

Agata SIEDLECKA, Katarzyna PIEKARSKA*

METODY HODOWLANE I MOLEKULARNE W BADANIACH ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI W WODZIE WODOCIĄGOWEJ

Woda wodociągowa przeznaczona do spożycia powinna być szczególnie uważnie monitorowana pod względem jakości mikrobiologicznej, gdyż stanowi potencjalne źródło rozprzestrzeniania się chorób czy epidemii. Zjawisko antybiotykooporności mikroorganizmów bytujących w wodzie wodociągowej jest niebezpieczne ze względu na możliwość przekazania determinantów oporności na drobnoustroje patogenne, również już poza systemami oczyszczania i dystrybucji wody, co utrudnia ich unieszkodliwienie, obniżając skuteczność antybiotykoterapii w procesie leczenia. Lekooporność mikroorganizmów zasiedlających systemy oczyszczania i dystrybucji wody powinna być monitorowana m.in. w celu oceny ryzyka rozprzestrzeniania się oporności oraz ustalenia dróg jej przekazywania pomiędzy drobnoustrojami. Przedostanie się lekoopornych bakterii do organizmów ludzi i zwierząt może doprowadzić do poważnych komplikacji zdrowotnych. W badaniach nad opornością mikroorganizmów stosuje się metody hodowlane, oparte na izolacji czystych kultur bakteryjnych i określeniu profili ich oporności oraz metody molekularne, charakteryzujące próbkę pod względem obecności (ilości) sekwencji nukleotydowych kodujących geny warunkujące oporność, również w przypadku mikroorganizmów niezdolnych do wzrostu na pożywkach w warunkach laboratoryjnych. Zakłady oczyszczania i systemy dystrybucji wody mogą przyczynić się do selekcji drobnoustrojów antybiotykoopornych.

1. WSTĘP

Antybiotykooporność jest stosunkowo dobrze poznanym i szeroko opisanym w literaturze zjawiskiem, polegającym na zdolności mikroorganizmów do wykształcania mechanizmów obronnych wobec antybiotyków (chemioterapeutyków), co skutkuje ograniczeniem możliwości walki z niepożądanymi drobnoustrojami. Lekooporność może być dziedziczona przez kolejne pokolenia mikroorganizmów lub przenoszona pomię-

* Politechnika Wroclawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii Sanitarnej i Ekotechniki, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, agata.siedlecka@pwr.edu.pl.

dzy bakteriami należącymi do tego samego lub innych gatunków (w procesie tzw. horyzontalnego transferu genów). Nabycie oporności może być skutkiem przekazania komórce bakteryjnej informacji genetycznej (genu lub zestawu genów) kodujących białka uczestniczące w jednym z wielu mechanizmów opornościowych. Przekazanie genów oporności może odbywać się np. na drodze podziałów komórkowych, koniugacji, transformacji, transdukcji, czy wymianie mobilnych elementów genetycznych (plazmidów, integronów, transpozonów); oporność może być też wynikiem mutacji [6]. Można wyróżnić antybiotykooporność pierwotną i wtórną (nabytą). Odkrycie antybiotykoopornych drobnoustrojów w trudnodostępnych rejonach Ziemi potwierdza znaczenie metabolitów wtórnych dla tzw. lekooporności pierwotnej, niezależnej od ekspozycji bakterii na współczesne wytwory medycyny (leki, antybiotyki) i cywilizacji, powodujących warunki stresu środowiskowego [13].

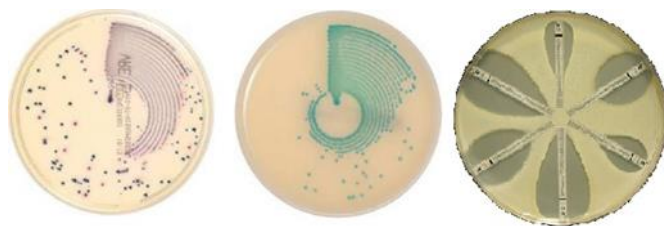
Celem niniejszego opracowania jest scharakteryzowanie metod: hodowlanych i molekularnych, wykorzystywanych do badań antybiotykooporności (obecności antybiotykoopornych mikroorganizmów i genów warunkujących oporność) w próbkach wody wodociągowej oraz określenie powszechności występowania zjawiska oporności i możliwości jej rozprzestrzeniania w systemach dystrybucji wody przeznaczonej do spożycia.

2. METODY BADANIA OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI

Klasyczne metody badania lekooporności mikroorganizmów opierają się na izolacji kultur bakteryjnych i obserwacji wpływu antybiotyku na wyroście kolonie. Wśród podłoży hodowlanych przeznaczonych do identyfikacji lekoopornych szczepów bakteryjnych wyróżnić można podłoża chromogenne: VRE (umożliwiające wykrywanie *Enterococcus faecium* i *E. faecalis* wykazujących nabytą oporność na wankomycynę, rys. 1.), MRSA (umożliwiające wykrywanie metycylino-opornych szczepów *Staphylococcus aureus*, rys 1.) czy ESBL (umożliwiające wykrywanie enterobakterii wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania) [17].

