

Natalia Jendrzewska
ul. Warszawska 26a/21
86-300 Grudziądz

Warszawa, dn. 6.03.2018 r.

Streszczenie

pracy doktorskiej pt. „Zmiany antybiotykooporności bakterii w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego”.

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się zjawisku oporności bakterii na antybiotyki, w tym rozprzestrzenianiu się drobnoustrojów lekoopornych, zarówno w warunkach klinicznych, jak i w środowisku. Dostępne dane sugerują, że oczyszczalnie ścieków, do których trafia znaczna część pozostałości antybiotyków oraz ich metabolitów, powinny być traktowane jako potencjalne źródło wtórnego zanieczyszczenia środowiska bakteriami lekoopornymi.

Badania podjęte w niniejszej pracy miały na celu prześledzenie i scharakteryzowanie zmian antybiotykooporności bakterii zachodzących w trakcie procesu oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Wykorzystano w nich ścieki pochodzące z dwóch oczyszczalni ścieków: „Czajka” w Warszawie, oraz miejskiej oczyszczalni w Grudziądzu. Przeprowadzono analizę ilościową i jakościową bakterii opornych na wybrane antybiotyki, występujących w próbkach ścieków pobranych na różnych etapach oczyszczania. Wyizolowano dominujące szczepy bakterii antybiotykoopornych, określono ich profile lekooporności na podstawie antybiogramów i oszacowano skalę występowania zjawiska wielooporności. Podjęto także próbę oceny wpływu obecności wybranych antybiotyków w ściekach na występowanie i selekcjonowanie się bakterii antybiotykoopornych w osadzie czynnym, na podstawie doświadczeń prowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Zakres badań obejmował również ocenę występowania enzymów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki β -laktamowe, takich jak karbapenemazy, metalo- β -laktamazy, cefalosporynazy, i β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym. W celu prześledzenia występowania w ściekach wybranych genów warunkujących antybiotykooporność posłużono się technikami biologii molekularnej: detekcją genów metodą PCR, badaniami ilościowymi metodą qPCR oraz sekwencjonowaniem.

Przeprowadzone badania pozwoliły na pozytywne zweryfikowanie przyjętych tez badawczych. Stwierdzono, że ścieki miejskie zawierały znaczne ilości bakterii lekoopornych,

których liczebność mogła jeszcze wzrastać w trakcie procesu oczyszczania ścieków. W przypadku większości antybiotyków miejscem występowania największej liczby drobnoustrojów lekoopornych były komory napowietrzania. Znaczne ilości bakterii opornych, zwłaszcza na niektóre antybiotyki β -laktamowe, występowały również w ściekach oczyszczonych. W przypadku oczyszczalni w Grudziądzu w ściekach oczyszczonych zaobserwowano wzrost liczby szczepów opornych na doksycyklinę, gentamycynę i ryfampicynę w porównaniu ze ściekami dostarczonymi do oczyszczalni. W oczyszczalni „Czajka” podobny efekt zaobserwowano dla lekooporności na gentamycynę i nitrofurantoinę. Wykazano, że podczas oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego dochodzi do selekcjonowania się szczepów wieloopornych, jak również zwiększania się zakresu lekooporności wyrażonego jako średnia liczba antybiotyków nieskutecznych wobec szczepów pochodzących z próbek na danym etapie oczyszczania ścieków. Stwierdzono, że w ściekach oczyszczonych bakterie antybiotykooporne stanowiły znaczny odsetek ogólnej liczby bakterii – w przypadku bakterii opornych na penicylinę przekroczył on 50%, natomiast dla bakterii opornych na antybiotyki β -laktamowe nowej generacji meropenem i imipenem – odpowiednio 8.8% i 6.4%. Identyfikacja dominujących szczepów bakterii opornych wykazała obecność gatunków: *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumani/calcoaceticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia sp.*, *Salmonella sp.* i *Escherichia coli*. Do gatunku *E.coli* należało 2.8% wszystkich bakterii lekoopornych występujących w ściekach oczyszczonych.

Eksperymenty laboratoryjne udowodniły, że w obecności podwyższonych stężeń antybiotyków w osadzie czynnym w stosunkowo krótkim czasie może dochodzić do intensywnego namnażania się bakterii opornych na antybiotyki oraz selekcjonowania się szczepów wieloopornych. Największy wzrost zaobserwowano w przypadku liczby bakterii opornych na penicylinę i nitrofurantoinę.

Na podstawie badań enzymatycznych u niektórych szczepów bakterii wyizolowanych z próbek ścieków stwierdzono aktywność enzymów odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki β -laktamowe. Aktywność karbapenemaz oznaczaną z użyciem testu Blue-Carba odnotowano w przypadku 97% bakterii wieloopornych.

Do badań dotyczących genetycznych uwarunkowań lekooporności bakterii w procesie oczyszczania ścieków wybrano dziesięć genów: *blaTEM1*, *blaGES*, *blaPER1*, *blaOXA58*, *blaOXA48*, *blaOXA 1*, *Int1*, *Int 3*, *blaCTXM1*, *blaSHV*. Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem technik biologii molekularnej potwierdziły wysoką częstość występowania genów antybiotykooporności, zwłaszcza genów *blaTEM1*. Analiza sekwencji nukleotydowych

genów *blaTEM1* występujących u bakterii na różnych etapach oczyszczania wykazała ich wzajemne podobieństwo na poziomie 40-100%. Stwierdzono, że sekwencjonowanie produktów reakcji PCR jest niezbędne do uzyskania wiarygodnej identyfikacji badanych genów oporności, pozwalając na uniknięcie wyników fałszywie pozytywnych.

Badania ilościowe przeprowadzone metodą qPCR potwierdziły utrzymywanie się wysokiej zawartości genów oporności na antybiotyki β -laktamowe i ich przechodzenie do ścieków oczyszczonych.

J. Jendryaszk