przez EMAPOL Sp. z o.o. Gdańsk.

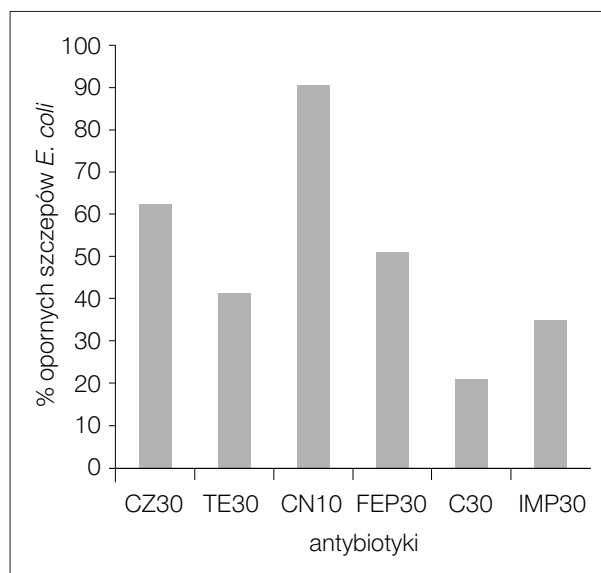
Hodowle w pierwszym etapie pozostawiano na 1 godzinę w temperaturze pokojowej, aby umożliwić dyfuzję antybiotyku z krążków do podłoża, a następnie inkubowano w temperaturze 36°C przez 24 godziny. Po czasie inkubacji mierzono średnicę (w milimetrach) obszaru, w którym wzrost bakterii został zahamowany przez działanie antybiotyków. Oporność badanych bakterii na antybiotyki była określana na podstawie instrukcji opracowanych przez producenta krążków. W badaniach zastosowano następujące antybiotyki: chloramphenikol 30 (C30 – 30,5 mcg/krążek), cefepim 30 (FEP 30 – 30,2 mcg/krążek), erytromycynę 15 (E15 – 15,7 mcg/krążek), gentamycynę 10 (CN 10 – 10,3 mcg/krążek), tetracyklinę 30 (TE 30 – 30,6 mcg/krążek), imipenem 10 (IMP 10 – 10,1 mcg/krążek), cefazolin 30 (CZ 30 – 30,6 mcg/krążek).

Antybiotyki do badań antybiotykooporności bakterii rodzaju *Enterobacteriaceae* wybrano w oparciu o zalecenia zawarte w Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, January 2012 (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) [15].

WYNIKI

Badania antybiotykooporności heterotroficznych bakterii wyizolowanych z wód potoków

Z pobranych próbek wody wyizolowano 114 szczepy *E. coli*, które zostały poddane badaniom antybiotykooporności. Szczepy te wykazywały zróżnicowany poziom oporności na działanie wybranych antybiotyków. Najbardziej odporne były na działanie CN10 – 90,4% (n = 103) wyizolowanych szczepów było opornych na działanie tego antybiotyku. Ponadto zaobserwowano ponad 50% oporność badanych *E. coli* na działanie antybiotyków: CZ30 i FEP 30. Najmniejszą oporność szczepy wykazywały wobec działania C30 – opornych na ten antybiotyk było 21% (n = 24) badanych *E. coli*. Opornych na działanie TE 30 i IMP 10 było odpowiednio 41,2% (n = 47) i 35,1% (n = 40) badanych szczepów *E. coli* (ryc. 1).



Ryc. 1. Porównanie antybiotykooporności szczepów bakterii *E. coli* wyizolowanych z wód badanych cieków

Fig 1. Comparison of antibiotic resistance in *E. coli* strains isolated from water samples from the investigated streams

Oporność wyizolowanych szczepów bakterii *E. coli* różniła się w zależności od potoku, z którego pochodziły próbki wody. Bakterie *E. coli* wyizolowanie z wód Potoków: Babidolskiego, Haffnera, Karlikowskiego, Grodowego oraz cieków C2, C1 i C6 były w 100% odporne na działanie CN10. Najmniejszą (38,5%) oporność na działanie tego antybiotyku wykazywały bakterie *E. coli* wyizolowane z wód Potoku Kamiennego (tab. I). W przypadku pozostałych antybiotyków oporność szczepów bakterii *E. coli* była bardziej zróżnicowana. Na dzia-

