

Wojciech BARAN¹, Ewa ADAMEK¹ i Andrzej SOBCZAK²

OCENA WRAŻLIWOŚCI MIKROORGANIZMÓW ŚRODOWISKOWYCH NA ANTYBIOTYKI Z WYKORZYSTANIEM TESTÓW PŁYTKOWYCH

ASSESSMENT OF SENSITIVITY OF ENVIRONMENTAL MICROORGANISMS TO ANTIBIOTICS USING THE PLATELET ASSAYS

Abstrakt: Ogromna konsumpcja antybiotyków wynikająca z ich powszechnego, globalnego zastosowania zarówno w farmakoterapii, jak i w hodowli zwierząt przyczyniła się do znacznego zwiększenia ich stężeń w środowisku. Obecne w środowisku antybiotyki wpływają na mikroorganizmy i sprzyjają powstawaniu lekoopornych szczepów bakterii. Celem pracy była ocena wrażliwości mikroorganizmów środowiskowych na cztery wybrane antybiotyki (Ampicylinę, Doksycyklinę, Tylozynę i Sulfatiazol), należące do grup najczęściej wykorzystywanych w gospodarce rolnej. Wielkość ta ma istotne znaczenie podczas projektowania biologicznych systemów oczyszczania ścieków zawierających znaczne ilości antybiotyków oraz - pośrednio - może służyć jako wskaźnik stopnia narażenia określonych ekosystemów na długotrwałą ekspozycję na antybiotyki. Jako miarę wrażliwości mikroorganizmów na wymienione wyżej antybiotyki przyjęto wartości MTC (Microbial Toxic Concentrations), wyznaczane z wykorzystaniem komercyjnego testu płytkowego MARA[®]. Stosując procedury wykorzystywane w tym teście, wyznaczono również wartości MTC badanych antybiotyków względem nieselekcjonowanych mikroorganizmów pochodzących z rzeki Brynicy oraz wchodzących w skład osadu czynnego oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu. Stwierdzono, że w przypadku testu MARA[®] po 48-godzinnej inkubacji najniższe wartości MTC w obecności Doksycykliny i Tylozyny uzyskano dla *Microbacterium* spp. (odpowiednio $0,0053 \pm 0,0003$ i $0,042 \pm 0,010$ mg/dm³). Szczepem najbardziej wrażliwym na Ampicylinę okazał się *Staphylococcus warneri* (MTC = $0,019 \pm 0,003$ mg/dm³), a na Sulfatiazol *Brevundimonas diminuta* (MTC = $9,4 \pm 1,1$ mg/dm³). Jednocześnie stwierdzono, że spośród mikroorganizmów testowych szczególnie mało wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki okazały się *Citrobacter freundii* oraz *Pseudomonas aurantiaca*. W przypadku mikroorganizmów nieselekcjonowanych te pochodzące z Brynicy okazały się znacznie bardziej wrażliwe od pozyskanych z oczyszczalni. Wartości MTC dla mikroorganizmów rzecznych względem Ampicyliny, Doksycykliny, Tylozyny i Sulfatiazolu wynosiły odpowiednio 50 ± 23 , $1,5 \pm 1,0$, 33 ± 11 i 42 ± 18 mg/dm³.

Słowa kluczowe: antybiotyki, środowisko, ekotoksyczność, testy toksyczności

Wstęp

Roczne globalne zużycie antybiotyków jest szacowane na od 100 000 do 200 000 Mg [1]. Jednym z największych światowych konsumentów tych leków są Stany Zjednoczone. Według Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA), tylko w 2009 roku w USA zużyto 16 400 Mg antybiotyków, z czego prawie 80% zostało użyte w produkcji żywności. Leki te były stosowane w większości w lecznictwie i profilaktyce chorób zwierząt, a około 1300 Mg zastosowano jako stymulujące wzrost dodatki do pasz [2, 3]. Szacunkowe dane donoszą, że w USA 88% hodowanych świń i 42% cieląt otrzymuje w paszy profilaktycznie antybiotyki, głównie z grupy tetracyklin lub makrolidów [4]. Prawdopodobnie również duże

¹ Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel. 32 364 15 64, email: bw-xxl@wp.pl

² Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, ul. Kościelna 13, 41-200 Sosnowiec

* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'14, Jarnołtówek, 15-17.10.2014

(lub większe) ilości antybiotyków zużywane są w gospodarce hodowlanej krajów azjatyckich. Na przykład w Wietnamie w hydrokulturach na 1000 kg produktu zużywa się 700 g antybiotyku (w Norwegii w podobnych hodowlach zużywa się jedynie 1 g/1000 kg produktu) [2, 5].

