

Wpłynęło 31.10.2017 r.
Zrecenzowano 8.12.2017 r.
Zaakceptowano 8.01.2018 r.

A – koncepcja
B – zestawienie danych
C – analizy statystyczne
D – interpretacja wyników
E – przygotowanie maszynopisu
F – przegląd literatury

STAN SANITARNY WÓD UŻYTKU EKOLOGICZNEGO „STAW PRZY KACZEŃCOWEJ” ORAZ LEKOOPORNOŚĆ BAKTERII *Escherichia coli* IZOLOWANYCH ZE ZBIORNIKA

Katarzyna WOLNY-KOŁADKA ABCDEF

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Katedra Mikrobiologii

Streszczenie

Badania miały na celu ocenę stanu mikrobiologicznego wód pobranych z użytku ekologicznego „Staw przy Kaczeńcowej” w Nowej Hucie (Kraków), a także określenie, czy w zbiorniku występują drobnoustroje potencjalnie niebezpieczne z epidemiologicznego punktu widzenia. Dodatkowo z wód „Stawu przy Kaczeńcowej” izolowano bakterie z gatunku *E. coli*, w celu określenia ich profilu lekooporności. Analizy mikrobiologiczne obejmowały określenie liczebności bakterii mezofilnych, psychrofilnych, bakterii z grupy *coli*, form kałowych *E. coli*, a także *E. faecalis*, *C. perfringens*, *Staphylococcus* spp. i *Salmonella* spp. Próbkę wód pobierane były 4 razy w roku (wiosna, lato, jesień, zima) w 5 punktach na terenie zbiornika. Ponadto, w każdym punkcie pomiarowym mierzono temperaturę wody oraz powietrza. Za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej określono wrażliwość szczepów *E. coli* na powszechnie stosowane antybiotyki. W pobranych próbkach zidentyfikowano wszystkie badane wskaźniki czystości mikrobiologicznej wód, które stanowią potencjalne zagrożenie epidemiologiczne. Wyizolowano 60 szczepów zidentyfikowanych jako *E. coli*, które najczęściej miały oporność na tetracyclinę i ampicylinę. Mimo że stwierdzono obecność szczepów wielolekoopornych, mechanizmu ESBL (β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym) nie wykryto.

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, lekooporność, metoda dyfuzyjno-krażkowa, mikrobiologiczne zanieczyszczenie wody, użytek ekologiczny

Do cytowania For citation: Wolny-Koładka K. 2018. Stan sanitarny wód użytku ekologicznego „Staw przy Kaczeńcowej” oraz lekooporność bakterii *Escherichia coli* izolowanych ze zbiornika. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie. T. 18. Z. 1 (61) s. 99–112.

WSTĘP

Zbiornikiem wodnym objętym badaniem w niniejszej pracy jest „Staw przy Kaczeńcowej”, który jest jednym z 12 użytków ekologicznych znajdujących się na terenie Miasta Krakowa. „Staw przy Kaczeńcowej”, utworzony uchwałą Rady Miasta Krakowa 19 grudnia 2007 r., położony jest na terenie dzielnicy Nowa Huta i zajmuje powierzchnię 0,82 ha. Użytek obejmuje zbiornik wodny i jego najbliższe otoczenie. Celem ochrony tego obszaru jest zachowanie ekosystemu, będącego siedliskiem chronionych gatunków zwierząt i roślin. Teren ten jest miejscem bytowania wielu gatunków ssaków oraz m.in. 23 gatunków ptaków związanych ze zbiornikiem wodnym i jego otoczeniem, wielu gatunków owadów, w tym 14 gatunków motyli, co stanowi 9% wszystkich motyli dziennych stwierdzonych w Polsce [Uchwała 2007]. Niestety, pomimo wysiłków władz miasta, miejskich aktywistów oraz lokalnej społeczności, użytek w dalszym ciągu jest ustawicznie zaśmiecany, a drobna infrastruktura (kosze na śmieci, ławki) dewastowana. Jest to zapewne spowodowane faktem, że „Staw przy Kaczeńcowej” zlokalizowany jest na uboczu, z dala od ruchliwych dróg i osiedli ludzkich. Ponieważ „Staw przy Kaczeńcowej” nie jest kąpieliskiem, wody zbiornika nie podlegają badaniom higieniczno-sanitarnym wykonywanym przez Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Krakowie. Natomiast do stawu mogą dostawać się w sposób przypadkowy bądź w wyniku celowej działalności człowieka zanieczyszczenia z instalacji wodno-kanalizacyjnych zlokalizowanych na terenie sąsiadującego ze zbiornikiem osiedla domków jednorodzinnych. Dlatego w wodach „Stawu przy Kaczeńcowej” znajdować się mogą mikroorganizmy chorobotwórcze, tj. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* czy *Enterococcus faecalis*. Biorąc pod uwagę fakt, że w Polsce do wód powierzchniowych trafia nawet 10% nieczyszczonych ścieków komunalnych i ok. 30% ścieków oczyszczonych niedostatecznie, stała obecność bakterii kałowych, w tym *E. coli*, w wodach powierzchniowych nie powinna dziwić. Głównym celem badań mikrobiologicznych wód powierzchniowych jest ocena liczebności bakterii *E. coli*, która jest uznanym wskaźnikiem czystości wód. Niemniej jednak coraz większego znaczenia nabiera także problem oporności środowiskowych szczepów *E. coli* na stosowane w medycynie antybiotyki [BARTOSZEWICZ i in. 2014]. Na rozprzestrzenianie się *E. coli* w środowisku ma wpływ odprowadzanie ścieków komunalnych do wód powierzchniowych i gleby [WATKINSON i in. 2007]. Dlatego coraz częściej zwraca się uwagę również na rolę *E. coli* w narastaniu lekooporności w środowisku wodnym [BAQUERO i in. 2008]. Jest to niezwykle istotne, ponieważ wykrycie bakterii *E. coli* opornych na antybiotyki może być przydatne, zwłaszcza w badaniach monitoringowych, wskaźnikiem obecności w środowisku wodnym zanieczyszczeń allochtonicznych [BARTOSZEWICZ i in. 2014].