Jedną z najprostszych, a zarazem najpowszechniejszych metod oznaczania lekooporności jest metoda dyfuzyjno-krążkowa (antybiogram) Kirby-Bauer, polegająca na nakładaniu nasączonych znanymi ilościami antybiotyków krążków bibułowych (krążki mogą zostać zastąpione np. tabletkami) i obserwacji stref inhibicji wzrostu mikroorganizmów wokół krążków. Wyniki mogą być odczytywane manualnie, za pomocą linijki czy suwmiarki, a także za pomocą programów do automatycznego odczytu antybiogramów. Lekowrażliwość może być również oznaczana metodą rozcieńczeniową. W celu wyznaczenia MIC (minimalnego stężenia hamującego) stosuje się nasączone gradientem stężeń antybiotyku paski bibułowe i obserwuje stężenie wywołujące inhibicję wzro-

stu. Ponadto, istnieją komercyjne testy (np. paski E-test, rys. 1.) do wykrywania i potwierdzania mechanizmów oporności, takich jak ESBL, AmpC, MBL, KPC, VRE, CARB i innych oraz automatyczne systemy określania lekowrażliwości drobnoustrojów. Antybiogramy mogą być zastępowane np. testami ATB EU (08), umożliwiającymi określanie profilu antybiotykooporności (oporności/wrażliwości szczepów na kilka antybiotyków) [17, 18]. Zastosowanie mogą też znaleźć metody immunologiczne, oparte na wykrywaniu całych komórek lub antygenów bakterii. Coraz częściej zastosowanie znajdują metody molekularne, polegające na detekcji genów warunkujących oporność na dane antybiotyki obecnych w genomach wyizolowanych szczepów lub w postaci wolnego DNA (RNA, białek) w całej objętości próbki środowiskowej.



Rys. 1. Podłoża chromogenne VRE, MRSA, E-Test [17]

3. OZNACZANIE PROFILI ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI MIKROORGANIZMÓW WYIZOLOWANYCH Z WÓD WODOCIĄGOWYCH Z WYKORZYSTANIEM PODŁOŻY HODOWLANYCH

Badanie bezpieczeństwa sanitarnego wody może opierać się na izolacji szczepów bytujących w wodzie wodociągowej i poddaniu ich testowi na antybiotykooporność. Zaobserwowanie oporności może być wskazówką do podjęcia dalszych badań w celu ustalenia źródła i drogi transferu niepożądanych cech.

W pracy Vincenti i in. badano szpitalną wodę wodociągową w celu określenia potencjalnej antybiotykooporności bytujących w niej mikroorganizmów. Próbki wody przefiltrowano na dwóch sączkach celulozowych o średnicy porów 45 μm . Następnie, membrany umieszczono na dwóch pożywkach agarowych: wybiórczej z cetrymidem dla *Pseudomonas aeruginosa* oraz MacConkey dla pozostałych gram-ujemnych bakterii niefermentujących, które poddano inkubacji w 37°C przez 48 h. Za pomocą testów ATB PSE 5 i ATB PSE EU (08) wykazano, iż 100% wyizolowanych szczepów *P. aeruginosa* było opornych na fosfomycynę, zaś spośród pozostałych gram-ujemnych bakterii niefermentujących, wszystkie wyizolowane szczepy *P. fluorescens* były odporne na imipenem. Badanie ograniczono do hodowlanych szczepów gram-ujemnych bakterii niefermentujących, które stanowią tylko część mikroflory wody wodociągowej [13].

W badaniach Subba i in. z próbek wody przeznaczonej do spożycia w Katmandu (Nepal) wyizolowano czyste szczepy *E. coli*, wyodrębniając ponadto szczepy termotolerancyjne (inkubacja w 44,5°C), z których ekstrahowano plazmidowe DNA. Wykazano, iż wszystkie wyizolowane szczepy, zarówno *E. coli* jak i termotolerancyjne *E. coli*, były wrażliwe na ofloksacynę, chloramfenikol i kotrimoksazol, zaś szczepy termotolerancyjne wykazywały zwiększoną oporność na amoksycylinę, amikacynę, cefiksym, kwas nalidyksowy i tetracyklinę. Pozytywne wyniki elektroforezy żelowej plazmidowego DNA korelowały z opornością szczepów na kwas nalidyksowy, co sugeruje możliwość przenoszenia oporności na ten lek na plazmidach. Należy zauważyć, że obecność pałeczek okrężnicy w każdej próbce wody stanowi dowód skażenia wód fekaliami [10].