W Unii Europejskiej i Szwajcarii podobne praktyki są zabronione [4], jednak, jak wskazują opublikowane w Danii wyniki monitoringu zużycia antybiotyków, zakaz ten jest systematycznie obchodzony [6].

Antybiotyki wykorzystywane w hodowli zwierząt często trafiają do środowiska w sposób periodyczny. Szybko ulegają w nim biotransformacji (np. antybiotyki β -laktamowe) lub rozproszeniu (np. sulfonamidy). Powoduje to, że kontrola ich stężeń może być trudna i kosztowna, a uzyskane wyniki mogą nie odzwierciedlać rzeczywistego narażenia środowiska. Jednak nawet incydentalny kontakt mikroorganizmów środowiskowych z antybiotykami powoduje pojawienie się lekoopornych szczepów, bytujących w danym ekosystemie przez długi czas [7]. Fakt ten można potwierdzić badaniami genetycznymi. Problemem jest w tym przypadku wysoki koszt takich badań.

Z wyżej opisanych powodów za celowe uznano opracowanie prostej i taniej metody szacowania narażenia środowiska na kontakt z antybiotykami. Mikroorganizmy środowiskowe, a ściślej ich wrażliwość na antybiotyki mogą w tym przypadku być wskaźnikiem takiego narażenia. W przypadku obecności antybiotyków w określonym ekosystemie bytujące w nim mikroorganizmy powinny cechować podwyższoną oporność na te leki. Zatem powinien istnieć wprost proporcjonalny związek pomiędzy opornością mikroorganizmów danego ekosystemu a narażeniem go na działanie antybiotyków. Aktywność żywych mikroorganizmów można śledzić, wykorzystując ich zdolność do redukcji bezbarwnego chlorowodoru 2,3,5-trójfenylotetrazoliny do czerwonego formazanu. Proces ten wykorzystywany jest między innymi w płytkowych testach MARA[®], służących do oceny toksyczności chronicznej, a wykorzystujący jako bioindykatory dziesięć szczepów bakterii i drożdże [8, 9]. Wyznaczana w tym teście wartość Microbial Toxic Concentration (*MTC*) jest miarą odporności mikroorganizmów testowych na substancje chemiczne [8, 9]. Wielkość ta ma istotne znaczenie podczas projektowania biologicznych systemów oczyszczania ścieków zawierających znaczne ilości substancji toksycznych. Potencjalnie może również być wykorzystana w szacowaniu ryzyka środowiskowego.

Celem pracy była ocena wrażliwości mikroorganizmów środowiskowych na cztery wybrane antybiotyki (Ampicylinę, Doksylicylinę, Tylozynę i Sulfotiazol) należące do grup najczęściej wykorzystywanych w gospodarce rolnej. Dla tych antybiotyków wyznaczono wartości *MTC* z użyciem komercyjnego testu płytkowego MARA[®]. Stosując procedury wykorzystywane w tym teście, wyznaczono również wartości *MTC* badanych antybiotyków względem nieselekcjonowanych mikroorganizmów pochodzących z rzeki Brynicy oraz wchodzących w skład osadu czynnego oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu.

Materiały i metody

Wybrane do badań antybiotyki zostały scharakteryzowane w tabeli 1. Próbkę inokulum stanowił osad czynny z komory tlenowej oczyszczalni ścieków Radocha II w Sosnowcu

oraz woda z nurtu rzeki Brynicy. Niezwłocznie po pobraniu próbek te zostały wykorzystane do szczepienia pożywek w teście płytkowym.

