

## ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW W SYSTEMACH OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW

### ANTIBIOTIC RESISTANCE OF MICROORGANISMS IN WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS

**Agata Siedlecka**

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

**Abstract:** Antibiotic resistance of microorganisms is a phenomenon widely reviewed in literature that could lead to the outbreak of diseases difficult to control by available pharmaceuticals, or even an epidemic. Wastewater treatment plants act as specific reservoirs of resistance, as contained in the wastewater antibiotics, antibiotic resistance bacteria and antibiotic resistance genes could lead to the phenomenon of spread of resistance - inside wastewater treatment plant, but also among strains that dwell in the environment, after the discharge of inadequately treated wastewater to the receiver. Technological systems in working treatment plants do not stop sufficiently the transfer of determinants of resistance to the environment, or do not provide the effective disposal. Therefore, it is necessary to look for new solutions or methods for wastewater treatment and monitoring of treated sewage, sludge and atmospheric air around treatment plants in the aspect of antibiotic resistance.

**Keywords:** spread of resistance, sludge and bioaerosol in wastewater treatment plants, reservoirs of resistance.

#### Wprowadzenie

Antybiotyki są obecnie powszechnie wykorzystywanymi w medycynie terapeutycznymi. Konsekwencją tak szerokiego ich zużycia jest przedostawanie się antybiotyków (chemioterapeutyków) do środowiska naturalnego i interakcje z bytującymi w glebie, wodach powierzchniowych i podziemnych oraz powietrzu atmosferycznym mikroorganizmami. Antybiotyki mogą przedostawać się do środowiska w postaci odpadów medycznych (wytwarzanych również już w procesie produkcji leków) oraz ze ściekami - zarówno szpitalnymi, jak i komunalnymi. Część przyjmowanych leków nie jest metabolizowana (lub jest metabolizowana niecałkowicie) w organizmach ludzi i zwierząt i trafia do systemów oczyszczania ścieków w formie zbliżonej do pierwotnej [3, 4]. Poza celami terapeutycznymi, antybiotyki są wykorzystywane w wielu krajach w hodowli zwierząt, jako np. dodatki do paszy, co ułatwia ich przedostawanie się do środowiska.

Obecność antybiotyków w środowisku naturalnym ma wpływ nie tylko na funkcjonowanie ekosystemów (antybiotyki mogą być postrzegane jako rodzaj zanieczyszczeń chemicznych). Podstawowym zagrożeniem dla zdrowia i życia ludzi i zwierząt jest zjawisko tzw. presji selekcyjnej, polegającej na eliminacji drobnoustrojów nieprzystosowanych do życia w warunkach obecności antybiotyków (wrażliwych na antybiotyki) i

pozostawieniu przy życiu mikroorganizmów, określanych mianem antybiotykoopornych, wykazujących cechy pozwalające im na przezwycięzenie niekorzystnego wpływu antybiotyków.

Patogenne i zarazem odporne mikroorganizmy nie podlegają leczeniu dostępnymi na rynku farmaceutykami, wymuszając na producentach syntezy nowych form leków o innych mechanizmach działania bakterio-bójczego/bakteriostatycznego. Projektowanie nowych antybiotyków wydaje się być nieskuteczne w ujęciu długofalowym - po pewnym czasie, m.in. na skutek niewłaściwego używania antybiotyków w terapii (niekontrolowane, np. zbyt niskie stężenia antybiotyków, niepowodujące uszkodzenia komórki bakteryjnej, ale umożliwiające wykształcenie mechanizmów obronnych) mikroorganizmy adaptują się do niekorzystnych warunków (obecności nowych antybiotyków w środowisku). Ponadto, mikroorganizmy są w stanie przekazywać sobie determinanty oporności (np. geny warunkujące oporność). W efekcie, kolejne grupy leków tracą skuteczność.

Wzrost zainteresowania badaczy zjawiskiem antybiotykooporności wiąże się ze znaczną śmiertelnością (lub utrudnieniem leczenia) pacjentów zainfekowanych opornymi szczepami. Oczyszczalnie ścieków zaczynają być postrzegane jako rezerwuary oporności - miejsca, w których zjawisko rozprzestrzeniania oporności jest szczególnie intensywne ze względu na specyfikę i

sposób funkcjonowania obiektów, zaś antybiotyki, antybiotykooporne drobnoustroje i geny warunkujące oporność - postrzegane są jako nowy rodzaj szczególnie niebezpiecznych zanieczyszczeń, dotychczas bagatelizowanych w stosowanych technologiach systemów oczyszczania ścieków.

## Opis zagadnienia

### Zjawisko rozprzestrzeniania się antybiotykooporności

Głównym problemem związanym z przedostawaniem się antybiotyków do środowiska jest ich nieuniknione rozcieńczenie. Ilości leków, zrzuconych do odbiornika ścieków oczyszczonych (np. do zbiornika wody powierzchniowej) mogą być zbyt małe, aby stanowić realne zagrożenie dla drobnoustrojów - w rezultacie stężenia poniżej wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*) w połączeniu ze stosunkowo długim czasem zalegania antybiotyków w środowisku, np. zaadsorbowanych na osadach dennych (czas połowicznego rozpadu zależy od budowy cząsteczek chemicznych leku i jest bardzo zróżnicowany - niektóre antybiotyki szybko rozpuszczają się w wodzie) sprzyja adaptacji mikroorganizmów - wykształceniu cech oporności. Co więcej, odporne mikroorganizmy mogą przekazywać drobnoustrojom wrażliwym determinanty oporności na wiele sposobów. Należą do nich tzw. pionowy transfer genów, czyli przekazywanie zmodyfikowanej informacji genetycznej kolejnym pokoleniom komórek potomnych oraz horyzontalny transfer genów, czyli wymiana informacji genetycznej pomiędzy współistniejącymi komórkami tego samego lub innych gatunków. Bakterie mogą wymieniać między sobą materiał genetyczny (m.in. sekwencje kodujące geny warunkujące oporność na antybiotyki) na wiele sposobów [2, 16]:

- podczas koniugacji (przekazywania plazmidów – pozagenomowego DNA; geny odpowiedzialne za antybiotykooporność czy wirulencję często umiejscowione są właśnie na plazmidach, co ułatwia przekazywanie tych cech kolejnym drobnoustrojom);

- podczas transformacji DNA (pobieranie DNA ze środowiska do komórki, dzięki udowodnionemu w eksperymencie Griffitha chemizmowi kwasów nukleinowych);

- podczas transdukcji (przekazywanie DNA za pośrednictwem wirusów - bakteriofagów);

- za pośrednictwem mobilnych elementów genetycznych, do których należą: plazmidy (koniugacja - jak wyżej), integrony i transpozony.

