



Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Nicoletta Makowska

PRACA DOKTORSKA

Geny integraz i oporności na antybiotyki β -laktamowe
i glikopeptydowe rezystomu ścieków miejskich

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. UAM dr hab. Joanny Mokrackiej
w Zakładzie Mikrobiologii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
w Poznaniu

Poznań 2019

Składam serdeczne podziękowania:

*mojej promotorce prof. UAM dr hab. Joannie Mokrackiej za przekazanie cennej wiedzy, poświęcony czas,
ogromną pomoc w realizacji badań i powstaniu tej pracy,
dr. hab. Ryszardowi Koczurze i wszystkim pracownikom Zakładu Mikrobiologii UAM za cenne uwagi,
życzliwość i miłą atmosferę pracy,
Pani prof. UAM dr hab. Mirosławie Dabert, mgr Urszuli Sobczyńskiej, mgr Julii Olechnowicz i mgr.
Arturowi Trzebnemu za pomoc i możliwość realizacji badań w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii
Molekularnej.
Panu dr. Janowi Podkowińskiemu za możliwość realizacji badań w Pracowni Genomiki Instytutu Chemii
Bioorganicznej PAN oraz za wsparcie merytoryczne i życzliwość,
dr Annie Philips z Zakładu Biologii Molekularnej i Systemowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za
serdeczność i nieocenioną pomoc w opracowaniu analiz statystycznych,
ponadto, rodzinie i narzeczonemu za wsparcie i motywację.*

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM

2015/17/N/NZ9/00954.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	1
STRESZCZENIE	2
ABSTRACT	4
1. WSTĘP	6
1.1. Oporność bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki	6
1.2. Charakterystyka rezystomu	8
1.3. Drogi rozprzestrzeniania się bakterii opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki w środowisku	11
1.4. Metagenomika	13
1.5. Integrony oporności.....	14
1.6. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe	17
1.7. Bakterie wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL).....	21
1.8. Pałeczki Gram-ujemne wytwarzające cefalosporynazy AmpC	22
1.9. β -laktamazy klasy A	23
1.10. β -laktamazy klasy D	24
1.11. Bakterie <i>Enterobacteriaceae</i> wytwarzające β -laktamazy o aktywności karbapenemaz ...	25
1.11.1. Karbapenemazy klasy A	25
1.11.2. Karbapenemazy klasy B	27
1.11.3. Karbapenemazy klasy D	29
1.12. Bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> oporne na metycylinę (MRSA)	30
1.13. Bakterie z rodzaju <i>Enterococcus</i> oporne na wankomycynę (VRE)	33
2. CEL PRACY	36
3. MATERIAŁ I METODY	37
3.1. Pobór materiału	37
3.1.1. Centralna Oczyszczalnia ścieków w Koziegłowach	38
3.1.2. Parametry fizykochemiczne ścieków	38
3.2. Analiza bakterii hodowalnych	39
3.2.1. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii	39

3.2.2. Oznaczanie liczby bakterii grupy coli	39
3.2.3. Oznaczenie liczby bakterii <i>S. aureus</i>	40
3.2.4. Oznaczenie liczby bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	40
3.2.5. Barwienie metodą Grama	40
3.2.6. Test na obecność oksydazy cytochromowej	41
3.2.7. Oznaczanie wrażliwości bakterii na antybiotyki metodą krążkowo-dyfuzyjną	41
3.2.8. Oznaczenie wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) – metoda dwóch krążków	41
3.2.9. Oznaczanie liczby gronkowców opornych na metycylinę (MRSA)	42
3.2.10. Oznaczanie liczby wankomycynoopornych szczepów <i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	43
3.2.11. Oznaczanie liczby bakterii wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)	44
3.2.12. Oznaczenie liczby bakterii karbapenemoopornych (CPE).....	45
3.2.13. Oznaczenie liczby bakterii karbapenemoopornych typu OXA-48 (CPE typu OXA-48).....	45
3.2.14. Przechowywanie szczepów bakteryjnych	46
3.2.15. Przygotowanie matrycowego DNA	47
3.2.16. Określanie polimorfizmu genetycznego szczepów metodą ERIC-PCR	47
3.2.17. Wykrywanie genów integraz	48
3.2.18. Identyfikacja szczepów <i>S. aureus</i> opornych na metycylinę (MRSA)	49
3.2.19. Identyfikacja wankomycynoopornych szczepów <i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	51
3.2.20. Identyfikacja genów kodujących β -laktamazy i karbapenemazy	52
3.2.21. Elektroforeza w żelu agarozowym	54
3.2.22. Sekwencjonowanie fragmentów DNA	54
3.3. Przygotowanie metagenomowego DNA	55
3.3.1. Zagęszczanie materiału	55
3.3.2. Izolacja metagenomowego DNA	55
3.3.3. Określenie rozcieńczeń preparatów metagenomowego DNA	56
3.4. Oznaczenie liczby kopii genów w metagenomowym DNA	57
3.4.1. Klonowanie produktów PCR przy użyciu zestawu pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)	58

3.4.2. Izolacja plazmidowego DNA	59
3.4.3. Real-time PCR	60
3.4.4. Emulsyjny PCR	63
3.5. Analiza składu populacji mikroorganizmów występujących w ściekach.....	66
3.6. Analiza statystyczna	68
3.7. Skład podłoża mikrobiologicznych.....	69
4. WYNIKI	76
4.1. Parametry fizykochemiczne ścieków	76
4.2. Ogólna liczba bakterii heterotroficznych	77
4.3. Liczba bakterii grupy coli	80
4.4. Liczba bakterii <i>S. aureus</i>	81
4.5. Liczba bakterii z rodzaju <i>Enterococcus</i>	82
4.6. Liczba metycyloopornych szczepów <i>S. aureus</i> (MRSA)	83
4.7. Liczba wankomycynoopornych szczepów bakterii <i>Enterococcus</i> sp. (VRE)	85
4.8. Liczba bakterii grupy coli wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)	87
4.9. Liczba bakterii grupy coli opornych na karbapenemy (CPE i CPE typu OXA-48).....	89
4.10. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki	93
4.11. Określanie polimorfizmu genetycznego szczepów metodą ERIC-PCR	104
4.12. Wykrywanie genów integraz	107
4.13. Identyfikacja genu <i>mecA</i>	111
4.14. Identyfikacja genów <i>vanA</i>	114
4.15. Identyfikacja genów kodujących β -laktamazy i karbapenemazy	116
4.16. Sekwencjonowanie produktów PCR	133
4.17. Oznaczenie liczby kopii genów w metagenomowym DNA.....	134
4.18. Wyniki analizy składu populacji mikroorganizmów występujących w ściekach.....	149
4.19. Analiza statystyczna	153
5. DYSKUSJA	170
6. PODSUMOWANIE	187
7. WNIOSKI	188

8. LITERATURA	189
9. ZAŁĄCZNIKI	203

WYKAZ SKRÓTÓW

ARB	Bakterie wielolekooporne (ang. antibiotic resistant bacteria)
ARG	Geny warunkujące oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki (ang. antibiotic resistance genes)
CFU	Jednostka określająca liczbę bakterii (ang. colony forming unit)
COŚ	Centralna Oczyszczalnia Ścieków w Koziegłowach
CPE	Bakterie z rodzaju <i>Enterobacteriaceae</i> odporne na karbapenemy (ang. carbapenem-resistant <i>Enterobacteriaceae</i>)
ddPCR	Emulsyjny PCR (ang. droplet digital PCR)
DDST	Test dwóch krążków (ang. double-disc synergy test)
ERIC	Enterobakteryjne powtarzające się sekwencje zgodności (ang. enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences)
ESBL	β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ang. extended-spectrum β -lactamases)
HGT	Horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer)
MBL	Metallo- β -laktamazy (ang. metallo- β -lactamases)
MDR	Wielolekooporność (ang. multi drug resistant)
MGE	Ruchome elementy genetyczne (ang. mobile genetic elements)
MRSA	Oporny na meticylinę <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
NGS	Sekwencjonowanie nowej generacji (ang. next-generation sequencing)
NTC	Kontrola bez matrycy (ang. no template control)
PBP	Białko wiążące penicylinę (ang. penicillin-binding protein)
PCoA	Analiza głównych współrzędnych (ang. principal coordinate analysis)
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
qPCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. quantitative PCR)
TDS	Zawartość substancji stałych rozpuszczonych
VBNC	Żywe, niehodowalne bakterie (ang. viable but non-culturable)
VRE	Enterokoki odporne na wankomycynę (ang. vancomycin resistant enterococci)
WWTP	Oczyszczalnia ścieków (ang. wastewater treatment plant)

STRESZCZENIE

Występowanie u bakterii lekooporności jest niekwestionowanym problemem w leczeniu zakażeń i, wg WHO, jednym z trzech najpoważniejszych globalnych zagrożeń w XXI wieku. Powszechne i niekontrolowane stosowanie antybiotyków, nie tylko w celach terapeutycznych, lecz również w rolnictwie i hodowli zwierząt, spowodowało narastanie liczby szczepów opornych na stosowane terapeutyki. Genetyczne podstawy oporności stanowią geny warunkujące odpowiednie mechanizmy oporności, natomiast za pojawienie się wielolekooporności i jej szerokie rozprzestrzenianie odpowiedzialne są integrony – fragmenty DNA, w obrębie których włączane są kasety genowe warunkujące oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki. Istotnym jest fakt, że występując na ruchomych elementach genetycznych, integrony mogą być przenoszone pomiędzy komórkami jednego, bądź różnych gatunków bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT – ang. horizontal gene transfer).

Środowisko wodne, a w szczególności środowisko oczyszczalni ścieków, stwarza znakomite warunki do rozprzestrzeniania się opornych bakterii. Duża liczba szczepów bakteryjnych, pochodzących z różnych źródeł, składniki odżywcze, antybiotyki w stężeniach subletalnych, w znaczący sposób przyczyniają się do przenoszenia genów oporności pomiędzy komórkami bakteryjnymi na drodze horyzontalnego transferu genów, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia ich częstości i pojawienia się bakterii wieloopornych także w ścieku oczyszczonym.

Celem niniejszej pracy była jakościowa i ilościowa analiza rezystomu ścieków miejskich Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach koło Poznania. Badania dotyczą określenia rodzaju i częstości występowania genów integrazy integronów klasy 1 (*intI1*) oraz genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe (*bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *ampC*, *bla_{DHA}*, *bla_{CMY}* i *mecA*) oraz glikopeptydowe (*vanA*) w genomach bakterii hodowlanych, a także w metagenomie ścieków. Badania metagenomiczne opierające się na analizie całkowitego DNA, uwzględniają obecność bakterii niehodowlanych, mogących stanowić do 99% mikroorganizmów obecnych w środowisku wodnym.

Wykazano, że w ściekach na każdym etapie oczyszczania, również w ścieku oczyszczonym obecne są bakterie z genami stwarzającymi największe zagrożenie dla

zdrowia publicznego, m.in. warunkującymi wytwarzanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL – ang. extended-spectrum β -lactamases) – *bla*_{CTX-M-15}, karbapenemaz – *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES} i *bla*_{OXA-48}, a także wankomycynoopornych enterokoków (*vanA*) i *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (*mecA*) oraz, że w trakcie oczyszczania ścieków następuje zwiększenie częstości występowania tych bakterii. Ponadto stwierdzono, że proces oczyszczania ścieków prowadzi do zwiększenia częstości występowania integronów klasy 1 i genów oporności: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48} i *mecA* w rezystomie ścieku oczyszczonego. Zwiększanie częstości występowania genów *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *vanA* i *mecA* w metagenomowym DNA już w ścieku z komory napowietrzania, może wskazywać na wzmożoną selekcję i procesy horyzontalnego transferu genów w osadzie czynnym. Istotne korelacje między częstością występowania genów w metagenomowym DNA, wskazują, że w procesie horyzontalnego transferu, geny oporności mogą być przenoszone razem, za pośrednictwem mobilnych elementów genetycznych. Badania składu populacji bakteryjnych w ścieku wykazały różnice pomiędzy poszczególnymi etapami oczyszczania oraz związek między składem populacji, a rezystomem ścieku.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy, stwierdzono istotną rolę oczyszczalni ścieków w zwiększaniu puli genów rezystomu środowiskowego. Wyniki badań metagenomicznych w połączeniu z analizą opartą na metodach hodowlanych dostarczyły szczegółowych informacji na temat ograniczonej skuteczności procesów oczyszczania ścieków w eliminacji bakterii antybiotykoopornych i genów oporności, wskazując tym samym na potrzebę opracowania efektywnej strategii i wdrożenia dodatkowych metod dezynfekcji ścieków, w celu ograniczenia narastania i rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki w środowisku.

ABSTRACT

The occurrence of drug resistance in bacteria is an unquestionable problem in the treatment of infections and, according to the WHO, one of the three most serious global threats in the 21st century. Intensive and uncontrolled use of antibiotics not only therapeutically in human and veterinary medicine, but also in animal breeding and agriculture, have provoked the worldwide spread of resistant bacteria. Genetic bases of resistance are genes that determine the appropriate mechanisms of resistance and integrons are responsible for the emergence and spread of multidrug antibiotic resistance among bacterial. Integrons are natural systems mediating the capture of gene cassettes that code for antibiotic resistance. It is essential that integrons are embedded in mobile genetic elements, such as transposons or plasmids and they can be transferred by horizontal gene transfer (HGT) between strains of the same or even different species.

Water environment, especially urban wastewater treatment plants, creates excellent conditions for spreading of resistant bacteria. The features of this environment, like the high number of bacteria originating from different sources, nutrients and the presence of trace concentrations of antibiotics, may significantly facilitate the transfer of antibiotic resistance genes among bacteria by horizontal gene transfer, which leads to increase their frequency and emergence of multidrug resistant strains in the effluent.

The aim of this study was the qualitative and quantitative analysis of the municipal wastewater resistome of Central Wastewater Treatment Plant in Koziegłowy near Poznań. The research concerns determine the type and frequency of integrase genes (*intI1*) and genes conferring resistance to β -lactam and carbapenem antibiotics (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *ampC*, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY} and *mecA*) and glycopeptide (*vanA*) in the genomes of culturable bacteria, as well as in the wastewater metagenome. Traditional approach based on analysis of DNA isolated from bacteria cultured from wastewater samples is limited to certain groups of microorganisms and does not take into consideration viable but non-culturable bacteria that can make up even 99% of all microorganisms present in water.

The results of these studies indicate that in wastewater at each stage of treatment, also in final effluent are present of bacteria with genes that pose the greatest threat to public health, including genes of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) – *bla*_{CTX-M-15},

carbapenemases – *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, as well as enterococci resistance to vancomycin (*vanA*) and *Staphylococcus aureus* resistance to methicillin (*mecA*) and that during the wastewater treatment there is an increase of the frequency of these bacteria.

Moreover, it was found that the wastewater treatment process leads to increased frequency of class 1 integrons and resistance genes: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48} and *mecA* in resistome of final effluent. Increase in the frequency of the *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *vanA* and *mecA* genes in metagenomic DNA already in the aeration tank may indicate enhanced selection and processes of horizontal gene transfer in activated sludge. Significant correlations between the frequency of genes in metagenomic DNA indicate that in the horizontal transfer process, resistance genes can be transferred together, via mobile genetic elements. Analysis of the composition of bacterial populations in the wastewater showed differences between the individual stages of treatment and the relationship between the composition of the population and the resistome of wastewater.

Based on the results obtained in this study, a significant role of wastewater treatment plants in increasing the pool of environmental resistome genes was found. Quantitative metagenomic analysis combined with analysis based on culturable methods provided significant information on the limited effectiveness of wastewater treatment processes in the elimination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes, which indicates the need to develop an effective strategy and implement additional methods of wastewater disinfection, in order to limit the increase and spread of antibiotic resistance in the environment.

1. WSTĘP

1.1. Oporność bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki

Pojawienie się i rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki wśród bakterii stało się niekwestionowanym problemem globalnym i jednym z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego w XXI wieku (WHO, 2000; 2015; 2017a). Powszechne, nadmierne i niekontrolowane stosowanie antybiotyków, nie tylko w celach terapeutycznych, lecz także w rolnictwie i hodowli zwierząt, spowodowało stały i szybki wzrost liczby szczepów opornych na stosowane leki (Van Boeckel i wsp., 2014).

Oporność jest to „zdolność mikroorganizmów do przeciwstawiania się chemioterapeutykowi” (HMSO, 1999). Wyróżniamy dwa typy oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki: naturalną i nabytą. Oporność naturalna, zwana inaczej wrodzoną, jest stała dla rodziny, rodzaju czy gatunku i wynika z braku swoistych receptorów lub niskiego powinowactwa do antybiotyku, niemożności penetracji i transportu leku przez ścianę komórkową oraz wytwarzania enzymów inaktywujących antybiotyki (Hawkey, 1998; 2009). Nabyta oporność polega ze zmianach w genomie bakterii związanych z mutacjami oraz z transferem genów zachodzącym między bakteriami (Taylor i wsp., 2011). Źródłem oporności bakterii na antybiotyki są mutacje punktowe w genach, będących celem działania antybiotyków lub w genach regulatorowych, czego przykładem może być oporność na rifamycyny, czy fluorochinolony (Perry i Wright, 2013). Nabyta lekooporność bakterii chorobotwórczych znajduje swoje źródło głównie u bakterii glebowych (D'Costa i wsp., 2006; Forsberg i wsp., 2012; Jiang i wsp., 2017). Wiele genów oporności na istotne klinicznie antybiotyki u bakterii należących do *Proteobacteria*, również patogennych, pochodzi od *Actinobacteria*, głównie *Streptomyces* sp. będących producentami antybiotyków (D'Costa i wsp., 2006; Allen i wsp., 2010; Jiang i wsp., 2017). Gen oporności na chloramfenikol, *cmx*, zidentyfikowany w genomach szczepów klinicznych *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* i *Enterobacter asburiae*, a także gen oporności na linezolid, *lmrA*, występujący u szczepów wyizolowanych od zwierząt hodowlanych, wykazują wysokie podobieństwo sekwencji do genów *Streptomyces* sp. (Jiang i wsp., 2017).

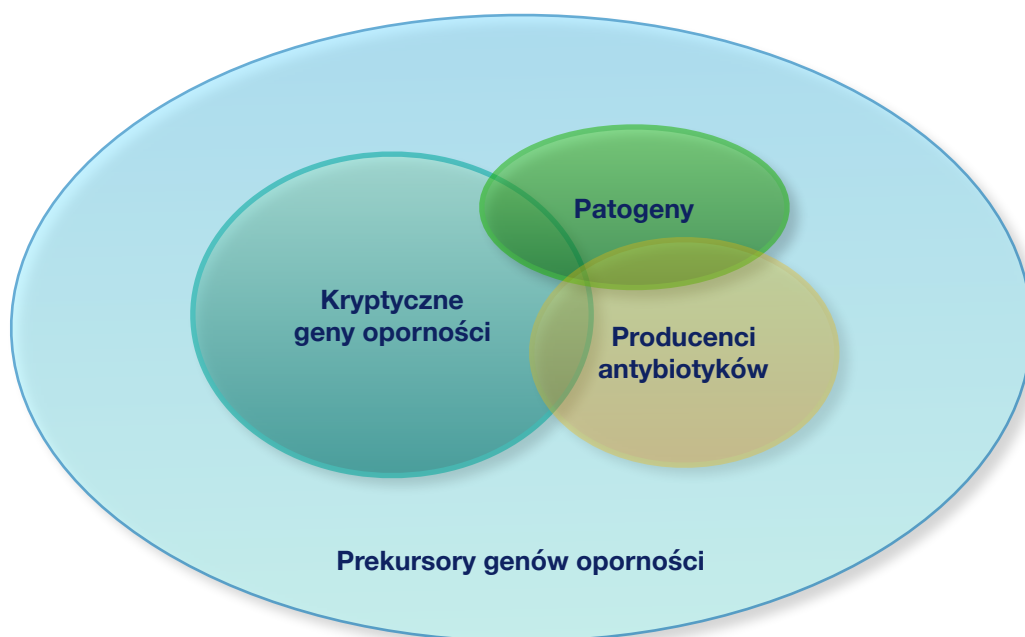
Przyjmuje się, że większość środowisk i organizmów odgrywa istotną rolę w przepływie bakterii opornych i genów oporności na antybiotyki (ARG – ang. antibiotic resistance genes). Przepływ ten jest dwukierunkowy, prowadząc do wprowadzania naturalnych genów oporności występujących u bakterii środowiskowych do bakterii patogennych dla człowieka i zwierząt i *vice versa* – istotnych genów oporności do mikroorganizmów środowiskowych (Stokes i Gillings, 2011). Przenoszenie się genów oporności na antybiotyki wśród bakterii odbywa się na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT – ang. horizontal gene transfer). W procesach HGT geny oporności, zlokalizowane często w obrębie mobilnych elementów genomu, przekazywane są pomiędzy bakteriami w procesach koniugacji, transdukcji poprzez fagi czy transformacji (Ochman i wsp., 2000; Thomas i Nielsen, 2005; Brown-Jaque i wsp., 2018; Wu i wsp., 2018). Selekcję szczepów opornych stymulują nie tylko obecne w środowisku antybiotyki w stężeniach subinhibicyjnych, ale również inne czynniki, takie jak pestycydy, środki przeciwporostowe, czwartorzędowe związki amoniowe, detergenty oraz metale ciężkie (Baker-Austin i wsp., 2006; Amos i wsp., 2014; Gillings i wsp., 2015). Procesy utrzymywania się i rozprzestrzeniania oporności na antybiotyki wzmagane są poprzez koselekcję, czyli selekcjonowanie różnych determinant genetycznych zlokalizowanych na tym samym elemencie genetycznym i selekcję krzyżową mającą miejsce wtedy, gdy ten sam gen oporności odpowiedzialny jest za oporność na różne antybiotyki i metale ciężkie (Gao i wsp., 2012; Baker-Austin i wsp., 2006; Martinez, 2012).

Dowodem na znamienny wpływ lateralnego transferu naturalnych genów oporności ze środowiska do patogenów jest dynamiczne rozprzestrzenianie się genu *bla_{CTX-M}*, warunkującego oporność na szerokie spektrum β -laktamów, pochodzącego z genomu środowiskowych szczepów *Kluyvera* sp. (Humeniuk i wsp., 2002), czy genu *bla_{OXA-48}* pochodzącego z genomu *Shewanella oneidensis* i warunkującego oporność na karbapenemy (Zong i wsp., 2012). Gen *qnrA* związany z plazmidem niosącym oporność na fluorochinolony, pochodzi od środowiskowych szczepów *Shewanella algae* (Poirel i wsp., 2005). Geny oporności na wankomycynę, obecnie występujące u szczepów *Enterococcus* sp. i *Staphylococcus* sp., znajdują swoje źródło w genomach bakterii glebowych m. in. *Paenibacillus popilliae* (Patel i wsp., 2000).

W 2017 roku WHO opublikowało po raz pierwszy listę opornych bakteryjnych patogenów stanowiących największe zagrożenie dla zdrowia ludzkiego i wymagających bezzwłocznych badań dotyczących nowych leków. Do patogenów „krytycznych” (priority 1: critical) o szczególnie niebezpiecznych mechanizmach oporności, zaliczają się oporne na karbapenemy szczepy bakterii *Acinetobacter baumannii* i *P. aeruginosa* oraz oporne na karbapenemy *Enterobacteriaceae* wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL – ang. extended-spectrum β -lactamases). Duże zagrożenie stanowią także oporne na wankomycynę szczepy *Enterococcus faecium*, szczepy *Staphylococcus aureus* oporne na metycylinę i wankomycynę, szczepy *Helicobacter pylori* oporne na klarytromycynę oraz bakterie z rodzaju *Campylobacter* i *Salmonella* oporne na fluorochinolony, a także szczepy *Neisseria gonorrhoeae* oporne na cefalosporyny trzeciej generacji i fluorochinolony (WHO, 2017b). Oprócz wzmożenia badań dotyczących nowych opcji terapeutycznych i kontroli zakażeń w środowiskach szpitalnych, jedną ze strategii przeciwdziałania rozprzestrzenianiu się oporności jest identyfikacja dróg migracji bakterii z istotnymi mechanizmami oporności w środowisku. Badania takie dotyczą występowania nie tylko bakterii opornych w ekosystemach, w których funkcjonuje człowiek i zwierzęta, ale również genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki tworzących tzw. rezystom.