Z problemem zanieczyszczenia wody przeznaczonej do spożycia bakteriami *E. coli* boryka się też Dhaka (Bangladesz). Wyizolowane przez badaczy szczepy, u których stwierdzono oporność na cefalosporyny, poddano następnie testowi na obecność β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL) za pomocą synergicznego, podwójnego testu krążkowego. W centralnej części pożywki agarowej Mueller-Hinton umieszczono krążek nasączony amoksycyliną (20 μ g) i kwasem klawulanowym (10 μ g), zaś w odległości 15 mm umieszczono krążki z ceftazydymem, cefotaksymem lub aztreonamem w ilości 30 μ g. Wszystkie szczepy wykazujące oporność typu ESBL zostały poddane testowi na obecność genów należących do grupy *bla* za pomocą techniki PCR. Spośród 233 wyizolowanych szczepów 36% wykazywało oporność na trzy lub więcej antybiotyków (tzw. oporność wielolekową), a ponad 9% szczepów wykazało oporność ESBL – wśród nich 90 % posiadało geny *bla*_{CTX-M-15}, 41% geny *bla*_{TEM}, zaś żaden z nich nie posiadał genu *bla*_{SHV} [11].

O plastyczności fenotypów organizmów prokariotycznych świadczyć mogą badania antybiotykooporności *Sphingomonadaceae* wyizolowanych ze szpitalnej wody wodociągowej, w których wykazano, że szczepy należące do tego samego gatunku prezentowały inne fenotypy oporności (głównie w wobec fluorochinolonów, cefalosporyn i sulfamidów) [8].

3.1. TESTY PRZEKAZYWANIA OPORNOŚCI NA PLAZMIDACH

W pracach [11] i [14] badano zjawisko przekazywania oporności na plazmidach. Wykonano testy koniugacji plazmidów R pomiędzy 15 opornymi szczepami wyizolowanymi z próbek wody wodociągowej a laboratoryjnymi szczepami wrażliwymi na antybiotyki. Pomędzy bakteriami uczestniczącymi w procesie następowało samoistne przekazanie plazmidów o masach w przedziale 50–105 MDa, warunkujących oporność na ampicylinę, trimetoprim + sulfametoksazol, ceftriakson i tetracyklinę [11]. Udowodniono ponadto, iż wrażliwe bakterie *E. coli* (laboratoryjny szczep HB 101) są w stanie nabyć przekazywaną na plazmidach oporność na tetracyklinę od szczepów opornych, wyizolowanych z wody wodociągowej [14].

4. METAGENOMICZNE UJĘCIE PROBLEMU ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Ze względu na brak możliwości hodowania w warunkach laboratoryjnych wielu szczepów występujących w próbkach środowiskowych, w tym wody wodociągowej, konwencjonalne metody ich identyfikacji i oznaczania antybiotykooporności, oparte na izolacji szczepów i obserwacji zmian w koloniach bakteryjnych, okazują się niewystarczające. Uzupełnieniem klasycznych antybiogramów czy E-testów może być metagenomika - badanie sekwencji DNA ze wszystkich genomów danego środowiska (z tak zwanych próbek środowiskowych) [2].

Znaczenie metagenomiki uwidacznia eksperyment Bergeron i in. wykorzystujący klasyczne techniki hodowli mikroorganizmów antybiotykoopornych i analizę wolnego DNA obecnego w próbkach wody. Badano wodę surową, oczyszczoną oraz wodociągową (kranową) na obecność antybiotykoopornych bakterii i genów warunkujących oporność. Obecność antybiotykoopornych szczepów (zarówno bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich) stwierdzono jedynie w próbkach wody surowej - po procesie oczyszczania (na który składała się m.in. filtracja) oraz w próbkach wody wodociągowej (po chlorowaniu) nie stwierdzono bakterii grupy coli ani żadnych jtk (jednostek tworzących kolonię) tlenowych bakterii heterotroficznych. Jednocześnie, z próbek wody ekstrahowano DNA i powielono je za pomocą PCR, używając starterów zdefiniowanych dla genów oporności na antybiotyki, takich jak: *mecA*, *ermB*, *sulI*, *tetA*, *tetW*, *tetX* (tab. 1.). Jedynie w próbkach wody surowej stwierdzono obecność poszukiwanych genów (*tetA* i *sulI*). Jednakże, obecność genów 16S rRNA zarówno w próbkach wody po oczyszczeniu w zakładzie, jak i pobranych u końcowych odbiorców, wskazuje na nieskuteczność filtracji w usuwaniu fragmentów DNA (procesy te nie są dedykowane do tych celów). Może to prowadzić do rozprzestrzenienia się zjawiska antybiotykooporności, m.in. na skutek transformacji czy horyzontalnego transferu genów. W rzeczywistości, chlorowanie unieszkodliwia bakterie, przyczyniając się jednocześnie do uwalniania z nich materiału genetycznego, który może przenosić potencjalnie niepożądane cechy na inne, obecne między innymi w rurociągach drobnoustroje [1].

5. DYNAMIKA ZMIAN BIORÓŻNORODNOŚCI I ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI MIKROORGANIZMÓW OD ŹRÓDŁA DO ODBIORCY WODY WODOCIĄGOWEJ

Ciekawym zjawiskiem jest korelacja między opornością na antybiotyki i dezynfektanty. Drobnoustroje antybiotykooporne wykazują obniżoną wrażliwość na proces dezynfekcji, gwarantujący przydatność do spożycia wody wodociągowej. Może to wiązać się z wykorzystywaniem podobnych mechanizmów obronnych (takich jak zmniejszenie

przepuszczalności błony/ściany komórkowej, wytwarzanie otoczek, zastąpienie uszkodzonych szlaków metabolicznych), przekazanych na plazmidach typu R. Lekooporne drobnoustroje są też znajdowane w wodach podziemnych, powszechnie (mylnie) uznawanych za wolne od zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Ponadto, lekooporność mikroorganizmów wyizolowanych z wody wodociągowej idzie w parze z obniżoną wrażliwością na metale dwuwartościowe [5].