łanie CZ30 w 100% odporne były szczepy pochodzące z wód Potoku Karlikowskiego oraz z cieków C1 (odpowiednio: n = 8, n = 11). Najmniejszą oporność na działanie tego antybiotyku wykazywały szczepy pochodzące z Potoku Grodowego i Babidolskiego (40%). Badane *E. coli* wykazywały dużą wrażliwość na działanie C30, odporne na jego działanie były jedynie bakterie pochodzące z wód: cieków C2 (66,7%), Potoku Kamiennego (61,5%) i Potoku Babidolskiego (61,5%) oraz w mniejszym już stopniu z wód Potoku Haffnera (15,4%). Również

w przypadku IMP10 zaobserwowano duże zróżnicowanie oporności badanych *E. coli*, w zależności od miejsca pochodzenia szczepu: szczepy wyizolowane z cieków C2 i C6 były w 100% odporne na działanie tego antybiotyku, a pochodzące z cieków C1 oraz Potoków: Babidolskiego Karlikowskiego, Grodowego i Sweliny – w 100% wrażliwe na jego działanie. W poniższej tabeli zestawiono dane dotyczące oporności bakterii *E. coli* na działanie wybranych antybiotyków, w zależności od miejsca poboru próbek wody.

Tabela I. Oporność na antybiotyki bakterii *E. coli* pochodzących z wód badanych potoków i cieków

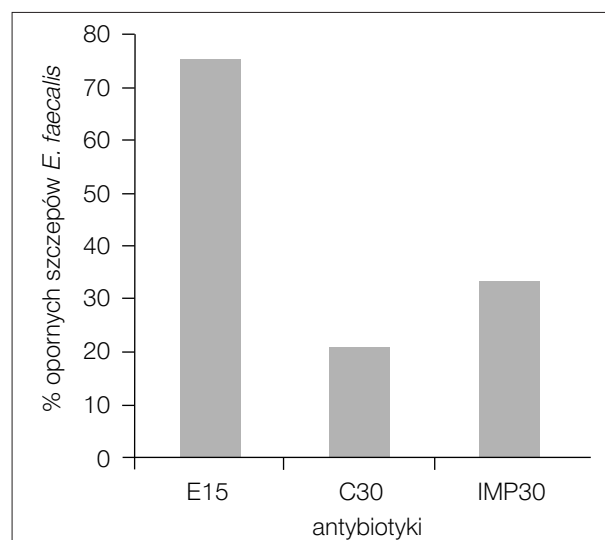
Table I. Resistance to antibiotics in *E. coli* originating from the investigated streams and watercourses

Ciek	Liczba wyizolowanych szczepów <i>E. coli</i>	CZ30		TE30		CN10		FEP30		C30		IMP10	
		n*	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
C2	9	5	55,6	4	44,4	9	100,0	8	88,9	6	66,7	9	100,0
C7	19	15	78,9	5	26,3	17	89,5	9	47,4	0	0,0	17	89,5
KP	13	6	46,2	7	53,8	5	38,5	10	76,9	8	61,5	6	46,2
B	15	6	40,0	2	13,3	15	100,0	6	40,0	8	53,3	0	0,0
H	13	8	61,5	9	69,2	13	100,0	7	53,8	2	15,4	1	7,7
C1	11	11	100,0	3	27,3	11	100,0	4	36,4	0	0,0	0	0,0
KR	8	8	100,0	2	25,0	8	100,0	6	75,0	0	0,0	0	0,0
C6	7	3	42,9	7	100,0	7	100,0	2	28,6	0	0,0	7	100,0
G	10	4	40,0	4	40,0	10	100,0	5	50,0	0	0,0	0	0,0
S	9	5	55,6	4	44,4	8	88,9	1	11,1	0	0,0	0	0,0
Σ	114												

* n – liczba opornych szczepów (number of resistant strains)

Oprócz bakterii *E. coli*, z pobranych próbek wody wyizolowano także 57 szczepów bakterii *E. faecalis*. Szczepy poddano badaniom antybiotykooporności na erytromycynę (E15), cefazolinę (C30) i imipenem (IMP30). Na podstawie zebranych wyników badań stwierdzono, że 75,4% (n = 43) wyizolowanych szczepów *E. faecalis* było opornych na działanie erytromycyny, 33,3% [n = 12] opornych na działanie IMP30 i 21,1% (n = 12) na działanie C30 (ryc. 2).