Dlatego w niniejszej pracy określono zmiany liczebności wybranych mikroorganizmów zasiedlających wody „Stawu przy Kaczeńcowej”, mających znaczenie

z higieniczno-sanitarnego punktu widzenia. W tym celu zastosowano kryteria oceny stanu mikrobiologicznego wody zawarte w Rozporządzeniu Ministra Środowiska w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać wody powierzchniowe [Rozporządzenie MŚ 2004]. Ponadto, celem badań była izolacja i identyfikacja gatunkowa szczepów *E. coli* znajdujących się w wodach użytku ekologicznego oraz określenie ich profilu lekooporności.

METODY BADAŃ

Wodę w ilości 1000 ml pobierano do sterylnych pojemników z 5 punktów zlokalizowanych na terenie „Stawu przy Kaczeńcowej”, znajdującego się w największej dzielnicy Krakowa – Nowej Hucie. W celu uwzględnienia zjawiska sezonowości pobór próbek wody prowadzono cztery razy w roku w następujących terminach: 23.01.2017 r. (zima), 24.04.2017 r. (wiosna), 17.07.2017 r. (lato) i 16.10.2017 r. (jesień) [PN-EN ISO 19458:2006]. Wodę pobierano w 5 punktach: 1 – dopływ, 5 – odpływ, 2, 3, 4 – oddalone od siebie miejsca na terenie stawu (tab. 1, rys. 1). W każdym punkcie pomiarowym mierzono temperaturę wody oraz powietrza za pomocą termometru elektronicznego (Biowin).

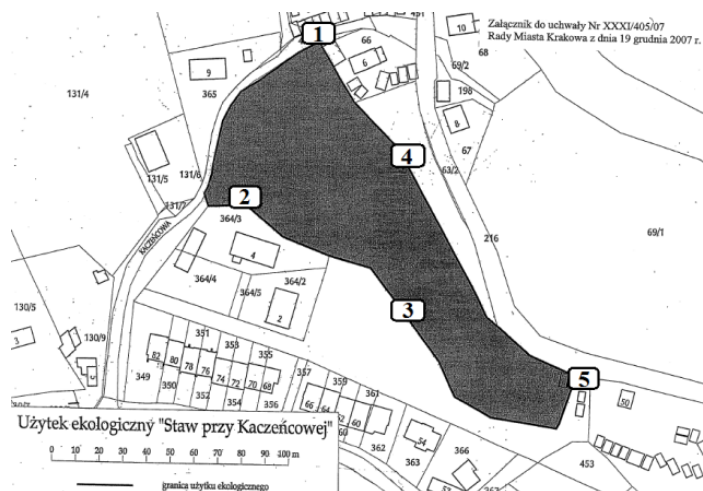
Tabela 1. Współrzędne punktów poboru

Table 1. Coordinates of the sampling sites

Numer No.	Lokalizacja GPS GPS position
1	N: 50° 05' 16", E: 20° 01' 59"
2	N: 50° 05' 14", E: 20° 01' 59"
3	N: 50° 05' 13", E: 20° 02' 01"
4	N: 50° 05' 15", E: 20° 02' 01"
5	N: 50° 05' 13", E: 20° 02' 03"

Źródło: opracowanie własne. Source: own elaboration.

Metodą filtracyjną oznaczono: bakterie z grupy *coli* (purpurowe kolonie ze złotym połyskiem, hodowane na agarze ENDO, 37°C, 48 h; BTL, Polska); termotolerancyjne formy kałowe *E. coli* (purpurowe kolonie ze złotym połyskiem, hodowane na agarze ENDO, 44°C, 48 h); *E. faecalis* (drobne, ciemnobordowe kolonie hodowane na podłożu Slanetz–Bartleya, 37°C, 72 h; BTL, Polska); *C. perfringens* (czarne kolonie hodowane w warunkach beztlenowych na podłożu Wilsona–Blaira, 37°C, 48 h; BTL, Polska). Metodą seryjnych rozcieńczeń według Kocha oznaczono występowanie: bakterii mezofilnych (hodowane na podłożu MPA, 37°C, 48 h; BTL, Polska); bakterii psychrofilnych (hodowane na podłożu MPA, 22°C, 72 h); *Staphylococcus* spp. (hodowane na podłożu Chapmana, 37°C, 48 h; BTL, Polska)



Rys. 1. Lokalizacja punktów poboru wody; źródło: Uchwała [2007]

Fig. 1. Location of the water sampling sites; source: Uchwała [2007]

oraz bakterii z rodzaju *Salmonella* (hodowane na agarze SS, 37°C, 48 h; BTL, Polska) [EN ISO 7899-2:2000; EN ISO 9308-1:2000; PN-EN ISO 6222:2002; Rozporządzenie MŚ 2004]. Po zakończonej inkubacji kolonie zliczono, a wyniki analizy wody wyrażono w zależności od zastosowanej metody jako liczbę jednostek tworzących kolonie w 100 ml wody – metoda filtracji membranowej (jtk·100 ml⁻¹ – bakterie z grupy *coli*, *E. coli*, *E. faecalis*, *C. perfringens*) lub w 1 ml wody – metoda seryjnych rozcieńczeń wg Kocha (jtk·ml⁻¹ – bakterie mezofilne i psychrofilne, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp.).