1.2. Charakterystyka rezystomu

Pojęcie rezystomu zostało wprowadzone w celu zrozumienia pojawiania i zaskakująco szybkiego tempa rozprzestrzeniania się oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki u szczepów istotnych dla zdrowia ludzkiego (Wright, 2007). Rezystom oznacza zbiór wszystkich genów oporności na antybiotyki, które znajdują się w genomach bakterii chorobotwórczych, niechorobotwórczych producentów antybiotyków, kryptyczne geny oporności oraz prekursorzy genów oporności (Wright, 2007) (Rycina 1).



Rycina 1. Schemat rezystomu (według Wright, 2007).

Te ostatnie to geny kodujące białka z umiarkowaną aktywnością przeciwanitybiotyczną lub z niewielkim powinowactwem do antybiotyku, które w przypadku wystąpienia odpowiedniej presji selekcyjnej mogą stać się efektywnymi genami oporności (Wright, 2007). Znanych jest ponad 23 000 genów oporności na antybiotyki, które zaklasyfikowano do prawie 400 rodzajów. Warunkują one oporność na ponad 240 antybiotyków m. in. na amiglikozydy, β -laktamy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, tetracykliny i glikopeptydy oraz występowanie pomp transportowych (<https://ardb.cbc.umd.edu/>). Jest to jednak ułamek rzeczywistej liczby genów, nie uwzględniający w pełni rezystomu bakterii glebowych.

Badania opierające się na oznaczaniu genetycznych determinant oporności u bakterii hodowalnych są ograniczone i nie uwzględniają bakterii niehodowalnych (VBNC – ang. viable but non-culturable), stanowiących 99% mikroorganizmów obecnych w środowisku wodnym (Amann i wsp., 1995). Dopiero badanie metagenomu (środowiskowego DNA), pozwala na dokładną analizę genomów wszystkich mikroorganizmów występujących w środowisku (Handelsman i wsp., 1998). Ilościowa analiza ARG w metagenomowym DNA wraz z badaniami opierającymi się na analizie

DNA wyizolowanego z bakterii hodowlanych, może wskazać rzeczywiste częstości występowania istotnych ARG.

Pierwsze badania rezystomu dotyczyły mikroorganizmów glebowych, u których wykazano obecność prekursorów genów oporności na aminoglikozydy i wankomycynę, występujące obecnie u bakterii chorobotwórczych (D'Costa i wsp., 2006). W przekrojowych badaniach metagenomowego DNA wyizolowanego z próbek gleby pochodzących z lat 1940-2008 zaobserwowano wzrost częstości występowania genów oporności na antybiotyki, w tym szczególnie na tetracykliny i β -laktamy – antybiotyki stosowane powszechnie w rolnictwie (Knapp i wsp., 2010). W przypadku pojedynczych genów oporności na tetracykliny (*tetO*) odnotowano 15-krotny wzrost częstości od lat 70-tych do 2008 roku.

W środowisku wodnym, podobnie jak w glebowym, bytują mikroorganizmy charakteryzujące się naturalną opornością na antybiotyki. Dodatkowo wpływ zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego zwiększa częstość występowania i rozprzestrzeniania się oporności nabytej. W wielu środowiskach wodnych takich jak wody powierzchniowe, rzeczne, gruntowe, morskie, akwakultury, ścieki, a nawet w systemach uzdatniania wody występują bakterie z genami oporności na β -laktamy, aminoglikozydy, glikopeptydy, fluorochinolony, tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, streptograminy, ryfamycyny, sulfonamidy i chloramfenikol. Obecność bakterii opornych i ARG w środowiskach wodnych stanowi trwałe zanieczyszczenie organiczne i podobnie jak metale ciężkie, może zagrażać zdrowiu publicznemu (Zhang i wsp., 2009; Wright, 2010). Presja selekcyjna spowodowana stosowaniem antybiotyków w rolnictwie i hodowli ryb, zwiększa częstość występowania genów oporności, także u patogenów, takich jak *Escherichia coli* i *Salmonella* sp. w środowisku wodnym i ma udział w cyrkulacji genów oporności do środowiska naturalnego i z niego do środowiska klinicznego (Wright, 2010). Efektem nawożenia i nawadniania są odporne na antybiotyki bakterie, które pochodzą z owoców i warzyw (Quiroz-Santiago i wsp., 2009; Berger i wsp., 2010).

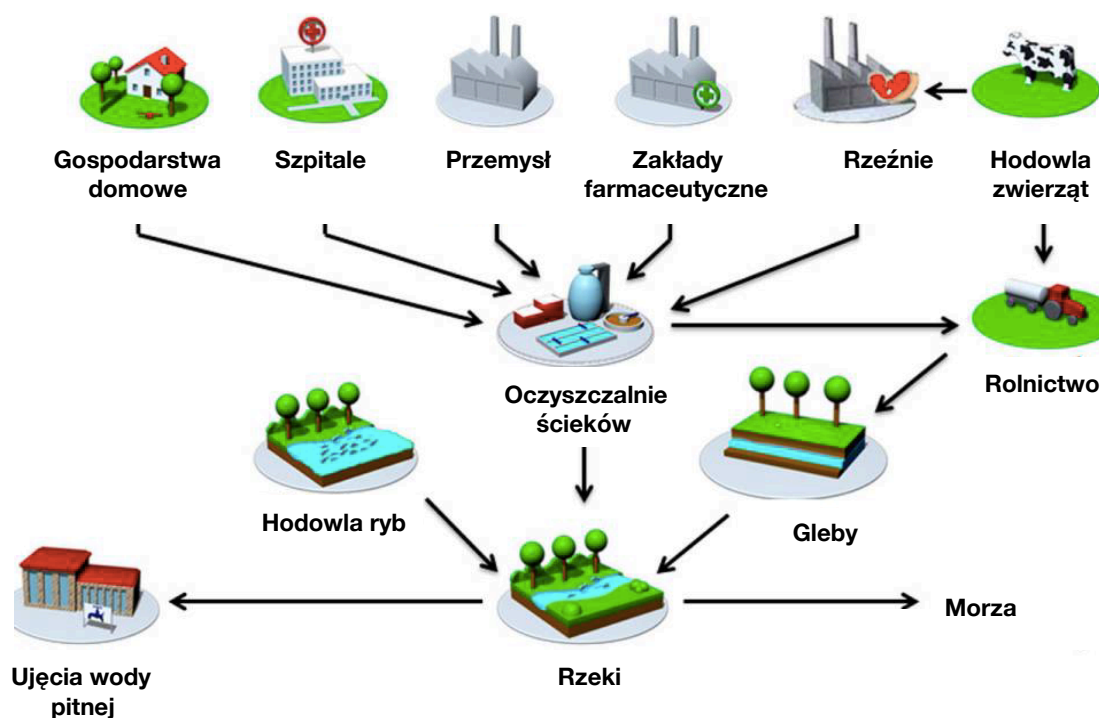
Bakterie odporne na antybiotyki wykrywano także u dzikich zwierząt. U dzików z terenów północnej Portugalii, stwierdzono bakterie *Enterococcus* sp. odporne na glikopeptydy, makrolidy i tetracykliny, u gryzoni z północno-zachodniej Anglii, szczepy *Enterobacteriaceae* odporne na β -laktamy i tetracykliny, w odchodach mew z rezerwatu

przyrody w Portugalii, stwierdzono występowanie szczepów *E. coli* opornych na β -laktamy, w tym szczepy z genami *bla*_{CTX-M} i *bla*_{TEM} oraz z integronami, u ryb akwariowych pochodzących z Singapuru, Kolumbii, Gujany i Brazylii, oznaczono szczepy *Aeromonas* sp. z integronami odporne na fluorochinolony i aminoglikozydy, natomiast u much z Los Angeles w Kalifornii wyizolowano szczepy *Providencia* sp. odporne na makrolidy, polipeptydy, tetracykliny i chloramfenikol (Gilliver i wsp., 1999; Kadavy i wsp., 2000; Poeta i wsp., 2007; Poeta i wsp., 2008; Verner-Jeffreys i wsp., 2009). Bakterie odporne na antybiotyki i ARG u zwierząt pochodziły głównie od człowieka, którego mikroflora także stanowi rezerwuuar bakterii opornych (Osterblad i wsp., 2001; Sommer i wsp., 2009).

1.3. Drogi rozprzestrzeniania się bakterii opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki w środowisku

Obecność bakterii opornych na antybiotyki (ARB – ang. antibiotic-resistant bacteria), genów oporności, w tym genów zawartych w integronach, w środowisku uważana jest za nowo powstały rodzaj zanieczyszczenia biotycznego i problem ekologiczny (Young, 1993; Martinez, 2009). Integrony i ARG, określane mianem zanieczyszczenia ksenogenetycznego (ang. xenogenetic pollutants), są indykatorem presji selekcyjnej wywołanej stosowaniem antybiotyków w danej populacji i jednocześnie zagrożenia opornością szczepów chorobotwórczych, której można spodziewać się w tej populacji (Gillings, 2013).

Badania dotyczące rozprzestrzeniania się opornych bakterii wskazują na ich potencjalną drogę wiodącą od gospodarstw domowych, zakładów farmaceutycznych, przemysłowych, szpitali, poprzez ścieki szpitalne, ścieki miejskie, ścieki przemysłowe do wód powierzchniowych (Rycina 2) (Rizzo i wsp., 2013; Czekalski i wsp., 2014; Stalder i wsp., 2014; Harnisz i wsp., 2015).



Rycina 2. Drogi rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki w środowisku (według Stalder i wsp., 2012).

Centralną rolę w rozprzestrzenianiu się bakterii opornych pełnią oczyszczalnie ścieków (WWTPs – ang. wastewater treatment plants). W środowisku oczyszczalni ścieków panują doskonałe warunki do selekcji i lateralnego transferu ARG i integronów oporności (Wright, 2007; Berglund i wsp., 2015; Xu i wsp., 2015; Lorenzo i wsp., 2018). Ze względu na dużą liczbę szczepów bakteryjnych, pochodzących z różnych źródeł, składniki odżywcze i niskie stężenia antybiotyków, a także obecność detergentów i metali ciężkich, oczyszczalnie ścieków pełnią rolę „punktów zapalnych” (ang. hot spots) w przepływie ARG i integronów oporności do środowiska (Czekalski i wsp., 2012; Stalder i wsp., 2012; Ma i wsp., 2013; Rizzo i wsp., 2013; Berglund i wsp., 2014). Obecność antybiotyków w środowisku oczyszczalni ścieków w stężeniach niższych niż stężenia hamujące wzrost bakterii przyczynia się bowiem nie tylko do selekcji szczepów opornych na antybiotyki, ale również do zwiększenia częstości HGT pomiędzy szczepami danego gatunku, a nawet różnych gatunków, co w konsekwencji prowadzi do pojawienia się bakterii lekoopornych, także w ścieku oczyszczonym (Gullberg i wsp., 2011; Novo i wsp., 2013; Amos i wsp., 2014; Gillings i wsp., 2015). Środowisko oczyszczalni ścieków sprzyja

zarówno przekazywaniu ARG z bakterii chorobotwórczych do środowiska jak i odwrotnie – ze środowiska do patogenów. W związku z tym, w ścieku oczyszczonym, którego odbiornikiem są wody rzeczne, występują bakterie stwarzające największe zagrożenie dla zdrowia publicznego; bakterie wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), karbapenemazy i metalo- β -laktamazy, a także bakterie odporne na wankomycynę i metycylinę (Nagulapally i wsp., 2009; Picão i wsp., 2013; Wan i Chou, 2014).

1.4. Metagenomika

Pojęcie „metagenomika” (synonim – genomika środowiskowa, genomika populacji) wprowadzone zostało po raz pierwszy przez Handelsmana i wsp. w 1998 roku na określenie metody umożliwiającej badanie bioróżnorodności mikroorganizmów opierając się na charakterystyce i identyfikacji wszystkich, w tym niehodowalnych, bakterii środowiskowych. Rozwój metagenomiki wynikał z ograniczeń jakie niesie za sobą klasyczna mikrobiologia polegająca na hodowli drobnoustrojów oraz konieczności zdobycia informacji o drobnoustrojach niehodowalnych, stanowiących ogromną większość we wszystkich środowiskach na Ziemi (Handelsman, 2004). Metagenomika stanowi zatem cenne źródło wiedzy o nowych taksonach, zróżnicowaniu genetycznym populacji bakteryjnych w biosferze, wpływie mikroorganizmów na środowisko i odwrotnie, a także pozwala odkryć nieznane dotąd geny, ich warianty i produkty bez konieczności prowadzenia ich hodowli (Jones i wsp., 2010; Shi i wsp., 2013; Garner i wsp., 2018).

Podstawą badań metagenomicznych jest analiza całkowitego DNA mikroorganizmów wyizolowanego z danego środowiska, nazywanego metagenomowym DNA lub środowiskowym DNA. Metagenomika obejmuje trzy główne strategie metodyczne:

- metagenomikę celowaną, bazującą na reakcji PCR (ang. target-based metagenomics, PCR-based metagenomics). Metoda ta polega na oznaczaniu i analizie genów, a także ich względnej i bezwzględnej zawartości w metagenomie środowiskowym. Takie podejście

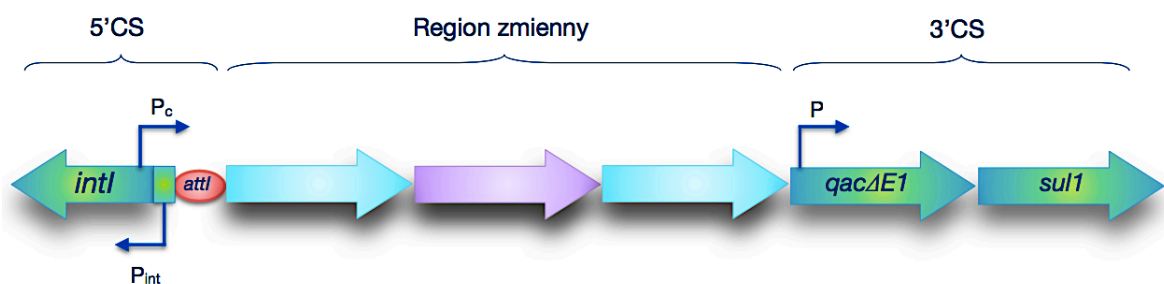
wymaga znajomości sekwencji analizowanych genów i nie pozwala na odkrycie nowych genów, np. oporności na antybiotyki (Wright, 2010; Penders i wsp., 2013).

- metagenomikę funkcjonalną (ang. functional metagenomics), która polega na klonowaniu DNA do odpowiednich wektorów, tworzenie bibliotek genowych, selekcji klonów i analizie ekspresji wklonowanych genów lub ich produktów. Metagenomika funkcjonalna nie wymaga znajomości sekwencji badanych genów, w związku z czym możliwe jest wykrywanie nowych genów. Dzięki tej metodzie opisano m. in. nowe geny oporności na antybiotyki, w tym acetylotransferazy aminoglikozydowe, β -laktamazy oraz pompy białkowe wypompowujące chloramfenikol (Riesenfeld i wsp., 2004; Allen i wsp., 2009; Lang i wsp., 2010). Ograniczeniem tej metody jest to, że nie wszystkie geny ulegają ekspresji heterologicznej (Allen i wsp., 2009; Handelsman, 2004; Shmieder i Edwards 2012; Penders i wsp., 2013).
- metagenomikę przez sekwencjonowanie (ang. sequence-based metagenomics). Metoda pozwala na bezpośrednie sekwencjonowanie DNA wyizolowanego z próbek środowiskowych i porównanie uzyskanych sekwencji ze zdeponowanymi w bazach danych. W ten sposób możliwa jest analiza sekwencji genów oporności na antybiotyki, a także różnorodności taksonomicznej w danym środowisku na podstawie sekwencji genu 16S rRNA (Allen i wsp., 2009; Shmieder i Edwards 2012; Penders i wsp., 2013).

1.5. Integrony oporności

Jedną z kluczowych ról w pojawieniu i rozprzestrzenianiu się lekooporności pełnią integrony (Cambray i wsp., 2010; Stokes i Gillings, 2011; Gillings, 2014; 2017; Stalder i wsp., 2014). Integrony to fragmenty DNA, w obrębie których otwarte ramki odczytu zawarte w egzogennych kasetach genowych konwertowane są w funkcjonalne geny. Wszystkie integrony opisane do tej pory składają się z trzech kluczowych elementów koniecznych do włączania egzogennych genów: genu *intI*, kodującego integrazę, należącą do rodziny rekombinaz tyrozynowych, pierwszorzędownego miejsca rekombinacji *attI* i promotora P_C , który skierowany w przeciwnym kierunku, umożliwia transkrypcję regionu

zawierającego *attI* kaset genowych (Rycina 3) (Mazel, 2006; Gillings, 2014). Integrony są strukturami ewolucyjnie starymi i występują w genomach bakterii różnych środowisk. Podzielono je na dwie główne grupy: superintegrony, zawierające do 200 kaset genowych, kodujących w dużej części białka o nieznanym funkcjach oraz mobilne integrony składające się z 10 kaset, które zazwyczaj determinują oporność na antybiotyki (Stalder i wsp., 2012). Integrony różnią się sekwencjami genu integrazy, wbudowanymi kasetami genowymi i lokalizacją w genomie. Z całej grupy, kilka klas odgrywa rolę w rozprzestrzenianiu genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki (Gillings, 2017).



Rycina 3. Schemat integronu klasy 1.

Dzięki integronom, bakterie mogą gromadzić różne kasety genowe i nabywać oporność na kilka klas antybiotyków. Istotnym jest fakt, że występując na ruchomych elementach genetycznych, integrony mogą być przenoszone pomiędzy komórkami jednego, bądź różnych gatunków bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów, powodując transformację komórki wrażliwej na antybiotyki w wielolekooporną.

W oparciu o homologię sekwencji aminokwasowej integrazy wyróżnia się 5 klas integronów, związanych z genami oporności na antybiotyki. Szczególne znaczenie w rozprzestrzenianiu się wielolekooporności mają integrony klasy 1 (Cambray i wsp., 2010; Gillings, 2018). Integrony klasy 1 związane są z funkcjonalnymi i niefunkcjonalnymi transpozonomi Tn402, znajdującymi się w obrębie większych transpozonów Tn21. Klasa 2 integronów związana jest z Tn7. Gen integrazy klasy 2 integronu zawiera zazwyczaj mutację nonsensowną w kodonie 179, której efektem jest niefunkcjonalne białko. Rearanżacje kaset genowych są możliwe przy rozpoznaniu miejsca *attI2* przez integrazy klasy 1. Integrony klasy 3, podobne, jeżeli chodzi o sekwencje aminokwasową integrazy

do integronów klasy 1, zlokalizowane w obrębie transpozonów, stanowią grupę mniej powszechną, o niewielkim znaczeniu klinicznym, jednak mogące stanowić ważną pulę wciąż niepoznanych elementów w ekosystemach środowiskowych (Gillings, 2014). Integrony klasy 4 związane są z ruchomym elementem koniugacyjnym SXT u *Vibrio cholerae*. Integrony klasy 5 występują w obrębie transpozonu, w strukturze plazmidu pRSV1 u *Aliivibrio salmonicida* (Mazel, 2006).

Najbardziej rozpowszechnione są integrony klasy 1, występujące u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych i kilku Gram-dodatnich (Combray i wsp., 2010). Występują one ze znaczną częstością u szczepów bakterii klinicznych; wykrywane są u 22 - 59% bakterii Gram-ujemnych.

Szczególną strukturę genetyczną stanowią kasety genowe, które są mobilnymi elementami integronów. Mogą one występować w formie liniowej jako element integronu lub jako kolistą cząsteczką występującą w cytoplazmie. Kasety genowe nie mają promotora, nie kodują mechanizmu umożliwiającego ich przenoszenie się, mają pojedynczą otwartą ramkę odczytu oraz sekwencję *attC* (określaną dawniej jako element 59-be), która stanowi miejsce rekombinacji ze strukturą *attI* integronu. Dotychczas opisano kasety genowe warunkujące oporność na antybiotyki wszystkich podstawowych grup: β -laktamy, aminoglikozydy, trimetoprim, makrolidy, linkozamidy rifampicynę, chloramfenikol oraz czwartorzędowe związki amonowe (Partridge i wsp., 2009; Combray i wsp., 2010).

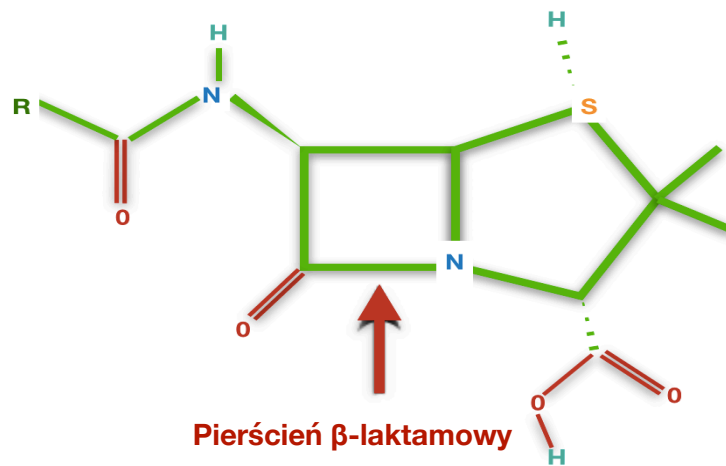
W środowisku naturalnym geny integrazy integronów klasy 1 są nie tylko markerem poziomu oporności na antybiotyki, oraz stopnia zagrożenia opornością szczepów chorobotwórczych, której można spodziewać się w danej populacji, ale również antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska (Gillings i wsp., 2015; 2017). Ze względu na powszechne występowanie w genomach bakterii komensalnych ludzi i zwierząt domowych, wysoką częstość występowania w ściekach, a także dzięki wysoce konserwatywnej sekwencji DNA, integrony klasy 1 uznaje się za środowiskowy marker zanieczyszczeń związanych z działalnością człowieka (Gillings i wsp., 2015). Ponadto, w trakcie procesu oczyszczania ścieków integrony nie są eliminowane i degradowane, a częstość ich występowania wzrasta w wodach odbierających ścieki oczyszczone z obszarów wysoce zaludnionych, w związku z czym, uznawane są za trwałe

zanieczyszczenia, podobnie jak obecność metali ciężkich, antybiotyków i środków dezynfekujących (Burch i wsp., 2014; Gillings i wsp., 2015).

Integrony uczestniczą w rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki w środowisku związanym z człowiekiem na drodze HGT. Integrony z genem *bla_{IMP}*, oryginalnie opisane u klinicznych szczepów *P. aeruginosa*, odnotowano w genomach szczepów *P. fluorescens* wyizolowanych ze ścieków (Pellegrini i wsp., 2009). Kasety genowe warunkujące oporność na trimetoprim i chinolony zidentyfikowano w integronach środowiskowych szczepów *Acinetobacter* sp. i *Aeromonas* sp. (Kumar i wsp., 2010; Xia i wsp., 2010). Ponadto, wykazano, że kliniczne integrony obecne są u komensalnych bakterii dzikich zwierząt, gromadząc nowe kasety genowe. Dowodem jest integron klasy 1 u szczepu *E. coli* wyizolowanego od dzikiego renifera, który zawierał kasetę oporności na aminoglikozydy (*ant(3'')-Ia*), a także nabył nową o nieznaną dotąd funkcję, zidentyfikowaną wcześniej u bakterii *Xanthomonas* sp. (Sunde, 2005). Zjawisko przenoszenia się oporności z bakterii klinicznych do komensalnych stanowi niebezpieczeństwo ze względu na generowanie nowych fenotypów oporności patogenów oportunistycznych.