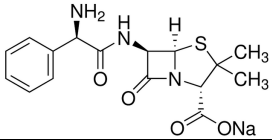
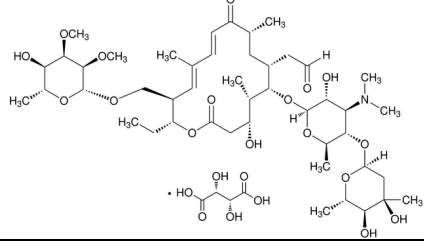
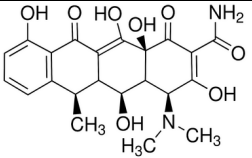
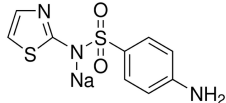
Oznaczanie wartości MTC dla badanych antybiotyków za pomocą testu MARA[®] wykonano zgodnie z procedurą producenta (NCIMB Ltd, Szkocja) [10]. Schemat aplikacji płytek testowych przedstawiono na rysunku 1. Stężenia wyjściowe badanych próbek antybiotyków (w rzędzie G) ustalono na podstawie szacunków w oparciu o dane literaturowe [9, 11]. Dla każdego antybiotyku wykonano serię trzech oznaczeń. Płytki skanowano zgodnie z procedurą, po 18 oraz, dodatkowo, po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 30°C. Informacje o mikroorganizmach testowych wykorzystywanych w teście MARA[®] przedstawiono na rysunku 1.

Tabela 1

Charakterystyka badanych antybiotyków

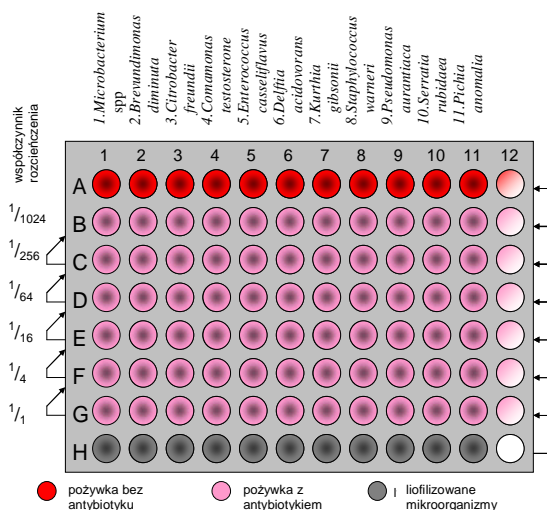
Table 1

Characteristics of the investigated antibiotics

Nazwa (numer CAS)	Struktura chemiczna	Producent (czystość)
Ampicylina - sól sodowa (69-53-4)		Sigma-Aldrich (91.0-100.5)
Tylozyny winian (1401-69-0)		Sigma-Aldrich (aktywność: ≥ 800 jednostki/mg)
Doksycykliny hyklat (24390-14-5)	 <ul style="list-style-type: none"> • HCl • $1/2 H_2O$ • $1/2 CH_3CH_2OH$ 	Sigma-Aldrich ($\geq 98\%$)
Sulfatiazol - sól sodowa (144-74-1)		Sigma-Aldrich (> 99%)

Wartości MTC względem nieselekcjonowanych mikroorganizmów pochodzących z rzeki i oczyszczalni ścieków wyznaczano w analogiczny sposób, przy czym pożywkę w kolumnach 1-11 szczepiono bezpośrednio porcjami wody lub osadu czynnego o objętości 15 ml. Jako pożywkę, podobnie jak w teście MARA[®], stosowano wodny roztwór zawierający 2% (m/m) peptonu sojowego (Fluka) i 0,02% (m/m) chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (POCH). Płytki skanowano po 24-godzinnej inkubacji

w temp. 30°C. Kolumna 12 zawierała pożywkę niezaszczepioną i stanowiła kontrolę jej sterylności. Przyjęta procedura pozwalała na jednorazowe wykonanie 11 serii pomiarowych. Skany płytek analizowano, wykorzystując oprogramowanie do wyznaczania wartości *MTC* firmy NCIMB Ltd, Szkocja.



Rys. 1. Procedura preparowania płytek do oceny toksyczności wybranych antybiotyków (wyznaczenia wartości *MTC*)

Fig. 1. Procedure of the plate preparation to assess the toxicity of the selected antimicrobial drugs (determination of *MTC* values)

Rezultaty i dyskusja

Przykładowe skany płytek testowych aplikowanych pożywką z Doksycyliną przedstawiono na rysunku 2. Rysunek 2a i 2b pokazuje obraz tej samej płytki testowej MARA[®] odpowiednio po 18 i 48 godzinach inkubacji. Na rysunku 2c i 2d zamieszczono skany płytek szczepionych osadem czynnym i wodą z rzeki. Wyniki uzyskane we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach zamieszczono w tabeli 2.