Aby potwierdzić przynależność gatunkową zgromadzonych izolatów *E. coli*, wyrosnięte purpurowe kolonie bakterii ze złotym połyskiem przeszczepiano z agaru ENDO na wybiórcze, chromogenne podłoże TBX agar (BTL, Polska) i inkubowano w 44°C przez 24 h oraz sporządzano preparaty mikroskopowe i barwiono je metodą Grama. Kolonie, które w preparacie mikroskopowym zidentyfikowano jako Gram-ujemne pałeczki, a na agarze TBX wyrosły w postaci zielono-niebieskich kolonii namnożono i użyto w dalszych analizach.

W celu zbadania wrażliwości szczepów *E. coli* izolowanych z próbek wody na antybiotyki, wykonano testy dyfuzyjno-krążkowe na podłożu Muellera–Hintona agar (BTL, Polska). Ocenę wrażliwości i interpretację wyników przeprowadzono zgodnie z wytycznymi EUCAST [2017], a w przypadku antybiotyków tam nieujętych, tj. cefalotyina [KRONVALL i in. 1984], cefazolina [TURNIDGE 2011], cefamandol [BARRY i in. 1983] oraz tetracyklina [SADER i in. 2007], posłużono się publikacjami innych autorów. Oznaczenie mechanizmu ESBL (β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym) wykonano zgodnie z metodą dwóch krążków, opisaną przez DRIEUX i in. [2008]. Jako kontrolę zastosowano szczepy wzorcowe:

Escherichia coli ATCC 25922, służące do kontroli jakości lekowrażliwości oraz do kontroli jakości oznaczenia mechanizmu ESBL, jako kontrola negatywna oraz *Escherichia coli* ATCC 35218, służące do kontroli jakości krążków antybiogramowych z antybiotykami β -laktamowymi w połączeniu z inhibitorami β -laktamaz (kwasy klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam).

Za pomocą programu Statistica v. 12.5 (StatSoft) wykonano dwuczynnikową analizę wariancji w celu sprawdzenia istotności czasowego i przestrzennego zróżnicowania liczebności badanych mikroorganizmów. Oceniono także korelację pomiędzy średnią liczebnością badanych grup drobnoustrojów w zależności od stwierdzonej w danej porze roku temperatury wody i powietrza. Test Chi-kwadrat (χ^2) przeprowadzono z wykorzystaniem kalkulatora Social Science Statistics [nie-datowane], w celu potwierdzenia istotności różnic w oporności na poszczególne antybiotyki bakterii *E. coli* izolowanych w czterech terminach (wiosna, lato, jesień, zima).

WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania dotyczące oceny stanu mikrobiologicznego wód „Stawu przy Kaczeńcowej” w Nowej Hucie w poszczególnych punktach pomiarowych w 2017 r. wykazały duże zróżnicowanie w liczebności i składzie gatunkowym badanych drobnoustrojów (tab. 2). Liczba bakterii mezofilnych wahała się od $109 \text{ jtk}\cdot\text{ml}^{-1}$ w zimie w punkcie 1. do $1470 \text{ jtk}\cdot\text{ml}^{-1}$ w lecie w punkcie 2. Natomiast największą liczbę bakterii psychrofilnych ($1648 \text{ jtk}\cdot\text{ml}^{-1}$) stwierdzono w punkcie 1. na wiosnę, a mniejszą $211 \text{ jtk}\cdot\text{ml}^{-1}$, w tej samej porze roku w punkcie 2. Ponadto, w ciągu rocznych badań stwierdzono, że stosunek liczebności bakterii mezofilnych do psychrofilnych ulegał znaczącym zmianom. Wiosną i latem przeważały mezofile, natomiast relacja ta ulegała odwróceniu jesienią i zimą (rys. 2).

Bakterie psychrofilne izolowane są z wód w okresach odznaczających się występowaniem niskiej temperatury, co poniekąd zostało potwierdzone w badaniach własnych. Największą średnią liczbę bakterii psychrofilnych stwierdzono wiosną i zimą, co mogło być spowodowane sukcesywnym wyczerpywaniem się związków organicznych w zbiorniku wodnym, a tym samym jego oczyszczeniem oraz występowaniem niskiej temperatury [CHELMICKI 2001; FRĄCZEK i in. 2015]. Natomiast zmiany liczebności bakterii mezofilnych często mają charakter dynamiczny, a ich obecność w zbiorniku wodnym może być okresowa. Bakterie mezofilne zaliczane są do mikroorganizmów allochtonicznych, których obecność w wodzie nie jest pożądana i może być efektem zanieczyszczenia, np. ściekami [RHEINHEIMER 1987].