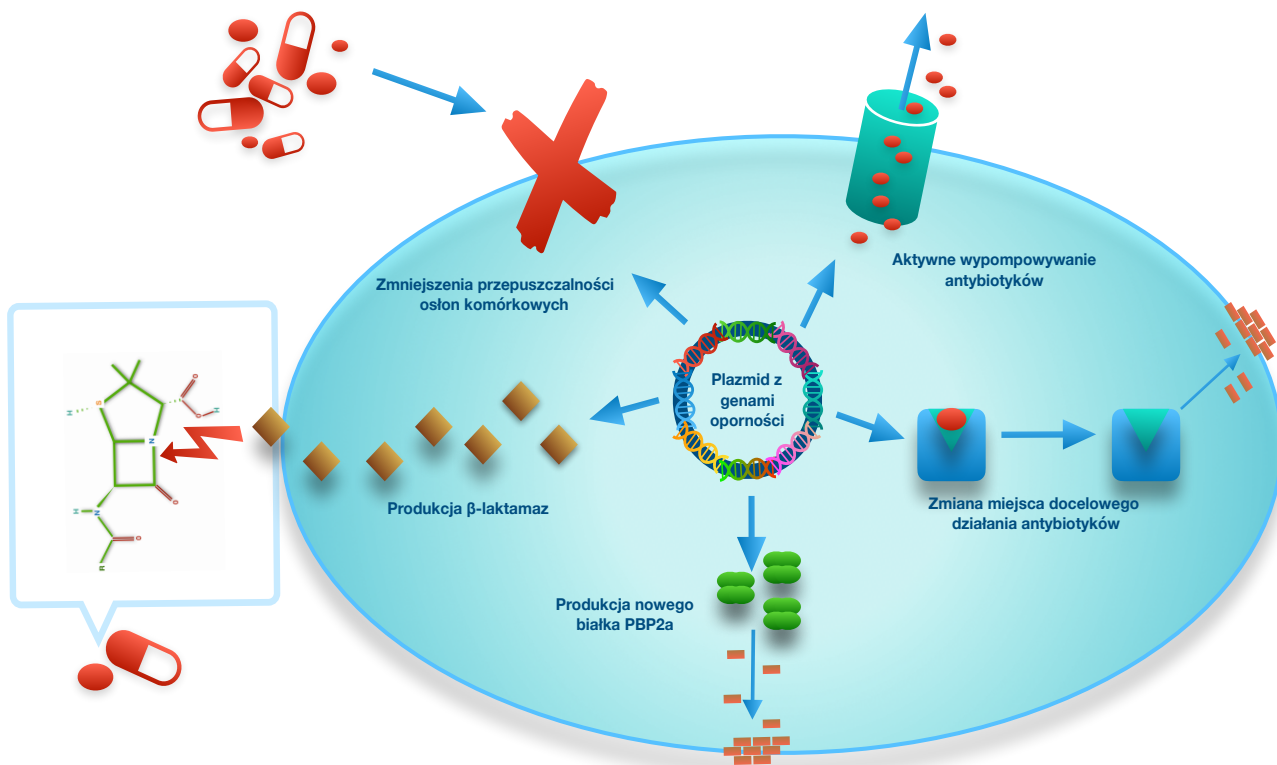
1.6. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β-laktamowe

Antybiotyki β-laktamowe są najczęściej stosowanymi antybiotykami w leczeniu wielu zakażeń bakteryjnych (Bush i Jacoby, 2010; Cho i wsp., 2014). Wspólną ich cechą jest obecność w cząsteczce pierścienia β-laktamowego, którego rozerwanie powoduje zanik aktywności antybiotyku (Rycina 4).



Rycina 4. Ogólny wzór penicylin (według Aharonowitz i wsp., 1992).

Bakteriobójczy mechanizm działania β -laktamów polega na blokowaniu białek PBP (ang. penicilin-binding proteins), które uczestniczą w procesie biosyntezy ściany komórkowej bakterii (Livermore, 1995). W efekcie, bakterie o uszkodzonej strukturze ściany komórkowej ulegają lizie (Bush i Jacoby, 2010; Cho i wsp., 2014). Wyróżnia się cztery główne mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki β -laktamowe (Rycina 5).



Rycina 5. Główne mechanizmy oporności na antybiotyki β -laktamowe.

Pierwszy z nich występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych i związany jest z białkami PBP. Mechanizm oporności polega na produkcji nowego białka PBP2' lub PBP2a, które cechuje obniżone powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych (Cho i wsp., 2014).

Drugi mechanizm charakterystyczny dla bakterii Gram-ujemnych, wynika ze zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych dla antybiotyku, na skutek zmniejszenia liczby białek porynowych znajdujących się w błonie zewnętrznej. W konsekwencji antybiotyk jest transportowany do przestrzeni periplazmatycznej komórki w niższych stężeniach (Wright, 2011).

Kolejnym powszechnym mechanizmem oporności na β -laktamy u bakterii Gram-ujemnych jest produkcja pomp (ang. efflux pump), które uczestniczą w aktywnym wypompowywaniu antybiotyku z komórki bakteryjnej. Jest to często występujący mechanizm oporności u szczepów klinicznych i jednocześnie najslabiej zbadany (Wright, 2011; Blair i wsp., 2015).

Głównym i najbardziej niepokojącym mechanizmem oporności na antybiotyki β -laktamowe jest ich enzymatyczna hydroliza zachodząca dzięki produkcji β -laktamaz przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie (Livermore i Woodford, 2006; Blair i wsp., 2015). Mechanizm ten znany jest od 1940 roku, gdy odkryto pierwszą β -laktamazę inaktywującą penicylinę (Wright, 2011; Blair i wsp., 2015). Enzymy tego typu rozkładają pierścień β -laktamowy dwuetapowo: w pierwszym etapie zachodzi acylacja z utworzeniem estru serynowego, w drugim deacylacja skutkująca inaktywacją pierścienia (Naas i wsp., 2008). Aktywność hydrolityczna β -laktamaz zależy przede wszystkim od rodzaju enzymu, liczby substytucji w łańcuchu aminokwasowym, które zwiększają spektrum substratowe, a także poziomu ekspresji genów kodujących β -laktamazę (Wright, 2011; Blair i wsp., 2015). Przy klasyfikacji β -laktamaz stosuje się dwa systemy: funkcjonalny opracowany przez Bush i Jacoby'ego, opierający się na porównaniu szybkości hydrolizy różnego typu β -laktamaz i wrażliwości β -laktamaz na inhibitory, oraz strukturalny, wprowadzony przez Amblera (Ambler, 1980; Bush i Jacoby; 1995, 2010). Według klasyfikacji funkcjonalnej enzymy podzielone są na trzy grupy: cefalosporynazy kodowane chromosomalnie, β -laktamazы serynowe podzielone na 12 podgrup, i metalo- β -laktamazы. Klasyfikacja strukturalna opiera się na sekwencji aminokwasowej i dzieli β -laktamazы na cztery klasy: A, C i D

wykorzystują serynę do hydrolizy β -laktamów, metaloenzymy z klasy B wymagają obecności dwuwartościowego jonu cynku (Ambler, 1980; Bush i Jacoby; 1995, 2010).

Tabela 1. Wybrane elementy klasyfikacji funkcjonalnej i strukturalnej β -laktamaz (Nikonorow i wsp., 2013).

Grupa funkcjonalna (wg Bush i Jacoby)		Klasa strukturalna (wg Ambler)	Wybrane substraty	Wrażliwość na inhibitory		Wybrane enzymy
				Klawulanian tazobaktam	EDTA	
1	1	C	Cefalosporyny (I, II, III)*	Nie	Nie	Cefalosporynazy AmpC <i>E. coli</i> i <i>P. aeruginosa</i> CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99
	1e		Cefalosporyny (I, II, III, IV)	Nie	Nie	GC1, CMY-37
2	2a	A	Penicyliny z wyjątkiem izoksazolilowych	Tak	Nie	PCI
	2b		Penicyliny i cefalosporyny (I)	Tak	Nie	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TLE-1 (TEM-90)
	2be		Penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), monobaktamy	Tak	Nie	CTX-M-15, CTX-M-44 (TOHO-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
	2br		Penicyliny i cefalosporyny (I)	Nie	Nie	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
	2ber		Penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), monobaktamy	Nie	Nie	TEM-50, TEM-68, TEM-89
	2c		Karboksypenicyliny	Tak	Nie	PSE-1, CARB-3
	2d	D	Penicyliny izoksazolilowe	Słaba	Nie	OXA-1, OXA-10
	2de		Penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV)	Słaba	Nie	OXA-11, OXA-15
	2df		Penicyliny, karbapenemy	Słaba	Nie	OXA-23, OXA-48
	2e	A	Cefalosporyny (I, II, III, IV)	Tak	Nie	CepA
2f	Karbapenemy		Tak	Nie	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-1	
3	3a	B	Penicyliny, cefalosporyny (I, II, III, IV), karbapenemy	Nie	Tak	IMP-1, LI, NDM-1, VIM-1
	3b		Karbapenemy	Nie	Tak	CphA, Sfh-1

*liczbami rzymskimi oznaczono generacje cefalosporynaz

1.7. Bakterie wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

Szerokie stosowanie antybiotyków β -laktamowych, wprowadzonych do powszechnego użytku w latach 1950 i 1960 doprowadziło do szybkiej selekcji szczepów wieloopornych na te antybiotyki (Medeiros, 1997; Magiorakos i wsp., 2012). Pierwszymi zidentyfikowanymi β -laktamazami o aktywności penicylinaz były TEM-1 i SHV-1 u szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* (Paterson i Bonomo, 2005; Bush i Jacoby, 2010). Jednakże wraz z wprowadzaniem cefalosporyn III generacji w latach 80-tych XX wieku, już po trzech latach wyisobniono szczepy wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) (Knothe i wsp., 1983). Enzymy te mają zdolność do hydrolizy penicylin, monobaktamów oraz cefalosporyn I-V generacji (z wyjątkiem cefamycyn) i hamowane są przez inhibitory β -laktamaz (Bush i wsp., 1995; Rokosz i wsp., 2001; Wright, 2011). Wytwarzanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym jest obecnie jednym z najistotniejszych klinicznie i epidemiologicznie mechanizmów oporności u pałeczek *Enterobacteriaceae* i pomimo pojawiania się innych mechanizmów, nadal pozostaje głównym źródłem oporności pałeczek jelitowych na antybiotyki β -laktamowe (Canton i wsp., 2008; Blair i wsp., 2015).

Wszystkie opisane dotychczas β -laktamazy różnią się sekwencją aminokwasową i zakresem hydrolizowanych substratów (Naas i wsp., 2008). Geny kodujące ESBL zlokalizowane są często w obrębie mobilnych elementów genetycznych (MGE – ang. mobile genetic elements), najczęściej w strukturze plazmidów koniugacyjnych, transpozonów i kaset integronowych, co umożliwia wyższy poziom ekspresji, a także rozprzestrzenianie, pomiędzy szczepami jednego bądź różnych gatunków bakterii (Hopkins i wsp., 2006; Jacoby i Bush, 2005; Coque i wsp., 2008; Poirel i wsp., 2008; Marcade i wsp., 2009). Szczepy wytwarzające ESBL często wykazują oporność *in vitro* na połączenia β -laktamów z inhibitorami, pomimo że ESBL są hamowane przez inhibitory β -laktamaz (kwas klawulanowy, sulbaktam, tazobaktam) (Livermore, 1995; Gniadkowski i wsp., 2009).

Bakterie wytwarzające ESBL, wykrywane są na całym świecie i głównie związane są z zakażeniami szpitalnymi (Blair i wsp., 2015). Szacuje się, że aż 80% szpitalnych

szczepów pałeczek Gram-ujemnych produkuje β -laktamazy. U szczepów wytwarzających ESBL, często stwierdza się występowanie więcej niż jednego typu β -laktamazy (Paterson i Bonomo, 2005).

Enzymy typu ESBL wykrywa się u wielu szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*, głównie u *E. coli* i *K. pneumoniae*, ale także u *Salmonella* i *Shigella* oraz u wielu pałeczek niefermentujących, np. z rodziny *Pseudomonodaceae* (Rokosz i wsp., 2001; Paterson i Bonomo, 2005; Canton i wsp., 2008). Wszystkie enzymy ESBL posiadają w miejscu aktywnym resztę serynową i zaliczane są do klasy A i D według Amblera (Paterson i Bonomo, 2005; Bush i Jacoby, 2010).

1.8. Pałeczki Gram-ujemne wytwarzające cefalosporynazy AmpC

Wiele bakterii Gram-ujemnych posiada naturalnie występujące, gatunkowo-specyficzne cefalosporynazy AmpC o zróżnicowanym poziomie aktywności, zaliczane do klasy C według Amblera (Bush i Jacoby, 2010). Wytwarzają je głównie bakterie z rodzaju *Acinetobacter*, *Pseudomonas* oraz pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, m. in. *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. i *Providencia* spp. Ekspresja enzymów AmpC jest indukowana przez β -laktamy, jednak w przypadku produkcji konstytutywnej, w wyniku mutacji genu naturalnie występującego (derepresja) lub nadprodukcji enzymu, obserwowana jest oporność również na cefalosporyny III generacji. Zatem uważa się, że cefalosporynazy AmpC hydrolizują wszystkie penicyliny, cefalosporyny (z wyjątkiem leków IV generacji) i aztreonam, a także nie są one podatne na działanie inhibitorów β -laktamowych, zwłaszcza kwasu klawulanowego (Barlow i Hall, 2002; Hopkins i wsp., 2006; Hawkey i Jones, 2009). W latach 2005-2006 u szczepów *Klebsiella* spp. i *E. coli* zidentyfikowano nabyte warianty naturalnie występujących cefalosporynaz AmpC, mianowicie DHA i CMY. Kodowane plazmidowo nabyte warianty tych genów są równie niebezpieczne jak β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, jednak ze względu na mniejszą częstość i szybkość rozprzestrzeniania, nie stanowią one wielkiego zagrożenia klinicznego (Philippon i wsp., 2002; Jacoby, 2009). Najczęściej występującymi wariantami genów cefalosporynaz u

szczepów klinicznych, izolowanych na całym świecie są DHA-1 i CMY-2 (Ding i wsp., 2008; Jacoby, 2009; Fatemi i wsp., 2018; Hennequin i wsp., 2018).

1.9. β -laktamazy klasy A

β -laktamazy typu ESBL pochodzą od enzymów SHV-1 i TEM-1, które były pierwszymi zidentyfikowanymi β -laktamazami o szerokim spektrum działania (ang. broad-spectrum β -lactamases) (Paterson i Bonomo, 2005; Bush i Jacoby, 2010). Natomiast obecnie znanych jest ponad sto wariantów TEM i SHV, których większość zaliczana jest także do ESBL.

Wśród szczepów *Enterobacteriaceae*, najczęściej występującymi genami warunkującymi mechanizm ESBL są geny z rodziny CTX-M, dotychczas opisano 168 wariantów (Borgogna i wsp., 2016). Spośród tych enzymów wyróżnia się pięć głównych rodzin genów CTX-M, a mianowicie CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, różniące się sekwencją aminokwasową. Każda z grup zawiera wiele wariantów genów CTX-M, ponadto istnieją co najmniej cztery warianty genów o strukturze hybrydowej z białkami nieznanego pochodzenia. Każdy wariant CTX-M pochodzi prawdopodobnie od szczepów z rodziny *Kluyvera*, które w bardzo szybkim tempie rozprzestrzeniły się wśród szczepów należących do innych rodzajów pałeczek *Enterobacteriaceae* (D'Andrea i wsp., 2013; Blair i wsp., 2015). U szczepów szpitalnych jak i pozaszpitalnych najczęściej stwierdza się *E. coli* wytwarzające ESBL z rodziny CTX-M, a dokładnie jego wariant CTX-M-15, który występuje najczęściej wśród szczepów izolowanych z ludzkich zakażeń na całym świecie (Pitout i wsp., 2005; Coque i wsp., 2008; Bush, 2013; Blair i wsp., 2015).

β -laktamazy ESBL typu GES (ang. guiana extended-spectrum) po raz pierwszy wykryto u *P. aeruginosa* w Gujanie francuskiej (Dubois i wsp., 2002). Odmiany tego enzymu zostały opisane również w Europie, Południowej Afryce, Azji i na Bliskim Wschodzie u szczepów *Enterobacteriaceae* (Poirel i wsp., 2000; Vourli i wsp., 2004). GES-1 wykazuje niski poziom aktywności katalitycznej wobec większości substratów i łatwo ulega zahamowaniu przez kwas klawulanowy (Patel i Bonomo, 2013). Geny te są często zlokalizowane w obrębie integronów klasy 1 na plazmidach (Poirel i wsp., 2000). Z

tej grupy enzymów ESBL wywodzą się nowe warianty β -laktamazy o aktywności karbapenemaz (Wstęp 1.11.1.).

Enzymy ESBL typu PER wykazują tylko 26% identyczności ze znanymi β -laktamazami ESBL. Pomimo tego, równie skutecznie hydrolizują penicyliny, szerokie spektrum cefalosporyn i aztreonam oraz są podatne na działanie kwasu klawulanowego. Pierwszym zidentyfikowanym enzymem był PER-1 u *P. aeruginosa*, następnie enzymy te oznaczono u bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Acinetobacter* (Nordmann i wsp., 1993; Vahaboglu i wsp., 1998; 2001). Wariant PER-2 wykryto u *S. enterica* serowar Typhimurium, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* i *Vibrio cholerae* (Bauernfeind i wsp., 1996; Petroni i wsp., 2002). β -laktamazy typu PER-1 odnotowuje się głównie w Turcji, Francji, Włoszech i Belgii, natomiast wariant PER-2 stwierdzono w Ameryce Południowej (Bauernfeind i wsp., 1996; Vahaboglu i wsp., 1997; Paterson i Bonomo, 2005).

Kodowaną plazmidowo β -laktamazę typu VEB zidentyfikowano po raz pierwszy we Francji, a następnie w Tajlandii, Kuwejcie i Chinach u szczepów *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. sakazakii* i *P. aeruginosa* izolowanych od chorych ludzi (Naas i wsp., 1999; Poirel i wsp., 1999; Tribuddharat i Fennewald, 1999; Girlich i wsp., 2001). Enzymy typu VEB charakteryzują się 38% homologią i takim samym zakresem substratowym jak PER-1. Wykazują wysoki stopień hydrolizy cefalosporyn III generacji i aztreonamu.

1.10. β -laktamazy klasy D

Enzymy ESBL typu OXA, hydrolizują kloksacylinę i oksycylinę, a w mniejszym stopniu cefalosporyny. Najczęściej identyfikowany jest wariant OXA-1, który nie hydrolizuje cefalosporyn III generacji, u szczepów *P. aeruginosa*, *E. coli* i *K. pneumoniae*, rzadziej u innych pałeczek Gram-ujemnych (Yan i wsp., 2006). Do enzymów ESBL zaliczane są warianty OXA-10, -11, -14, 15, -16, -17, -18, -19, -28, -31, -32, -35, -45, które hydrolizują dodatkowo cefalosporyny III generacji i monobaktamy (Paterson i Bonomo, 2005). Z tej grupy enzymów wywodzą się enzymy OXA-48 hydrolizujące karbapenemy (Wstęp 1.11.3.).

1.11. Bakterie *Enterobacteriaceae* wytwarzające β -laktamazy o aktywności karbapenemaz

W ostatnich latach z coraz większym niepokojem odnotowywane jest pojawienie się i bardzo szybkie rozprzestrzenianie szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy. Wprowadzone do lecznictwa w 1980 roku karbapenemy, to jedna z najnowszych generacji β -laktamów o najszerszym spektrum działania, spośród wszystkich antybiotyków. W swojej strukturze zawierają atom węgla w pozycji 1 zamiast atomu siarki oraz nienasycony pięciocłonowy pierścień połączony z pierścieniem β -laktamowym, co odróżnia je od penicylin i cefalosporyn (El-Gamal i Oh, 2010). Istotną cechą tej grupy antybiotyków jest to, że nie są one hydrolizowane przez β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym i cefalosporynazy AmpC. Szerokie rozprzestrzenianie się pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBL, spowodowało, że karbapenemy stały się lekami ostatniej szansy przy leczeniu najpoważniejszych infekcji bakteryjnych wywoływanych przez bakterie gram ujemne. Wśród pałeczek jelitowych *Enterobacteriaceae* opornych na karbapenemy (CPE – ang. carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) jest wiele gatunków zdolnych do wywoływania różnych typów zakażeń, w Polsce są to głównie *K. pneumoniae* i *E. coli*. Oporność tych bakterii może wynikać nie tylko z produkcji różnych karbapenemaz, ale także z występowania jednocześnie dodatkowych mechanizmów oporności, mianowicie wytwarzania ESBL i obniżania przepuszczalności osłon komórkowych dla antybiotyków. Karbapenemazy wykazują różnorodność molekularną i epidemiologiczną. Należą do trzech strukturalnych klas β -laktamaz sklasyfikowanych przez Amblera, tj. klasy A, B oraz D (Bush i Jacoby, 2010, Patel i Bonomo, 2013).

1.11.1. Karbapenemazy klasy A

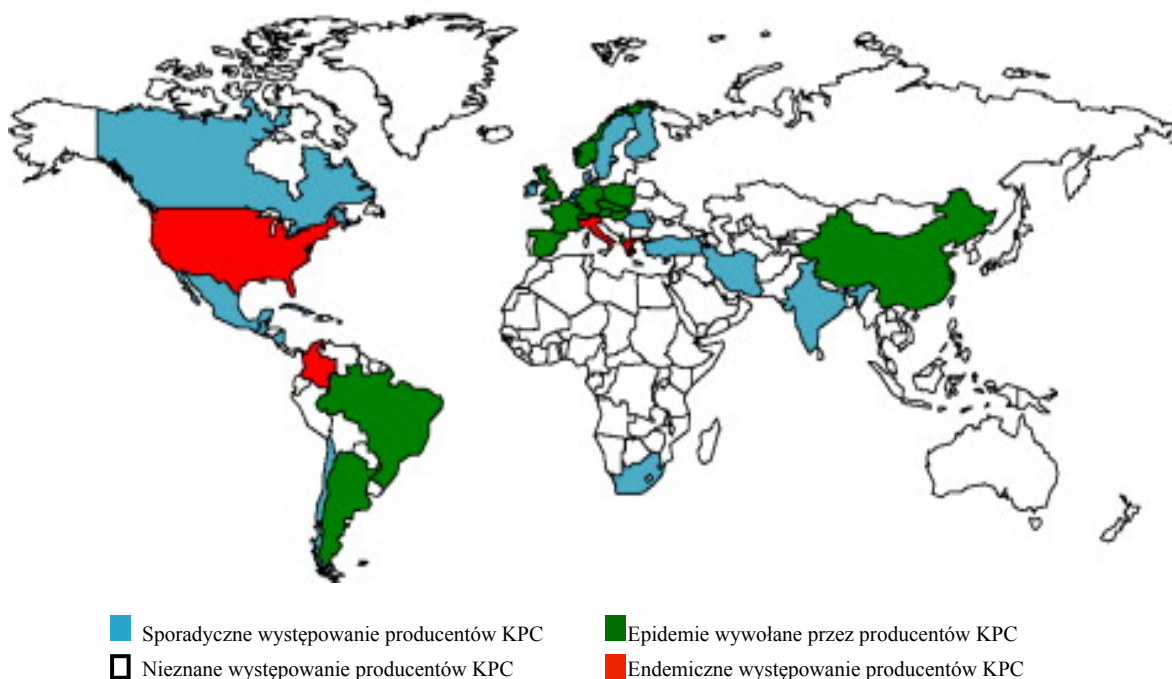
Najniebezpieczniejszymi karbapenemazami są enzymy z rodziny KPC (ang. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), po raz pierwszy zidentyfikowane w 1996 roku w USA (Patel i Bonomo, 2013). Najczęściej, produkowane są przez szczepy *K. pneumoniae*, jednak obecnie identyfikuje się je również u *Pseudomonas* spp., *A. baumannii* i innych

pałeczek niefermentujących. Dotychczas oznaczono 12 typów karbapenemaz KPC, z których większość stanowią KPC-2 i KPC-3 (Bush i Jacoby, 2010). Enzymy te mają najszersze spektrum substratowe spośród wszystkich β -laktamaz. Skutecznie hydrolyzują wszystkie dostępne klinicznie β -laktamy, najaktywniej penicyliny i cefalosporyny I generacji. Wysoka oporność szczepów wytwarzających karbapenemazy KPC wynika z obecności dodatkowych mechanizmów oporności tj. redukcja liczby czy utrata poryn oraz wytwarzanie ESBL. Gen *bla_{KPC}* zlokalizowany jest w obrębie transpozonu Tn4401 z grupy Tn3 (Bush i Jacoby, 2010). Plazmidy zawierające *bla_{KPC}* mają różną wielkość i należą do różnych typów, a wiele z nich zawiera dodatkowe geny warunkujące oporność na aminoglikozydy. Jednak głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost częstości występowania szczepów wytwarzających KPC jest hiperepidemiczny klon *K. pneumoniae* ST258, który po raz pierwszy pojawił się w USA, następnie został przeniesiony do Izraela, Grecji i wielu miejsc na całym świecie (Rycina 6). W 2008 roku został wykryty również w Polsce (Nikonorow i wsp., 2013). W wyniku zakażenia szczepami KPC(+), śmiertelność wynosi nawet 50% (Juda i Malm, 2013).