Już w 2009 roku w pracy Xi i in. stwierdzono znaczną rozbieżność pomiędzy obniżeniem liczebności heterotroficznych bakterii w procesie uzdatniania wody (odpowiednio $9,9 \cdot 10^6$ jtk/100 ml wody przed oczyszczaniem i 68 jtk/100 ml wody po procesie) a zmniejszeniem ilości 16S rRNA ($3,4 \cdot 10^7$ kopii/100 ml wody przed oczyszczaniem i $1,6 \cdot 10^6$ kopii/100 ml wody po procesie), co świadczy o skutecznej dezaktywacji komórek bakteryjnych, ale nie o ich usunięciu z wody. Ponadto, w przypadku testowanej oporności na amoksycylinę, chloramfenikol, gentamycynę i rifampicynę stwierdzono znaczny wzrost oporności szczepów obecnych w uzdatnionej wodzie w porównaniu do wody surowej. Zaobserwowano też namnażanie bakterii w systemie dystrybucji wody. Autorzy zasugerowali, iż dezynfekcja monochloraminami, podobnie do dezynfekcji chlorem, może sprzyjać selekcji szczepów opornych - zastąpienie chlorowania monochloraminami nie zniweluje zatem problemu oporności bakterii występujących w wodzie wodociągowej [15].

Farkas i in. założyli, iż potencjalnym źródłem determinantów antybiotykooporności w wodzie wodociągowej jest biofilm tworzący się w zakładach oczyszczania wody. Aby zweryfikować tę hipotezę dla konkretnego wodociągu, w pracy [3] badano obecność integronów klasy 1., ze szczególnym uwzględnieniem genów: integrazy *intI*, warunkujących oporność na czwartorzędowe związki amoniowe *qacE* (i *qacEΔI*) i warunkujących oporność na sulfonamidy *sulI*, a także modułów transpozonowych *tni* w koloniach zasiedlających biofilm pobrany z zakładu oczyszczania wody w Cluj (Rumunia). Próbkę biofilmu zostały pobrane z osadnika oraz piasku filtracyjnego, a bakterie wchodzące w ich skład hodowane na różnych pożywkach wybiórczych i identyfikowane za pomocą testów API. W celu amplifikacji genów specyficznych dla integronów klasy 1. wykonano kolonijny PCR, wykorzystując zawiesinę czystych kultur bakteryjnych w sterylnej wodzie, o stężeniu 10^6 jtk/ml, jako matrycy DNA. Produkty PCR sekwencjonowano metodą Sangera; sekwencjonowano również geny 16S rRNA kolonii, u których stwierdzono obecność poszukiwanych genów integronów 1. klasy, w celu potwierdzenia ich przynależności gatunkowej. Stwierdzono obecność genów integrazy, oporności na czwartorzędowe związki amoniowe (z reguły geny należące do grupy *qacE* powiązane są z integronami; wykrycie sekwencji *qacE* w środowiskowym szczepie *P. fragi* nieposiadającym genów integrazy wskazuje na wysoki stopień rekombinacji i plastyczność materiału genetycznego bakterii zasiedlających biofilm) oraz oporności na sulfonamidy. Obecność genów charakterystycznych dla integronów klasy 1., sprzężonych z genami warunkującymi oporność na antybiotyki w koloniach bakteryjnych

biofilmu obecnego w zakładach oczyszczania wody może prowadzić do transferu oporności na organizmy bytujące w wodzie wodociągowej [3].