Do mechanizmów oporności komórek bakteryjnych należą m.in. [16]:

- modyfikacja celu działania leku, np. danego enzymu, miejsca docelowego w komórce;

- inaktywacja leku dzięki wytwarzanym przez komórkę oporną enzymom;

- zahamowanie/ograniczenie transportu leku do komórki wykazującej oporność;

- wytworzenie alternatywnego szlaku metabolicznego, pełniącego podobną lub tę samą funkcję, co szlak inaktywowany przez lek lub ograniczenie zapotrzebowania komórki na metabolity wytwarzane w zahamowanym szlaku;

- zwiększenie stężenia inaktywowanej przez lek substancji;

- aktywne usuwanie antybiotyku z komórki bakteryjnej za pomocą pompy komórkowej.

Zarówno mechanizmy oporności komórek bakteryjnych, jak i sposoby przekazywania determinantów oporności, zostały szeroko opisane w literaturze [5, 16] a ich szczegółowa charakterystyka nie jest celem niniejszego opracowania.

W kontekście oczyszczania ścieków (szpitalnych, z przemysłu farmaceutycznego, a także ogółu ścieków bytowo-gospodarczych/komunalnych), za rodzaj zanieczyszczenia uważa się nie tylko antybiotyki - w literaturze coraz częściej uznaje się za zanieczyszczenia również uodpornione mikroorganizmy (bakterie antybiotykooporne) oraz geny warunkujące oporność (obecne nie tylko w komórkach drobnoustrojów, ale też w postaci pozakomórkowego DNA). Takie wolne cząsteczki DNA niosące informację genetyczną umożliwiającą wykształcenie mechanizmów oporności mogą być nabyte, jak wspomniano, np. na drodze transformacji DNA i przyczyniać się do powstania szczepów opornych. W tabeli 1 przedstawiono rodzaje zanieczyszczeń przyczyniających się do rozprzestrzeniania oporności w systemach oczyszczania ścieków i w środowisku.

Tab. 1. Rodzaje zanieczyszczeń wpływających na zjawisko antybiotykooporności, możliwe interakcje i efekty.

Rodzaj zanieczyszczenia:	Antybiotyki (sub-MIC)	Mikroorganizmy antybiotykooporne	Geny warunkujące oporność
Możliwe interakcje:	Presja selekcyjna; adaptacja mikroorganizmów; losowe mutacje DNA	Przekazanie oporności: pionowy i horyzontalny transfer genów	Transformacja DNA przez bakterie wrażliwe
Efekt:	Mikroorganizmy antybiotykooporne w ściekach	Rozprzestrzenianie oporności	Nabycie oporności, dalsze rozprzestrzenianie

W badaniach nad rozprzestrzenianiem się antybiotykooporności w systemach oczyszczania ścieków najczęściej stosuje się metody hodowlane, oparte (w ogólnym zarysie) na izolacji kultur bakteryjnych i obserwacji stref zahamowania wzrostu drobnoustrojów

spowodowanych wprowadzeniem do pożywek antybiotyków (tzw. antybiogramy) oraz metody molekularne, oparte na izolacji genomowego i/lub plazmidowego DNA i wykrywaniu sekwencji nukleotydowych kodujących geny warunkujące oporność

(również ilościowo), np. za pomocą technik PCR i ilościowego PCR (qPCR, PCR w czasie rzeczywistym). Analizę PCR z powodzeniem wykorzystano do badań antybiotykooporności próbek środowiskowych osadu czynnego [23]. Techniki hodowlane pozwalają na zbadanie jedynie niewielkiej części całkowitej populacji bakteryjnej [2], ich zaletą jest jednak częściowe odzwierciedlenie bioróżnorodności mikroorganizmów zdolnych do wzrostu w organizmie człowieka [3].

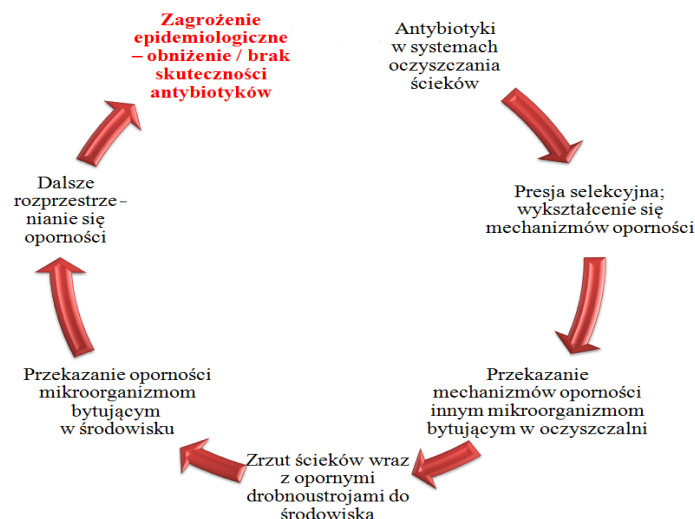
**Oczyszczalnie ścieków jako rezerwuary determinantów oporności**