Karbapenemazy GES to typ β -laktamaz wywodzących się od enzymów ESBL. GES-1 jest hamowany przez imipenem i kwas klawulanowy, natomiast jego pochodne GES-2 i GES-5 wykazują swoistość karbapenemaz i efektywnie hydrolyzują imipenem (Patel i Bonomo, 2013).

Pozostałe typy karbapenemaz klasy A izolowane są znacznie rzadziej i nie stanowią tak poważnego problemu jak KPC. Karbapenemaza Nmc-A (ang. non-metallo-carbapenemase-A) jest chromosomalnie kodowaną, niebędącą metaloenzymem β -laktamazą wyizolowaną z *Enterobacter cloacae* we Francji. Obecnie występowanie tego enzymu jest rzadko odnotowywane (Patel i Bonomo, 2013). Enzymy IMI (ang. imipenem-resistant) a dokładnie wariant IMI-1 został wyizolowany z chromosomu *E. cloacae* na południowym wschodzie USA. Jego wariant IMI-2 znaleziono w plazmidach środowiskowych szczepów *E. asburiae* w rzekach USA (Patel i Bonomo, 2013). Karbapenemaza SME (ang. *Serratia marcescens* enzyme) została po raz pierwszy opisana w 1982 roku u szczepu *S. marcescens* wyizolowanego od pacjenta w Londynie, a następnie w USA, Kanadzie i Szwajcarii. Chromosomalnie kodowana karbapenemaza SME nadal, choć z niską częstotliwością występuje w Ameryce Północnej. Karbapenemazami

występującymi u szczepów izolowanych z prób środowiskowych były SFC (ang. *S. fonticola* enzyme) i BIC (Girlich i wsp., 2010; Patel i Bonomo, 2013). Pierwotnie wyizolowane z *S. fonticola* w Portugalii, później znalezione u *P. fluorescens* pochodzących z Sekwany (Patel i Bonomo, 2013).

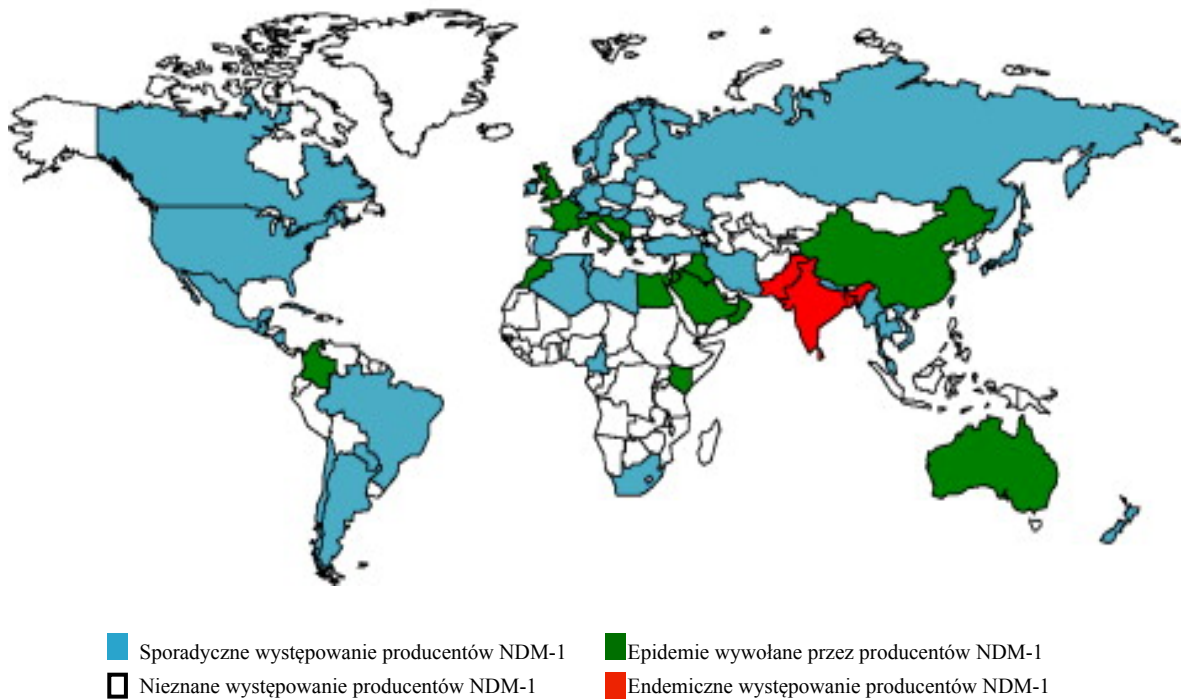


Rycina 6. Geograficzne występowanie producentów KPC (Nordmann i Poirel, 2014).

1.11.2. Karbapenemazy klasy B

Klasa B obejmuje enzymy określane jako metalo- β -laktamazy (MBL – ang. metallo- β -lactames). Są to β -laktamazy, które nie mają reszty serynowej w centrum aktywnym i wymagają jonów cynku jako kofaktorów reakcji hydrolizy pierścienia β -laktamowego (Wright, 2011). Zależność od jonów cynku powoduje hamowanie ich przez EDTA oraz inne czynniki chelatujące jony dwuwartościowe, natomiast inhibitory β -laktamowe nie działają na tę grupę enzymów (Patel i Bonomo, 2013). Wszystkie β -laktamazy należące do MBL wykazują zdolność do hydrolizy karbapenemów, a także penicylin i cefalosporyn. Nie rozkładają natomiast monobaktamów. Pierwsze enzymy MBL stwierdzono i opisano u niefermentujących pałeczek *P. aeruginosa* w 1988 roku w

Japonii (Bush i Jacoby, 2010). Od 2001 roku szczepy wytwarzające MBL pojawiają się również wśród *Enterobacteriaceae* na terenie Europy. Najbardziej powszechnymi rodzinami metalo- β -laktamaz są enzymy IMP, VIM oraz NDM. Łatwość ich rozprzestrzeniania wynika z umiejscowienia genów oporności na ruchomych fragmentach DNA (Patel i Bonomo, 2013; Blair i wsp., 2015). Geny *bla*_{IMP} i *bla*_{VIM} zazwyczaj zlokalizowane są w obrębie integronów klasy 1, które z kolei zlokalizowane są w transpozonach, co umożliwia im przemieszczanie pomiędzy szczepami (Walsh i wsp., 2005). Wielkie zagrożenie jakie niesie ze sobą szybkość rozprzestrzeniania się szczepów wytwarzających MBL obrazuje sytuacja, która miała miejsce w Grecji. Szczep *K. pneumoniae* wytwarzający enzym VIM-1 w zaledwie pięć lat rozprzestrzenił się na ok. 50% populacji szpitalnych tego gatunku. Do tej pory zostało opisane 37 wariantów VIM, z których najczęstszy – VIM-2 izolowany jest na całym świecie. Duży niepokój wzbudza również zidentyfikowany u wieloopornego szczepu *K. pneumoniae* enzym NDM-1, w 2008 roku w Szwecji, u pacjenta wcześniej hospitalizowanego w Indiach. Niedługo po pierwszym odkryciu ukazały się liczne doniesienia o szybkim rozprzestrzenianiu się szczepów NDM-1(+) wśród innych gatunków *Enterobacteriaceae* (Patel i Bonomo, 2013; Blair i wsp., 2015). Za źródło tych bakterii uznaje się Indie, Pakistan i Bangladesz, skąd szczep NDM(+) został przeniesiony do Wielkiej Brytanii i innych państw Europy oraz USA, Australii, krajów Zatoki Perskiej i Afryki (Rycina 7) (Nordmann i Poirel, 2014). Analiza prób wody z wodociągów publicznych w Indiach wykazała, że źródłem NDM-1 może być środowisko, szczególnie wody z terenów wokół New Delhi (Patel i Bonomo, 2013). Obecność genu *bla*_{NDM-1} stwierdzono także u bakterii zjadliwych takich jak *Vibrio cholerae* (Walsh i wsp., 2005).

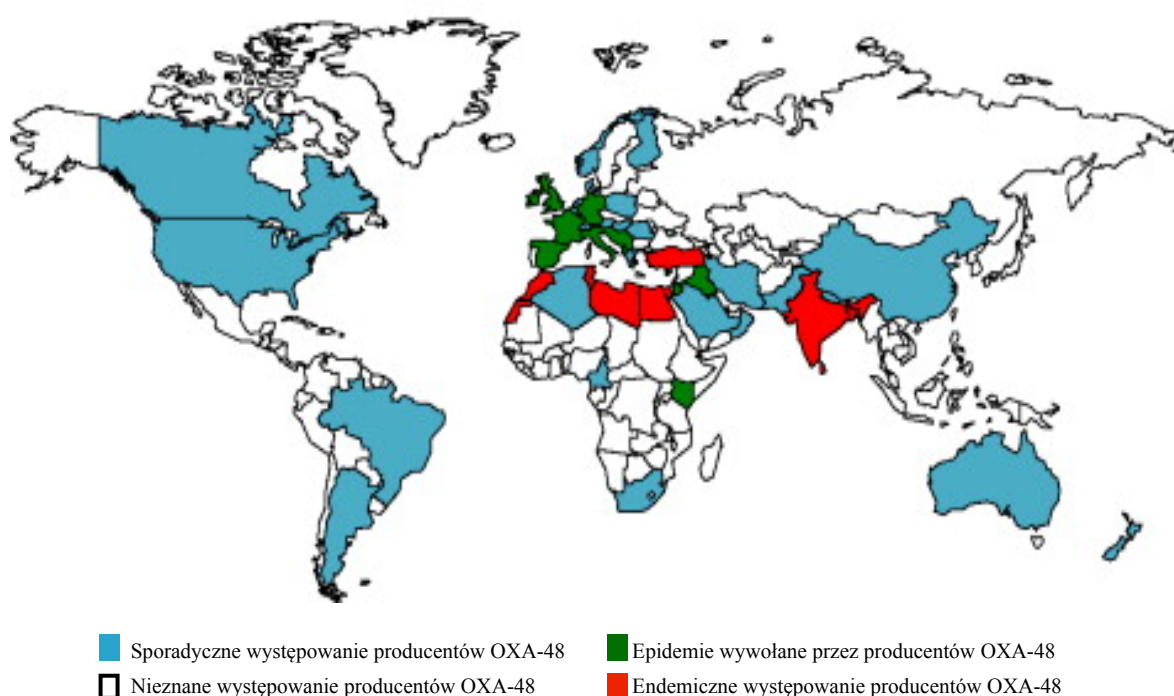


Rycina 7. Geograficzne występowanie producentów NDM-1 (Nordmann i Poirel, 2014).

1.11.3. Karbapenemazy klasy D

β -laktamazy hydrolizujące karbapenemy klasy D (CHDL – ang. carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases) obejmują niejednorodną grupę enzymów zdolnych do hydrolizy karbapenemów, penicylin i cefalosporyn I generacji, niewrażliwych na inhibitory β -laktamaz oraz hamowanych *in vitro* przez NaCl. Karbapenemazy CHDL pochodzą od enzymów ESBL typu OXA. W 1980 roku po raz pierwszy, naturalnie występujące enzymy CHDL stwierdzono u przedstawicieli niefermentujących *Acinetobacter* sp., głównie u szczepów *A. baumannii*, u których stanowią główne źródło oporności na karbapenemy (Evans i Amyes, 2014; Mitchell i wsp., 2015). Pierwszym opisanym nabytym wariantem naturalnie występujących enzymów CHDL był OXA-23 (Evans i Amyes, 2014). W 2001 roku w Turcji zidentyfikowano kodowany plazmidowo, nowy rodzaj OXA-48 związany wyłącznie z *Enterobacteriaceae*. Pomimo, że enzymy CHDL mają stosunkowo słabą aktywność wobec karbapenemów, wysoka ekspresja i częsta obecność innych mechanizmów oporności takich jak zmiany struktury białek błony zewnętrznej,

zwiększenie liczby kopii genu, ekspresja innych karbapenemaz, czy zwiększony wpływ leków, powoduje, że szczepy OXA-48(+) są wysoce odporne na β -laktamy i inne grupy leków (Mitchell i wsp., 2015). Gen *bla*_{OXA-48} zlokalizowany jest w obrębie transpozonu Tn1999 i rozprzestrzenia się wśród *Enterobacteriaceae* głównie za pomocą koniugacyjnego transferu specyficznych grup plazmidów (Poirel i wsp., 2005). Za rejon endemiczny dla szczepów OXA-48(+) uznaje się Indie, Turcję, Afrykę Północną oraz kraje wschodniej i południowej części Morza Śródziemnego, skąd napływają do Europy (Rycina 8) (Patel i Bonomo, 2013; Nordmann i Poirel, 2014).



Rycina 8. Geograficzne występowanie producentów OXA-48 (Nordmann i Poirel, 2014).

1.12. Bakterie *Staphylococcus aureus* odporne na metycylinę (MRSA)

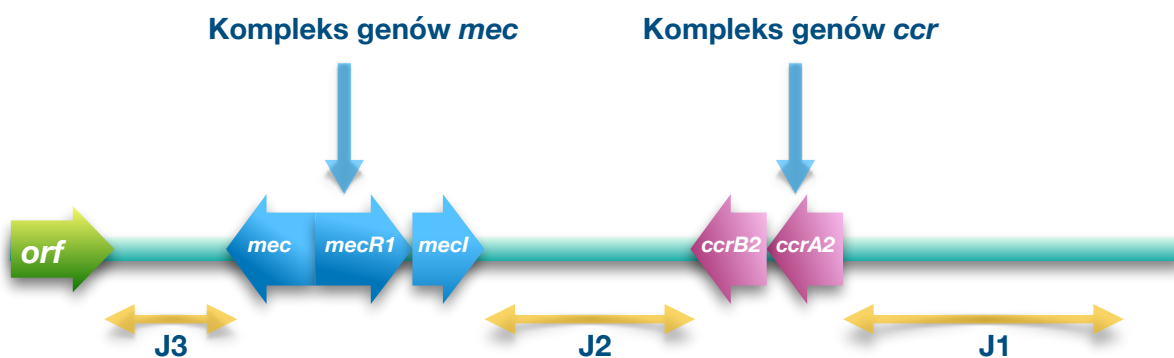
Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* to Gram-dodatnie ziarenkowce, o średnicy 0,5 do 1,5 μ m. W preparatach mikroskopowych występują pojedynczo, w parach lub tworzą charakterystyczne układy gron (Kloos i Bannerman, 1999; Götz i wsp., 2006). Gronkowce są w większości względnie beztlenowcami, a optymalna temperatura ich wzrostu wynosi

od 30 do 35°C. Bakterie te są nieprzetrwalnikujące, nie wykazują ruchu, zwykle są katalazo-dodatnie, fermentują glukozę oraz wytwarzają oksydazę (Szewczyk, 2005).

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* należą do jednych z najbardziej rozpowszechnionych drobnoustrojów w przyrodzie. Mają zdolność kolonizacji i utrzymywania się w różnych środowiskach, ale najczęściej ich rezerwuarem są ludzie i zwierzęta (Międzobrodzki i wsp., 2008). Stanowią główny składnik naturalnej mikroflory skóry i błon śluzowych górnych dróg oddechowych człowieka i zwierząt. Najliczniejszym i najpowszechniej spotykanym gatunkiem jest *Staphylococcus epidermidis*, którego można wyizolować ze skóry, a przede wszystkim z nosogardzieli. Gronkowce mogą występować zarówno w powietrzu, kurzu, w wodzie, glebie, a także w produktach spożywczych (Götz i wsp., 2006; Międzobrodzki i wsp., 2008). Wiele gatunków z rodzaju *Staphylococcus* od lat znajduje się na czele listy drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne. Wynika to nie tylko z ich szerokiego rozprzestrzeniania i powszechnej kolonizacji skóry i śluzówek człowieka, ale także z łatwego nabywania genów oporności na wiele grup antybiotyków (Szewczyk, 2005).

Staphylococcus aureus jest głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych. Najczęstszymi infekcjami wywoływanymi przez *S. aureus* są zakażenia skóry i tkanek miękkich, ale także zakażenia układu oddechowego, układu pokarmowego, układu moczowego, zakażenia szpiku, kości i stawów oraz zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i posocznice (Szewczyk, 2005). Obecnie ponad 95% szczepów *S. aureus* występujących w środowisku szpitalnym opornych jest na penicylinę, którą wprowadzono do powszechnego użycia w latach 40-tych XX wieku. W 1942 roku wyizolowano szczep *S. aureus* oporny na penicylinę, którego niewrażliwość wynikała z produkcji penicylinazy kodowanej przez geny plazmidowe (Spink i Ferris, 1945; Jevons, 1961). W latach 60-tych XX w. opracowano półsyntetyczną penicylinę czyli meticylinę, niepodatną na działanie penicylinazy. Dwa lata po jej wprowadzeniu, pojawiły się pierwsze szczepy *S. aureus* odporne na meticylinę (MRSA – ang. methicillin-resistant *S. aureus*) (Jevons, 1961). W Polsce pierwsze szczepy MRSA wyizolowano w 1964 roku, jeszcze przed wprowadzeniem w naszym kraju meticyliny do użytku. Szczepy *S. aureus* wykazują oporność na wszystkie kliniczne stosowane antybiotyki β-laktamowe, jak i również na wiele innych grup antybiotyków (Blair i wsp., 2015). Obecnie w wielu

szpitalach w USA i Europie Zachodniej odsetek szczepów MRSA sięga 90% (Markiewicz i Kwiatkowski, 2010). Oporność szczepów MRSA determinowana jest obecnością genu *mecA*, kodującego białko wiążące penicylinę, zwane PBP2a lub PBP2', które w przeciwieństwie do PBP, wykazuje obniżone powinowactwo do antybiotyków β -laktamowych, jednocześnie zachowując funkcje katalityczne białek PBP (Satta i wsp., 1991). Gen *mecA* wchodzi w skład kasety SCC*mec* (ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*), będącej mobilnym elementem genetycznym, która może być przekazywana między szczepami jednego lub różnych gatunków bakterii na drodze horizontalnego transferu genów (Hanssen i Ericson, 2006; Blair i wsp., 2015). Pochodzenie kaset SCC*mec* oraz mechanizm ich nabywania nie jest w pełni poznany. Kaseta SCC*mec* zawiera kompleks genów *mec*, rekombinaz *ccr*, geny regulujące aktywność genu *mecA* oraz regiony towarzyszące: J1, J2 i J3, które mogą zawierać sekwencje niekodujące, sekwencje insercyjne, plazmidy i transpozony, w których często obecne są geny warunkujące oporność na różne klasy antybiotyków. Obecnie opisano 11 typów kaset SCC*mec*, różniących się sekwencją genu *mecA* oraz rodzajem genów rekombinaz (Rycina 9) (Młynarczyk i Młynarczyk, 2008; Shore i Coleman, 2013).



Rycina 9. Schemat kasety SCC*mec*: *mecA* – gen oporności na metycylinę, *mecR1* i *mecI* – geny regulatorowe, *ccrB2* i *ccrA2* – geny rekombinaz, J3, J2 i J1 – regiony towarzyszące (według Berglund i wsp., 2009).

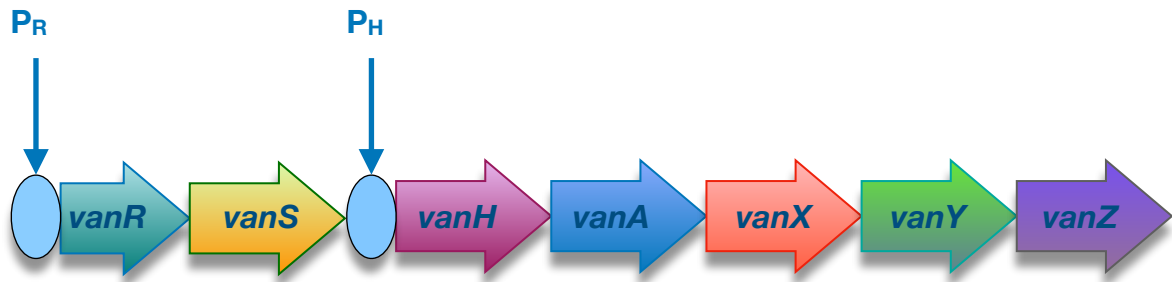
1.13. Bakterie z rodzaju *Enterococcus* odporne na wankomycynę (VRE)

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to Gram-dodatnie ziarenkowce, osiągające rozmiar do 2,5 μm . Bakterie te są względnie beztlenowe i zdolne do wzrostu w szerokim zakresie temperatur, optymalna temperatura ich wzrostu wynosi 35°C (Szewczyk, 2005). Enterokoki nie produkują przetrwalników, nie wytwarzają oksydazy oraz są koagulazoujemne (Oladipo i wsp., 2013). Bakterie te to komensale wchodzące w skład mikroflory dolnego odcinka układu pokarmowego ludzi i zwierząt. Ze względu na duże zdolności adaptacyjne i odporność na niekorzystne warunki środowiska, enterokoki występują powszechnie w glebie, wodach powierzchniowych, ściekach, na roślinach, owocach, warzywach i mięsie (Giraffa, 2002). Obecnie, enterokoki stały się czynnikiem etiologicznym wielu zakażeń w środowiskach szpitalnych, głównie u pacjentów z niedoborem odporności lub poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii (Murray, 1997; Cetinkaya i wsp., 2000; Mundy i wsp., 2000). Szczepy *Enterococcus* sp. powodują poważne zakażenia takie jak: infekcje układu moczowego, wsierdzia, ran, dróg żółciowych oraz zapalenia otrzewnej i zakażenia krwi (O'Driscoll i Crank, 2015). Gatunek *Enterococcus faecalis* stał się istotą przyczyną zakażeń szpitalnych i zazwyczaj wykazuje wielolekową oporność (Oladipo i wsp., 2013).