Informacja na temat dróg transferu oporności dostarczyć może porównanie dynamiki zmian bioróżnorodności i profili antybiotykooporności. W badaniu bioróżnorodności antybiotykoopornych drobnoustrojów oraz obecności genów warunkujących oporność w wodzie wodociągowej wykonanym przez Shi i in. posłużono się wysokowydajnym sekwencjonowaniem i ilościową PCR w czasie rzeczywistym (wykorzystując SYBR Premix jako znacznik). Stwierdzono, iż bioróżnorodność mikroorganizmów ulegała zmianom na różnych etapach oczyszczania wody. Izolując mikroorganizmy wykazano, iż w wodzie poddanej filtracji dominowały szczepy z rodzaju *Escherichia*, zaś po dezynfekcji chlorem – z rodzaju *Pseudomonas* (ich względna liczebność zwiększyła się w miarę przepływu wody przez rurociąg - od zakładu do miejsca poboru – z 27,8 % do 63,0%). Jednocześnie wzrosła oporność bakterii na antybiotyki: chloramfenikol, trimetoprym, cefalotynę (nawet 4,8-krotnie w wodzie wodociągowej w porównaniu do poddanej filtracji), ampicylinę i tetracyklinę. Badanie metagenomiczne potwierdziło wyraźne zmiany bioróżnorodności prokariotów bytujących w wodzie na różnych etapach oczyszczania / przesyłu, w tym wzrastającą przewagę *Pseudomonas* w wodzie poddanej dezynfekcji. Analiza wykonana techniką qPCR potwierdziła wzrost liczebności genów warunkujących oporność w próbkach po dezynfekcji, w stosunku do wody poddanej filtracji, przy jednoczesnym spadku ich liczebności w wodzie wodociągowej (liczebność genów odnoszono do ilości 16S rRNA obecnego w próbce). Podobną tendencję zauważono w badaniach metagenomicznych; stwierdzono ponadto, że przeważały geny warunkujące oporność na β -laktamy. Pewna rozbieżność zaobserwowana między wynikami uzyskanymi dla izolowanych szczepów, a sekwencjami genów oporności próbek środowiskowego DNA może wynikać z faktu niezdolności wielu szczepów do namnażania się w warunkach laboratoryjnych, różnic fenotypowo-genotypowych (posiadanie genów oporności nie musi oznaczać ich ekspresji i faktycznej oporności drobnoustrojów) oraz różnorodności sekwencji nukleotydowych (poznano tylko niektóre geny warunkujące oporność). Dezynfekcja chlorem stanowi jeden z czynników stresu środowiskowego, który może powodować odpowiedź bakterii przejawiającą się w replikacji plazmidowego DNA, co prowadzi w konsekwencji do zwiększenia liczby kopii genów warunkujących oporność wykrywanych w analizach qPCR [9].

W badaniach Vaz-Moreira i in. do izolacji i identyfikacji mikroorganizmów bytujących w wodzie wodociągowej należących do rodzaju *Pseudomonas spp.* zastosowano techniki hodowli na wybiórczych pożywkach oraz screening z wykorzystaniem specyficznych dla *Pseudomonas* starterów Ps-F i Ps-R. Z próbek pochodzących z zakładu oczyszczania wody, systemu dystrybucji wody i wody wodociągowej pobranych u odbiorców wyizolowano łącznie 95 szczepów należących do *Pseudomonas spp.*. Wszystkie poddano testowi na antybiotykooporność ATB PSE EU (08) oraz metodzie dyfuzyjno-krażkowej (dla kwasu nalidyksynowego, cefalotyny, tetracykliny

i streptomycyny). Stwierdzono pojawienie się oporności na streptomycynę i rifampicynę w wodzie wodociągowej (oporności tej nie wykryto w próbkach wody z zakładu i systemu dystrybucji). Zaobserwowano też znaczny wzrost oporności na fosfomicynę i kwas nalidyksowy, przy jednoczesnym zaniku oporności na ceftazydym. Sugeruje to istotne znaczenie nie tylko poziomego transferu genów, ale i przekazywania cech oporności w kolejnych pokoleniach mikroorganizmów namnażających się w rurociągach, w wodzie poddanej dezynfekcji. Nie wykluczono również możliwości przedostania się innych bakterii (posiadających cechy oporności na antybiotyki) ze środowiska do rurociągów [14]. Podobne obserwacje poczyniono wobec *Acinetobacter spp.*, porównując bioróżnorodność i rozprzestrzenienie gatunków należących do tego rodzaju w próbkach wody pobranych bezpośrednio z zakładu oczyszczania i systemu dystrybucji; wykluczono jednak występowanie tzw. efektu założyciela (odbudowania populacji z niewielkiej liczby osobników założycielskich, skutkującego m.in. ograniczeniem zmienności genetycznej nowopowstałej populacji) [7].

6. METODY I STANDARDY OZNACZANIA ANTYBIOTYKOOPORNOŚCI

Zasady przeprowadzania testów na antybiotykooporność oraz interpretacji wyników są regulowane wytycznymi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) oraz Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Bazy danych EUCAST zawierają informacje dotyczące wnioskowania o wrażliwości (S), średniej wrażliwości (I) i oporności (R) szczepów, szacowania oporności na inne (nieprzebadane) antybiotyki na podstawie uzyskanego profilu oporności, a także dolne granice stref zahamowania wzrostu. Mikroorganizmy wrażliwe na antybiotyki bywają nazywane drobnoustrojami typu dzikiego, o ile w teście dyfuzyjno-krażkowym średnice stref ich inhibicji nie przekraczają określonych wartości, podanych w mm. Jest to tzw. dolna granica strefy zahamowania ECOFF (z ang. *epidemiological cutoff*). Zgodnie z definicją EUCAST, organizm jest uznawany za typ dziki, jeśli nie wykazuje nabytej (również w wyniku mutacji) oporności na antybiotyki [7, 19].