Na liczebność antybiotykoopornych bakterii oraz genów warunkujących oporność w ściekach może mieć wpływ układ technologiczny oczyszczalni ścieków, skład ścieków docierających do oczyszczalni oraz warunki jej eksploatacji. Oczyszczone ścieki, postrzegane jako bezpieczne dla środowiska naturalnego, zrzucane są do odbiorników takich jak np. wody powierzchniowe, gleby. Pomimo spełnienia przez operatorów oczyszczalni ścieków wymogów dotyczących maksymalnych wartości stężeń węgla organicznego, azotu ogólnego, fosforu ogólnego, metali ciężkich i innych zanieczyszczeń, regulowanych aktami prawnymi obowiązującymi w danym rejonie świata, nieefektywne usuwanie determinantów lekooporności stanowi poważny i niezauważalny "gołym okiem" (w przeciwieństwie do np. łatwo dostrzegalnych zawiesin lub powodujących eutrofizację zbiorników wody stojącej pierwiastków biogenych) problem środowiskowy. Bouki in. podaje np., że w wielu badaniach wykryto gwałtowny wzrost liczebności opornych mikroorganizmów i genów warunkujących oporność poniżej punktów zrzutu ścieków z oczyszczalni (rzeki Arga w Hiszpanii oraz Tamma w Japonii) [4]. Geny *bla<sub>SHV</sub>* i *bla<sub>NDM</sub>* (oporność na β-laktamy) wykryto też w osadach rzeki Kaweri w Indiach, do której trafiają ścieki szpitalne [6]. Obserwacje te dostarczają kolejnych dowodów na to, iż oczyszczalnie ścieków stanowią źródło rozprzestrzeniania się antybiotykooporności w środowisku. Kontrola wpływu ścieków zrzucanych do wód płynących na jakość wody jest utrudniona ze

względu na sam charakter odbiornika (wysoka zmienność); należy ponadto wykluczyć tło zanieczyszczeń - obecność w rzece substancji doprowadzanych (okresowo) z punktowych źródeł zanieczyszczeń powyżej punktu poboru próbek.

Badania mikroorganizmów zasiedlających komory oczyszczalni dowodzą powszechności zjawiska antybiotykooporności w systemach oczyszczania ścieków. Przykładowo, Huang i in. wykazali, że spośród wszystkich bakterii heterotroficznych zasiedlających oczyszczalnię ścieków w Beijing (Chiny) 63%, 47%, 55%, 69%, 2,6% i 11% było opornych odpowiednio na działanie: penicyliny, ampicyliny, cefalotyny, chloramfenikolu tetracykliny i rifampicyny [10], powszechnie stosowanych w Chinach farmaceutyków. Badacze potwierdzili też obecność bakterii wykazujących oporność wielolekową w odpływie z oczyszczalni. Bouki i in. wskazują np., że oczyszczalnie ścieków są w stanie usunąć mikroorganizmy odporne z podobną skutecznością, z jaką usuwają drobnoustroje wrażliwe; nie unieszkodliwiają i nie zatrzymują jednak w wystarczającym stopniu genów warunkujących oporność [4].

Konsekwencją obecności antybiotyków w systemach oczyszczania ścieków jest ich rozcieńczenie w całej objętości ścieków docierających do oczyszczalni, a co za tym idzie - presja selekcyjna w komorach osadu czynnego (i innych urządzeniach odpowiedzialnych za biologiczne oczyszczanie ścieków). Mikroorganizmy, którym udaje się zaadaptować do obecności antybiotyków, z łatwością przekazują nabyte cechy sąsiednim komórkom. Na szybkość przekazywania determinantów oporności między bakteriami wpływ ma wysoka gęstość i bioróżnorodność drobnoustrojów osadu czynnego. W rezultacie, warunki panujące w oczyszczalni ścieków przyczyniają się do rozprzestrzeniania determinantów oporności. Ponadto, czas przebywania kłaczek osadu czynnego w komorze (wiek osadu) to potencjalny czas adaptacji mikroorganizmów do obecnych w ściekach antybiotyków. Na rys. 1 przedstawiono schemat rozprzestrzeniania oporności na antybiotyki za pośrednictwem oczyszczalni ścieków.



Rys. 1. Schemat rozprzestrzeniania się antybiotykooporności za pośrednictwem systemów oczyszczania ścieków.

**Osady z biologicznych oczyszczalni ścieków i bioaerazol jako źródła antybiotykooporności**

Jednym ze sposobów zagospodarowania osadów nadmiernych powstających we wszystkich biologicznych oczyszczalniach ścieków jest ich wykorzystanie jako nawozów w rolnictwie. W kwestii bezpieczeństwa użytkowania gruntów rolnych nawożonych osadami powstałymi w oczyszczalniach szczególną uwagę zwrócono m.in. na zawartość w nich metali ciężkich, bagatelizując aspekt mikrobiologiczny. Poza możliwością wprowadzenia do gruntów wielu drobnoustrojów patogennych, na uwagę zasługuje przede wszystkim problem antybiotykooporności. Dotyczy on obecności w osadach nie tylko opornych mikroorganizmów (patogennych lub nieszkodliwych dla zdrowia i życia ludzi i zwierząt), ale również genów warunkujących oporność oraz samych antybiotyków, mogących stanowić, po wprowadzeniu (w ilościach śladowych lub sub-MIC) do środowiska naturalnego, źródło adaptacji i dalszego rozprzestrzeniania się antybiotykooporności. Co istotne, oporność na antybiotyki może być przenoszona pomiędzy bakteriami razem z opornością na, obecne w osadach, metale ciężkie za sprawą dwóch zjawisk: lokalizacji genów warunkujących oporność na oba rodzaje zanieczyszczeń na tych samych mobilnych elementach genetycznych (bliskie sąsiedztwo sprzyja wspólnemu przemieszczaniu się genów) oraz wykorzystywaniem przez mikroorganizmy tych samych mechanizmów obronnych wobec metali ciężkich i antybiotyków [3]. Co więcej, Mao i in. wykazali, iż najwięcej genów warunkujących oporność na antybiotyki przedostaje się z oczyszczalni ścieków do środowiska za pośrednictwem odwodnionych osadów [15].