Narastająca oporność na antybiotyki β -laktamowe spowodowała konieczność szukania nowych, skutecznych antybiotyków w leczeniu najpoważniejszych infekcji bakteryjnych. Ogromne nadzieje wiązano z wprowadzoną do lecznictwa w 1958 roku wankomycyną. Wankomycyna, podobnie jak teikoplanina, to antybiotyk należący do grupy glikopeptydów, aktywnych głównie wobec bakterii Gram-dodatnich i zaliczanych do antybiotyków ostatniej szansy w leczeniu najpoważniejszych zakażeń wywoływanych przez wielolekooporne szczepy *Enterococcus* sp. (Kawalec i wsp., 2007; Werner i wsp., 2008). Mechanizm działania wankomycyny polega na blokowaniu biosyntezy ściany komórkowej bakterii. W wyniku wiązania się antybiotyku bezpośrednio z D-alanylo-D-alaninowymi peptydami końcowymi, co uniemożliwia działanie trans peptydazy, następuje zahamowanie polimeryzacji peptydoglikanu (Wilhelm i Estes, 1999). Po latach skutecznej antybiotykoterapii wankomycyną, w 1988 roku po raz pierwszy zidentyfikowano szczepy *Enterococcus* sp. o nabytej oporności na wankomycynę i teikoplaninę (Krawczyk i wsp.,

2004). Oporność szczepów z rodzaju *Enterococcus* na wankomycynę (VRE – ang. vancomycin resistant enterococci) polega na zmianie miejsca docelowego działania antybiotyku, a mianowicie w wyniku syntezy zmienionych prekursorów mureiny, D-alanino-D-mleczanu i D-alanino-D-seryny. Dipeptydy te włączane są zamiast D-alanylo-D-alaniny w łańcuch prekursora, co uniemożliwia wankomycynie blokowanie syntezy peptydoglikanu (Gholizadeh i Courvalin, 2000). Dotychczas opisano dziewięć głównych fenotypów oporności enterokoków na wankomycynę: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM oraz VanN (Gholizadeh i Courvalin, 2000; Mckessar i wsp., 2000; Boyd i wsp., 2008; Xu i wsp., 2010; Lebreton i wsp., 2011). Ze względu na częstość występowania i szybkość rozprzestrzeniania między komórkami enterokoków za pomocą plazmidów i transpozonów największe znaczenie kliniczne i epidemiologiczne mają szczepy VRE o fenotypie VanA i VanB, notowane najczęściej wśród gatunków *E. faecalis* (85-90%) i *E. faecium* (10-15%) (Ruoff i wsp., 1990; Cetinkaya i wsp., 2000; O’Driscoll i Crank, 2015). Fenotyp VanA charakteryzuje szczepy odporne na wysokie stężenia wankomycyny i teikoplaniny. Natomiast szczepy o fenotypie VanB wykazują oporność na różne stężenia wankomycyny i wrażliwość na teikoplainę. Geny *vanA* i *vanB* warunkujące fenotyp VanA i VanB zlokalizowane są w obrębie operonu *van* w strukturze transpozonów Tn1546, Tn1549, Tn1547 i Tn5382 na plazmidzie lub w chromosomie (Gholizadeh i Courvalin, 2000). Molekularny mechanizm oporności na antybiotyki glikopeptydowe, w szczególności na wysokie stężenia wankomycyny, wynika ze złożoności kompleksu genów w operonie *van*. W skład operonu warunkującego fenotyp VanA, w obrębie transpozonu Tn1546, wchodzi siedem genów oporności na antybiotyki glikopeptydowe (*vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanY*, *vanZ*, *vanS* i *vanR*), promotory P_H i P_R, które umożliwiają transkrypcję genów *van*, oraz dwie ramki odczytu (ORF1 i ORF2) (Gholizadeh i Courvalin, 2000; Courvalin, 2005; Przybylski, 2007) (Rycina 10). Geny *vanS* i *vanR* warunkują indukcję oporności w obecności antybiotyku glikopeptydowego. Białko błonowe VanS ulega fosforylacji w obecności glikopeptydów, po czym następuje ufosforylowanie produktu genu *vanR*, który aktywuje transkrypcję genów *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* i *vanZ*. Białko VanH redukuje pirogronian do D-mleczanu, z kolei VanA jest ligazą odpowiedzialną za powstanie terminalnych dipeptydów D-alanino-D-mleczanu, co uniemożliwia wiązanie się antybiotyku glikopeptydowego (Arthur i wsp., 1991; Przybylski, 2007). Utworzenie

dipeptydu D-alanino-D-mleczanu warunkuje także gen *vanX*, który koduje DD-dipeptydazę, hydrolizującą D-Ala-D-Ala, natomiast VanY jest DD-karboksypeptydazą, usuwającą koniec D-Ala (Brandt i wsp., 2000; Méndez-Alvarez i wsp., 2000; Przybylski, 2007). Szczepy o fenotypie VanA występują najczęściej w Europie, USA i Południowej Korei, natomiast fenotyp VanB w Singapurze i Australii (Suzuki i wsp., 2014).



Rycina 10. Schemat operonu VanA (według Przybylski, 2007).

2. CEL PRACY

Celem pracy była jakościowa i ilościowa analiza rezystomu ścieków miejskich Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach koło Poznania. Badania dotyczyły określenia rodzaju i częstości występowania genów integrazy integronów klasy 1 (*intI1*) oraz genów warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *ampC*, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY} i *mecA*) oraz glikopeptydowe (*vanA*) w genomach bakterii hodowlanych, a także w metagenomie ścieków. W Polsce prowadzi się niewiele badań dotyczących rezystomu oczyszczalni ścieków i jego wpływu na rezystom środowiskowy.

Przetestowano następujące hipotezy badawcze:

1. W trakcie procesu oczyszczania ścieków zachodzi selekcja i zwiększenie częstości występowania wielolekoopornych szczepów w ścieku oczyszczonym.
2. Częstość występowania ARG w ścieku oczyszczonym zwiększa się na skutek transferu ARG pomiędzy szczepami w środowisku oczyszczalni ścieków.
3. W mikrobiomie ścieku oczyszczonego obecne są wielolekooporne bakterie oraz geny warunkujące wytwarzanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), karbapenemaz, a także oporność na wankomycynę i metycylinę.
4. Częstość występowania genów oporności na antybiotyki i integronów związana jest ze zmianami składu populacji mikroorganizmów.

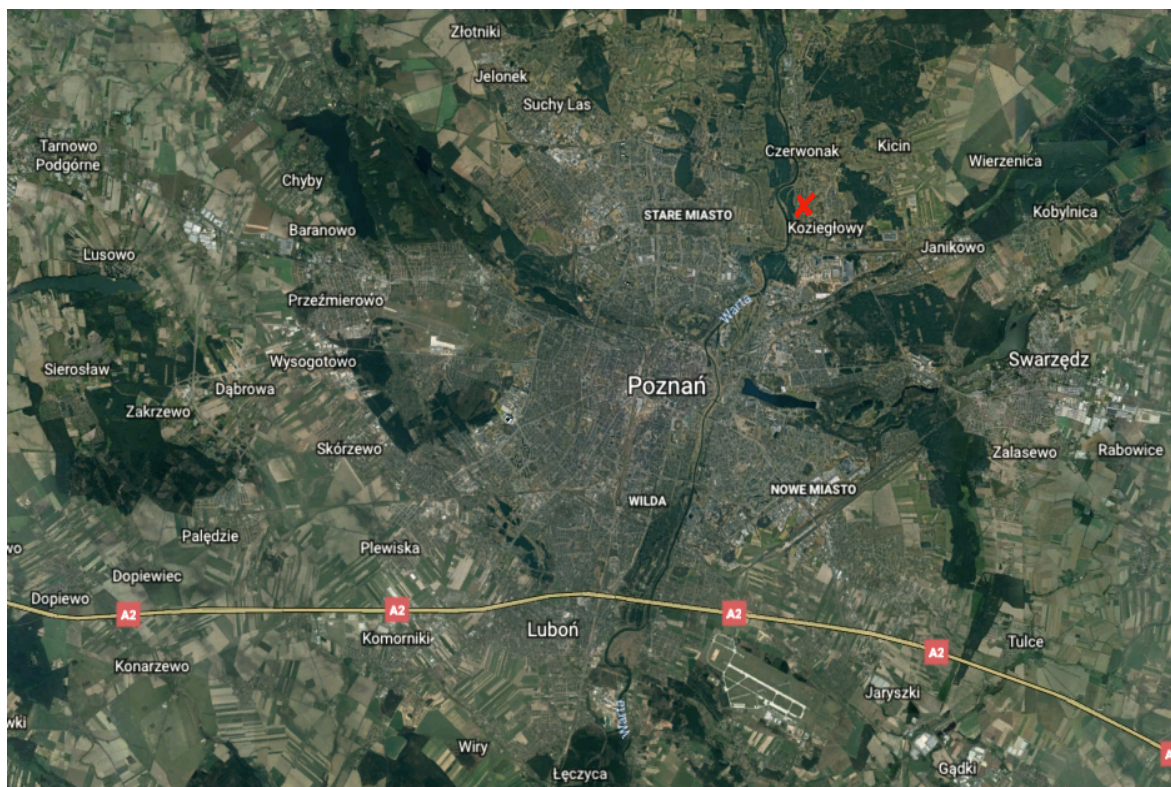
Zadania badawcze mające na celu zweryfikowanie powyższych hipotez obejmowały:

1. Sezonowy pobór próbek oraz określenie fizykochemicznych i mikrobiologicznych wskaźników ścieków.
2. Selekcję i identyfikację bakterii wytwarzających ESBL, karbapenemazy, szczepów VRE i MRSA oraz bakterii z integronami.
3. Oznaczenie wariantów genów oporności na antybiotyki u bakterii hodowlanych.
4. Określenie liczby kopii i częstości występowania genów oporności na antybiotyki i integraz integronów klasy 1 w metagenomie ściekowym.
5. Oznaczenie różnorodności taksonomicznej w metagenomie ścieków na poszczególnych etapach ich oczyszczania.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Pobór materiału

Materiałem do badań były próby ścieku pobierane sezonowo z osadnika wstępnego (ściek surowy po oczyszczeniu mechanicznym), kanału wylotowego (ściek oczyszczony) i komory napowietrzania Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowych. Próby ścieku (10 L) pobierano w odległości 0,5 m od krawędzi zbiornika, z głębokości ok. 0,5 m, a następnie transportowano w jałowych pojemnikach w temperaturze 4°C do laboratorium w Zakładzie Mikrobiologii UAM i niezwłocznie poddawano dalszym procedurom. Pobory ścieku surowego, oczyszczonego oraz z komory napowietrzania przeprowadzono osiem razy: od marca 2015 r. do stycznia 2017 r. za wyjątkiem wiosny 2016 r. Miejsce poboru materiału oznaczono na rycinie 11.



Rycina 11. Miejsce poboru materiału i obszar spływu ścieków do COŚ. **X** – Centralna Oczyszczalnia Ścieków w Koziegłowych. **Koordynaty GPS:** Koziegłowy: 52.4495 °N, 16.9811 °E (<https://earth.google.com/web/>).

3.1.1. Centralna Oczyszczalnia ścieków w Koziegłowach

Centralna Oczyszczalnia Ścieków (COŚ) zlokalizowana jest w północno-wschodniej części powiatu poznańskiego w Koziegłowach w gminie Czerwonak (Rycina 12). COŚ jest oczyszczalnią mechaniczno-biologiczną, która pozwala na przyjęcie 200 000 m³ ścieków na dobę. Ścieki dopływają do COŚ systemami kanalizacyjnymi z Poznania, Swarzędza, Lubonia, Tarnowa Podgórnego, Suchego Lasu oraz części Gminy Czerwonak. Oczyszczony ściek przyjmuje rzeka Warta (<http://www.aquanet.pl>).



Rycina 12. Centralna Oczyszczalnia ścieków w Koziegłowach (<http://www.aquanet.pl>).

3.1.2. Parametry fizykochemiczne ścieków

Pomiary pH, przewodności, zawartości substancji stałych rozpuszczonych (TDS – ang. total dissolved solids), oraz zasolenia określano wieloparametrowym miernikiem przenośnym OrionStar A329 (Thermo Scientific).

3.2. Analiza bakterii hodowalnych

3.2.1. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii

Ogólną liczbę bakterii heterotroficznych określono metodą posiewu powierzchniowego. W tym celu wykonywano szereg rozcieńczeń próbek ścieków od 10^{-1} do 10^{-5} w 0,85% NaCl. Z każdego rozcieńczenia pobierano 100 μ l zawiesiny i posiewano na powierzchnię podłoża agarowego BHI (bioMérieux), w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano w temperaturze 30°C, 18-24 h, a następnie zliczano kolonie. Do wyznaczenia ogólnej liczby bakterii w 1 ml (CFU/ml) uwzględniono wartości mieszczące się w szeregu <10;300>. Ogólną liczbę heterotrofów wyznaczano według wzoru (Harrigan i McCance, 1976):

$$L = \frac{C}{(N_1 + 0,1 N_2) \cdot d \cdot a}$$

C – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

N_1 – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia,

N_2 – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia,

d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający pierwszemu (najniższemu) liczonemu rozcieńczeniu,

a – objętość rozcieńczenia próbki posiewana na 1 płytkę.

3.2.2. Oznaczanie liczby bakterii grupy coli

W celu oznaczenia liczby bakterii grupy coli wykorzystano podłoże chromogenne Brilliance™ E.coli/Coliform Selective Agar (Oxoid). Próbki ścieków rozcieńczano w 0,85% NaCl w szeregu od 10^0 do 10^{-5} . Na powierzchnię podłoża posiewano 100 μ l zawiesiny każdego rozcieńczenia, w dwóch powtórzeniach. Płytki inkubowano w

temperaturze 37°C przez 18-24 h. Po inkubacji zliczano kolonie barwy fioletowej, typowe dla *E. coli*, ze względu na zdolność wytwarzania β-galaktozydazy i β-glukoronidazy oraz kolonie barwy różowej, typowe dla pozostałych bakterii grupy coli, dzięki produkcji β-galaktozydazy. Do wyznaczenia liczby *E. coli* i bakterii grupy coli w 1 ml (CFU/ml) uwzględniono wartości mieszczące się w szeregu <10;300>. Liczbę *E. coli* i bakterii grupy coli wyznaczano według wzoru (Materiał i metody 3.2.1.).

3.2.3. Oznaczenie liczby bakterii *S. aureus*

Liczbę bakterii *S. aureus* oznaczono na podłożu Baird-Parkera Agar (Oxoid). Dla prób ścieku i osadu wykonywano szereg rozcieńczeń (10^{-1} - 10^{-4}) w 0,85% NaCl. Na powierzchnię podłoża posiewano 100 μl zawiesiny każdego rozcieńczenia, w dwóch powtórzeniach. Po inkubacji w 37°C zliczano kolonie barwy brązowej ze strefą proteolizy typowe dla bakterii *S. aureus* i wyznaczono liczbę bakterii według wzoru (Materiał i metody 3.2.1.).

3.2.4. Oznaczenie liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* oznaczono na podłożu Slanetza i Bartley (Oxoid). Wykonano szereg rozcieńczeń prób ścieku i osadu (10^{-1} - 10^{-4}) w 0,85% NaCl. Posiewano 100 μl zawiesiny każdego rozcieńczenia, w dwóch powtórzeniach na powierzchnię podłoża i inkubowano w 37°C (4 h) i 44°C (44 h). Po inkubacji zliczano kolonie barwy różowo-fioletowej typowe dla bakterii z rodzaju *Enterococcus* i wyznaczono liczbę bakterii według wzoru (Materiał i metody 3.2.1.).

3.2.5. Barwienie metodą Grama

W celu potwierdzenia przynależności taksonomicznej bakterii, wykonywano barwienie metodą Grama. Na utrwalony preparat наносzono fiolet gencjany na 2-3 minuty, płyn Lugola przez 1,5 do 2 minut, odbarwiano 90% etanolem z dodatkiem acetonu przez 30 s i dobarwiano fuksyną przez 20 s.

3.2.6. Test na obecność oksydazy cytochromowej

Test na obecność oksydazy cytochromowej przeprowadzono za pomocą pasków bibułowych nasączonych N,N,N',N' tetrametylo-*p*-fenylenodiaminą (Oxidase Strip, Oxoid). Badany szczep hodowano na podłożu agarowym BHI przez 18-24 h w temp. 37°C. Za dodatni wynik testu uznawano fioletowe zabarwienie paska pojawiające się w ciągu 5 s po zetknięciu z kolonią bakteryjną.

3.2.7. Oznaczanie wrażliwości bakterii na antybiotyki metodą krążkowo-dyfuzyjną

Z 24-godzinnej hodowli szczepu na podłożu agarowym BHI przygotowywano zawiesinę komórek w 0,85% roztworze NaCl o gęstości równej 0,5 w skali McFarlanda. Za pomocą jałowej wymazówki rozprowadzono inokulum na podłożu stałym Muellera-Hinton (bioMérieux) i nakładano krążki bibułowe nasączone antybiotykami. Płytki inkubowano 18±2 godziny w 35±1°C. Po inkubacji mierzono strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków i interpretowano według rekomendacji EUCAST v. 3.0 (2016). Badano wrażliwość bakterii na następujące antybiotyki:

- karbapenemowe dla szczepów karbapenemoopornych, CPE, CPE typu OXA-48 i wytwarzających ESBL: meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ertapenem (10 µg),
- temocylinę (30 µg) dla szczepów CPE typu OXA-48,
- cefoksytynę (30 µg) dla szczepów MRSA,
- wankomycynę (30 µg) dla szczepów VRE.

3.2.8. Oznaczenie wytwarzania β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) – metoda dwóch krążków

Wytwarzanie β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) określano przy pomocy testu dwóch krążków (DDST – ang. double-disc synergy test) z użyciem cefotaksymu (30 µg), ceftazydymu (30 µg) i amoksycyliny z kwasem klawulanowym (30 µg). Krążek wysycony amoksycyliną z kwasem klawulanowym

układano w odległości nie większej niż 2 cm od krążka z cefotaksymem i ceftazydymem i inkubowano 18±2 godzin w temperaturze 35±1°C. O produkcji ESBL świadczyło wyraźne powiększenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z cefotaksymem lub ceftazydymem od strony krążka amoksyliny z kwasem klawulanowym (Gniadkowski i wsp., 2009).

3.2.9. Oznaczanie liczby gronkowców opornych na metycylinę (MRSA)

Podłoże chromID™ MRSA Medium (bioMérieux) przeznaczone jest do wykrywania opornych na metycylinę bakterii *S. aureus* (MRSA). W celu wyizolowania szczepów MRSA, próbki ścieku surowego i z komory napowietrzania o objętości 0,1 ml oraz ścieku oczyszczonego o objętości 0,1 ml i 1 ml posiewano bezpośrednio na podłoże chromogenne. Dodatkowo, próbki ścieku oczyszczonego o objętości 10 ml sączono przez filtry membranowe o średnicy porów 0,45 µm (Sartorius Stedim), następnie filtry umieszczano na podłożu chromID™ MRSA Medium i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Zliczano typowe czerwone kolonie bakterii, będące potencjalnymi izolatami MRSA i przesiewano na wybiórczo-różnicujące podłoże Chapmana (Oxoid) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Kolonie typowe dla *S. aureus* przesiewano na podłoże agarowe BHI, inkubowano 18-24 h w 37°C i przygotowano preparaty mikroskopowe barwione metodą Grama (Materiał i metody 3.2.5.). Następnie oznaczano wrażliwość bakterii na metycylinę metodą krążkowo-dyfuzyjną (Materiał i metody 3.2.7.). Szczepy odporne przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Z wyselekcjonowanych szczepów izolowano DNA (Materiał i metody 3.2.15.) i przeprowadzono multipleksową reakcję PCR, w celu wykrycia obecności genu *nuc*, kodującego nukleazę u *S. aureus* oraz *mecA*, warunkującego oporność na metycylinę (Materiał i metody 3.2.18.). Liczbę bakterii MRSA w jednostce objętości szacowano na podstawie procentu jaki stanowiły szczepy z potwierdzonym mechanizmem oporności wśród szczepów wyhodowanych na podłożu chromogennym po podaniu odpowiedniej objętości próby, jako potencjalne szczepy MRSA. Częstość występowania szczepów MRSA szacowano na podstawie liczby bakterii MRSA w stosunku do liczby *S. aureus* (Materiał i metody 3.2.3.).

3.2.10. Oznaczanie liczby wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus* sp. (VRE)

Do wykrywania enterokoków wykazujących nabytą oporność na wankomycynę (VRE) wykorzystano podłoże chromID™ VRE Medium (bioMérieux), z jednoczesnym różnicowaniem *E. faecium* i *E. faecalis*. Po 24-godzinnej inkubacji w 37°C kolonie *E. faecium* mają barwę fioletową, a kolonie *E. faecalis* barwę niebiesko-zieloną (www.biomerieux.pl).

W celu oznaczenia liczby bakterii VRE, próbki ścieków posiewano bezpośrednio na podłoże chromogenne w objętości: 1 ml, 10 ml (ściek oczyszczony) i 0,1 ml (ściek surowy i ściek z komory napowietrzania). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Typowe kolonie potencjalnych bakterii VRE zliczano i przesiewano na podłoże wybiórczo-różnicujące Slanetza i Bartley i inkubowano w temperaturze 37°C (4 h) i 44°C (44 h). Kolonie barwy różowo-fioletowej, typowe dla bakterii *Enterococcus* sp., przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Po inkubacji przygotowano preparaty mikroskopowe barwione metodą Grama, w celu potwierdzenia morfologii ziarenkowców Gram(+) (Materiał i metody 3.2.5.). Następnie oznaczano wrażliwość bakterii na wankomycynę metodą krążkowo-dyfuzyjną (Materiał i metody 3.2.7.). Szczepy odporne przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Z wyselekcjonowanych szczepów izolowano DNA (Materiał i metody 3.2.15.) i przeprowadzono reakcję PCR, w celu stwierdzenia obecności genu *vanA*, *vanB* i *vanC* występujących u szczepów VRE (Materiał i metody 3.2.19.). Dopiero na tej podstawie szacowano liczbę bakterii VRE, uwzględniając procent jaki stanowiły szczepy VRE wśród potencjalnych szczepów VRE wyizolowanych z podłoża chromogennego. Częstość występowania szczepów VRE szacowano na podstawie ich liczby w stosunku do liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* (Materiał i metody 3.2.4.).

3.2.11. Oznaczanie liczby bakterii wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

Do wykrywania bakterii grupy coli wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) użyto podłoża chromogennego Brilliance ESBL Agar (Oxoid). Podłoże to pozwala na wstępną identyfikację *E. coli*, rodzajów *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Citrobacter* (grupa KESC) oraz rodzajów *Proteus*, *Morganella* i *Providencia* (grupa PMP) po 24-godzinnej inkubacji (www.oxoid.com).

W celu wyizolowania szczepów wytwarzających ESBL, próbki ścieku oczyszczonego o objętości 10 ml i 100 ml sączono przez filtry membranowe o średnicy porów 0,45 μm , umieszczane następnie na powierzchni podłoża. Próbkę ścieku surowego i ścieku z komory napowietrzania o objętości 0,1 ml i 1 ml posiewano bezpośrednio na powierzchnię podłoża chromogennego. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 18-24 h. Zliczano typowe kolonie bakterii potencjalnie wytwarzających ESBL: *E. coli* o barwie fioletowej, KESC o barwie różowej i PMP o barwie brunatnej. Pojedyncze, wyodrębnione kolonie potencjalnych izolatów wytwarzających ESBL przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano w temperaturze 35°C przez 24 h. Po inkubacji wykonywano test na obecność oksydazy cytochromowej (Materiał i metody 3.2.6.). Szczepy oksydazo-ujemne przesiewano na podłoże agarowe BHI, inkubowano 24 godziny w 37°C, i wykonywano oznaczenia wytwarzania ESBL metodą dwóch krążków (Materiał i metody 3.2.8) i wrażliwości na antybiotyki karbapenemowe (meropenem, ertapenem i imipenem) metodą krążkowo-dyfuzyjną (Materiał i metody 3.2.7.). Szczepy wytwarzające ESBL przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji przeprowadzono izolację DNA (Materiał i metody 3.2.15.), w celu wykonania reakcji ERIC-PCR wykluczającej obecność izolatów będących klonami (Materiał i metody 3.2.16.). Na podstawie procentu jaki stanowiły potwierdzone szczepy wytwarzające ESBL wśród szczepów wyizolowanych z podłoża chromogenne jako potencjalnie wytwarzające ESBL, szacowano liczbę bakterii wytwarzających ESBL w jednostce objętości ścieku. Częstość występowania szczepów wytwarzających ESBL szacowano na podstawie ich liczby względem liczby bakterii grupy coli (Materiał i metody 3.2.2.).

3.2.12. Oznaczenie liczby bakterii karbapenemoopornych (CPE)

W celu oznaczenia liczby i wyizolowania szczepów bakterii grupy coli wytwarzających karbapenemazy (CPE) zastosowano podłoże chromID™ CARBA Medium (bioMérieux). Próbki ścieku surowego rozcieńczano w 0,85% NaCl i posiewano 0,1 ml rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-3} , natomiast ściek z komory napowietrzania i ściek oczyszczony posiewano bezpośrednio w objętości 0,1 i 1 ml. Dodatkowo, 10 ml ścieku oczyszczonego sączono przez filtry membranowe o średnicy porów 0,45 μm , filtry umieszczano na powierzchni podłoża chromogenego i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji liczone typowe kolonie bakterii z grupy KESC (kolonie koloru niebieskiego), oraz *E. coli* (kolonie burgundowe). Potencjalnie odporne na karbapenemy kolonie bakterii grupy KESC i *E. coli* przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 h w 37°C. Po inkubacji wykonywano test na obecność oksydazy cytochromowej (Materiał i metody 3.2.6.). Szczepy oksydazo-ujemne przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Następnie wykonywano oznaczenie wrażliwości bakterii na antybiotyki karbapenemowe (meropenem, ertapenem i imipenem) metodą krążkowo-dyfuzyjną (Materiał i metody 3.2.7.). Szczepy odporne na karbapenemy przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji przeprowadzono izolację DNA (Materiał i metody 3.2.15.) w celu wykonania reakcji ERIC-PCR i wykluczano z analiz izolaty będące klonami (Materiał i metody 3.2.16.). Na podstawie procentu jaki stanowiły szczepy CPE wśród potencjalnych szczepów CPE wyizolowanych z podłoża chromogenego szacowano liczbę bakterii karbapenemoopornych w jednostce objętości ścieku. Częstość występowania szczepów CPE obliczano na podstawie ich liczby względem liczby bakterii grupy coli (Materiał i metody 3.2.2.).