Podobnie jak w przypadku szczepów bakterii *E. coli* zaobserwowano zróżnicowanie oporności wyizolowanych *Enterococcus faecalis* na działanie antybiotyków, w zależności od miejsca pobierania próbek, co przedstawia tabela II. Wysoką, bo ponad 60% opornością na działanie E15, charakteryzowały się szczepy *E. faecalis* wyizolowane z wód 8 na 10 badanych cieków, jedynie szczepy pochodzące z wód dwóch Potoków, Karlikowskiego i Grodowego, były bardziej wrażliwe na działanie tego antybiotyku – procent opornych szczepów był niższy niż 20% (tab. II).



Ryc. 2. Porównanie antybiotykooporności szczepów bakterii *E. faecalis* wyizolowanych z wód badanych cieków

Fig. 2 Comparison of antibiotic resistance of *E. faecalis* strains isolated from the waters of investigated watercourses

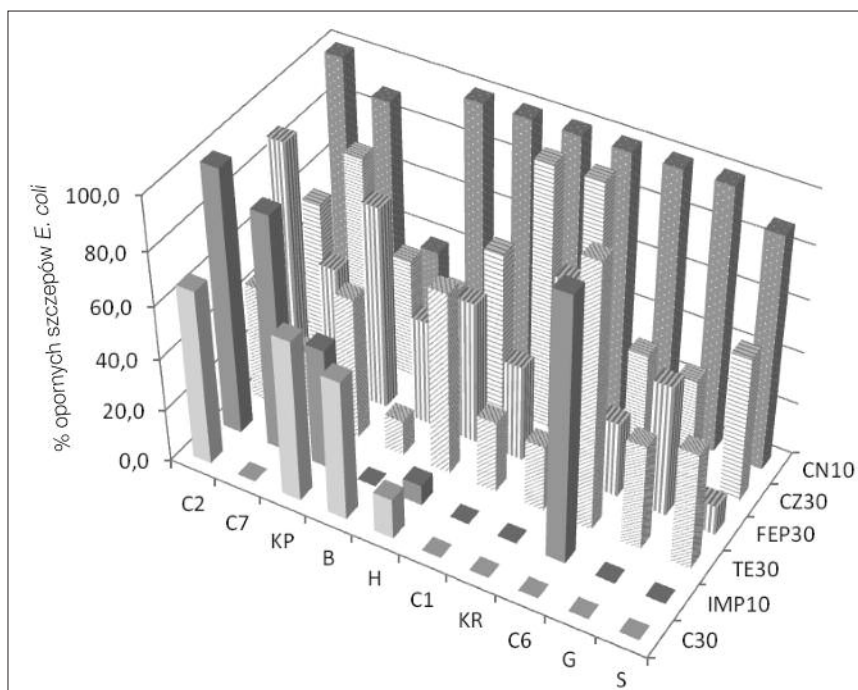
Tabela II. Oporność na antybiotyki bakterii *E. faecalis* pochodzących z wód badanych potoków i ciekówTable II. Antibiotic resistance in *E. faecalis* bacteria originating from the waters of investigated streams and watercourses

Ciek	Liczba wyizolowanych szczepów <i>E. faecalis</i>	E15		C30		IMP30	
		n	%	n	%	n	%
C2	5	4	80,0	3	60,0	2	40,0
C7	6	6	100,0	2	33,3	3	50,0
KP	7	7	100,0	4	57,1	1	14,3
B	6	6	100,0	1	16,7	5	83,3
H	4	4	100,0	2	50,0	0	0,0
C1	5	5	100,0	0	0,0	2	40,0
KR	7	1	14,3	0	0,0	0	0,0
C6	6	5	83,3	0	0,0	1	16,7
G	5	1	20,0	0	0,0	3	60,0
S	6	4	66,7	0	0,0	2	33,3
Σ	57						

Zarówno w przypadku bakterii *E. coli* jak i *E. faecalis*, zaobserwowano zależności w reakcji na działanie poszczególnych antybiotyków. Bakterie *E. coli* które wykazywały wysoką oporność na działanie CN10 gentamycyny, leku z grupy antybiotyków aminoglikozydowych, były najczęściej wrażliwe na działanie C30 antybiotyku z grupy tetracyklin. Mniej wyraźnie, tym niemniej zauważalnie, zaznaczyła się zależność pomiędzy opornością na erytromycynę a wrażliwością na C30 wśród szczepów *E. faecalis* (tab. II i III).