Mimo, iż przytoczone eksperymenty były projektowane do weryfikacji różnych hipotez, pewne etapy badań i zastosowane techniki wielokrotnie się powtarzały. Pobrane próbki wody były transportowane i przechowywane w temperaturze 4°C [1, 4], następnie poddawane wirowaniu (w celu ekstrakcji DNA) [1] lub filtracji przez sterylne, celulozowe membrany o średnicy porów 45 µm (w celu inokulacji podłoży hodowlanych i hodowli drobnoustrojów) [7–9, 13] i ekstrakcji DNA [10].

Antybiotykooporność oznaczano za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej [1, 7, 9–11, 14] oraz testów ATB EU (08) [8, 13, 14]. Z reguły, mianem wieloopornych określano te szczepy, które wykazywały oporność na substancje należące do przynajmniej trzech klas antybiotyków, przy czym nie uwzględniano oporności pierwotnej.

Geny oporności wykrywano za pomocą techniki PCR [3, 11] lub (ilościowo) real-time PCR [4, 9], zarówno z wyhodowanych na podłożach czystych kolonii i próbek środowiskowych (podejście metagenomiczne) [1, 9, 15].

Badanie zjawiska transformacji DNA przez laboratoryjne, wrażliwe szczepy polegało na ich łączonej hodowli ze szczepami opornymi wyizolowanymi z wody [11, 14]. Po procesie koniugacji zastosowano test dyfuzyjno-krażkowy oraz alkaliczną ekstrakcję plazmidowego DNA [11] oraz hodowlę populacji bakteryjnych na podłożach z antybiotykiem w celu selekcji transkoniugantów (komórek, które nabyły plazmidy wraz z genami oporności) [14].

W tabeli 1. przedstawiono niektóre z wykorzystanych w analizach molekularnych genowe determinanty oporności na antybiotyki, kodowane przez nie mechanizmy oporności, ich sekwencje nukleotydowe oraz ich długość i temperaturę annealingu. Zestawienie hipotez stawianych przez badaczy, zastosowanych technik badawczych oraz uzyskanych wyników i wniosków przedstawia tabela 2.

Tabela 1. Wybrane geny warunkujące oporność, mechanizm przez nie kodowany, sekwencja starterów wykorzystywanych w technice PCR, długość sekwencji nukleotydowej genu oraz temperatura annealingu PCR [1, 11]

Gen oporności	Mechanizm oporności	Sekwencja starterów 5'-->3'	Dł. sek. [bp]	Temp. ann. [°C]
<i>erm(B)</i>	ochrona rybosomu	F: GATACCGTTTACGAAATTGG R: GAATCGAGACTTGAGTGTGC	364	58
<i>sulI</i>	modyfikacje enzymatyczne	F: CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG R: TTGCCGATCGCGTGAAGT	67	60
<i>tet(A)</i>	pompa mikrobiologiczna	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	60
<i>tet(W)</i>	ochrona rybosomu	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	60
<i>tet(X)</i>	modyfikacje enzymatyczne	F: AGCCTTACCAATGGGTGTAAG R: TTCTTACCTTGGACATCCCG	278	60
<i>mec(A)</i>	białko wiążące β -laktamy	F: ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT R: TACGCGATATCTAACTTTCCTA	163	60
<i>bla_{TEM}</i>	geny ESBL	F: TCGGGGAAATGTGCGCG R: TGCTTAATCAGTGAGGACCC	850	57
<i>bla_{SHV}</i>	geny ESBL	F: CACTCAAGGATGTATTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	861	57
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	geny ESBL	F: CACACGTGGAATTTAGGGACT R: GCCGTCTAAGGCGATAAACA	996	56

Tabela 2. Metody badawcze zastosowane w oznaczaniu antybiotykooporności mikroorganizmów bytujących w wodach wodociągowych

Cel / hipoteza	Zastosowane metody badawcze	Wyniki / wnioski	Źródło
obecność mikroorganizmów antybiotykoopornych oraz genów oporności w wodzie surowej, po oczyszczeniu i wodociągowej	metoda dyfuzyjno-krażkowa; PCR DNA środowiskowego	brak opornych mikroorganizmów i genów oporności w wodzie po oczyszczeniu i wodociągowej	[1]
obecność integronów klasy 1. w biofilmie ZOW	kolonijny PCR	8,33 % bakterii posiadało integrony klasy 1.	[3]
korelacja między genami oporności a obecnością antybiotyków w wodach powierzchniowych	qPCR	korelacja potwierdzona dla tetracykliny i sulfonamidów	[4]
oznaczenie typów dzikich i mutantów wśród <i>Acinetobacter spp.</i> z ZOW i wody wodociągowej	metoda dyfuzyjno-krażkowa	80 % wyizolowanych szczepów stanowiło typy dzikie	[7]
wpływ chlorowania na antybiotykooporność	metoda dyfuzyjno-krażkowa; qPCR DNA środowiskowego	selekcja mikroorganizmów opornych po dezynfekcji chlorem	[9]
plazmidy <i>E. coli</i> jako wektory oporności na inne patogeny	metoda dyfuzyjno-krażkowa; PCR plazmidowego DNA; ekstrakcja alkaliczna plazmidowego DNA	możliwość przenoszenia oporności na kwas nalidysowy na plazmidach	[10]
plazmidy <i>E. coli</i> jako wektory oporności na inne patogeny	metoda dyfuzyjno-krażkowa; PCR; ekstrakcja alkaliczna plazmidowego DNA	potwierdzenie przenoszenia oporności wielolekowej na plazmidach	[11]
<i>Pseudomonas spp.</i> jako rezerwuar antybiotykooporności w wodach wodociągowych	testy ATB EU (08)	stosunkowo niewielka oporność, ale możliwość rozprzestrzeniania genów oporności (pionowy transfer)	[12]
antybiotykooporność bakterii gram-ujemnych, niefermentujących wyizolowanych ze szpitalnej wody wodociągowej	ATB EU (08)	100 % wyizolowanych <i>P. areuginosa</i> opornych na fosfomicynę, 100 % <i>P. fluorescens</i> opornych na imipenem	[13]
plazmidy <i>E. coli</i> jako wektory oporności na inne patogeny	hodowla na podłożu z antybiotykiem; ekstrakcja plazmidowego DNA lizozymem i SDS	potwierdzenie przenoszenia oporności na tetracyklinę na plazmidach	[14]
obecność mikroorganizmów antybiotykoopornych oraz genów oporności w wodzie surowej, po oczyszczeniu i wodociągowej	podłoża hodowlane z antybiotykami; qPCR DNA środowiskowego	selekcja mikroorganizmów opornych po dezynfekcji monochloraminami	[15]