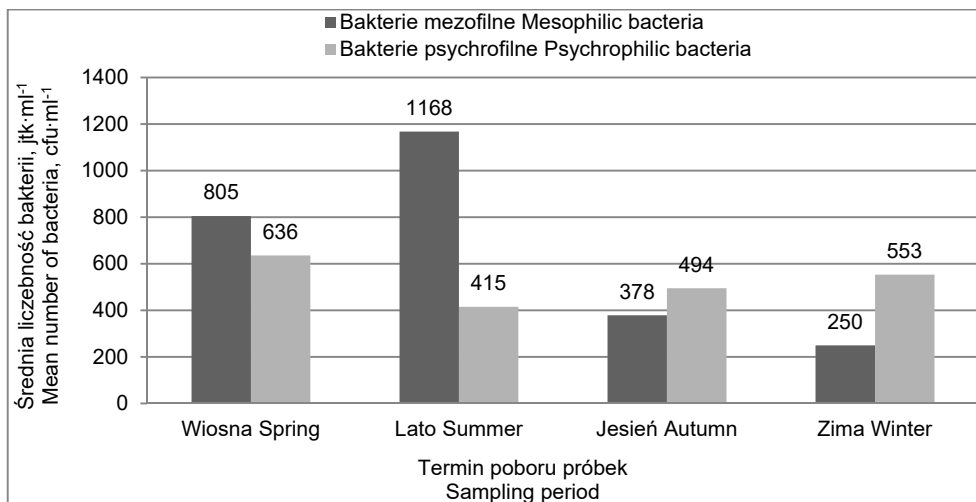
Bakterie z grupy *coli* wykryto we wszystkich badanych próbkach, poza dwoma pobranymi w zimie. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku form kałowych *E. coli*, które w zimie występowały jedynie w punkcie 1. ($10 \text{ jtk}\cdot(100 \text{ ml})^{-1}$). Zarówno bakterie z grupy *coli*, jak i formy kałowe *E. coli* obficie izolowano z po-

Tabela 2. Częstość występowania wybranych grup drobnoustrojów w wodach „Stawu przy Kaczeńcowej” oraz temperatura wody i powietrza w punktach pomiarowych

Table 2. The prevalence of the selected microbial groups in waters of the „Staw przy Kaczeńcowej” as well as water and air temperature at the sampling sites

Termin poboru Sampling date	Punkt poboru Sampling site	Bakterie z grupy coli Coliforms	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	jtk·ml ⁻¹			Temperatura, °C Temperature, °C	
							Bakterie mezofilne Mesophilic bacteria	Bakterie psychrofilne Psychrophilic bacteria	<i>Salmonella</i> spp.	wody water	powietrza air
Wiosna Spring	1.	93	980	10	40	45	1 253	1 648	6	13,1	14,2
	2.	174	289	16	10	20	1 097	211	10	14,2	14,0
	3.	39	45	4	184	30	875	674	0	14,5	13,8
	4.	40	64	11	5	8	280	356	5	14,3	13,7
	5.	28	38	9	0	18	520	290	0	13,0	13,8
Lato Summer	1.	35	155	37	128	55	1 274	576	5	19,0	27,5
	2.	264	130	40	370	60	1 470	456	17	27,8	26,3
	3.	15	480	40	290	44	1 374	400	10	27,2	25,9
	4.	72	135	30	180	35	630	289	0	27,5	26,3
	5.	55	85	89	5	130	1 092	353	3	19,7	22,1
Jesień Autumn	1.	300	44	8	172	28	152	472	0	6,7	6,9
	2.	144	111	15	184	184	430	906	0	5,3	5,7
	3.	193	370	31	120	14	500	378	0	5,3	5,4
	4.	130	115	0	80	20	490	309	0	5,2	4,5
	5.	103	100	0	29	100	320	407	0	6,1	5,0
Zima Winter	1.	52	10	0	50	15	109	352	0	4,5	1,7
	2.	10	0	0	72	10	309	578	0	1,7	0,5
	3.	70	0	0	16	10	367	638	0	1,0	0,8
	4.	0	0	0	7	9	190	398	0	1,4	0,6
	5.	0	0	0	0	16	273	800	0	4,0	0,5

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

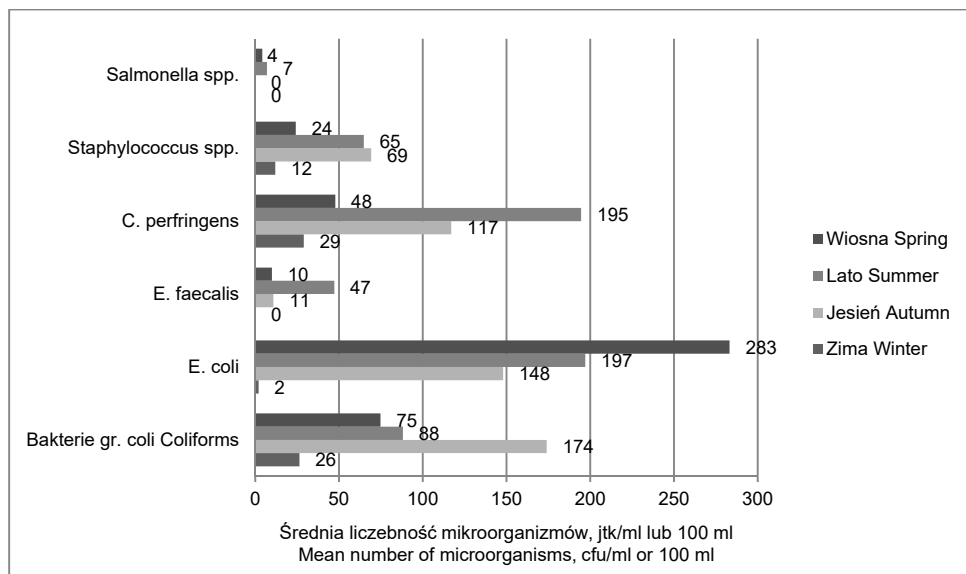


Rys. 2. Zmiany średniej liczebności bakterii mezofilnych i psychrofilnych w analizowanym okresie badawczym; źródło: wyniki własne

Fig. 2. Changes in the mean number of mesophilic and psychrophilic bacteria in the analyzed research period; source: own study

branych próbek wody wiosną, latem i jesienią (tab. 2, rys. 3). Pozostałe bakterie chorobotwórcze najliczniej w analizowanych wodach występowały latem (rys. 3).