Na podstawie rezultatów uzyskanych z użyciem komercyjnego testu MARA[®] stwierdzono, że istnieją duże różnice wrażliwość mikroorganizmów względem badanych leków. Poza tym na poszczególne badane leki wrażliwe są inne z mikroorganizmów wskaźnikowych (tab. 2). Wypadkowe działanie toksyczne tych leków ilustruje następujący szereg:

Sulfatiazol >> Tylozyna > Ampicylina >> Doxycyklina

Najmniejszą wrażliwość obserwowano w przypadku Sulfatiazolu. W jego przypadku wzrost 5 z 11 mikroorganizmów wskaźnikowych nie został zakłócony w badanym zakresie stężeń. Oznacza to, że mikroorganizmy te nie są wrażliwe na Sulfatiazol o stężeniu $\leq 300 \text{ mg/dm}^3$. Jednak, wg danych literaturowych, wrażliwość tych samych mikroorganizmów na inny sulfonamid - Sulfadiazynę jest znacznie wyższa [9].

Tabela 2

Wartości MTC badanych antybiotyków

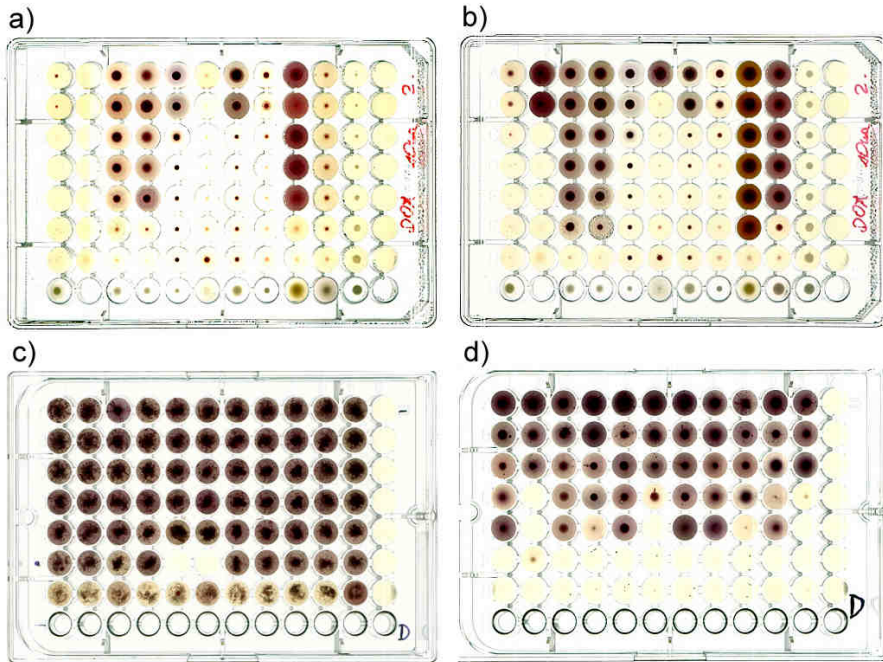
Table 2

The MTC values of the used antibiotics

Bioindykator/ inokulum	MTC [mg/dm ³]			
	Ampicylina	Doksycyklina	Tylozyna	Sulfatiazol
Wyniki testu MARA® po 18 (48) godz. inkubacji				
C _{max} antybiotyku (w rzędzie G) [mg/dm ³]	50	10	50	300
<i>Microbacterium</i> spp.	0,24±0,02 (0,12±0,04) ¹	0,088±0,060 (0,0053±0,0003) ¹	0,34±0,21 (0,042±0,010) ¹	306±9 (29,5±6,5) ¹
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1,4 ² (10,3±1,7) ¹	bd ³ (0,011±0,000) ¹	4,4±1,9 (30,5±19,5) ¹	4,8 ² (9,4±1,1) ¹
<i>Citrobacter freundii</i>	24 ±7 (21±0) ¹	0,54±0,23 (1,65±0,05) ¹	9,8±0,3 (> 50) ¹	195±28 (275±41) ¹
<i>Comamonas testosterone</i>	30±21 (> 50) ¹	0,77 ² (0,54±0,10) ¹	> 50 (> 50) ¹	> 300 (240±55) ¹
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,89±0,59 (0,99±0,21) ¹	0,074±0,005 (0,089±0,021) ¹	4,2±2,9 (6,1±0,1) ¹	> 300 (> 300) ¹
<i>Delftia acidovorans</i>	33±25 (32±10) ¹	0,003 ² (0,0033±0,0001) ¹	7,7±3,3 (> 50) ¹	4,4 ² (28,5±0,5) ¹
<i>Kurthia gibsonii</i>	0,024±0,002 (0,034±0,001) ¹	0,015±0,004 (0,016±0,001) ¹	1,2±0,3 (1,3±0,1) ¹	105±5 (221±0) ¹