Fermentacja i stabilizacja osadów wapnem przyczynia się do spadku liczebności antybiotykoopornych drobnoustrojów, jednak nie likwiduje sekwencji DNA genów kodujących mechanizmy oporności. Wysokie zagęszczenie sąsiadujących ze sobą komórek bakteryjnych w osadach czynnych i nadmiernych sprzyja rozprzestrzenianiu się oporności [3]. Konieczne jest zatem zainicjowanie bardziej szczegółowego monitoringu aspektu mikrobiologicznego osadów zagospodarowywanych rolniczo, ze szczególnym uwzględnieniem określania potencjału rozprzestrzeniania oporności na bytujące w nawożonej glebie szczepy środowiskowe.

Ryzyko rozprzestrzeniania się antybiotykooporności w środowisku zwykle kojarzone jest z przedostawaniem się opornych mikroorganizmów, genów warunkujących oporność lub antybiotyków do wód i gleb stanowiących odbiorniki ścieków oczyszczonych. Determinanty oporności mogą również przedostawać się z oczyszczalni bezpośrednio do powietrza (podczas mechanicznego oczyszczania ścieków surowych lub napowietrzania osadów czynnych na etapie biologicznym, jak również odrywania się komórek bakteryjnych z ruchomych tarcz złóż biologicznych) w postaci bioaerozolu, a dalej - do otaczających obiektów elementów środowiska naturalnego.

W badaniach Korzeniowskiej i in. wyizolowano 167 szczepów *E. coli* ze ścieków szpitalnych i 147 ze ścieków komunalnych. Odpowiednio 37,1% i 17,7% z

nich stanowiło szczepy zdolne do wytwarzania  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania (ESBL). Tę cechę wykazywało też 18,4% szczepów *E. coli* wyizolowanych z rzeki - odbiornika ścieków oczyszczonych oraz 25,6% wyizolowanych z powietrza. W celu wykrycia kolonii określanych mianem ESBL posłużono się synergicznym, podwójnym testem krążkowym wykorzystując kombinację cefotaksymu, ceftazydymu i cefpodoksymu z kwasem klawulanowym, uznając za wynik pozytywny zwiększenie średnicy strefy inhibicji wzrostu o  $\geq 5$  mm w porównaniu do krążków bez kwasu klawulanowego. Jako kontrolę wykorzystano szczepy ATCC *E. coli* (25922) i *Klebsiella pneumoniae* (700603). Ekstrahowano genomowe i plazmidowe DNA z *E. coli* wykazujących zdolność do wytwarzania  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania, a następnie poddano je analizie PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych do amplifikacji genów warunkujących oporność na  $\beta$ -laktamazy: *bla*<sub>CTX-M</sub> (należące do grupy 1. i 9.), *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>. Uzyskane na żelu agarowym, wybarwione bromkiem etydydy prążki o oczekiwanych długościach były następnie sekwencjonowane. Obecność genów kodujących  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania wykazano w 66,4% spośród przebadanych kolonii, natomiast w 33,6 % stwierdzono jedynie geny *bla*<sub>TEM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-1</sub>, nie należące do ESBL [12].  $\beta$ -laktamazy należą do powszechnie stosowanych i stosunkowo łatwo dostępnych antybiotyków, zatem prawdopodobieństwo ich przedostawania się do ścieków (zwłaszcza szpitalnych) jest znaczne, a warunki panujące w oczyszczalniach, w tym zjawisko selekcji mikroorganizmów opornych, sprzyja przekazywaniu determinantów oporności na tę grupę leków. W powietrzu atmosferycznym na terenie oczyszczalni ścieków wykryto też geny *sul2*, warunkujące oporność na kotrimoksazol oraz geny integronów klasy pierwszej [14].

**Wpływ stężenia antybiotyków na determinanty oporności w oczyszczalniach ścieków**

Szczególne znaczenia dla zjawiska rozprzestrzeniania się lekooporności wśród mikroorganizmów mają ścieki z przemysłu farmaceutycznego, bogate w antybiotyki i inne leki - jednak o stężeniach poniżej progu bakteriobójczego (bakteriostatycznego), umożliwiając przetrwanie drobnoustrojów i jednoczesną ich adaptację.

W eksperymencie Aydin i in. badano wpływ roztworów imitujących ścieki z przemysłu farmaceutycznego, poddawanych oczyszczaniu w dwóch beztlenowych sekwencyjnych reaktorach wsadowych (SBRs, *sequencing batch reactors*), zawierających odpowiednio kombinację sulfametoksazolu, tetracykliny i erytromycyny oraz sulfametoksazolu i tetracykliny na częstość występowania genów warunkujących oporność wśród mikroorganizmów zasiedlających reaktory. Za pomocą ilościowej techniki PCR w czasie rzeczywistym badano obecność genów kodujących oporność na wszystkie z obecnych w ściekach antybiotyki: *sul1*, *sul2*, *sul3*, *ermA*, *ermF*, *ermB*, *msrA*, *ereA*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetM*, *tetS*, *tetQ*, *tetW*, *tetX* oraz obecność genów kodujących integrony klasy pierwszej *int1*, postrzeganych

jako indykatory horyzontalnego transferu genów (integrony należą do tak zwanych mobilnych elementów genetycznych). Żaden z genów warunkujących oporność na antybiotyki nie został wykryty w osadzie czynnym wykorzystanym do zaszczepienia reaktorów; nie wykryto też żadnego z nich w próbkach pobranych z reaktora kontrolnego przez cały czas trwania eksperymentu. Wraz z kolejnymi cyklami pracy reaktorów, trwającymi 30 dni każdy, sukcesywnie zwiększano stężenia antybiotyków: stężenia sulfametoksazolu zwiększano w zakresie  $0,5\div 40\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , zaś erytromycyny i tetracykliny w zakresie  $0,1\div 3\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Wraz ze wzrostem stężenia antybiotyków, obserwowano wzrost stężenia genów warunkujących oporność i pojawianie się w późniejszych cyklach kolejnych, wcześniej nie wykrywanych, sekwencji genów. Wyższe wartości stężenia genów oporności na sulfametoksazol i tetracyklinę w reaktorze, do którego dopływał roztwór zawierający również erytromycynę świadczą o synergicznym wpływie mieszaniny antybiotyków na rozprzestrzenianie się oporności. Wykazano ponadto korelację pomiędzy występowaniem genów *intI* oraz *sul1* i *sul2*, co wskazuje na ich obecność w obrębie integronów klasy pierwszej [1].