3.2.13. Oznaczenie liczby bakterii karbapenemoopornych typu OXA-48 (CPE typu OXA-48)

Do wykrywania bakterii grupy coli wytwarzających karbapenemazy typu OXA-48 (CPE typu OXA-48) zastosowano podłoże chromID™ OXA-48 Medium (bioMérieux). Obecność trzech substratów chromogenych w tym podłożu daje możliwość identyfikacji najczęściej izolowanych CPE: *E. coli* i grupy KESC (www.biomerieux.pl).

Próbki ścieku oczyszczonego o objętości 10 ml i 100 ml sączono przez filtry membranowe o średnicy porów 0,45 μm , następnie filtry umieszczono na powierzchni podłoża. Natomiast ściek z komory napowietrzania i ściek surowy posiewano bezpośrednio w objętości 1 ml i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji liczono typowe kolonie bakterii z grupy KESC (kolonie koloru niebieskiego), oraz *E. coli* (kolonie burgundowe). Potencjalnie odporne na karbapenemy kolonie z grupy KESC i *E. coli* przesiewano na podłoże stałe BHI i inkubowano 24 h w 37°C. Po inkubacji wykonywano test na obecność oksydazy cytochromowej (Materiał i metody 3.2.6.). Szczepy oksydazoujemne przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Następnie oznaczano wrażliwość bakterii na antybiotyki karbapenemowe (meropenem, ertapenem i imipenem) i temocylinę metodą krążkowo-dyfuzyjną (Materiał i metody 3.2.7.). Szczepy odporne na karbapenemy i temocylinę przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji przeprowadzono izolację DNA (Materiał i metody 3.2.15.), w celu wykonania reakcji ERIC-PCR, wykluczającej obecność szczepów będących klonami (Materiał i metody 3.2.16.). Na podstawie procentu jaki stanowiły szczepy CPE typu OXA-48 wśród szczepów wyizolowanych z podłoża chromogennego jako potencjalne szczepy CPE typu OXA-48 szacowano liczbę bakterii z tym mechanizmem oporności w jednostce objętości ścieku. Częstość występowania szczepów CPE typu OXA-48 obliczano na podstawie ich liczby względem liczby bakterii grupy coli (Materiał i metody 3.2.2.).

3.2.14. Przechowywanie szczepów bakteryjnych

Materiał pobrany z 24-godzinnych hodowli szczepów na podłożu agarowym BHI, posiewano na agar odżywczy z chlorkiem sodu (agarek amerykański, Emapol) do przechowywania szczepów bakteryjnych, inkubowano 24 godziny w 30°C. Po inkubacji przechowywano w temperaturze pokojowej.

3.2.15. Przygotowanie matrycowego DNA

Genomowy DNA izolowano metodą gotowanych lizatów z kolonii (Grape i wsp., 2005). Szczepy z odpowiednimi mechanizmami oporności przesiewano na podłoże agarowe BHI i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C. Następnie materiał z kolonii bakterii zawieszano w 30 µl jałowej wody dejonizowanej i ogrzewano przez 2 min. w temperaturze 95°C. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Dla prób ze wszystkich poborów i lokalizacji przygotowano po 96 lizatów losowo wybranych kolonii bakterii heterotroficznych i po 96 lizatów bakterii grupy coli. Ponadto przygotowano lizaty szczepów z mechanizmami oporności MRSA, VRE, wytwarzających ESBL, szczepów CPE i CPE typu OXA-48.

3.2.16. Określanie polimorfizmu genetycznego szczepów metodą ERIC-PCR

W celu wyeliminowania szczepów będących klonami zastosowano reakcję PCR przy użyciu starterów ERIC1 i ERIC2 komplementarnych do enterobakteryjnych powtarzających się międzygenowych sekwencji zgodności (ERIC – ang. enterobacterial repetitive intergenic consensus) (Versalovic i wsp., 1991).

Sekwencje starterów:

ERIC1: 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC 3'

ERIC2: 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA matrycowy	2 µl
10 × bufor do PCR (Novazym) o składzie:	2,5 µl
750 mM Tris HCl pH 8,8	
200 mM NH ₄ (SO ₄) ₂	
0,1% Tween	
25 mM MgCl ₂	
5 mM dNTP mix (Novazym)	(200 µM)

Startery: ERIC1 i ERIC2	(0,6 μM)
Taq polimeraza DNA (Novazym)	1U
Jałowa woda dejonizowana	do 25 μl

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa	94°C, 30 s
30 cykli obejmujących:	
- Denaturację	94°C, 30 s
- Hybrydyzację	50°C, 1 min
- Elongację	72°C, 6 min
Wydłużanie końcowe	72°C, 8 min

Wszystkie reakcje PCR prowadzono w termocykleach C1000™ oraz MyCycler (Bio-Rad), stosując dwukrotne powtórzenia prób badanych.

3.2.17. Wykrywanie genów integraz

Obecność integronów określano stosując amplifikację genów trzech klas integraz: *intI1*, *intI2* oraz *intI3* w multipleksowej reakcji PCR przy użyciu trzech par starterów (Oligo.pl) o sekwencjach komplementarnych do sekwencji fragmentów genów poszczególnych klas integraz.

Sekwencje starterów (Dillon i wsp., 2005):

Int1 f: 5' CAGTGGACATAAGCCTGTTC 3'

Int1 r: 5' CCCGACGCATAGACTGTA 3'

Int2 f: 5' CACGGATATGCGACAAAAG 3'

Int2 r: 5' GATGCAAACGAGTGACGAAA 3'

Int3 f: 5' GCCTCCGGCACGCACTTTCAG 3'

Int3 r: 5' ACGGATCTGCCAAACCTGAC 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej (Koelman i wsp., 2001):

DNA matrycowy	2 µl
10 × bufor do PCR (Novazym)	5 µl
5 mM dNTP mix (Novazym)	0,5 µl (100 µM)
Starter Int1f	(0,25 µM)
Starter Int1r	(0,25 µM)
Starter Int2f	(0,25 µM)
Starter Int2r	(0,25 µM)
Starter Int3f	(0,25 µM)
Starter Int3r	(0,25 µM)
Taq polimeraza DNA (Novazym)	2U
Jałowa woda dejonizowana	do 25 µl

Warunki multipleksowej reakcji Int-PCR:

Denaturacja początkowa	94°C, 5 min
30 cykli obejmujących:	
- Denaturację	94°C, 1 min
- Hybrydyzację	59°C, 1 min
- Elongację	72°C, 1 min
Wydłużanie końcowe	72°C, 1 min

Wielkość produktów: *int11* – 160 pz, *int12* – 788 pz, *int13* – 979 pz.

3.2.18. Identyfikacja szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (MRSA)

Identyfikację szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę określono stosując reakcję multipleksowego PCR w celu amplifikacji fragmentów trzech genów: 16S rRNA, *nuc* (kodującego nukleazę u *S. aureus*) i *mecA*, który jest częścią kasyety SCC*mec* u szczepów MRSA. Sekwencje starterów użyte do reakcji (Predari i wsp., 1991; Poulsen i wsp., 2003):

16s-F: 5' GTGCCAGCAGCCGCGGTAA 3'
16s-R: 5' AGACCCGGGAACGTATTCAC 3'
nuc-F: 5' TCAGCAAATGCATCACAAACAG 3'
nuc-R: 5' CGTAAATGCACTTGCTTCAGG 3'
mecA-F: 5' GGGATCATAGCGTCATTATTC 3'
mecA-R: 5' AACGATTGTGACACGATAGCC 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA matrycowy	2 µl
10 × bufor do PCR (Novazym)	2,5 µl
5 mM dNTP mix (Novazym)	0,5 µl (100 µM)
Starter 16s-F	(0,25 µM)
Starter 16s-R	(0,25 µM)
Starter nuc-F	(0,25 µM)
Starter nuc-R	(0,25 µM)
Starter mecA-F	(0,25 µM)
Starter mecA-R	(0,25 µM)
Taq polimeraza DNA (Novazym)	1U
Jałowa woda dejonizowana	do 25 µl

Warunki multipleksowej reakcji PCR:

Denaturacja początkowa	94°C, 5 min
30 cykli obejmujących:	
- Denaturację	94°C, 30s
- Hybrydyzację	55°C, 30s
- Elongację	72°C, 1 min
Wydłużanie końcowe	72°C, 10 min

Wielkość produktów: 16S rRNA – 886 pz, *nuc* – 255 pz, *mecA* – 527 pz.

3.2.19. Identyfikacja wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus* sp. (VRE)

Identyfikację szczepów *Enterococcus* sp. opornych na wankomycynę określono stosując reakcję PCR trzech rodzajów genów *vanA*, *vanB* i *vanC*. Sekwencje starterów użyte do reakcji (Patel i wsp., 1997, Dutka-Malen i wsp., 1995):

vanA-F: 5' CATGACGTATCGGTAAAATC 3'

vanA-R: 5' ACCGGGCAGRGTATTGAC 3'

vanB-F: 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3'

vanB-R: 5' GATTCGTTCCTCGACC 3'

vanC1-F: 5' GGTATCAAGGAAACCTC 3'

vanC1-R: 5' CTTCCGCCATCATAGCT 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA matrycowy	2 µl
10 × bufor do PCR (Novazym)	2,5 µl
5 mM dNTP mix (Novazym)	0,5 µl (100 µM)
Starter vanA-F	(0,25 µM)
Starter vanA-R	(0,25 µM)
Starter vanB-F	(0,25 µM)
Starter vanB-R	(0,25 µM)
Starter vanC1-F	(0,25 µM)
Starter vanC1-R	(0,25 µM)
Taq polimeraza DNA (Novazym)	1U
Jałowa woda dejonizowana	do 25 µl

Warunki reakcji PCR:

Denaturacja początkowa	94°C, 4 min
30 cykli obejmujących:	
- Denaturację	94°C, 30s
- Hybrydyzację	45-48°C, 1 min

- Elongację	72°C, 1 min
Wydłużanie końcowe	72°C, 5 min

Wielkość produktów: *vanA* – 885 pz, *vanB* – 647 pz, *vanC* – 822 pz.

3.2.20. Identyfikacja genów kodujących β-laktamazy i karbapenemazy

W celu identyfikacji genów kodujących β-laktamazy i karbapenemazy przeprowadzono reakcję amplifikacji z zastosowaniem starterów komplementarnych do fragmentów genów (Tabela 2).

Tabela 2. Sekwencje nukleotydowe starterów używanych w reakcjach PCR do identyfikacji genów kodujących ESBL, cefalosporynazy AmpC i karbapenemazy oraz genu 16S rRNA, wielkość oczekiwanych produktów i temperatura hybrydyzacji w poszczególnych reakcjach PCR.

Gen	Sekwencja startera	Wielkość produktu	Temperatura hybrydyzacji	Piśmiennictwo
16s rRNA	16SF1502: 5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'	1484 pz	47°C	Acinas i wsp., 1997
	16SR1502: 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'			
bla_{CTX-M}	P1C: 5' TTAATTCGTCTCTTCCAGA 3'	1000 pz	50°C	Gniadkowski i wsp., 1998b
	P2D: 5' CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG 3'			
bla_{SHV}	SHV-A: 5' ACTGAATGAGGCGCTTCC 3'	300 pz	50°C	Gniadkowski i wsp., 1998a
	SHV-B: 5' ATCCCGCAGATAAATCACC 3'			
bla_{TEM}	TEM-F: 5' ATTCTTGAAGACGAAAGGGC 3'	1150 pz	49°C	Sáenz i wsp., 2004
	TEM-R: 5' ACGCTCAGTGAACGAAAAC 3'			
bla_{OXA-1}	OXA-F: 5' ACACAATACATATCAACTTCGC 3'	813 pz	49°C	Sáenz i wsp., 2004
	OXA-R: 5' AGTGTGTTTAGAATGGTGATC 3'			
bla_{OXA-48}	OXA48F: 5' TGTTTTTGGTGGCATCGAT 3'	177 pz	47°C	Monteiro i wsp., 2012
	OXA48R: 5' GTAAMRATGCTTGGTTCGC 3'			

Gen	Sekwencja startera	Wielkość produktu	Temperatura hybrydyzacji	Piśmiennictwo
<i>bla_{GES}</i>	GES-F: 5' TTCCATCTCAAGGGATCACC 3'	890 pz	50°C	Mendonca i wsp., 2009
	GES-R: 5' GCGTCAACTATTTGTCCGTG 3'			
<i>bla_{VEB}</i>	VEB-F: 5' GTTAGCGGTAATTTAACCAGATAG 3'	1070 pz	50°C	Aragón i wsp., 2008
	VEB-R: 5' CGGTTTGGGCTATGGGCA 3'			
<i>bla_{PER}</i>	PER-1-A: 5' TGACGATCTGGAACCTTT 3'	900 pz	50°C	De Champs i wsp., 2002
	PER-1-B: 5' AACTGCATAACTACTCC 3'			
<i>amp_C</i>	ampCF: 5' CCTCTTGCTCCACATTTGCT 3'	189 pz	50°C	Szczepanowski i wsp., 2009
	ampCR: 5' ACAACGTTTGCTGTGTGACG 3'			
<i>bla_{CMY}</i>	CMY25F: 5' CAATGTGTGAGAAGCAGTC 3'	1432 pz	47°C	Hanson i wsp., 2002
	CMY2DR: 5' CGCATGGGATTTTCCTTGCTG 3'			
<i>bla_{DHA}</i>	DHAMF: 5' AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT 3'	404 pz	47°C	Perez-Perez i Hanson 2002
	DHMAR: 5' CCGTACGCATACTGGCTTTGC 3'			
<i>bla_{IMP}</i>	IMP_F: 5' GTACAGTCTATGCCTCG 3'	750 pz	49°C	Qin i wsp., 2008
	IMP_R: 5' GTAMGTTTCAAGAGTGATGC 3'			
<i>bla_{KPC}</i>	KPC_F: 5' FGCTACACCTAGCTCCACCTTC 3'	988 pz	48°C	Qin i wsp., 2008
	KPC_R: 5' ACAGTGGTTGGTAATCCATGC 3'			
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F: 5' GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC 3'	621 pz	48°C	Poirel i wsp., 2011
	NDM-R: 5' CGGAATGGCTCATCACGATC 3'			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-B: 5' ATGGTGTGGTTCGCATATC 3'	509 pz	49°C	Tato i wsp., 2007
	VIM-F: 5' TGGGCCATTCAGCCAGATC 3'			

Skład mieszaniny reakcyjnej:

matrycowy DNA	2 µl
10 × bufor do PCR (Thermo Scientific) z dodatkiem 20mM MgCl ₂	2,5 µl
5 mM dNTP mix (Novazym)	0,5 µl (100 µM)
Starter F	(0,25 µM)
Starter R	(0,25 µM)
Dream Taq Polymerase 5U/µl (Thermo Scientific)	1U

Jałowa, dejonizowana woda

do 25 µl

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa

95°C, 3 min

30 cykli obejmujących:

- Denaturację

95°C, 30s

- Hybrydyzację

47-50°C, 1 min

- Elongację

72°C, 1 min

Wydłużanie końcowe

72°C, 7 min

3.2.21. Elektroforeza w żelu agarozowym

Produkty amplifikacji reakcji PCR poddawano rozdzielaniu w 1,5% żelu agarozowym (2% w przypadku produktów reakcji ERIC-PCR) w buforze TBE (0,089 M Tris; 0,089 M H₃BO₃; 0,0025 M EDTA) przy napięciu 5 V/cm. Do studzienek podawano 5 µl produktu oraz 10× stężony bufor obciążający (50% 10×TBE; 40% glicerol; 0,0025 M błękit bromofenolowy; woda). Zastosowanym wzorcem masowym była mieszanina fragmentów DNA Nova DNA Ladder Mix (Novazym) lub Mass Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie MultiSub Maxi Duo (Clever Scientific Ltd.) lub Vari-Gel TVG (Scie-Plas). Po zakończeniu elektroforezy, żel barwiono bromkiem etydyny (1 µg/ml, Sigma) przez 20 min i oglądano na transilluminatorze UV przy długości fali 312 nm. Zdjęcia wybarwionych żeli zapisywano w formacie graficznym TIFF stosując system do dokumentacji żeli BioPrint 99. 04 (Vilber-Lourmat, Francja).

3.2.22. Sekwencjonowanie fragmentów DNA

Produkty uzyskane w reakcjach amplifikacji fragmentów poszczególnych genów oporności poddano sekwencjonowaniu w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w sekwencjonatorze Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems). Uzyskane w ten sposób dane poddano analizie w programie FinchTV v.1.4.0 (Geospiza), a

następnie wykorzystano algorytm porównujący sekwencje nukleotydowe w programie BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) z sekwencjami w bazie GenBank, która jest częścią NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.3. Przygotowanie metagenomowego DNA

3.3.1. Zagęszczanie materiału

Przed przystąpieniem do izolacji metagenomowego DNA próby ścieku zagęszczano. W zależności od rodzaju, materiał zagęszczano przy zastosowaniu filtracji lub wirowania:

- ściek surowy – 300 ml próby sączono kolejno przez filtry o średnicy porów 8 i 0,45 μm (Milipore), następnie filtry cięto, przenoszono do jałowych probówek typu Falcon o pojemności 50 ml i przechowywano w temperaturze -80°C . Przed izolacją DNA próby rozmrażano, dodawano ok. 25-30 ml NaCl lub PBS (tak, aby filtry były zanurzone), następnie wytrząsano ok. 30 min. Filtry usuwano, a pozostałą zawiesinę wirowano 15-20 min., 5000 rpm ($4600\times g$). Supernatant usuwano, a osad poddawano odpowiednim procedurom izolacji DNA,
- ściek z komory napowietrzania – 500 ml ścieku pobranego z komory napowietrzania wirowano przy 3500 rpm ($4600\times g$) przez 55 min.,
- ściek oczyszczony – 3 l ścieku sączono kolejno przez filtry o średnicy porów 8 i 0,45 μm (Milipore). Dalsza część zagęszczania, jak w przypadku prób ścieku surowego.

3.3.2. Izolacja metagenomowego DNA

Metagenomowy DNA z zagęszczonych prób przygotowywano poprzez gotowanie (Johnson i Brown, 1996). W zależności od rodzaju próby stosowano następujące procedury:

Izolacja metagenomowego DNA ze ścieku surowego i oczyszczonego:

1. Do probówek z osadem, uzyskanym po zagęszczaniu prób, dodawano 1 ml wody.

2. Próby wytrząsano, a następnie gotowano 10 min. w temperaturze 100°C w łaźni wodnej.
3. Probówki wirowano 2 min., 14 000 rpm (18 000×g).
4. Supernatanty zebrano i przenoszono do nowych probówek o pojemności 2 ml.

Izolacja metagenomowego DNA ze ścieku z komory napowietrzania:

1. Do probówek o pojemności 2 ml odważano 1 g osadu i dodawano 1 ml NaCl.
2. Probówki z osadem wytrząsano 10 min., a następnie gotowano 10 min. w temperaturze 100°C w łaźni wodnej.
3. Probówki wirowano 5 min. w temperaturze 18°C, 14 000 rpm (18 000×g).
4. Supernatanty zebrano do nowych probówek o pojemności 2 ml.

Stężenie DNA określano przy użyciu spektrofotometru Nano-100 Micro-Spectrophotometr (Allsheng) na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 260 nm. Celem wyznaczenia stopnia zanieczyszczenia preparatów białkami i innymi związkami mierzono również absorbancję przy długości fali 280 i 230 nm. Stosunek A260/A280 informuje o zanieczyszczeniach białkami, natomiast A260/A230 o zanieczyszczeniach innego rodzaju, np. solami, węglowodorami czy związkami organicznymi. Do dalszych analiz wykorzystywano preparaty DNA, których wartości współczynnika A260/280 mieściły się w przedziale 1,8-2,0, natomiast wartości współczynnika A260/230 wynosiły ok. 2,2.

3.3.3. Określenie rozcieńczeń preparatów metagenomowego DNA

Celem dobrania rozcieńczenia próby niezbędnego do uzyskania produktu reakcji PCR, którego konieczność wynika z zanieczyszczenia preparatów metagenomowego DNA inhibitorami reakcji PCR, przeprowadzono reakcję amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA z wykorzystaniem pary starterów: 16S0341 i 16S0785 (Klindworth i wsp., 2013). Oczekiwana wielkość ampliconu wynosi 464 pz.

Sekwencje starterów:

16S-0785: 5' GACTACAVGGGTATCTAATCC 3'

16S-0341: 5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3'

Skład mieszaniny reakcyjnej:

DNA matrycowy	2 µl
10 × bufor do PCR (Novazym):	2,5 µl
2 mM dNTP mix (Novazym)	(200 µM)
Starter 16S-0785	(0,25 µM)
Starter 16S-0341	(0,25 µM)
Taq polimeraza DNA (Novazym)	0,5U
Jałowa woda dejonizowana	do 15 µl

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa	94°C, 3 min
34 cykli obejmujące:	
- Denaturację	94°C, 45s
- Hybrydyzację	52°C, 30s
- Elongację	72°C, 30s
Wydłużanie końcowe	72°C, 3 min

Produkty amplifikacji reakcji PCR poddawano rozdzielowi w 1,5% żelu agarozowym (Materiał i metody 3.2.21.).

3.4. Oznaczenie liczby kopii genów w metagenomowym DNA

Ilościową analizę genów integraz i warunkujących oporność na antybiotyki β -laktamowe, glikopeptydowe oraz genu 16S rRNA w DNA metagenomowym uzyskanym ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego, określano na podstawie amplifikacji genów z wykorzystywaniem metody real-time PCR (qPCR – ang. quantitative polymerase chain reaction) z zastosowaniem barwnika SYBR Green oraz emulsyjnego PCR (ddPCR – ang. droplet digital PCR) z zastosowaniem EvaGreen.

3.4.1. Klonowanie produktów PCR przy użyciu zestawu pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)

Klonowaniu zostały poddane produkty otrzymane w wyniku reakcji PCR, których włączenie do plazmidowego DNA miało posłużyć jako standard w reakcji qPCR. W trakcie reakcji klonowania wykonano następujące etapy:

- **Przeprowadzenie reakcji ligacji pGEM-T Easy Vector Systems**

W celu uzyskania wektora zawierającego insert DNA przygotowano mieszaninę do ligacji według tabeli 3, a następnie inkubowano 16 h w temperaturze pokojowej.

Tabela 3. Skład mieszaniny ligacyjnej.

Składniki reakcji	Mieszanina reakcyjna
Wektor	1 μ l
Insert DNA (rozcieńczony 10 \times)	1 - 1,5 μ l
Bufor do ligacji	5 μ l
Ligaza T4DNA	0,5 μ l
Woda	do 4,5 μ l

- **Transformacja chemicznie kompetentnych komórek *E. coli* DH5 α**

1. Przygotowano mieszaninę wg tabeli 4 i inkubowano w lodzie przez 30 minut:

Tabela 4. Skład mieszaniny do transformacji.