Dane dotyczące różnic w poziomie oporności wyizolowanych szczepów bakterii, w zależności od cieków, z którego pochodziły próbki wody, przedstawia ryc. 3. Szczepy bakterii *E. coli* wyizolowane z wód cieków C2 wykazywały ponad 50% oporność na działanie zastosowanych antybiotyków, wyjątkiem była jedynie niższa, bo 44,4% oporność na działanie TE30. Szczepy wyizolowane z wód Potoku Kamiennego były odporne na działanie wszystkich zastosowanych antybiotyków, z tym, że poziom tej oporności był niższy – maksymalnie 76,9% szczepów było opornych na działanie FEP30. W przypadku cieków C2 zaobserwowano 100% oporność na działanie IMP10 i CN10.

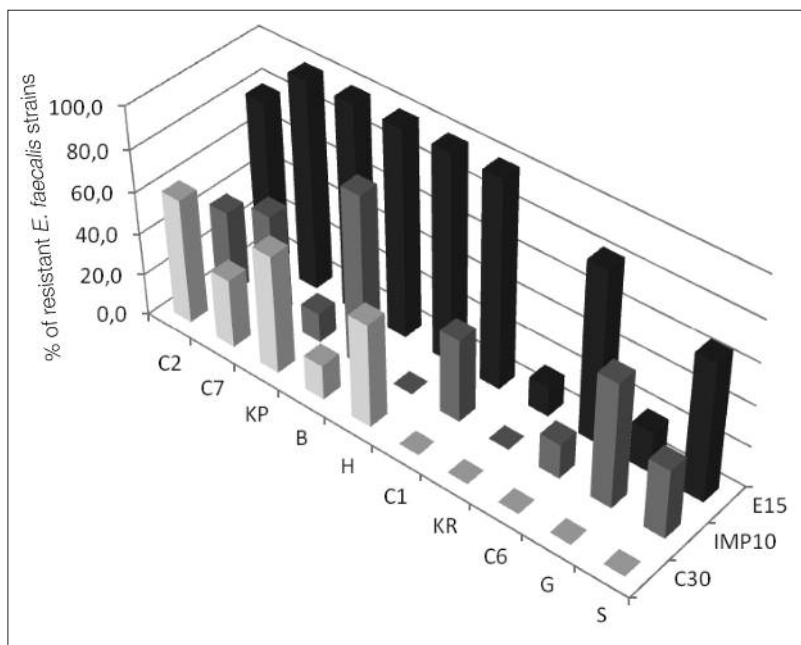
Szczepy wyizolowane z wód cieków C6 były odporne na działanie pięciu z sześciu zastosowanych antybiotyków, jednak wykazywały 100% oporność na działanie aż trzech: TE30, CN10 i IMP10. Najbardziej wrażliwe na działanie antybiotyków były szczepy *E. coli* pochodzące z wód Sweliny, wykazywały oporność w stosunku do jedynie czterech antybiotyków. Poziom tej oporności wahał się od 11% (C30), do 88% (CN10) (ryc. 3).

Ryc. 3. Oporność szczepów bakterii *E. coli* na działanie wybranych antybiotyków w zależności od miejsca pobierania próbek wody [cieku]Fig. 3. Resistance to selected antibiotics in *E. coli* strains in dependence on the water sample location [watercourse]

Szczepy bakterii *E. faecalis* pochodzące w wód cieków C2 i C7 oraz Potoków Babiolskiego i Kamiennego były w różnym stopniu odporne na działanie wszystkich zastosowanych antybiotyków (ryc. 4). Najbardziej wrażliwe na działanie wybranych antybiotyków były szczepy *E. faecalis* wyizolowane z wód Potoku Karlikowskiego – wykazywały jedynie 14% oporność na działanie ery-tromycyny (E15).