Zależność między stężeniem antybiotyków a genów warunkujących oporność w dopływających do oczyszczalni ściekach nie zawsze jest oczywista. W eksperymencie Xu i in. mierzono stężenia tetracyklin (oksytetracykliny, tetracykliny i chlorotetracykliny), dziesięciu sulfonamidów oraz chinolonów (ofloksacyny, enrofloksacyny, cyprofloksacyny i norfloksacyny) za pomocą chromatografii cieczowej - tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS) oraz odpowiadających im determinantów oporności, genów: *tetA*, *tetB*, *tetE*, *tetW*, *tetM*, *tetZ*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *gryA*, *parC*, *qnrC* i *qnrD* za pomocą ilościowej techniki PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem SYBR Green jako barwnika. Wykazano znaczną zależność między wartościami *tetB*/16S rRNA i *tetW*/16S rRNA a stężeniem tetracyklin, brak zależności między sulfonamidami a genami kodującymi oporność na tę grupę antybiotyków oraz negatywną korelację między enrofloksacyną a wartością *qnrC*/16S rRNA. W przytoczonym eksperymencie różnorodność aniliczebność genów warunkujących oporność na antybiotyki nie zmieniały się znacząco na drodze układu technologicznego oczyszczania ścieków [21]. Jednakże Mao i in. zaobserwowali wyraźną współzależność między zmierzonymi stężeniami antybiotyków, jak również stężeniami metali ciężkich, a liczebnością odpowiadających im genów warunkujących oporność. Efektywność usuwania antybiotyków w badanych oczyszczalniach wahała się w szerokich przedziałach (od 50 do 98 %) [15]. Natomiast Novo i in. podają wiele przykładów eksperymentów, w których nie wykazano zależności między stężeniem antybiotyków w ściekach surowych a liczebnością genów warunkujących oporność czy opornych mikroorganizmów [19]. Sprzeczne doniesienia na ten temat unaocniają, jak wiele kwestii wymaga wyjaśnienia i rzetelnego zbadania.

Według Novo i in., na rozprzestrzenianie się determinantów oporności ma wpływ m.in. struktura populacji

bakteryjnych zasiedlających komory biologicznych oczyszczalni ścieków. Badacze wykazali zależność między stężeniem tetracykliny w ściekach surowych a rozpowszechnieniem oporności na antybiotyki (bez wyraźnej korelacji ukierunkowanej na oporność na tetracyklinę) oraz zależność między stężeniami antybiotyków należących do tetracyklin, penicilin, sulfonamidów, chinolonów i liczebnością hodowlanych, antybiotykoopornych bakterii w ściekach surowych a liczebnością *Epsilonproteobacteria* w ściekach oczyszczonych; natomiast w stosunku do liczebności powszechnie spotykanych w systemach oczyszczania ścieków *Gamma-*, *Betaproteobacteria* i *Firmicutes* obecnych w ściekach oczyszczonych, zależność ta była odwrotnie proporcjonalna [19]. Badanie wpływu antybiotyków na bioróżnorodność osadu czynnego jest wyzwaniem niezwykle trudnym, ponieważ ze względu na charakter medium, jakim są ścieki, nie ma możliwości wyeliminowania wpływu ogromnej gamy innych substancji w nich obecnych, wywołujących interakcje w układach technologicznych oczyszczania ścieków. Tło zanieczyszczeń może zatem zaburzać obraz bezpośredniego oddziaływania antybiotyków na osad czynny.

#### **Wpływ dezynfekcji ścieków na zjawisko antybiotykooporności**

Już w drugiej połowie XX wieku stwierdzono, że procesy dezynfekcji mogą wpływać na udział mikroorganizmów opornych w ogólnej puli drobnoustrojów w ściekach oczyszczonych. Mimo, iż wyniki poszczególnych eksperymentów różniły się od siebie, zauważono ogólną tendencję w kierunku wzrostu oporności populacji, zwłaszcza w procesie chlorowania. Hunag i in. dopatrywali się przyczyny tej rozbieżności w różnicach w dawkach dezynfektantu i sposobach chlorowania [4, 11]. Próby zastąpienia chlorowania dezynfekcją promieniami UV nie przyniosły oczekiwanego rezultatu; nie stwierdzono też zmniejszenia liczebności genów oporności w oczyszczanych ściekach za pomocą promieni ultrafioletowych [4]. Zjawisko reaktywacji oporności mikroorganizmów po procesie chlorowania można tłumaczyć presją selekcyjną dezynfektanta - zdolne do przetrwania są tylko te komórki, które są w stanie wykształcić mechanizmy obronne, jak np. niespecyficzne pompy molekularne, zabezpieczające dodatkowo komórkę przed wniknięciem czynnika bakteriobójczego - a zatem, proporcja drobnoustrojów opornych w populacji wzrasta; z opornych komórek, na drodze pionowego transferu genów (podziały komórkowe i przekazywanie informacji genetycznej następnym pokoleniom) powstają kolejne, posiadające determinanty oporności. Niewłaściwie prowadzony proces dezynfekcji może więc przyczynić się w konsekwencji do reaktywacji zjawiska oporności w danej populacji.