Składniki reakcji	Mieszanina reakcyjna	Kontrola+	Kontrola-
Komórki TOPO	10 μ l	5 μ l	5 μ l

Składniki reakcji	Mieszanka reakcyjna	Kontrola+	Kontrola-
Plazmidowe DNA (CCC)- pGEM- (5 ng/ μ l)	---	1 μ l	---
Mix ligacyjny	2 μ l	---	---

3. Przeprowadzono Heat-Shock w temperaturze 42°C przez 30 sekund. Następnie próbki inkubowano w lodzie przez 2 minuty.
4. Do próbek dodawano po 100 μ l ogrzanej do 37°C płynnej pożywki SOC bez antybiotyku i inkubowano 1 h w 37°C.
5. W tym czasie na powierzchnię podłoża LA z ampicyliną (100 μ g/ml) podawano i rozprowadzano 10 μ l IPTG (24 mg/ml) i 60 μ l X-Gal (20 mg/ml).
6. Na płytce wysiewano komórki po transformacji, kontrolę ujemną oraz dodatnią i inkubowano przez ok. 16 h w 37°C.

Białe kolonie przesiewano na podłoże stałe BHI i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji pojedyncze kolonie przesiewano na agarki amerykańskie w celu przechowania ich do dalszych analiz (Materiał i metody 3.2.14.). W celu potwierdzenia wyników klonowania przeprowadzono reakcję PCR ze starterami specyficznymi dla wklonowanych genów, a otrzymane amplikony poddawano sekwencjonowaniu.

3.4.2. Izolacja plazmidowego DNA

Do 15 ml kolb podawano 5 ml jałowej, płynnej pożywki LB oraz ampicyliny o stężeniu 100 mg/ml. Do tak przygotowanych kolb przenoszono jałowym tipsem wyselekcjonowane kolonie bakteryjne zawierające plazmid z odpowiednim insertem. Hodowlę prowadzono przez noc z wytrząsaniem 200-250 rpm w temperaturze 37°C. Następnego dnia z uzyskanej zawiesiny bakteryjnej izolowano plazmidowe DNA z wykorzystaniem zestawu do izolacji plazmidów GeneJET Plasmid Miniprep System (Thermo Scientific). Zawiesinę bakteryjną z całonocnej hodowli wirowano przez 2 minuty przy 8000 rpm (6000 \times g). Supernatant zlewano a osad bakterii zawieszano w 250 μ l roztworu do zawieszania z RNazą A. Zawiesinę przenoszono do nowych 1,5-ml probówek

polietylenowych, do których dodawano 250 µl buforu lizującego. Zawiesinę bakteryjną mieszano przez delikatne, sześciokrotne odwracanie próbówki. Następnie do mieszaniny podawano 350 µl roztworu neutralizującego, mieszano przez delikatne, sześciokrotne odwracanie i wirowano przy 14 000 rpm (18 000×g) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskany supernatant przenoszono na kolumnę wiążącą plazmid. Kolumnę wirowano przez 1 minutę przy 14 000 rpm (18 000×g), przemywano 500 µl roztworu płuczającego, ponownie wirowano 1 minutę i powtórnie przemywano 500 µl roztworu płuczającego. Po ostatnim przemyciu próby wirowano 1 minutę przy 14 000 rpm (18 000×g) po czym kolumnę przenoszono do nowej 1,5 ml próbówki polietylenowej podając na środek złoża 50 µl buforu elucyjnego. Probówkę inkubowano 45 minut w temperaturze pokojowej po czym wirowano przez 2 minuty przy 14 000 rpm (18 000×g). Uzyskany supernatant zawierał plazmid pGEM-T Easy z wklonowanym insertem. Plazmidowe DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

W celu sprawdzenia skuteczności przeprowadzonej izolacji plazmidowego DNA wykonywano rozdział elektroforetyczny otrzymanego preparatu w 0,7% żelu agarozowym. Równolegle przeprowadzano reakcję PCR, z wykorzystaniem plazmidowego DNA i starterów specyficznych dla wklonowanych genów. Analizę produktów reakcji PCR przeprowadzono za pomocą elektroforezy agarozowej (Materiał i metody 3.2.21.), a następnie produkty PCR sekwencjonowano (Materiał i metody 3.2.22.).

3.4.3. Real-time PCR

W celu oznaczenia liczby kopii genu *intI1*, *intI1KL* (gen integrazy klasy 1 występujący u szczepów klinicznych), *vanA*, *mecA*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GES}*, oraz genu 16S rRNA w metagenomowym DNA przeprowadzono reakcję qPCR (ang. quantitative polymerase chain reaction) z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, którego detekcja na podstawie poziomu fluorescencji prowadzona jest w każdym cyklu reakcji amplifikacji. Dokładne wyznaczenie liczby kopii badanego genu możliwe było dzięki sporządzeniu krzywej standardowej o znanej liczbie kopii genu badanego oraz pomiarowi fluorescencji, która wzrasta wraz z ilością amplifikowanego fragmentu DNA w fazie przyrostu wykładniczego (Mackay, 2004). Detekcja wzrostu fluorescencji odbywa się w cyklu, w którym jej sygnał przekracza wartość graniczną (Ct –

ang. threshold cycle). Reakcję qPCR przygotowano stosując trzykrotne powtórzenia prób badanych, które stanowiły trzykrotne powtórzenia biologiczne.

Do ilościowych oznaczeń liczby kopii genów metodą qPCR wybrano geny najczęściej warunkujące określone mechanizmy lekooporności występujące w genomach bakterii hodowlanych wyosobnionych ze ścieku, a równocześnie najbardziej istotne dla zdrowia publicznego.

• Przygotowanie krzywej standardowej do reakcji qPCR

Jako standardy do reakcji qPCR zastosowano plazmidowe DNA z wklonowanym fragmentem analizowanych genów. Insety uzyskano w reakcji PCR z zastosowaniem DNA bakterii wyizolowanych z próbek ścieków i starterów specyficznych dla badanego genu (Tabela 2). Klonowane insety były większe niż fragmenty oznaczanych genów w reakcji qPCR i zawierały w sobie sekwencję produktu amplifikacji reakcji qPCR. W przypadku genu *intI1* jako standard do reakcji qPCR wykorzystano liniowy fragment DNA – produkt amplifikacji uzyskany w reakcji PCR z zastosowaniem starterów specyficznych dla genu *intI1* (Tabela 2).

W celu przygotowania standardów oznaczono spektrofotometrycznie stężenie plazmidowego DNA z wklonowanym insertem produktu amplifikacji stosując Nano-100 Micro-Spectrophotometer (Allsheng), a następnie sporządzono serię rozcieńczeń od 10^2 do 10^9 liczby kopii genu/ μl . Przeliczenie stężeń DNA na liczbę kopii danego genu wykonywano z użyciem algorytmu DNA Copy Number and Dilution Calculator (Life Technologies) (<https://www.thermofisher.com/pl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>).

• Kontrola jakości reakcji qPCR

W celu zweryfikowania danych uzyskiwanych w czasie reakcji ilościowego PCR zastosowano kontrolę pozytywną, negatywną, czystości odczynników (NTC – ang. no template control), a także kontrolę wewnętrzną, którą stanowiło DNA wyizolowane z bakterii, zawierających zrekombinowany plazmid z wklonowanym fragmentem

analizowanego genu. Reakcję uznano za prawidłową, gdy liczba kopii genu była taka sama jak wartość CFU/ml bakterii z wklonowanym fragmentem badanego genu, oznaczana metodą posiewu powierzchniowego. Interpretacja wyników prowadzona była w oparciu o analizy krzywej topnienia. Specyficzność reakcji określano na podstawie wydajności reakcji (E – ang. efficiency) w przedziale od 90%-110% oraz współczynnika nachylenia krzywej standardowej (S – ang. slope), którego idealna wartość 3,32 wskazuje wydajność równą 100%. Ponadto, oceniano wartość współczynnika korelacji (R^2), który wskazuje stopień bliskości punktów wartości badanych prób z linią regresji krzywej standardowej, a jego idealna wartość to 1. Reakcję przeprowadzono w aparacie CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) i analizowano z wykorzystaniem programu CFX Manager 3.0 (Bio-Rad). Sekwencje nukleotydowe zastosowanych w reakcji qPCR starterów do oznaczenia liczby kopii badanych genów oraz 16S rRNA przedstawiono w tabeli 5. Startery dla genu *bla_{OXA-1}*, wykrywających także jego pochodne oraz dla *bla_{GES}* zaprojektowano wykorzystując program Primer3 (Rozen i Skaletsky 2000).

Liczbę kopii analizowanych genów w ml obliczano uwzględniając uzyskaną objętość DNA po izolacji, rozcieńczenie próby do reakcji qPCR oraz objętość ścieku z którego izolowano metagenomowy DNA. Liczbę kopii genów w jednostce objętości (ml) ścieku z komory napowietrzania uzyskano, przeliczając masę osadu uzyskanego po wirowaniu ścieku z komory napowietrzania (Materiał i metody 3.3.1.) na objętość próby z której była uzyskana. Częstość występowania bakterii z poszczególnymi genami obliczano w odniesieniu do liczby kopii genu 16S rRNA, zakładając, że w jednej komórce bakteryjnej występują średnio cztery kopie genu 16S rRNA (Stalder i wsp., 2014).

$$\text{Częstość występowania genu [\%]} = \frac{\text{liczba kopii genu}}{\text{liczba kopii genu 16S rRNA} / 4} \times 100\%$$

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Metagenomowy DNA	5 µl
Supermix SsoAdvanced™ (Bio-Rad)	10 µl
Starter F	(0,25 µM)
Starter R	(0,25 µM)

Jałowa woda dejonizowana do 20 μ l

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa 95°C, 3 min

40 cykli obejmujące:

- Denaturację 95°C, 15s

- Hybrydyzację (z pomiarem fluorescencji) 60°C, 20s

Analiza krzywej topnienia w zakresie od 65°C do 95°C, z pomiarem fluorescencji co 0,5°C.

3.4.4. Emulsyjny PCR

W celu przeprowadzenia ilościowej analizy rzadko występujących genów karbapenemaz i metalo- β -laktamaz o istotnym znaczeniu dla zdrowia publicznego (*bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* i *bla_{NDM}*) wykorzystano metodę ddPCR (ang. droplet digital PCR). Metoda ta oparta jest na technologii emulsyjno-kropelkowej, dzięki czemu następuje rozbitcie pojedynczej reakcji PCR na ok. 20 000 kropli zawierających pojedynczą cząsteczkę matrycy. W efekcie możliwa jest bardzo czuła i precyzyjna detekcja nawet pojedynczej cząsteczki DNA. System odczytuje poziom fluorescencji cząsteczek docelowych (dodatnich) i pozostałych (negatywnych), w oparciu o które generowana jest bezwzględna liczba cząsteczek docelowych w próbce, bez konieczności odniesienia do krzywych standardowych czy genu referencyjnego (w przeciwieństwie do real-time PCR). W celu zweryfikowania danych uzyskiwanych w czasie reakcji ddPCR zastosowano kontrolę pozytywną, negatywną i NTC.

W pierwszym etapie przygotowano mix reakcyjny z matrycowym DNA i przeprowadzono frakcjonowanie próbki na poszczególne reakcje z użyciem oleju do generowania kropli (QX200 Droplet Generator Oil for EvaGreen-BioRad) w QX200 Droplet Generator. Wygenerowaną emulsję przenoszono na 96-dółkowe płytki i zgrzewano folią w aparacie PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). Następnie przeprowadzono reakcję PCR w termocyklerze C1000 TouchTM Thermal Cycler z wysokoprofilowym blokiem 96-Deep Well Reaction Module (Bio-Rad). Odczyt bezwzględnej liczby cząstek docelowych przeprowadzono z zastosowaniem QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) i analizowano z

wykorzystaniem programu QuantaSoft (Bio-Rad). Sekwencje nukleotydowe zastosowanych w reakcji ddPCR starterów do oznaczenia liczby kopii genu *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}* i *bla_{NDM}* przedstawiono w tabeli 5. Startery dla genu *bla_{VIM}* zostały zaprojektowane przez firmę Novazym. Częstość występowania bakterii z poszczególnymi genami obliczano według wzoru (Materiał i metody 3.4.3.).

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Metagenomowy DNA	5 µl
QX200™ dd PCR™ Eva Green Supermix (Bio-Rad)	10 µl
Starter F	(0,1 µM)
Starter R	(0,1 µM)
Jałowa woda dejonizowana	do 20 µl
Olej do generowania kropli	70 µl

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa	95°C, 5 min
40 cykli obejmujące:	
- Denaturację	95°C, 30s
- Hybrydyzację	55°C, 1 min
- Elongację	72°C, 30s
Stabilizacja sygnału	4°C, 5 min
Stabilizacja sygnału	90°C, 5 min

Tabela 5. Sekwencje nukleotydowe starterów używanych w reakcjach qPCR i ddPCR, wielkość produktu i temperatura hybrydyzacji.

Gen	Sekwencja startera	Wielkość produktu	Temperatura hybrydyzacji	Piśmiennictwo
16s rRNA	16sF: 5' GTGSTGCAYGGYTGTCGTC 3'	147 pz	60°C	Maeda i wsp., 2003
	16sR: 5' ACGTCRTCCMCACCTTCCTC 3'			
intl1	intl1f: 5' CAGTGGACATAAGCCTGTTC 3'	160 pz	60°C	Dillon i wsp., 2005
	intl1r: 5' CCCGACGCATAGACTGTA 3'			

Gen	Sekwencja startera	Wielkość produktu	Temperatura hybrydyzacji	Piśmiennictwo
intI1KL	intI1F165 : 5' CGAACGAGTGGCGGAGGGTG 3'	311 pz	60°C	Gillings i wsp., 2015
	intI1R476: 5' TACCCGAGAGCTTGGCACCCA 3'			
vanA	VanA-F: 5' CTGTGAGGTCGGTTGTGCG 3'	64 pz	60°C	Volkman i wsp., 2004
	VanA-R: 5' TTTGGTCCACCTCGCCA 3'			
mecA	mecA-F: 5' GAATGCAGAAAGACCAAAGC 3'	126 pz	60°C	Kim i wsp., 2013
	mecA-R: 5' TTCTTTGGAACGATGCCTAT 3'			
bla_{CTX-M}	CTX-F: 5' ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC 3'	300 pz	60°C	Önnberg i wsp., 2011
	CTX-R: 5' ATCACKCGGRTCGCCGGRAT 3'			
bla_{SHV}	SHV-F: 5' CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTT 3'	110 pz	60°C	Xi i wsp., 2009
	SHV-R: 5' TCCTGCTGGCGATAGTGGATCTTT 3'			
bla_{TEM}	TEM-F: 5' GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG 3'	247 pz	60°C	Xi i wsp., 2009
	TEM-R: 5' CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA 3'			
bla_{OXA-1}	OXA-F: 5' TATGGCATTGATGCGGAAA 3'	137 pz	60°C	Własne
	OXA-R: 5' CTTGCGAAACCCAAACAACA 3'			
bla_{OXA-48}	OXA48F: 5' TGTTTTTGGTGGCATCGAT 3'	177 pz	60°C	Monteiro i wsp., 2012
	OXA48R: 5' GTAAMRATGCTTGGTTCGC 3'			
bla_{GES}	GES-F: 5' AGCGACAATGGGGCTACTAA 3'	131 pz	60°C	Własne
	GES-R: 5' TATCTCTGAGGTCGCCAGGT 3'			
bla_{KPC}	KPC_F: 5' CAGCTCATTCAAGGGCTTTC 3'	195 pz	55°C	Subirats i wsp., 2017
	KPC_R: 5' GGCGGCGTTACTACTGTATT 3'			
bla_{NDM}	NDM-F: 5' GATTGCGACTTATGCCAATG 3'	188 pz	55°C	Subirats i wsp., 2017
	NDM-R: 5' TCGATCCCAACGGTGATATT 3'			
bla_{VIM}	VIM-B: 5' TCCGTGATGGTGATGAGT 3'	262 pz	55°C	Novazym
	VIM-F: 5' GCTCGATGAGAGTCCTTCTA 3'			

3.5. Analiza składu populacji mikroorganizmów występujących w ściekach

Skład populacji bakteryjnych w ściekach na różnych etapach oczyszczania oznaczono z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS – ang. next-generation sequencing). Przeprowadzono sekwencjonowanie regionu zmiennego V4 genu 16S rRNA w metagenomie ścieku w technologii Ion Torrent z wykorzystaniem systemu Ion PGM (Thermo Scientific). Podczas sekwencjonowania przeprowadzono następujące etapy:

1. Przygotowanie biblioteki jednoniciowego DNA za pomocą reakcji PCR z wykorzystaniem starterów fuzyjnych dla regionu V4 genu 16S rDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Metagenomowy DNA	1 µl
Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)	5 µl
Starter V4F (A49-A64)	(0,25 µM)
Starter V4R (P165, P786, P333)	(0,25 µM)
Jałowa woda dejonizowana	do 10 µl

Warunki reakcji:

Denaturacja początkowa	95°C, 5 min
30 cykli obejmujące:	
- Denaturację	95°C, 30s
- Hybrydyzację	58°C, 30s
- Elongację	72°C, 20s
Wydłużanie końcowe	72°C, 7 min

Produkty amplifikacji reakcji PCR poddano rozdzielowi w 1,5% żelu agarozowym (Materiał i metody 3.2.21.).

W kolejnym etapie połączono produkty PCR w jedną bibliotekę DNA. Następnie, w celu wyizolowania biblioteki DNA przeprowadzono elektroforezę w 3% żelu

agarozowym. Po rozdziale elektroforetycznym produkt DNA wycinano z żelu i oczyszczano z wykorzystaniem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen), wg instrukcji podanej przez producenta zestawu. Oznaczenie dokładnej wielkości i jakości biblioteki DNA przeprowadzono przy użyciu elektroforezy kapilarnej w systemie TapeStation firmy Agilent Technologies. Następnie rozcieńczono bibliotekę do 100 pM przy pomocy Qubit dsDNA HS Assay Kit z wykorzystaniem fluorometra Qubit® 2.0 i przygotowano bibliotekę DNA do amplifikacji według poniższego schematu (Ion PGM™ Hi-Q™ Template Kit):

Biblioteka DNA	6,5 µl (100 pM)
Jałowa woda dejonizowana	do 25 µl

2. Amplifikacja biblioteki w procesie reakcji PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy w emulsji wodno-olejowej), przy użyciu zestawu Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Jałowa woda dejonizowana	25 µl
Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix	50 µl
Biblioteka DNA	25 µl
Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs	100 µl
Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix	800 µl

3. Sekwencjonowanie przez syntezę z detekcją zmiany pH w układzie scalonym, spowodowane uwalnianiem H⁺ w trakcie wbudowania nukleotydów, przeprowadzono z użyciem Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit według protokołu producenta.
4. Dane w formacie FASTQ poddano obróbce wycinania adapterów i analizowano przy pomocy programu Geneious.

3.6. Analiza statystyczna

Powiązania między ogólną liczbą bakterii hodowalnych, częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności, a także częstością występowania genów u bakterii hodowalnych, a miejscem poboru i porą roku określano testem Kruskala-Wallisa i testem *U* Manna-Whitney'a. Korelacje między ogólną liczbą bakterii, częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności i częstością występowania genów u bakterii hodowalnych, a parametrami fizykochemicznymi wody oraz między częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności i częstością występowania genów określano testem korelacji rang Spearmana.

Związek między liczbą kopii genów, a miejscem poboru i porą roku określano testem Kruskala-Wallisa i testem *U* Manna-Whitney'a. Korelacje między częstością i liczbą kopii genów, a parametrami fizykochemicznymi wody oraz między liczbą kopii i częstością poszczególnych genów określano testem korelacji rang Spearmana. Testowanie statystycznej istotności różnic pomiędzy częstościami występowania genów i typem taksonów w próbkach metagenomowego DNA a miejscem poboru przeprowadzono stosując test-t i wielowymiarową analizę wariancji MANOVA (ang. multivariate analysis of variance). W celu zbadania zróżnicowania i wpływu struktury populacji na częstość występowania poszczególnych genów przeprowadzono analizę głównych współrzędnych (PCoA – ang. principal coordinate analysis) i analizę klastrowania hierarchicznego (ang. hierarchical clustering), która przedstawia powiązania i podobieństwa pomiędzy częstością występowania poszczególnych genów i rodzajem taksonów w próbkach w postaci dendrogramów. Dodatkowo stopień zróżnicowania populacji bakteryjnych w ściekach na różnych etapach procesu oczyszczania oceniono stosując wskaźnik bioróżnorodności Shannona (ang. Shannon diversity index). Przyjęto poziom istotności statystycznej $P < 0,05$. Obliczenia przeprowadzono w programie Statistica 12 (StatSoft) i w programie R (<http://R-project.org>).

3.7. Skład podłoży mikrobiologicznych

Podłoże agarowe na wyciągu mózgowo sercowym (BHI, Oxoid):

• Hydrolizat mózgowi cielęcych	125 g
• Wyciąg z serc wołowych	50 g
• Pepton	10 g
• Dekstroza	2 g
• NaCl	5 g
• Na ₂ HPO ₄	2,5 g
• Agar (Biocorp)	15 g
• Woda dejonizowana	do 1000 ml

pH 7,4; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Podłoże chromogenne Brilliance™ E.coli/Coliform Selective Agar (Oxoid):

• Pepton	8 g
• Na ₂ HPO ₄	2,2 g
• NaCl	5 g
• KH ₂ PO ₄	1,8 g
• Siarczyn sodowo-laurylowy	0,1 g
• Mieszanka chromogenów (Rose-Gal + X-Glu)	0,35 g
• Agar	10,6 g
• Woda dejonizowana	do 1000 ml

pH $6,7 \pm 0,2$; podłoże rozpuszczano w aparacie Kocha w temperaturze 100°C .

Podłoże agarowe Baird-Parkera (ang. Baird-Parker Agar, Oxoid):

- Trypton 10 g
- Lab-Lemco Powder 5.0 5 g
- Ekstrakt drożdżowy 1 g
- Pirogronian sodu 10 g
- Glicyna 12 g
- Chlorek litu 5 g
- Agar 20 g
- Emulsja żółtka jaja z tellurem potasu 50 ml
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH $6,8 \pm 0,2$; warunki sterylizacji: 121°C , 1 atm., 15 min.

Podłoże agarowe Slanetza i Bartley (ang. Slanetz and Bartley Medium, Oxoid):

- Tryptyna 20 g
- Ekstrakt drożdżowy 5 g
- Glukoza 2 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 g
- Azydek sodu 0,4 g
- Chlorek tetrazoliowy 0,1 g
- Agar 10 g

- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH $7,2 \pm 0,2$; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Podłoże agarowe Chapmana (ang. mannitol Salt Agar, Oxoid):

- Wyciąg wołowy 3 g
- Pepton 10 g
- NaCl 75 g
- D-Mannitol 10 g
- Czerwień fenolowa (0,2%) 12,5 ml
- Agar 15 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH $7,4 \pm 0,2$; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Podłoże chromogenne Brilliance ESBL Agar (Oxoid):

- Pepton 12g
- NaCl 5g
- Bufory fosforanowe 4g
- Mieszanka chromogenów 4g
- Mieszanka antybiotyków 0,28 g
- Agar 18g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,4.

Podłoże chromogenne ChromID CARBA (bioMérieux):

- Pepton 18g
- Węglowodany 1 g
- L-tryptofan 0,9 g
- Bufor fosforanowy 1 g
- Mieszanka chromogenów 1,4 g
- Mieszanka odżywcza 2,8 g
- Mieszanka selektywna 0,3 g
- Agar 18 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,4.

Podłoże chromogenne ChromID OXA-48 (bioMérieux):

- Pepton 15 g
- Węglowodany 2 g
- Tlenek tytanu 5,1 g
- Mieszanka chromogenów 1 g
- Mieszanka antybiotyków 19 ml
- Agar 15 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,4.

Podłoże chromogenne ChromID VRE (bioMérieux):

- Kazeina i Pepton 18 g
- Pepton z serc (bydlęcych lub świńskich) 3 g
- Skrobia kukurydziana 1 g
- Chlorek sodu 6 g
- Mieszanka chromogenów 0,12 g
- Mieszanka selektywna 52,3 mg
- Agar 15 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,2.

Podłoże chromogenne ChromID MRSA (bioMérieux):

- Pepton 20,1 g
- Tris 0,65 g
- Mieszanka chromogenów 0,4 g
- Mieszanka selektywna 4,1 mg
- Agar 13 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,3.

Bulion SOC:

- Trypton 2%
- Ekstrakt drożdżowy 0,5%
- NaCl 0,05%

- KCl 2,5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM
- Glukoza 20 mM
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH = 7,0; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Bulion sterylizowano w autoklawie, a następnie dodawano roztwór glukozy sterylizowany przez sączenie przez filtr 0,22 µM (Sartorius Stedim).