7. PODSUMOWANIE

Zjawisko antybiotykooporności mikroorganizmów występujących w wodzie wodociągowej jest wynikiem obiegu genów warunkujących oporność, obecnych między innymi w ściekach bytowo-gospodarczych, przedostających się następnie do wód powierzchniowych i podziemnych, a stamtąd ujmowanych do zakładów oczyszczania wód. Na rozpowszechnianie genów oporności znaczny wpływ ma przedostawanie się antybiotyków (głównie wraz z niewystarczająco dokładnie oczyszczonymi ściekami) do środowiska. Niskie stężenia medykamentów w wodach powierzchniowych są niegroźne dla drobnoustrojów, przyczyniając się jednocześnie do wykształcenia mechanizmów oporności. Mikroorganizmy bytujące w środowisku mają ponadto czas na przekazanie sobie informacji genetycznej niosącej potencjalną oporność. Zależność między obecnością antybiotyków i genów warunkujących na nie oporność wykazano m. in. w badaniach Jiang i in. [4].

Dotychczas, zakłady oczyszczania wody koncentrowały się na mikrobiologicznych wskaźnikach jakości wody, opierających się na obecności organizmów wskaźnikowych w badanych próbkach. Jednakże, niemniej ważne wydają się być śladowe ilości antybiotyków, szczepy wykazujące oporność na antybiotyki, czy geny warunkujące oporność [1]. Na przykład, geny *tetO* i *tetW*, warunkujące oporność na tetracyklinę, mogą świadczyć o zanieczyszczeniu wody fekaliami [15]. Warto zauważyć, iż techniki membranowe mogą okazać się nieskuteczne w próbach usuwania drobnoustrojów antybiotykoopornych ze względu na zjawisko deformacji ściany komórkowej szczepów opornych, umożliwiające przechodzenie takich komórek przez pory membrany [5]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, zakłady oczyszczania wody i oczyszczalnie ścieków obniżają zawartość bakterii, ale przyczyniają się do selekcji mikroorganizmów opornych, zdolnych do wykształcenia mechanizmów obronnych – a zatem do rozprzestrzeniania się zjawiska oporności na inne drobnoustroje.

Podjęcie metagenomiczne pozwala znacznie rozszerzyć zakres analiz i uzupełnić obraz antybiotykooporności szczepów zasiedlających wody wodociągowe; należy jednak pamiętać, że sama obecność genów w próbce nie jest dowodem na fenotypową oporność i wirulencję niehodowlanych szczepów. Ponadto, uzyskana liczebność sekwencji kodujących białka mechanizmów oporności powinna być odnieszona do liczebności sekwencji 16S rRNA - tylko wówczas wyniki przedstawiają realny obraz oporności w odniesieniu do całkowitej populacji mikroorganizmów zasiedlających daną próbkę.

Ograniczając skuteczność dostępnych na rynku farmaceutyków, lekooporność może stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi i zwierząt [16]. Z tego względu monitoringowi mikrobiologicznemu, ze szczególnym uwzględnieniem antybiotykooporności, powinny zostać poddane systemy dystrybucji wody przeznaczonej do spożycia. Obecność mikroorganizmów antybiotykoopornych w wodzie wodociągowej stanowi poważne ryzyko rozprzestrzenienia się oporności na inne, patogenne

drobnoustroje. Woda wodociągowa określana jest w literaturze mianem "rezerwuaru" genów oporności. Przekazanie determinantów oporności może odbyć się już poza systemem dystrybucji wody wodociągowej, zatem stwierdzenie mikrobiologicznej przydatności wody do spożycia nie usprawiedliwia zaniechania monitoringu antybiotykooporności.