Bakterie chorobotwórcze, mogą się dostawać do wód powierzchniowych wraz ze ściekami komunalnymi, ściekami pochodzącymi z ferm hodowlanych oraz wodami opadowymi. Ich źródłem może być także kał dzikich zwierząt [KUKUŁA 2006; LIBUDZISZ, KOWAL 2000]. Podstawowym wskaźnikiem mikrobiologicznym, uwzględnianym w ocenie jakości sanitarnej wód, jest obecność w badanym materiale bakterii z grupy *coli* (głównie szczepów *E. coli* oraz drobnoustrojów z rodzaju *Enterobacter*, *Citrobacter* i *Klebsiella*) i *E. coli* typu fekalnego (szczepy termotolerancyjne, zdolne do wzrostu w 44°C), które oznaczane były w niniejszej pracy [ROMPRÉ i in. 2002]. *E. faecalis* to bakteria, która nie ma zdolności do namnażania się w środowisku wodnym, dlatego jej obecność świadczy o świeżym kałowym zanieczyszczeniu wody [LIBUDZISZ, KOWAL 2000]. Natomiast oznaczana w badaniach własnych obecność laseczek beztlenowych z rodzaju *Clostridium*, ze względu na ich zdolność do wytwarzania przetrwalników, świadczy o odległym w czasie zanieczyszczeniu kałowym wody [LIBUDZISZ, KOWAL 2000; MEDEMA i in. 1997]. Analizę mikrobiologiczną wody poszerzono o ocenę liczebności bakterii *Staphylococcus* spp. Szczególnie niebezpieczne są koagulazo-dodatnie gatunki, należące do rodzaju *Staphylococcus*, ponieważ mogą stać się przyczyną zakażeń ropnych skóry, tkanek podskórnych oraz tkanek miękkich, zakażeń układowych oraz zatruc związanych z produkcją toksyn [WOLNY-KOŁADKA i in. 2014]. Gronkowce, w przeciwieństwie do większości bakterii wskaźnikowych, odznaczają się nato-



Rys. 3. Zmiany średniej liczebności bakterii wskaźnikowych w analizowanym okresie badawczym; źródło: wyniki własne

Fig. 3. Changes in the mean prevalence of indicator bacteria in the study period; source: own study

miast dłuższym okresem przeżywalności w wodzie, przez co stanowią większe potencjalne zagrożenie epidemiologiczne [NIEWOLAK, OPIEKA 2000]. W niniejszej pracy oznaczano także występowanie w badanych próbkach wody pałeczek z rodzaju *Salmonella*, które są często izolowane ze środowiska wodnego. Niemniej jednak ich występowanie i liczebność jest bardzo zmienna w czasie, a wpływ na to ma chociażby brak zdolności do tworzenia przetrwalników [CHIU i in. 2004]. Wszystkie gatunki należące do rodzaju *Salmonella* uważane są za bezwzględnie chorobotwórcze. Mogą być przyczyną wystąpienia zatruc pokarmowych połączonych z gorączką, duru brzuszego, posocznicy a także infekcji skórnych oraz zakażeń dróg oddechowych i moczowych [CHIU i in. 2004].

Otrzymane wyniki zinterpretowano na podstawie norm zawartych w Rozporządzeniu Ministra Środowiska [2004], mówiącym o jakości wód powierzchniowych. Próbkę wód pobrane ze „Stawu przy Kaczeńcowej” zostały zakwalifikowane do II klasy czystości wód (w pięciostopniowej skali). Do II klasy zalicza się wody dobrej jakości, które spełniają większość stawianych im wymagań i podlegają niewielkiemu wpływowi antropogenicznemu [Rozporządzenie MŚ 2004]. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że jakość wody w użytku ekologicznym „Staw przy Kaczeńcowej” w Nowej Hucie jest zadowalająca, mimo obecności w niej drobnoustrojów potencjalnie niebezpiecznych dla człowieka.

Na podstawie analizy statystycznej uzyskanych wyników określono, które różnice w liczebności mikroorganizmów pomiędzy poszczególnymi porami roku oraz

punktami poboru wód są istotne statystycznie. Ponadto, analiza statystyczna zależności średniej liczebności drobnoustrojów w badanych próbkach wód od średniej temperatury wody i powietrza potwierdziła, z wyjątkiem bakterii psychrofilnych, istnienie dodatniej korelacji między tymi wartościami (tab. 3).