<i>Staphylococcus warneri</i>	0,019±0,005 (0,019±0,003) ¹	0,021±0,002 (0,014±0,000) ¹	2,1±0,1 (1,4±0,2) ¹	> 300 (213±34) ¹
<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	40±24 (> 50) ¹	0,46±0,25 (2,95±0,05) ¹	> 50 (> 50) ¹	3,5±0,4 (125±22) ¹
<i>Serratia rubidaea</i>	0,15±0,11 (0,98±0,12) ¹	1,26±0,49 (0,98±0,13) ¹	19±25 (> 50) ¹	216±167 (218±24) ¹
<i>Pichia anomalia</i>	35±22 (30±10) ¹	> 10 (8,50±6,82) ¹	> 50 (> 50) ¹	> 300 (> 300) ¹
Średnia szacowana wartość z testu MARA	~ 15,0 (~ 15,0) ¹	~ 1,32 (~ 1,34) ¹	~ 18 (~ 31) ¹	~ 184 (~ 178) ¹
Wyniki dla osadu czynnego i wody rzecznej po 24 godz. inkubacji				
C _{max} antybiotyku (w rzędzie G) [mg/dm ³]	100	50	100	300
Osad czynny	82±36	31±13	89±34	261±89
Woda rzeczna	50±23	1,5±1,0	33±12	42±18

¹⁾ po 48 godzinach inkubacji²⁾ wynik uzyskany na podstawie jednej możliwej do interpretacji próby³⁾ nie uzyskano wyników możliwych do interpretacji

Za najbardziej istotne należy uznać, że zaobserwowano bardzo duże różnice wrażliwości poszczególnych mikroorganizmów testowych na poszczególne badane leki. Przykładowo, wartość MTC względem Doksycykliny dla najbardziej wrażliwych mikroorganizmów (*Microbacterium* spp. i *D. acidovorans*) była około 3000 mniejsza niż wartości MTC dla opornych drożdży (*P. anomalia*). Podobne rezultaty uzyskane względem innych antybiotyków zostały również opisane przez Nałęcz-Jaweckiego i in. [9]. Wskazuje to, że rezultaty uzyskane z wykorzystaniem jednogatunkowych testów do oceny ekotoksyczności mogą być niemiarodajne.



Rys. 2. Przykładowe skany płytek inkubowanych w obecności Doksycyliny: a) MARA[®] po 18 h inkubacji, b) MARA[®] po 48 h inkubacji, c) szczepionych osadem czynnym po 24 h inkubacji, d) szczepionych wodą po 24 h inkubacji

Fig. 2. The sample scans of the plates incubated with Doxycycline: a) MARA[®] after 18 hours of incubation, b) MARA[®] after 48 hours of incubation, c) inoculated with activated sludge and after 24 hours of incubation, d) inoculated with water and after 24 hours of incubation