Większa przeżywalność mikroorganizmów opornych, w porównaniu do ogółu populacji bakteryjnych w oczyszczalniach ścieków po procesie dezynfekcji chlorem została potwierdzona również w badaniach Mao i in.. Wniosek ten wysnuto na podstawie analiz genetycznych: badano geny specyficzne dla oporności na tetracykliny, sulfonamidy, chinolony i makrolidy oraz

sekwencje 16S rRNA (w celu określenia liczebności całkowitej populacji bakteryjnej). Wykazano redukcję liczebności genów warunkujących oporność w zakresie 89,0–99,8%, jednak liczebność 12 spośród 23 przebadanych ilościowo sekwencji genów zwiększyła się w odpływie i odwodnionym osadzie w porównaniu do ich liczebności w ściekach dopływających do oczyszczalni. Stwierdzono ponadto niewystarczającą skuteczność układów technologicznych dwóch przebadanych oczyszczalni w usuwaniu antybiotyków i znaczącą korelację pomiędzy ich stężeniami a liczebnością genów warunkujących oporność (odniesioną do liczebności genów 16S rRNA). W badanych oczyszczalniach na układ technologiczny biologicznego etapu oczyszczania składały się kolejno procesy beztlenowe, anoksyczne i klasyczna, tlenowa komora osadu czynnego. Oczyszczone ścieki dezynfekowane były chlorem. W celu określenia wpływu chlorowania na oporność hodowlanych bakterii, próbki oczyszczonych ścieków pobranych przed zastosowaniem dezynfekcji i natychmiast po inkubowano na podłożu agarowym w 37°C przez 48 h, zliczając jtk; jednocześnie prowadzono hodowlę na podłożach różnicujących z sulfonamidem, erytromycyną, tetracykliną i cyprofloksacyną (w stężeniach odpowiednio 50, 50, 10 i 10 mg·l<sup>-1</sup>). Wykazano, iż odporne drobnoustroje były mniej podatne na dezynfekcję, mimo iż podejrzewa się, że za oporność na antybiotyki i chlor odpowiedzialne są inne mechanizmy. Proces chlorowania unieszkodliwił 85±6% i 88±5% całkowitej, heterotroficznej mikroflory bakteryjnej (odpowiednio w dwóch oczyszczalniach) i znacznie mniej jtk bakterii antybiotykoopornych (względem sulfonamidu: 42±3/65±5%, erytromycyny: 55±6/78±9%, tetracykliny: 41±5/79±6% i cyprofloksacyny: 55±6/77±8%, odpowiednio dla dwóch oczyszczalni). Podobnie jak w eksperymencie Xu i in., do pomiaru stężenia antybiotyków wykorzystano LC-MS/MS. W obu oczyszczalniach obserwowano wzrost sumarycznych stężeń genów warunkujących oporność na etapie biologicznego oczyszczania (w pierwszej z oczyszczalni stężenia wzrosły również w osadniku wstępnym, co może świadczyć o zanieczyszczeniu komory mikroorganizmami) i wyraźny spadek w osadniku wtórnym. Stężenia genów nieznacznie wzrastały w ciągu układu biologicznego etapu oczyszczania, jednak na każdym etapie oczyszczania ścieków (również przed i po ciągu biologicznym) obserwowano wyraźną korelację między stężeniami genów a sekwencjami 16S rRNA, mówiącymi wprost o liczebności populacji bakteryjnej w urządzeniach jednostkowych układu. Stosunkowo wysokie stężenia (w odniesieniu do g suchej masy) genów wykrywane były w odwodnionym osadzie - głównie za sprawą opadających w procesie sedymentacji bakterii [15].

#### **Propozycje rozwiązań technologicznych usprawniających usuwanie determinantów antybiotykooporności ze ścieków**

Antybiotyki są usuwane ze ścieków na drodze biodegradacji i adsorpcji, jednak efektywność ich usuwania zależy głównie od budowy chemicznej, warunkującej m.in. trwałość, czy podatność na hydrolizę cząsteczek

leków. Zhou i in. wykazali na przykład, że sulfonamidy, makrolidy, trimetoprym, chloramfenikol i linkomycyna były usuwane ze ścieków na drodze biodegradacji, zaś tetracykliny i fluorochinolony ulegały adsorpcji na kłaczkach osadu czynnego [22]. Według innych doniesień literaturowych, chinolony stanowią przykład grupy antybiotyków silnie adsorbujących na kłaczkach osadu czynnego i nierozpuszczających się w wodzie [19].

W celu poprawy efektywności usuwania antybiotyków w systemach oczyszczania ścieków, Michael i in. proponują zastosowanie procesów membranowych, adsorpcji na węglu aktywnym, zaawansowanych procesów utleniania lub ich kombinacji [18]. Z kolei Mao i in. zalecają zmniejszenie stosunku substancji pokarmowych (ładunku zanieczyszczeń) do ilości mikroorganizmów oraz zwiększenia czasu przetrzymania ścieków w komorach fermentacyjnych w celu ograniczenia zjawiska rozprzestrzeniania oporności wśród bakterii w oczyszczalniach ścieków. Autorzy proponują też wstępne podczyszczanie ścieków z antybiotyków i metali ciężkich [15]. Proponowanym rozwiązaniem jest również wstępna dezynfekcja ścieków szpitalnych, dostarczających największe ilości determinantów oporności do systemów oczyszczania ścieków [12]; w badaniach nad drogami przekazywania oporności wykazano np., że po raz pierwszy zidentyfikowane w bakteriach z rodzaju *Aeromonas spp.* geny oporności na chinolony i β-laktamazy (*aac(6)-Ib-cr* i *bla<sub>OXA</sub>*) występowały w odpowiednio 58% i 56% wyizolowanych ze ścieków szpitalnych szczepów [20].