Tabela 3. Wyniki analizy wariancji dotyczącej czasowego i przestrzennego zróżnicowania liczebności mikroorganizmów oraz wartość współczynnika korelacji r Pearsona

Table 3. Results of analysis of variance of the spatial and temporal variability in the number of microorganisms and the value of Pearson's correlation coefficient r

Wskaźniki mikrobiologiczne Microbiological indexes	Wartość współczynnika F Coefficient F		Współczynnik korelacji Correlation coefficient	
	punkt poboru sampling site	termin poboru season	temperatura wody water temperature °C	temperatura powietrza air temperature °C
Bakterie z grupy <i>coli</i> Coliforms	0,86	4,37 ¹⁾	0,02	0,06
<i>E. coli</i>	5,99 ¹⁾	10,80 ¹⁾	0,66	0,67
<i>E. faecalis</i>	0,22	4,85 ¹⁾	0,92	0,93
<i>C. perfringens</i>	0,0001	1,47	0,74	0,76
<i>Staphylococcus</i> spp.	0,11	0,73	0,43	0,47
Bakterie mezofilne Mesophilic bacteria	0,15	11,11 ¹⁾	0,99	0,99
Bakterie psychrofilne Psychrophilic bacteria	7,58 ¹⁾	6,18 ¹⁾	-0,45	-0,46
<i>Salmonella</i> spp.	0,007	1,69	0,98	0,98

¹⁾ Wartości są istotne, gdy $p < 0,05$. ¹⁾ Values are significant at $p < 0,05$.

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

Z wody pobranej ze „Stawu przy Kaczeńcowej” wyizolowano 60 szczepów *E. coli*, po 15 izolatów w każdej porze roku. Najczęściej stwierdzano oporność na tetracylinę (47%) i ampicylinę (45%) (tab. 4). Szczepy *E. coli* izolowane z położonego nieopodal Zalewu w Nowej Hucie również odznaczały się najwyższą opornością na te dwa antybiotyki (56% i 53%) [WOLNY-KOŁADKA, LENART-BOROŃ 2016]. PIGNATO i in. [2009], REINTHALER i in. [2009] oraz PATOLI i in. [2010] w swoich badaniach uznali ampicylinę za antybiotyk, na który bakterie *E. coli* izolowane z wód były najbardziej odporne (88,89%; 22,71%; 18% szczepów opornych). Duży odsetek szczepów opornych stwierdzono także w przypadku cefazolin i cefalotyny. Nie zaobserwowano oporności na amikacynę, aztreonam, cefepim, cefotaksym, ceftazydym, gentamicynę, netilmicynę i trimetoprim/sulfametoksazol.

Wśród bakterii z gatunku *E. coli* 30% izolatów było wrażliwych na wszystkie testowane antybiotyki. Niestety, pozostałe szczepy (70%) były odporne na jeden lub

Tabela 4. Profil lekooporności *E. coli***Table 4.** Profile of *E. coli* drug resistant

Lp. No.	Antybiotyk (skrót, µg) Antibiotic (abbr., µg)	Zakres Range		Lekowrażliwość Drug sensitivity		
		S ≥	R <	S	I	R
1	Amikacyna (AK, 30) Amikacin	18	15	57	3	–
2	Amoksycyлина/ kwas klawulanowy ¹⁾ (AMC, 30) Amoxicillin/ clavulanic acid ¹⁾	19	19	50	–	10
3	Ampicylina (AMP, 10) Ampicillin	14	14	31	2	27
4	Aztreonam (ATM, 30) Aztreonam	26	21	54	6	–
5	Cefamandol (MA, 30) Cefamandole	18	14	52	3	5
6	Cefepim (FEP, 30) Cefepime	27	21	58	2	–
7	Cefotaksym ¹⁾ (CTX, 30) Cefotaxime ¹⁾	20	17	60	–	–
8	Cefoksytyna (FOX, 30) Cefoxitin	19	19	50	–	10
9	Ceftazydim ¹⁾ (CAZ, 30) Ceftazidime ¹⁾	22	19	54	6	–
10	Cefalotyna (KF, 30) Cefalotin	13	13	30	15	15
11	Cefazolina (KZ, 30) Cefazolin	23	19	33	8	19
12	Ciprofloksacylina (CIP, 5) Ciprofloxacin	26	24	56	–	4
13	Gentamicyna (CN, 10) Gentamicin	17	14	36	24	–
14	Netilmicylina (NET, 30) Netilmicin	15	12	55	5	–
15	Piperacylina (PRL, 100) Piperacillin	20	17	50	–	10
16	Piperacylina/tazobaktam (TZP, 110) Piperacillin /tazobactam	20	17	56	2	2
17	Tetracyklina (TE, 30) Tetracycline	15	11	44	6	10
18	Tikarcylina (TIC, 75) Ticarcyllin	23	23	30	2	28
19	Tobramycyna (TOB, 10) Tobramycin	17	14	29	23	8
20	Trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 25) Trimethoprim/sulfamethoxazole	14	11	56	4	–

¹⁾ Antybiotyki stosowane w wykrywaniu mechanizmu ESBL.

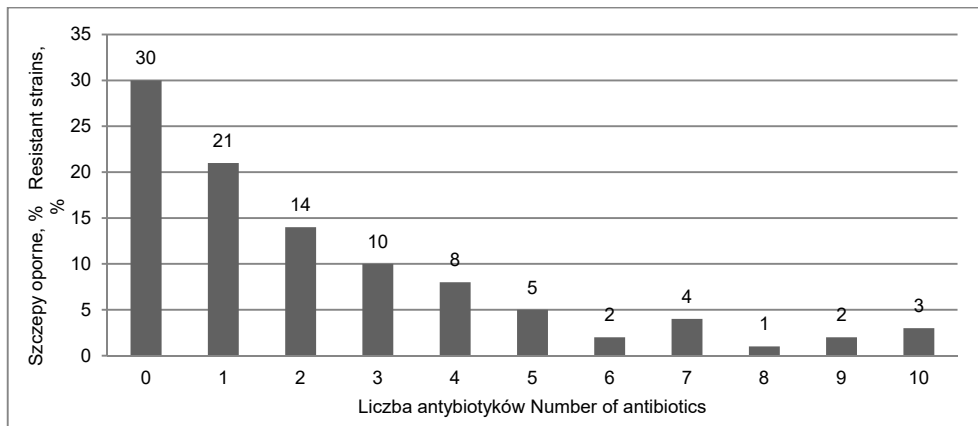
¹⁾ Antibiotics used in the detection of ESBL mechanism.