W przypadku badań o przeznaczeniu komercyjnym kontrowersje mogą również wzbudzać testy wielogatunkowe, w których dokonano wcześniejszej selekcji mikroorganizmów testowych z uwzględnieniem oczekiwanych rezultatów. W tym kontekście zastosowanie gotowych testów wielogatunkowych pozwala na bardziej rzetelną ocenę oddziaływania określonych substancji na środowisko, a zwłaszcza pozwala na pewniejsze wyznaczenie wartości NOEC i potencjalnego ryzyka środowiskowego. Pewien problem stanowią duże różnice szybkości wzrostu mikroorganizmów testowych. W konsekwencji, po podanej w instrukcji producenta 18-godzinnej inkubacji uzyskuje się w wielu przypadkach zbyt niski przyrost kolonii testowych, również w rzędzie kontrolnym (rys. 2a). Z tego powodu czas inkubacji został przedłużony do 48 godzin. Przykładowe rezultaty przedstawiono na rysunku 2b. Jak wskazują dane zamieszczone w tabeli 2, większość rezultatów uzyskanych po 18 i 48 godzinach nie różni się w istotny sposób. Stwierdzono jednak, że, wydłużając czas inkubacji, znacznie poprawiono jakość uzyskanego na płytce obrazu i dzięki temu zwiększono precyzję jego odczytu (rys. 2a i 2b). Kwestią otwartą pozostaje standaryzacja opisywanej metody.

Na rysunku 2c i 2b przedstawiono skany płytek szczepionych odpowiednio osadem czynnym i wodą rzeczną, inkubowanych w obecności Doksyliny. Wartości MTC dla wszystkich badanych antybiotyków zamieszczono w tabeli 2. Odzwierciedlają one efekt toksyczny w stosunku do mikroorganizmów mniej wrażliwych, obecnych w próbkach w badanych próbkach środowiskowych. Z tego powodu nie są właściwe do określania ryzyka środowiskowego, jednak mogą stanowić podstawę do wyznaczania granicznych stężeń substancji toksycznych w procesach biodegradacji.

Stwierdzono, że mikroorganizmy osadu czynnego cechuje znacznie wyższa oporność względem wszystkich badanych leków niż mikroorganizmy pochodzące z rzeki. Szczególnie dużą różnicę obserwowano w przypadku Doksyliny i Sulfatiazolu. Może być to spowodowane znacznie większą bioróżnorodnością mikroorganizmów osadu czynnego, jednak może być również dowodem na występowanie w tej próbce mikroorganizmów o genetycznie zmienionym metabolizmie gwarantującym wyższą lekooporność. Obecność i wysoka aktywność takich mikroorganizmów (czas badania jest krótszy niż potencjalny czas adaptacji) mogą wskazywać, że środowisko ich bytowania jest lub było narażone na działanie substancji powodujących powstawanie takiej oporności (w tym antybiotyków). Charakterystyczna jest znacznie wyższa niż średnia w teście MARA[®] oporność mikroorganizmów względem Ampicyliny. Może to być spowodowane powszechnością stosowania tego antybiotyku w Polsce w medycynie. Z drugiej strony te z mikroorganizmów wskaźnikowych MARA[®], które bytują w glebach (np. *C. freundii*, *C. testosterone*, *D. acidovorans*, *P. aurantiaca*), również są mało wrażliwe na penicyliny. Zaskakującą jest wysoka wrażliwość mikroorganizmów rzeki Brynicy na Sulfatiazol (tab. 1). Ponieważ ekosystem Brynicy nie jest narażony na kontakt ze ściekami rolniczymi, zatem ryzyko jego ekspozycji na sulfonamidy jest również niewielkie. W dostępnej literaturze brak jest danych dotyczących obecności sulfonamidów w wodach tej rzeki.

Reasumując, uzyskane rezultaty wskazują na występowanie związku pomiędzy wartościami MTC wyznaczonymi z wykorzystaniem testu płytkowego a obecnością mikroorganizmów lekoopornych świadczących o narażeniu ekosystemu na antybiotyki. Niewątpliwie jednak wyznaczenie ilościowych zależności wymaga znacznie szerszych badań.

Wnioski

Mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystywane w badaniach ekotoksyczności znacznie różnią się wrażliwością. Dlatego rzetelna ocena oddziaływania określonych substancji na środowisko wymaga zastosowania gotowych testów wielogatunkowych, np. testu MARA[®]. Wysoką jakość wyników uzyskiwanych w takim teście można otrzymać, dopasowując czas trwania inkubacji do szybkości wzrostu mikroorganizmów testowych.

Za pomocą testów płytkowych można w prosty i tani sposób wyznaczyć wrażliwość mikroorganizmów środowiskowych na dowolne substancje chemiczne, w tym antybiotyki. Wrażliwość ta prawdopodobnie może być miarą wcześniejszego narażenia tych mikroorganizmów na oddziaływanie antybiotyków.