Praca zrealizowana w ramach zlecenia statutowego S50-549.

LITERATURA

- [1] BERGERON S., BOOPATHY R., NATHANIEL R., CORBIN A., LAFLEUR G., *Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, Vol. 102, 370–374.
- [2] BROWN T.A., *Genomy*, PWN, Warszawa 2013, 237.
- [3] FARKAS A., BUTIUC-KEUL A., CIATARAS D., NEAMTU C., CRACIUNAS C., PODAR D., DRAGAN-BULARDA M., *Microbiological contamination and resistance genes in biofilms occurring during the drinking water treatment process*, Science of the Total Environment, 2013, Vol. 443, 932–938.
- [4] JIANG L., HU X., XU T., ZHANG H., SHENG D., YIN D., *Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China*, Science of the Total Environment, 2013, Vol. 458–460, 267–272.
- [5] ŁEBKOWSKA M., *Występowanie bakterii antybiotykoopornych w wodzie przeznaczonyj do spożycia przez ludzi*, Ochrona Środowiska, 2009, Vol. 31, No. 2, 11–15.
- [6] MARKIEWICZ Z., KWIATKOWSKI Z.A., *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*, PWN, Warszawa 2008, 97–192.
- [7] NARCISO-DA-ROCHA C., VAZ-MOREIRA I., SVENSSON-STADLER L., MOORE E.R.B., MANAIA C.M., *Diversity and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. in water from the source to the tap*, Applied Microbial and Cell Physiology, 2013, Vol. 97, 329–340.
- [8] NARCISO-DA-ROCHA C., VAZ-MOREIRA I., MANAIA C.M., *Genotypic diversity and antibiotic resistance in Sphingomonadaceae isolated from hospital tap water*, Science of the Total Environment, 2014, Vol. 466–467, 127–135.
- [9] SHIP., JIA S., ZHANG X.-X., ZHANG T., CHENG S., LI A., *Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water*, Water Research, 2013, Vol. 47, 111–120.
- [10] SUBBA P., JOSHI D.R., BHATTA D.R., *Antibiotic Resistance Pattern and Plasmid Profiling of Thermotolerant Escherichia coli Isolates in Drinking Water*, Journal of Nepal Health Research Council, 2013, Vol. 11, No. 1/23, 44–48.
- [11] TALUKDAR P.K., RAHMAN M., RAHMNAN M., NABI A., ISLAM Z., HOQUE M.M., ENDTZ H.P., ISLAM M.A., *Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of Escherichia coli Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh*, PLoS ONE, 2013, Vol. 8, No. 4, 1–8.
- [12] VAZ-MOREIRA I., NUNES O.C., MANAIA C.M., *Diversity and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from drinking water*, Science of the Total Environment, 2012, Vol. 426, 366–374.
- [13] VINCENTI S., QUARANTA G., DE MEO C., BRUNO S., FICARRA M.G., CAROVILLANO S., RICCIARDI W., LAURENTI P., *Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: Prevalence and distribution of antibiotic resistant strains*, Science of the Total Environment, 2014, Vol. 499, 47–54.

- [14] WALIA S.K., KAISER A., PARKASH M., CHAUDHRY R., *Self-Transmissible Antibiotic Resistance to Ampicillin, Streptomycin, and Tetracyclin Found in Escherichia coli Isolates from Contaminated Drinking Water*, Journal of Environmental Science and Health, 2004, Vol. 39, No. 3, 651–662.
- [15] XI C., ZHANG Y., MARRS C.F., YE W., SIMON C., FOXMAN B., NRIAGU J., *Prevalence of Antibiotic Resistance in Drinking Water Treatment and Distribution Systems*, Applied and Environmental Microbiology, 2009, Vol. 75, No. 17, 5714–5718.
- [16] www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx.
- [17] www.biomerieux.pl/.
- [18] www.emapol.com.pl/.
- [19] www.eucast.org/.

THE CULTURE-DEPENDENT AND MOLECULAR METHODS IN ANTIBIOTIC RESISTANCE STUDIES OF TAP WATER

Drinking water should be especially carefully monitored in respect of microbiological quality, because it is a potential source of diseases and epidemics. Antibiotic resistance of microorganisms dwelling in tap water is a dangerous phenomenon, because there is a possibility of transmission of resistance determinants to pathogenic microorganisms, also outside the treatment and distribution systems of water, what impedes antibiotic therapy in a treatment process. Antimicrobial resistance of microorganisms dwelling in the water treatment and distribution systems should be monitored i.a. in order to assess the risk of prevalence of resistance and evaluate the ways of transmission of resistance among bacteria. The penetration of antibiotic-resistant bacteria into human and animal organisms could lead to health complications. The methods used in the antibiotic resistance studies include: the culture-dependent methods, based on the isolation of pure bacterial cultures and their resistance-patterns assessments and the molecular methods for characterizing the sample in respect of presence (quantity) of nucleotide sequences coding for resistance genes, also in the case of non-cultivable bacteria. Water treatment plants and distribution systems could contribute to the selection of antibiotic-resistant bacteria.