Ryc. 4. Oporność szczepów bakterii *E. faecalis* na działanie wybranych antybiotyków w zależności od miejsca pobierania próbek wody

Fig. 4. Resistance to selected antibiotics in *E. faecalis* isolates in dependence on the water sample location [watercourse]



DYSKUSJA

Zanieczyszczenie wód jest zjawiskiem powszechnym. Szczególnie wody powierzchniowe są narażone na wpływ zanieczyszczeń pochodzących z naturalnych i sztucznych źródeł takich jak oczyszczalnie ścieków komunalnych, oczyszczalnie ścieków przemysłowych czy składowiska odpadów. Skutkiem tak silnej antropopresji jest wzrost stężenia komórek bakterii pochodzenia zymogenicznego w wodach powierzchniowych. Szacuje się, że nadal do wód powierzchniowych w Polsce trafia 10% nieczyszczonych ścieków komunalnych i około 30% ścieków oczyszczonych niedostatecznie. Między innymi z tego powodu bakterie ściekowe stały się nieomal stałym składnikiem flory bakteryjnej tych wód. W badaniach mikrobiologicznych wód powierzchniowych główny nacisk kładziony jest na oznaczenie liczby bakterii pochodzenia ściekowego (*E. coli*, enterokoki jelitowe), bo jest to parametr, na podstawie wartości którego szacuje się ryzyko dla zdrowia związane z korzystaniem z zanieczyszczonych wód powierzchniowych. Problem oporności tych bakterii na działanie antybiotyków nie został jeszcze dostatecznie szeroko opisany. Jak wskazują doświadczenia ostatnich lat wzrasta ryzyko chorób wywoływanych przez bakterie dotychczas uważane za jedynie potencjalnie chorobotwórcze. Dobrym przykładem może być tu epidemia spowodowana rozprzestrzenieniem się bakterii *E. coli* OH w Niemczech w 2011 r. Można się spodziewać, że takich przypadków będzie więcej, a to ze względu

na ogromną plastyczność genetyczną bakterii *E. coli*. W takiej sytuacji kwestia antybiotykooporności bakterii *E. coli* nabiera szczególnego znaczenia. W niniejszej pracy próbki wody do badań były pobierane z cieków płynących na terenie administracyjnym Sopotu. Cieki te, ze względu na to, że w dużej części płyną otwartymi korytami oraz są częścią kanalizacji deszczowej, okresowo niosą dużą ilość bakterii fekalnych. Ponadto, cieki te są także narażone na skutki nielegalnych zrzutów ścieków (nadal nie wszystkie posesje Sopotu są podłączone do kanalizacji ogólnospławnej). Niejednokrotnie w miesiącach letnich, gdy liczba mieszkańców miasta ze względu na napływ turystów wzrasta, liczba bakterii *E. coli* w wodach badanych cieków przekraczała wartość 1000 komórek w 100 ml wody. Liczba ta jest jednak znacznie niższa, w porównaniu do liczby bakterii *E. coli* w ściekach oczyszczonych pochodzących z komunalnej oczyszczalni ścieków, szacowanej najczęściej w granicach od 10^4 do 10^6 w 100 ml.

Na podstawie dostępnych danych można stwierdzić, że oporność bakterii heterotroficznych, pochodzących z wód powierzchniowych i ścieków komunalnych na działanie antybiotyków, zmienia się w bardzo szerokich granicach. Dobrym przykładem mogą być dane dotyczące oporności bakterii *E. coli* na działanie TE30 i C30. Da Costa i in. [16] wykazali, że aż 80,7% bakterii *E. coli*, które wyizolowali ze ścieków komunalnych było odporne na działanie tego antybiotyku. Z kolei Pignato i in. [8] stwierdzili, że jedynie 17% szczepów *E. coli*, również pocho-

dzących ze ścieków, było opornych na działanie TE 30. Szczepy *E. coli* zbadane w ramach niniejszej pracy były w około 41% oporne na działanie tego antybiotyku.

Bakterie *E. coli* zbadane w ramach niniejszej pracy były także w 21% oporne na działanie C30. Wrażliwość bakterii *E. coli* na działanie tego antybiotyku wykazywali również Pignato i in. [8], jednak szczepy *E. coli*, które wyizolowali oni ze ścieków oczyszczonych, były bardziej wrażliwe na działanie C30 – opornych na jego działanie było jedynie 0–10% szczepów.