Objaśnienia: S – izolaty wrażliwe, I – izolaty średnio wrażliwe, R – izolaty odporne.

Explanations: S – sensitive isolates, I – medium-sensitive isolates, R – resistant isolates.

Źródło: wyniki własne. Source: own study.

więcej antybiotyków. Oporność na aż 10 antybiotyków wykazywało jednocześnie 3% izolatów (rys. 4). SAHM i in. [2001] stwierdzili, że szczepów wielolekoopornych na 4 (1,4%) lub 5 (0,2%) antybiotyków jest znacznie mniej niż tych, które są odporne na jeden (20%) czy dwa (17%). Zbliżoną zależność można odnaleźć w badaniach PATOLI i in. [2010], gdzie oporność na dwa antybiotyki prezentowało 33,34% izolatów, a na pięć antybiotyków już tylko 3,70%, przy czym należy zauważyć, że na sześć antybiotyków oporność wykazywało już aż 11,11% szczepów *E. coli*. W badaniach własnych nie stwierdzono występowania mechanizmu oporności typu ESBL.



Rys. 4. Odsetek wielolekoopornych szczepów *E. coli* na stosowane antybiotyki; źródło: wyniki własne

Fig. 4. The proportion of multidrug resistant *E. coli* strains; source: own study

Test χ^2 potwierdził statystycznie istotne różnice w częstotliwości występowania izolatów opornych ($p < 0,05$) w przypadku sześciu antybiotyków. Wartość statystyki χ^2 wynosiła odpowiednio: ampicylina (13,52), cefepim (9,38), cefazolina (13,01), gentamicyna (10,97), tikarcylina (11,99), tobramycyna (16,28).

WNIOSKI

1. W zbiorniku „Staw przy Kaczeńkowej” występują drobnoustroje potencjalnie niebezpieczne z epidemiologicznego punktu widzenia, tj. bakterie z grupy *coli*, formy kałowe *E. coli*, a także *E. faecalis*, *C. perfringens*, *Staphylococcus* spp. i *Salmonella* spp.

2. Liczebność drobnoustrojów podlegała dynamicznym zmianom i jest kształtowana warunkami temperaturowymi.

3. Wody zbiornika zasiedlają wielolekooporne szczepy *E. coli*.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane z dotacji celowej na naukę przyznanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (BM 4104).

BIBLIOGRAFIA

- BAQUERO F., MARTINEZ J.L., CANTON R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 19 s. 260–265.
- BARRY A.L., JONES R.N., THORNSBERRY C. 1983. Evaluation of the cefonicid disk criteria, including disk quality control guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 17. Iss. 2 s. 232–239.

- BARTOSZEWICZ M., MICHALSKA M., CIESZYŃSKA M. 2014. Antybiotykooporność bakterii heterotroficznych jako skutek zanieczyszczenia środowiska [Resistance to antibiotics in heterotrophic bacteria as a result of environmental pollution]. *Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine*. Vol. 17. Iss. 4 s. 38–46.
- CHELMICKI W. 2001. Woda. Zasoby, degradacja, ochrona [Water. Resources, degradation, protection]. Warszawa. PWN. ISBN 978-83-01-13557-7 ss. 306.
- CHIU CH., SU L.H., CHU C. 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 17 s. 311–322.
- DRIEUX L., BROSSIER F., SOUGAKOFF W., JARLIER V. 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 14. Iss. 1 s. 90–103.
- EN ISO 7899-2. 2000. Water quality. Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method.
- EN ISO 9308-1. 2000. Water quality. Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method.
- EUCAST 2017. Clinical breakpoints – bacteria (v. 7.0) [online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. [Dostęp 01.01.2017]. Dostępny w Internecie: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.0_Breakpoint_Tables.pdf
- FRĄCZEK K., GRZYB J., CHMIEL M.J. 2015. Ocena zagrożenia bakteriologicznego w wodach powierzchniowych w rejonie eksploatowanego składowiska odpadów komunalnych [The evaluation of bacteriological hazard in surface waters near the operating municipal landfill site]. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*. T. 15. Z. 1 (49) s. 37–45.
- KRONVALL G., PETERSSON A.C., LJUNGGREN K., SOLTESZ V. 1984. Single-strain regression analysis for quality control of cephalotin-susceptibility testing and determination of interpretive breakpoints. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. Sec. B. Vol. 92. Iss. 1 s. 13–22.
- KUKUŁA E. 2006. Ocena jakości mikrobiologicznej wód Sanu [Evaluation of microbiological quality of San water]. Materiały z II Konferencji Naukowo-Technicznej „Błękitny San”. Rzeszów. Uniwersytet Rzeszowski s. 121–125.
- LIBUDZISZ Z., KOWAL K. 2000. Mikrobiologia techniczna [Technical microbiology]. Łódź. PŁ. ISBN 978-83-01-15221-5. T. I s. 442.
- MEDEMA G.J., BAHAR M., SCHETS F.M. 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, fecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganisms. *Water Science and Technology*. Vol. 35 s. 249–252.
- NIWOLAK S., OPIEKA A. 2000. Potentially pathogenic microorganisms in water and bottom sediments in the Czarna Hańcza River. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol. 9 s. 183–194.
- PATOLI A.A., PATOLI B.B., MEHRAJ V. 2010. High prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from Hyderabad. *Gomal Journal of Medical Sciences*. Vol. 8. Iss. 1 s. 23–26.
- PIGNATO S., CONIGLIO M.A., FARO G., WEILL F.X., GIAMMANCO G. 2009. Plasmid-mediated multiple antibiotic resistances of *Escherichia coli* in crude and treated wastewaters used in agriculture. *Journal of Water and Health*. Vol. 7(2) s. 251–258.
- PN-EN ISO 6222. 2002. Jakość wody. Oznaczenie żywych organizmów. Określanie ogólnej liczby kolonii na agarze odżywczym metodą posiewu powierzchniowego lub wgłębnego [Water quality. Determination of living organisms. Determination of the total number of colonies on nutrient agar using spread plate or pour plate methods].
- PN-EN ISO 19458. 2006. Jakość wody. Pobieranie próbek do badań mikrobiologicznych [Water quality. Sampling for microbiological analysis].
- RHEINHEIMER G. 1987. Mikrobiologia wód [Microbiology of water]. Warszawa. PWRiL ss. 303.