Mao i in. wskazują natomiast, powołując się na McKinney i Pruden, iż pomimo znacznych kosztów eksploatacji układów wyposażonych w dezynfekcję promieniami UV, związanych m.in. z koniecznością zastosowania odpowiednio wysokich intensywności promieniowania do usunięcia sekwencji nukleotydowych kodujących geny warunkujące oporność [17], metoda ta może przynieść pożądane skutki w połączeniu z fotokatalizą wytwarzającą reaktywne formy tlenu, umożliwiając dodatkowo utlenianie pozostałych w ściekach, niepodatnych na rozkład zanieczyszczeń organicznych przy ograniczeniu ryzyka powstawania ubocznych produktów dezynfekcji chlorem [15]. W badaniach Du i in. prześledzono zmiany stężeń genów warunkujących oporność w ciągu technologicznym oczyszczalni pracującej w układzie beztlenowo/anoksyczno/tlenowym z bioreaktorem membranowym. Stwierdzono spadek stężeń w odpływie ze strefy beztlenowej i anoksycznej, następnie - wzrost w odpływie ze strefy tlenowej i nagły spadek w odpływie z bioreaktora. Porównanie wartości stężeń w odpływach i osadach wytworzonych w kolejnych etapach oczyszczania ścieków wskazuje, iż w rzeczywistości oczyszczalnia nie usuwa genowych determinantów oporności - są one jedynie przenoszone pomiędzy cieczą nadosadową a osadami [8]. Wyniki otrzymane przez Li i in. wskazują, iż antybiotyki i geny warunkujące oporność są w głównej mierze usuwane ze ścieków na drodze biologicznego oczyszczania, natomiast antybiotykooporne mikroorganizmy - na drodze procesów mechanicznych. Dezynfekcja ścieków promieniami UV nie przyczyniła się wyraźnie do poprawy

skuteczności. Co więcej, również w tym badaniu wykryto znaczne ilości genów warunkujących oporność i opornych jtk w osadach z oczyszczalni (odpowiednio  $10^{11}$  kopii·g<sup>-1</sup> i  $10^8$  jtk·ml<sup>-1</sup>), co sugeruje ich transfer ze ścieków do osadów, bez docelowego unieszkodliwienia [13].

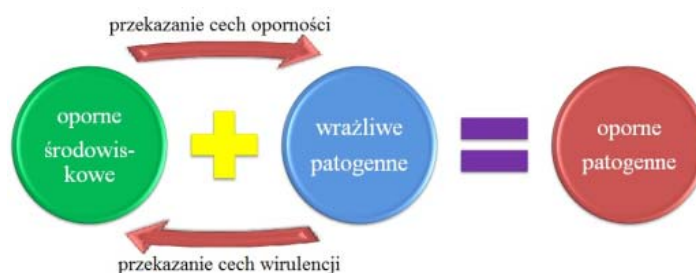
## Podsumowanie

Obecność determinantów oporności w środowisku, spowodowana głównie nierozważnym używaniem antybiotyków wynikającym z niedostatecznie kontrolowanego dostępu do nich, a także przez niewystarczająco skuteczne oczyszczanie ścieków stanowi poważne zagrożenie epidemiologiczne. Na skalę problemu szybkości adaptacji mikroorganizmów do obecności antybiotyków wskazują chociażby obserwacje Korzeniewskiej i in. - wzrost oporności na cefotaksym, ceftazydim, gentamycynę, tobramycynę i amikacynę na przestrzeni 10 lat (autorzy porównują badania z 2003 roku do badań własnych, z roku 2013) [12].

Trudności w porównywaniu ze sobą wyników badań przeprowadzonych przez różne zespoły eksperymentatorów wynikają m.in. z odmienności warunków, w jakich przeprowadzane były testy (czas badania, zastosowane techniki i sprzęt, układ technologiczny oczyszczalni ścieków, sezonowość pór roku - nie zawsze uwzględniana w projektowaniu eksperymentów, a także lokalizacja oczyszczalni i klimat, w którym ona pracuje). Osad czynny, stanowiący podstawowe medium badawcze, charakteryzuje się ogromną bioróżnorodnością zasiedlających go mikroorganizmów, co również może utrudnić próby analizy porównawczej wyników badań. Korzeniewska i in. wskazują ponadto, że pewne

nieścisłości mogą pojawić się już przy samej konstrukcji testów na antybiotykooporność, ze względu na różne standardy proponowane przez EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) i CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*).

Określanie oczyszczalni ścieków mianem "rezerwuarów oporności" ma swoje uzasadnienie pod wieloma względami. Na zdolność bakterii do przetrwania w niekorzystnych warunkach, jakie stwarza obecność w otaczającym je środowisku antybiotyków, mogą mieć wpływ też inne substancje obecne w ściekach, jak np. metale ciężkie; za zjawisko to może odpowiadać wspólny dla antybiotyków i metali ciężkich mechanizm "pozbywania się" niepożądanych składników z komórek (pompy) [15]. Co więcej, po przedostaniu się ścieków zawierających antybiotykooporne szczepy, geny warunkujące oporność czy nieunieszkodliwione antybiotyki do środowiska, rolę rezerwuaru oporności mogą przejąć szczepy środowiskowe. Raz nabyta oporność może trwać "w uśpieniu" wśród niechorobotwórczych szczepów środowiskowych; problem pojawia się jednak po przekazaniu determinantów oporności na szczepy patogenne. Zjawisko oporności szczepów środowiskowych nie powinno zatem zostać zbagatelizowane, gdyż prędzej czy później jego skutki mogą wpłynąć na pojawienie się epidemii, których nie da się zwalczyć za pomocą dostępnych farmaceutyków. Przekazywanie informacji genetycznej może też działać w drugą stronę - oporne szczepy środowiskowe mogą nabyć cechy wirulencji, w konsekwencji stając się zarazem oporne i chorobotwórcze. Rys. 2 przedstawia uproszczony schemat ilustrujący przekazywanie cech oporności i wirulencji.