Wyniki badań uzyskane w ramach niniejszej pracy można także porównać z wynikami uzyskanymi przez Mudryka [17], który badał antybiotykooporność bakterii obecnych w piasku plaży w Sopocie (jednak bez identyfikacji do poszczególnych gatunków). Bakterie te były również wrażliwe na działanie chloramfenikolu (C30) – maksymalnie 19,7% szczepów dla porównania 21% szczepów *E. coli* pochodzących z wód sopockich potoków wykazywało oporność na ten antybiotyk. Inaczej wypada porównanie oporności na działanie gentamycyny (CN10). Szczepy wyizolowane przez Mudryka [17] były bardziej wrażliwej na jej działanie – maksymalnie 16,4% było opornych, podczas gdy szczepy *E. coli* przebadane w ramach niniejszej pracy wykazywały aż 90% oporność na działanie tego antybiotyku. Jednak pomimo zróżnicowanych reakcji na działanie antybiotyków, uzyskane wyniki badań potwierdzają występowanie w wodach sopockich potoków bakterii *E. coli* opornych na działanie kilku antybiotyków jednocześnie.

Niejednokrotnie autorzy prac poświęconych zagadnieniu lekooporności bakterii podkreślają zależność tej reakcji od budowy chemicznej stosowanych antybiotyków. Bakterie *E. coli* wyizolowane z wód powierzchniowych Sopotu wykazywały największą oporność na działanie CN10 (90%) i C30 (78,9%). Gentamycyna (CN10) to antybiotyk z grupy aminoglikozydowych, a C30 (chloramfenikol) to antybiotyk należący do amfenikoli. W tym względzie uzyskane wyniki odbiegają od tych uzyskanych przez Mudryka [17], który stwierdził największą oporność badanych bakterii na działanie antybiotyków z grupy beta-laktamowych (głównie penicylin).

Szczepy bakterii *E. coli* badane w ramach niniejszej pracy wykazywały mniejszą oporność na działanie antybiotyków beta-laktamowych – 35% oporność na działanie imipenemu (IMP 10) i 62% na działanie cefazoliny (CZ30). Imipenem (IMP 10) to antybiotyk beta-laktamowy z grupy karbapenemów. Został dopuszczony do obrotu handlowego pod koniec lat osiemdziesiątych (Urząd Rejestracji

Produktów Leczniczych, ADFA). W 2002 roku przebadano 277 szczepów bakterii *E. coli* pochodzących z amerykański rzek [18]. Szczepy te były w 100% wrażliwe na działanie IMP 10. Wykazywały natomiast 28% oporność na działanie chloramfenikolu i 27% oporność na działanie tetracykliny. Nawet ten jeden przykład świadczy o wzroście oporności szczepów *E. coli* na działanie antybiotyków.

Szczepy *E. faecalis* badane w ramach niniejszej pracy, podobnie jak i w przypadku *E. coli*, wykazywały oporność na wszystkie zastosowane w badaniach antybiotyki. Największą na działanie erytromycyny – spośród 57 zbadanych 43 szczepy były oporne na działanie tego antybiotyku co stanowiło 75%. Wysoką bo ponad 66% oporność szczepów *E. faecalis* na działanie erytromycyny potwierdzają także wyniki badań Łuczkiwicz i in. [19]. Wyniki badań prowadzonych w latach wcześniejszych świadczyły o większej wrażliwości *E. faecalis* na działanie erytromycyny. Jedynie 24,8% do 40% szczepów tego gatunku bakterii wyizolowanych ze ścieków z oczyszczalni na terenie Portugalii, było opornych na działanie erytromycyny [3, 5, 6]. *E. faecalis* nadal wykazuje znaczną wrażliwość na działanie chloramfenikolu (C30). Procent opornych szczepów mieścił się w zakresie od 0% do 13,4% w przypadku badań prowadzonych przez da Costa i in. [20], natomiast w niniejszych badaniach takich szczepów było 21%.

WNIOSKI

1. Stan ludzkiego zdrowia, a nawet życie, w dużej mierze zależy od antybiotyków. Jednak nadmierne, czy niedostateczne kontrolowanie ich użycia doprowadziło do wzrostu oporności mikroorganizmów.
2. Stosowane obecnie systemy oczyszczania ścieków nie są w stanie skutecznie dezynfekować tych ścieków.
3. Liczba bakterii przedostających się do wód powierzchniowych jest nadal znaczna.
4. Bakterie antybiotykooporne obecne w wodach powierzchniowych mogą stanowić poważny problem zdrowotny, wywołując schorzenia przewodu pokarmowego i inne. Stąd wynika potrzeba prowadzenia monitoringu jakości wód powierzchniowych, także pod kątem występowania w nich bakterii antybiotykoopornych.