- REINTHALER F.F., POSCH J., FEIERL G., HAAS D., RUCKENBAUER D., MASCHER F., MARTH E. 2003. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*. Vol. 37 s. 1685–1690.
- ROMPRE A., SERVAIS P., BAUDART J., DE-ROUBIN M.R., LAURENT P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 49 s. 31–54.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód. [Regulation of the Minister of Environment dated 11 February 2004 on the classification for presenting the status of surface water and groundwater, on the ways of monitoring, interpreting results and presentation of the status of these waters]. *Dz.U.* 2004. Nr 32 poz. 284.
- SADER H.S., FERRARO M.J., RELLER B., SCHRECKENBERGER P.C., SWENSON J.M., JONES R.N. 2007. Reevaluation of clinical and laboratory standards institute disk diffusion breakpoints for tetracyclines for testing Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 45. Iss. 5 s. 1640–1643.
- SAHM D.F., THORNSBERRY C., MAYFIELD D.C., JONES M.E., KARLOWSKY J.A. 2001. Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 45. Iss. 5 s. 1402–1406.
- Social Science Statistics niedatowane. Chi-Square test calculator [online]. [Dostęp 28.12.2017]. Dostępny w Internecie: <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/Default.aspx>
- TURNIDGE J.D. 2011. Cefazolin and *Enterobacteriaceae*: rationale for revised susceptibility testing breakpoints. *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 52. Iss. 7 s. 917–924.
- Uchwała nr XXXI/405/07 Rady Miasta Krakowa z dnia 19 grudnia 2007 r. w sprawie ustanowienia użytku ekologicznego „Staw przy Kaczeńcowej” [Resolution No. XXXI/405/07 of the Krakow City Council of 19 December 2007 on the establishment of ecological area „Staw przy Kaczeńcowej”].
- WATKINSON A.J., MICALIZZI G.R., BATES J.R., COSTANZO S.D. 2007. Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 7. Iss. 7 s. 2224–2229.
- WOLNY-KOŁADKA K., LENART-BOROŃ A. 2016. Phenotypic and molecular assessment of drug resistance profile and genetic diversity of waterborne *Escherichia coli*. *Water Air and Soil Pollution*. Vol. 227 ss. 146.
- WOLNY-KOŁADKA K., LENART-BOROŃ A., KASPROWICZ A. 2014. Disc-diffusion and PCR detection of methicillin resistance in environmental airborne strains of *Staphylococcus* spp. *Polish Journal of Microbiology*. Vol. 63. Iss. 3 s. 363–368.

Katarzyna WOLNY-KOŁADKA

**SANITARY CONDITION OF WATER
OF THE “STAW PRZY KACZEŃCOWEJ” ECOLOGICAL AREA
AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli*
ISOLATED FROM THE RESERVOIR**

Key words: *ecological area, Escherichia coli, disc diffusion method, drug resistance, microbiological contamination of water*

S u m m a r y

This study was aimed to assess the microbiological quality of water in the ecological area „Staw przy Kaczeńcowej” in Nowa Huta (Cracow) as well as to determine whether its waters contain microorganisms potentially dangerous from an epidemiological point of view. In addition, *E. coli* bacteria were isolated from the water of “Staw przy Kaczeńcowej” to determine their drug resistance profile. Microbiological analyses included the determination of the number of mesophilic and psychrophilic bacteria, coliforms, fecal *E. coli*, as well as *E. faecalis*, *C. perfringens*, *Staphylococcus* spp. and *Salmonella* spp. Water samples were collected 4 times per year (spring, summer, autumn, winter) at 5 points within the area of the reservoir. Water and air temperature was measured onsite. Using the disc diffusion method, the sensitivity of *E. coli* strains to commonly used antibiotics was determined. All analyzed microbiological indicators of poor water quality were found in the analyzed water samples, which may pose a potential epidemiological risk. In addition were isolated 60 strains identified as *E. coli*, that most commonly had resistance to ticarcillin and ampicillin. Although, multidrug resistant strains have been identified, ESBL (β -lactamases with an extended substrate spectrum) mechanism has not been detected.

Adres do korespondencji: dr inż. Katarzyna Wolny-Koładka, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Katedra Mikrobiologii, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; tel. +48 12 662-40-96, e-mail: katarzyna.wolny@urk.edu.pl