Rys. 2. Przekazywanie cech oporności i wirulencji między mikroorganizmami.

Ponadto, w kontekście antybiotykooporności na uwagę zasługuje też zjawisko powstawania biofilmów bakteryjnych. W badaniach Emami i in. potwierdzono, iż *Pseudomonas aeruginosa* tworzące biofilm bakteryjny są bardziej odporne na działanie tobramycyny, piperacyliny, gentamycyny i imipenemu niż bakterie wolno żyjące, a także, iż ze zdolnością do tworzenia biofilmów koreluje oporność wielolekowa [9].

Rozważając niewątpliwą kwestię zagrożenia zdrowotnego, jaką stanowi zjawisko antybiotykooporności i jej rozprzestrzeniania w oczyszczalniach ścieków, nie należy zapominać, iż sama obecność antybiotyków w ściekach może przyczynić się do spadku wydajności

funkcjonowania zaprojektowanych układów technologicznych [19]. Za procesy usuwania azotu i fosforu, takie jak asymilację, amonifikację, nityfikację i denityfikację oraz wzmoczoną biologiczną defosfatację (lub defosfatację denityfikacyjną) odpowiadają specyficzne gatunki mikroorganizmów, zdolne do przekształcania form azotu i fosforu na drodze przeprowadzanych reakcji metabolicznych - obecność antybiotyków może zaburzyć ich szlaki metaboliczne, wpłynąć na liczebność populacji czy znacznie zmienić warunki panujące w komorach oczyszczalni, a w konsekwencji - obniżyć wydajność. Widoczny w literaturze wzrost zainteresowania badaczy kwestią antybiotykooporności

w systemach oczyszczania ścieków powinien zaowocować opracowaniem nowych, usprawniających pracę oczyszczalni rozwiązań technologicznych i przyczynić się do zmniejszenia ryzyka epidemiologicznego. Poza skuteczniejszym oczyszczaniem ścieków, konieczny jest

stały monitoring mikrobiologiczny uwzględniający aspekt antybiotykooporności i wzmożona kontrola przyjmowania leków czy zagospodarowywania odpadów medycznych.

### Literatura

1. Aydin, S., Ince, B., Ince, O., Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater, *Water Research*, 2015, 83, pp. 337-344.
2. Brown, T.A., Genomy, PWN, Warszawa, 2013.
3. Bondarczuk, K., Markowicz, A., Piotrowska-Seget, Z., The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application, *Environment International*, 2016, 87, pp. 49-55.
4. Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E., Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 91, pp. 1-9.
5. Byarugaba, D.K., Mechanisms of Antimicrobial Resistance, [In:] Antimicrobial Resistance in Developing Countries, Springer, New York, 2010, pp. 15-26.
6. Devarajan, N., Laffite, A., Mulaji, C.K., Otamonga, J.-P., Mpiana, P.T., Mubedi, J.I., Prabakar, K., Ibelings, B.W., Poté, J., Occurrence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Markers in a Tropical River Receiving Hospital and Urban Wastewaters, *PLoS ONE*, 2016, 11(2), pp. 1-14.
8. Du, J., Geng, J., Ren, H., Diang, L., Xu, K., Zhang, Y., 2015. Variation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater treatment plant with A<sup>2</sup>O-MBR system, *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(5), pp. 3715-3726.
9. Emami, S., Nikokar, I., Ghasemi, Y., Ebrahimpour, M., Ebrahim-Saraie, H.S., Araghian, A., Faezi, S., Farahbakhsh, M., Rajabi, A., Antibiotic Resistance Pattern and Distribution of *pslA* Gene Among Biofilm Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Waste Water of a Burn Center, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015, 8(11), pp. 1-5.
10. 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, *Environment International*, 2012, 42, pp. 31-36.
11. Huang, J.J., Hu, H.Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.Q., Lu, Y., Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 2011, 45, pp. 2775-2781.
12. Korzeniewska, E., Korzeniewska, A., Harnisz, M., Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 91, pp. 96-102.
13. Li, J., Cheng, W., Xu, L., Jiao, Y., Baig, S.A., Chen, H., Occurrence and removal of antibiotics and the corresponding resistance genes in wastewater treatment plants: effluents' influence to downstream water environment, *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, In Press (DOI: 10.1007/s11356-015-5916-2), pp. 1-10.
14. Li, J., Zhou, L., Zhang, X., Xu, C., Dong, L., Yao, M., Bioaerosol emissions and detection of airborne antibiotic resistance genes from a wastewater treatment plant, *Atmospheric Environment*, 2016, 124, pp. 404-412.
15. Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., Alvarez, P.J.J., Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants, *Water Research*, 2015, 85, pp. 458-466.
16. Markiewicz, Z., Kwiatkowski, Z.A., Bakterie, antybiotyki, lekooporność, PWN, Warszawa, 2008.
17. McKinney, C.W., Pruden, A., Ultraviolet Disinfection of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Antibiotic Resistance Genes in Water and Wastewater, *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(24), pp. 13393-13400.
18. Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos D., Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review, *Water Research*, 2013, 47, pp. 957-995.
19. Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater, *Water Research*, 2013, 47, pp. 1875-1887.
20. Varela, A.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., Quinolone resistant *Aeromonas spp.* as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater, *Science of the Total Environment*, 2016, 542, pp. 665-671.
21. Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., Meng, W., Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river, *Chemosphere*, 2015, 119, pp. 1379-1385.
22. Zhou, L.-J., Ying, G.-G., Liu, S., Zhao, J.-L., Yang, B., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., 2013. Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China, *Science of the Total Environment*, 2013, 452-453, pp. 365-376.
23. Ziemińska-Buczyńska, A., Felis, E., Folkert, J., Meresta, A., Stawicka, D., Gnida, A., Surmacz-Górska, J., Detection of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant – molecular and classical approach, *Archives of Environmental Protection*, 2015, 41(4), pp. 23-32.