Źródło finansowania: praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na działalność statutową Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

PIŚMIENNICTWO

- Martinez J.L.: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants; *Environ Pollut* 2009; 157: 2893-2902.
- Lobova T.I., Barkhatov J., Salamatina O.V., Popova L.Y.: Multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in the littoral zone of lake Shira as an indicator of human impact on the ecosystem. *Microbiol Res* 2008; 163: 152-160.
- Maheshwari R.: Combating antibiotic resistance in bacteria. *Indian J Microbiol* 2007; 47: 181-183.
- Kowalczyk P., Jankiewicz U.: Metody przenoszenia informacji genetycznej i ich wpływ na zdrowie człowieka. *Borgis – nowa Medycyna* 2013; 3: 124-129.
- Stanton T. B.: A call for antibiotic alternatives research. *Trends in Microbiology*; 2013; Vol. 21; No.3: 111-113.
- Olczak-Pienkowska A., Mazinska B., Ozorowski T., Hryniewicz W.: Hospital antibiotic management in Poland – results of the ABS maturity survey of the ABS International group; *Wien Klin Wochenschr* 2008; 307-311.
- WHO Report: Antimicrobial Resistance; 2014; www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en
- Pignato S., Coniglio M. A., Faro G., Weill F. X., Giammanco G.: Plasmid-mediated multiple antibiotic resistances of *Escherichia coli* in crude and treated wastewaters used in agriculture. *J Water Health* 2009; 251-8: 251-258.
- Huang J.-J., Hu H.-Y., Lu S.-Q., Li Y., Tang F., Lu Y., Wei B.: Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria AT a municipal wastewater treatment plant in China. *Environ International* 2012; 42: 31-36.
- da Silva F.M., Tiago I., Verissimo A., Bonaventura R.A., Nunes O.C., Manaia C.M.: Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 55(2): 322-329.
- Velicu M., Suri R.: Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. *Environ Monit Assess* 2009; 154: 349-359.
- Watkinson A.J., Micalizzi G.R., Bates J.R., Costanzo S.D.: Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Appl Environ Microbiol* 2007; Volume 7; Issue 7: 2224-2229.
- Łebkowska M.: Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Ochrona Środowiska* 2009; Vol. 31; Nr 2: 11-15.
- Baquero F., Martinez J.-L., Canton R.: Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19: 260-265.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute USA 2012; Vol. 32 No. 3.
- da Costa P.M., Vaz-Pires P., Bernardo F.: Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated in wastewater and sludge from poultry slaughterhouse wastewater. *J Environ Health* 2008; 70(7): 40-45.
- Mudryk Z. J.: Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. *Mar Pollut Bull* 2005; 50: 80-86.
- Ash R. J., Iverson J. L.: Antibiotic and Disinfectant Resistant Bacteria in Rivers of the United States. *Emerg Infect Diseases* 2002; 8(7): 713-716.
- Łuczkiwicz A., Jankowska K., Kurlenda J., Olańczuk-Neyman K.: Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from surface water. *Water Sci Technol* 2010; 62.2: 466-473.
- da Costa P. M., Vaz-Pires P., Bernardo F.: Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from inflow, effluent and sludge from municipal water treatment plants. *Water Res* 2006; 40; 1735-1740.

Przytoczone normy:

- PN-ISO9308-3:2002. Jakość wody –Wykrywanie i oznaczanie ilościowe *Escherichia coli* i bakterii grupy coli – Część 3: Zminiaturyzowana metoda wykrywania i oznaczania *E. coli* w wodach powierzchniowych i w ściekach (najbardziej prawdopodobna liczba bakterii)
- PN-EN ISO 7899-2. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe enterokoków kałowych – Część 2: Metoda filtracji membranowej

Adres do korespondencji:

Maria Bartoszewicz
Gdański Uniwersytet Medyczny
Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Zakład Ochrony Środowiska i Higieny Transportu
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3A
tel. +58 349 17 68
mary@gumed.edu.pl