Podziękowania

Badania były finansowane z grantu NCN nr UMO-2011/03/D/NZ7/01684.

Literatura

- [1] Zuccato E, Bagnati R, Melis M, Fanelli R, Castiglioni S. *J Hazard Mater.* 2010;179:1042-1048. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.03.110.
- [2] Hollis A, Ahmed Z. *New Engl J Med.* 2013;369:2474-2476. DOI: 10.1056/NEJMp1311479.
- [3] FDA. Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-producing Animals 2009. 2010:1. <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM231851.pdf>.
- [4] Landers T, Cohen B, Wittum T, Larson E. *Public Health Rep.* 2012;127:4-22.
- [5] Carvalho ED, Silva DG, Silva RJ, editors. *Health and Environment in Aquaculture*. Rijeka, Croatia: InTech; 2012. DOI: 10.5772/2462.
- [6] DANMAP 2012 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, http://www.danmap.org/Downloads/~-/media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/DANMAP%202012/Danmap_2012.ashx.
- [7] Pruden A. *Environ Sci Technol.* 2014;48:5-14. DOI: 10.1021/es403883p.
- [8] Wadhia K, Dando T, Thompson KC. *J Environ Monit.* 2007;9:953-958. DOI: 10.1039/b704059h.
- [9] Nałęcz-Jawecki G, Wadhia K, Adomas B, Piotrowicz-Cieślak AI, Sawicki J. *Environ Toxicol.* 2010;25:487-494. DOI: 10.1002/tox.20593.
- [10] <http://www.ncimb.com/DefaultInfo.aspx?Page=maras%20toxicity%20test%20kits>.
- [11] Adamek E, Baran W, Ziemiańska J, Sobczak A. *Appl Catal B Environ.* 2012;126:29-38. DOI: 10.1016/j.apcatb.2012.06.027.

ASSESSMENT OF SENSITIVITY OF ENVIRONMENTAL MICROORGANISMS TO ANTIBIOTICS USING THE PLATELET ASSAYS

¹ Department of General and Analytical Chemistry, School of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine, Medical University of Silesia in Katowice, Sosnowiec

² Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec

Abstract: High consumption of antibiotics, resulting from their widespread global use both in the pharmacotherapy as well as in the animal husbandry, has contributed to significant increase their concentrations in the environment. The residual of antibiotics in the environment affect the micro-organisms and conducive to the formation of drug-resistant bacteria strains. The aim of the study was to assess the sensitivity of environmental microorganisms to four selected antibiotics (Ampicillin, Doxycycline, Tylosin and Sulfathiazol) that belong to the most commonly groups used in agriculture. The sensitivity of environmental microorganisms is important during the design process of biological wastewater treatment systems containing significant amounts of antibiotics and - indirectly - can serve as an indicator of exposure of specific ecosystems to a long exposure to antibiotics. The Microbial Toxic Concentrations (MTC) values, determined using a commercial MARA[®] microbiotest, were used as a measure of microorganisms sensitivity to the selected antibiotics. Additionally, the MTC values of these antibiotics to unselected microorganisms from Brynica river and microbes included in the activated sludge from the wastewater treatment plant (Radocha II in Sosnowiec) were determined based on the procedures used in MARA[®] test. In the case of MARA[®] biotest, the lowest MTC values of doxycycline and tylosin were obtained for *Microbacterium* spp. (0.0053 ± 0.0003 and 0.042 ± 0.010 mg/dm³, respectively) after 48 hours of incubation. The most sensitive strains was *Staphylococcus warneri* to Ampicillin (MTC = 0.019 ± 0.003 mg/dm³) and *Brevundimonas diminuta* to Sulfathiazole (MTC = 9.4 ± 1.1 mg/dm³). Simultaneously, *Citrobacter freundii* and *Pseudomonas aurantiaca* were especially very insensitive to the all selected antibiotics among the test microorganisms. In the case of unselected microorganisms, these from Brynica river were much more sensitive than those from the wastewater treatment plant. The MTC values of Ampicillin, Doxycycline, Tylosin and Sulfathiazol relative to river microorganisms were 50 ± 23 , 1.5 ± 1.0 , 33 ± 11 and 42 ± 18 mg/dm³, respectively.

Keywords: antibiotics, environment, ecotoxicity, toxicity tests