Agar Luria (LA) z dodatkiem ampicyliny (Atlas i Parks, 1993):

- Wyciąg drożdżowy 5 g
- Pepton- trypton 10 g
- NaCl 5 g
- NaOH [1 M] 4 ml
- Agar 15 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH = 7,5; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Roztwór ampicyliny przygotowano w stężeniu 1 g/ml wody dejonizowanej sterylizowano przez sączenie. Następnie podawano do podłoża iaw stężeniu 100 µg/ml.

Podłoże płynne LB Broth Lennox (BioShop):

- Wyciąg drożdżowy 5 g
- Pepton- trypton 10 g
- NaCl 5 g

- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH = 7,5; warunki sterylizacji: 121°C, 1 atm., 15 min.

Podłoże agarowe Mueller-Hinton (ang. Mueller-Hinton Agar, bioMérieux):

- Ekstrakt wołowy 300 g
- Kwaśny hydrolizat kazeiny 17,5 g
- Skrobia 1,5 g
- Agar 17 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,3 ± 0,1; warunki sterylizacji: 117°C, 3/4 atm., 15 min.

Agarek Amerykański (Emapol):

- Enzymatyczny hydrolizat tkanek mięsnych 5 g
- Ekstrakt mięsny 3 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Woda dejonizowana do 1000 ml

pH 7,3 ± 0,1.

4. WYNIKI

4.1. Parametry fizykochemiczne ścieków

Wartości pH ścieków, przewodności, zawartości substancji stałych rozpuszczonych (TDS) oraz zasolenia przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Parametry fizykochemiczne ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

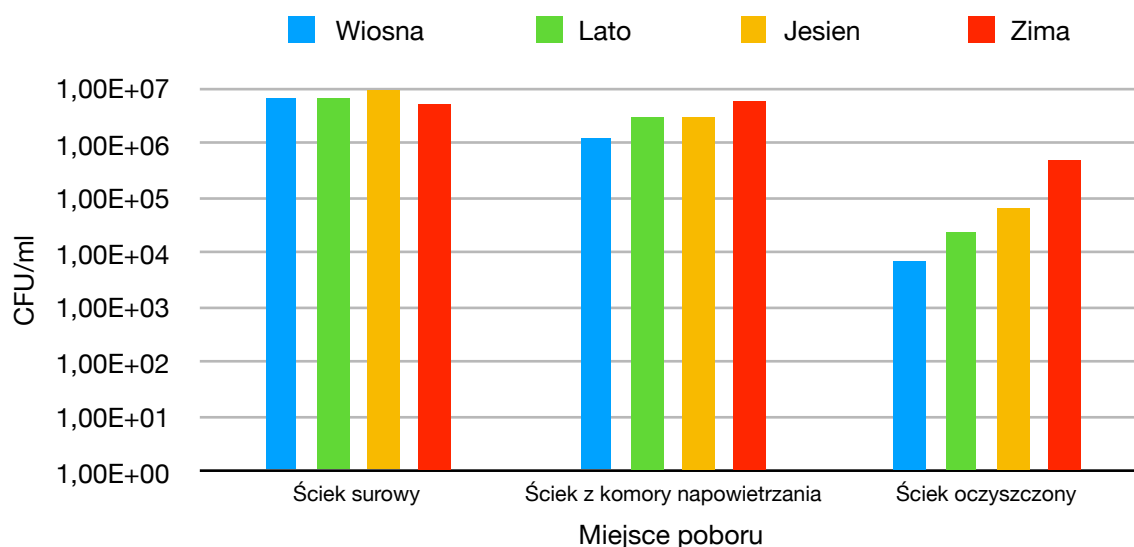
Czas poboru	Miejsce poboru	pH	Przewodność [μS/cm]	TDS [ppm]	Zasolenie [ppt]
I - marzec 2015 (zima)	Ściek surowy	7,26	1783	874	0,937
	Ściek z komory napowietrzania	7,24	1424	698	0,75
	Ściek oczyszczony	7,29	1440	706	0,759
II - maj 2015 (wiosna)	Ściek surowy	7,18	2041	1000	1,077
	Ściek z komory napowietrzania	7,18	1423	698	0,755
	Ściek oczyszczony	7,38	1414	693	0,751
III - lipiec 2015 (lato)	Ściek surowy	6,7	1735	851	0,922
	Ściek z komory napowietrzania	7,26	1488	729	0,793
	Ściek oczyszczony	7,46	1036	802	0,87
IV - listopad 2015 (jesień)	Ściek surowy	7,29	1071	525	0,572
	Ściek z komory napowietrzania	7,15	1229	603	0,651
	Ściek oczyszczony	7,3	1238	607	0,651
V - luty 2016 (zima)	Ściek surowy	7,31	1956	951	1,003
	Ściek z komory napowietrzania	7,19	1482	672	0,662
	Ściek oczyszczony	7,34	1420	703	0,694
VI - lipiec 2016 (lato)	Ściek surowy	7,21	1952	957	1,039

Czas poboru	Miejsce poboru	pH	Przewodność [μS/cm]	TDS [ppm]	Zasolenie [ppt]
	Ściek z komory napowietrzania	6,96	1402	688	0,747
	Ściek oczyszczony	7,36	1377	675	0,737
VII - listopad 2016 (jesień)	Ściek surowy	7,21	1929	946	1,015
	Ściek z komory napowietrzania	7,08	1285	630	0,681
	Ściek oczyszczony	7,25	1338	656	0,708
VIII - styczeń 2017 (zima)	Ściek surowy	7,25	1996	978	1,053
	Ściek z komory napowietrzania	7,12	1458	715	0,773
	Ściek oczyszczony	7,24	1524	747	0,801

4.2. Ogólna liczba bakterii heterotroficznych

Ogólna liczba bakterii heterotroficznych wyhodowanych ze ścieku surowego mieściła się w przedziale od $2,7 \times 10^5$ do $1,8 \times 10^7$ CFU/ml, ze ścieku z komory napowietrzania od $9,7 \times 10^4$ do $1,7 \times 10^7$ CFU/ml oraz ze ścieku oczyszczonego od $7,3 \times 10^3$ do $1,4 \times 10^6$ CFU/ml (Tabela 7). Średnio ze wszystkich poborów, najwyższą liczbę bakterii odnotowano w ścieku surowym ($6,7 \times 10^6$ CFU/ml), nieco niższą w ścieku z komory napowietrzania ($4,0 \times 10^6$ CFU/ml), natomiast najniższą w ścieku oczyszczonym ($2,1 \times 10^5$ CFU/ml). Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli 7, natomiast rycina 13 przedstawia sezonowe zmiany ogólnej liczby bakterii heterotroficznych wyizolowanych z próbek ścieków.

W trakcie procesu oczyszczania ścieków nastąpiła redukcja ogólnej liczby bakterii heterotroficznych średnio o 96,7% (Tabela 8). Największą redukcję ogólnej liczby bakterii pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym zaobserwowano wiosną (99,9%), natomiast najniższą w trzech poborach zimowych (92,8%). Procentowe wartości redukcji ogólnej liczby bakterii przedstawia tabela 8.



Rycina 13. Sezonowe zmiany ogólnej liczby bakterii heterotroficznych wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłównach.

Tabela 7. Ogólna liczba bakterii heterotroficznych, grupy coli, *E. coli*, bakterii *Enterococcus* sp. i *S. aureus* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłównach.

		Liczba bakterii (CFU/ml)				
Czas poboru		Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>S.aureus</i>
Ściek surowy	I - marzec 2015	1,21×10 ⁷	1,99×10 ⁶	7,76×10 ⁴	1,45×10 ⁴	1,60×10 ⁴
	II - maj 2015	6,67×10 ⁶	1,80×10 ⁶	7,33×10 ⁴	1,50×10 ⁴	2,70×10 ⁴
	III - lipiec 2015	8,64×10 ⁶	1,40×10 ⁶	9,91×10 ⁴	2,41×10 ⁴	1,41×10 ⁵
	IV - listopad 2015	1,76×10 ⁷	2,15×10 ⁶	2,45×10 ⁵	3,15×10 ⁴	3,67×10 ⁴
	V - luty 2016	3,90×10 ⁶	8,27×10 ⁵	3,50×10 ⁴	1,28×10 ⁴	1,60×10 ⁵
	VI - lipiec 2016	4,25×10 ⁶	1,08×10 ⁶	1,15×10 ⁵	6,15×10 ³	1,00×10 ⁴
	VII - listopad 2016	2,73×10 ⁵	1,97×10 ⁵	5,50×10 ³	5,90×10 ³	2,65×10 ⁴
	VIII - styczeń 2017	2,65×10 ⁵	8,50×10 ⁴	1,85×10 ⁴	1,82×10 ⁴	2,43×10 ⁴

		Liczba bakterii (CFU/ml)				
	Czas poboru	Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>S.aureus</i>
	Średnia ±SD	6,72×10⁶ ±5,96×10⁶	1,19×10⁶ ±7,85×10⁵	8,36×10⁴ ±7,57×10⁴	1,60×10⁴ ±8,64×10³	5,52×10⁴ ±5,96×10⁴
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	1,65×10 ⁷	2,65×10 ⁵	4,41×10 ³	1,20×10 ⁴	7,33×10 ³
	II - maj 2015	1,23×10 ⁶	1,35×10 ⁴	1,26×10 ³	7,25×10 ³	8,05×10 ³
	III - lipiec 2015	1,85×10 ⁶	1,39×10 ⁵	5,71×10 ³	1,05×10 ⁴	3,54×10 ⁴
	IV - listopad 2015	6,15×10 ⁶	4,42×10 ⁵	6,00×10 ³	6,45×10 ³	1,10×10 ⁴
	V - luty 2016	1,30×10 ⁶	1,65×10 ⁵	2,50×10 ³	1,83×10 ⁴	2,73×10 ³
	VI - lipiec 2016	4,45×10 ⁶	1,36×10 ⁶	7,90×10 ⁵	2,49×10 ³	8,00×10 ³
	VII - listopad 2016	9,68×10 ⁴	5,80×10 ⁴	8,00×10 ²	1,04×10 ³	2,50×10 ¹
	VIII - styczeń 2017	1,77×10 ⁵	5,95×10 ⁴	9,05×10 ³	NO*	2,30×10 ³
	Średnia ±SD	3,97×10⁶ ±5,48×10⁶	3,13×10⁵ ±4,45×10⁵	1,02×10⁵ ±2,78×10⁵	8,30×10³ ±5,92×10³	9,35×10³ ±1,11×10⁴
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	1,35×10 ⁶	4,29×10 ³	2,55×10 ²	1,40×10 ²	3,65×10 ³
	II - maj 2015	1,35×10 ⁶	3,02×10 ³	1,85×10 ²	1,25×10 ²	6,50×10 ¹
	III - lipiec 2015	4,15×10 ⁴	3,91×10 ³	3,60×10 ²	2,20×10 ²	2,90×10 ²
	IV - listopad 2015	1,19×10 ⁵	4,21×10 ³	3,05×10 ²	1,80×10 ²	1,20×10 ²
	V - luty 2016	1,08×10 ⁵	8,95×10 ³	4,15×10 ²	4,45×10 ²	1,60×10 ¹
	VI - lipiec 2016	7,27×10 ³	5,74×10 ³	3,50×10 ²	2,50×10 ¹	1,00×10 ¹
	VII - listopad 2016	8,35×10 ³	4,50×10 ³	0	4,90×10 ¹	1,15×10 ¹
	VIII - styczeń 2017	2,04×10 ⁴	7,25×10 ³	2,00×10 ²	8,90×10 ¹	1,15×10 ¹
	Średnia ±SD	2,08×10⁵ ±4,65×10⁵	5,23×10³ ±1,97×10³	2,59×10² ±1,31×10²	1,59×10² ±1,32×10²	5,22×10² ±1,27×10³

*NO – nie oznaczono.

Tabela 8. Redukcja ogólnej liczby bakterii heterotroficznych, grupy coli, *E. coli*, bakterii *Enterococcus* sp. i *S. aureus* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Czas poboru	Redukcja ogólnej liczby bakterii [%]				
	Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>S.aureus</i>
I - marzec 2015	88,80	99,80	99,70	99,00	77,20
II - maj 2015	99,90	99,80	99,70	99,20	99,80
III - lipiec 2015	99,50	99,70	99,60	99,10	99,80
IV - listopad 2015	99,30	99,80	99,90	99,40	99,70
V - luty 2016	97,20	98,90	98,80	96,50	99,90
VI - lipiec 2016	99,80	99,50	99,70	99,60	99,90
VII - listopad 2016	96,90	97,70	NO*	99,20	99,90
VIII - styczeń 2017	92,30	91,50	98,90	99,50	99,90
Średnia	96,71	98,34	99,47	98,94	97,01

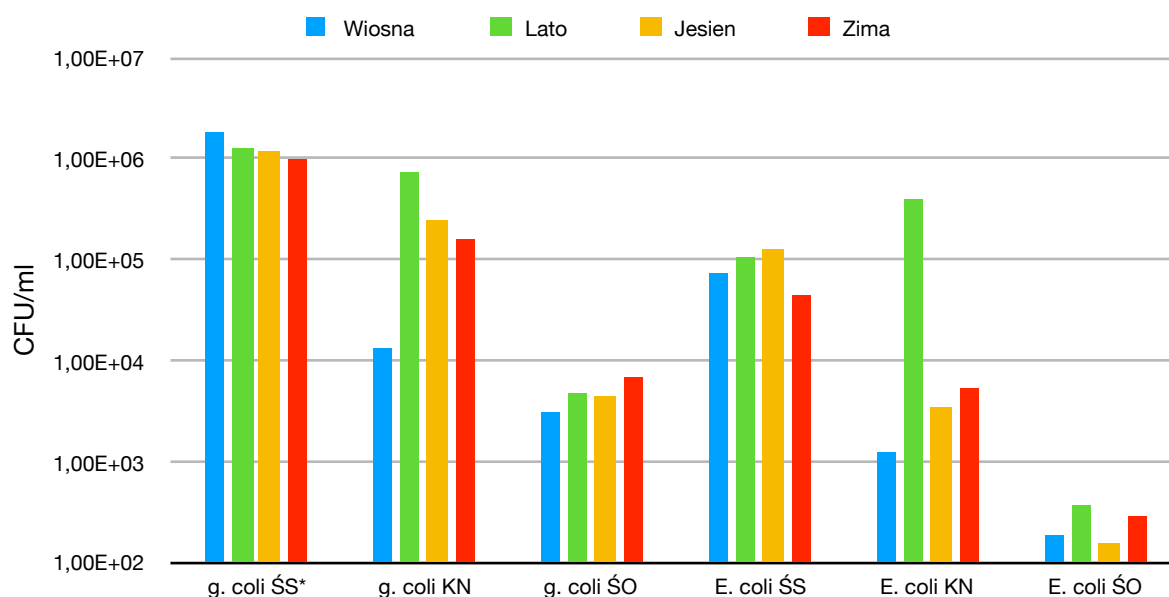
*NO – nie oznaczono.

4.3. Liczba bakterii grupy coli

Liczba bakterii grupy coli oraz *E. coli*, wyhodowanych na podłożu chromogennym Brilliance™ E.coli/Coliform Selective Agar, mieściła się w przedziałach odpowiednio: od $3,0 \times 10^3$ w ścieku oczyszczonym do $2,2 \times 10^6$ CFU/ml w ścieku surowym oraz od 0,0 w ścieku oczyszczonym do $7,9 \times 10^5$ CFU/ml w ścieku z komory napowietrzania (Tabela 7). Najwyższą średnią liczbę bakterii grupy coli odnotowano w ścieku surowym ($1,2 \times 10^6$ CFU/ml), z kolei najniższą średnią w ścieku oczyszczonym ($5,2 \times 10^3$ CFU/ml). Najwyższą średnią liczbę bakterii *E. coli* odnotowano w ścieku z komory napowietrzania ($1,0 \times 10^5$ CFU/ml), natomiast najniższą w ścieku oczyszczonym ($2,6 \times 10^2$ CFU/ml) (Rycina 14).

W trakcie procesu oczyszczania ścieków nastąpiła redukcja liczby bakterii grupy coli i *E. coli* średnio o 98,3% i 99,5%. Najwyższą redukcję liczby bakterii grupy coli pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym zaobserwowano wiosną (99,8%), natomiast

E. coli jesienią (99,9%). Najniższą średnią redukcję bakterii grupy coli i *E. coli* odnotowano zimą (odpowiednio 96,7% i 99,1%) (Tabela 8).



*g. coli ŚS – bakterie grupy coli w ścieku surowym,
g. coli KN – bakterie grupy coli w ścieku z komory napowietrzania,
g. coli ŚO – bakterie grupy coli w ścieku oczyszczonym,
E. coli ŚS – bakterie *E.coli* w ścieku surowym,
E. coli KN – bakterie *E.coli* w ścieku z komory napowietrzania,
E. coli ŚO – bakterie *E.coli* w ścieku oczyszczonym.

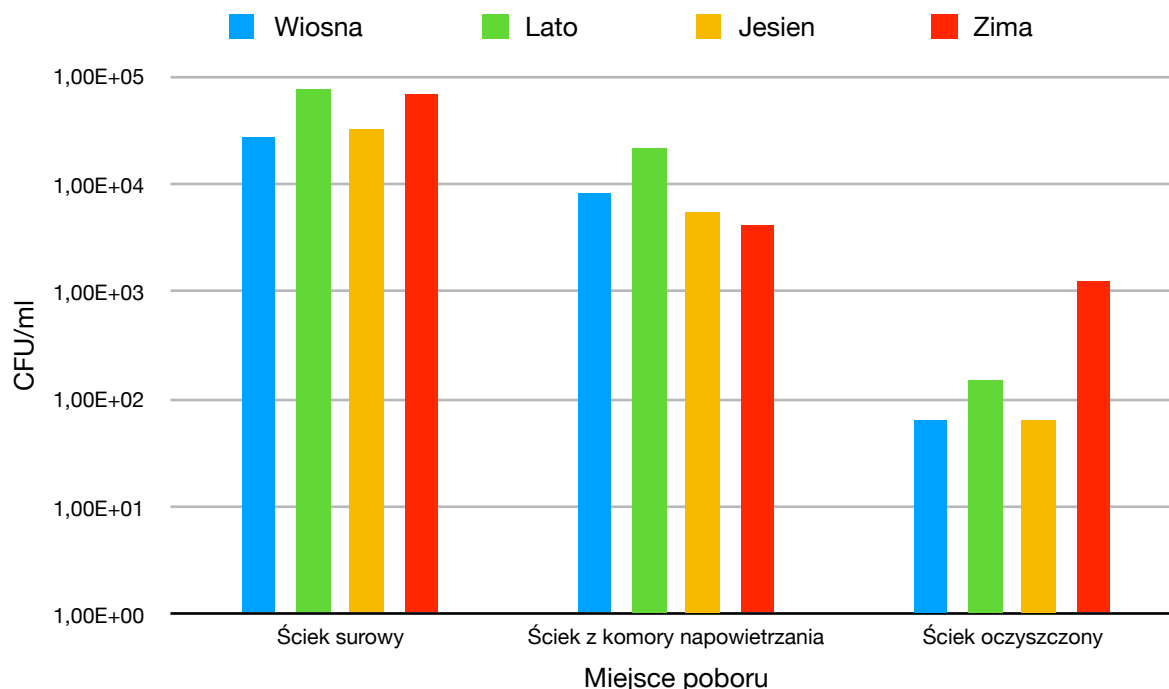
Rycina 14. Sezonowe zmiany liczby bakterii grupy coli i *E. coli* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.4. Liczba bakterii *S. aureus*

Liczba bakterii *S. aureus*, wyhodowanych na podłożu Baird-Parkera mieściła się w przedziale od $1,0 \times 10^1$ CFU/ml w ścieku oczyszczonym do $1,6 \times 10^5$ CFU/ml w ścieku surowym (Tabela 7). Średnio najwyższą liczbę bakterii odnotowano w ścieku surowym ($5,5 \times 10^4$ CFU/ml), natomiast najniższą średnią w ścieku oczyszczonym ($5,2 \times 10^2$ CFU/ml) (Rycina 15).

W procesie oczyszczania ścieków liczba bakterii *S. aureus* we wszystkich poborach została zredukowana średnio o 97,0% (Tabela 8). Najwyższą redukcję liczby bakterii *S.*

aureus pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym zaobserwowano latem (99,9%), natomiast najniższą zimą (92,3%) (Tabela 8).

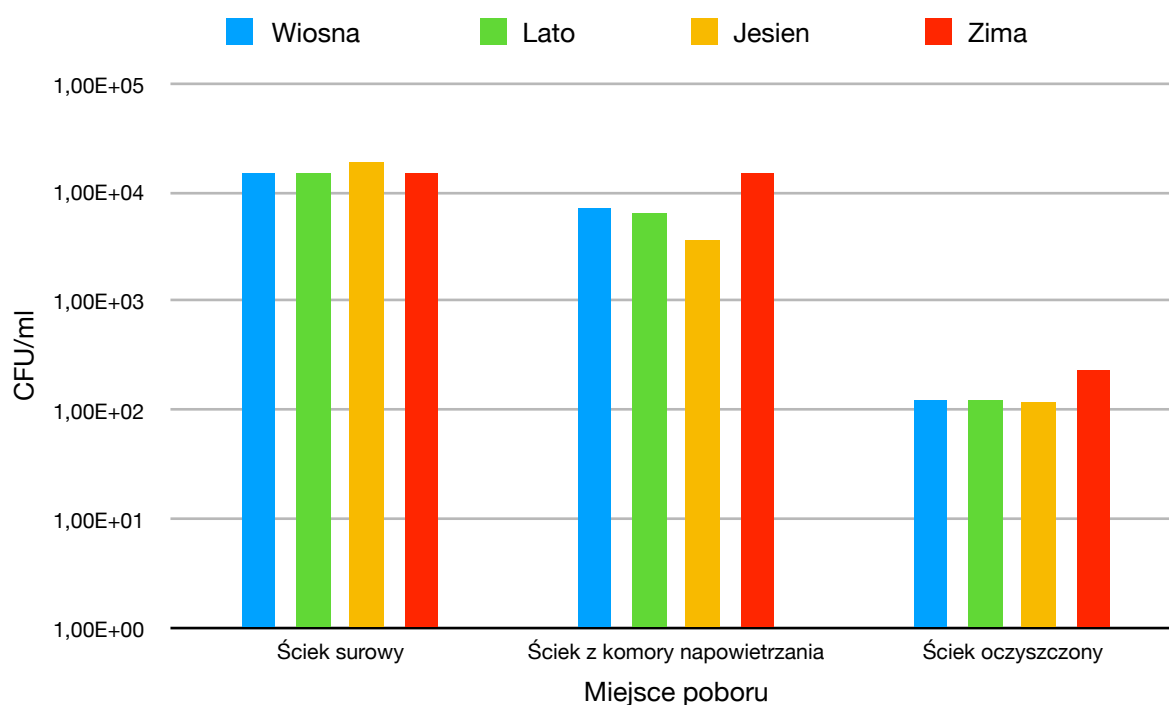


Rycina 15. Sezonowe zmiany liczby bakterii *S. aureus* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.5. Liczba bakterii z rodzaju *Enterococcus*

Liczba bakterii *Enterococcus* sp. wyhodowanych na podłożu Slanetza i Bartley mieściła się w przedziale od $2,5 \times 10^1$ CFU/ml w ścieku oczyszczonym do $3,2 \times 10^4$ CFU/ml w ścieku surowym (Tabela 7). Średnio najwyższą liczbę bakterii odnotowano w ścieku surowym ($1,6 \times 10^4$ CFU/ml), natomiast najniższą średnią w ścieku oczyszczonym ($1,6 \times 10^2$ CFU/ml) (Rycina 16).

W trakcie procesu oczyszczania ścieków nastąpiła redukcja ogólnej liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. we wszystkich poborach średnio o 98,9% (Tabela 8). Najwyższą redukcję ogólnej liczby bakterii *Enterococcus* sp. pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym zaobserwowano latem (99,4%), natomiast najniższą zimą (98,3%) (Tabela 8).



Rycina 16. Sezonowe zmiany liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.6. Liczba metycyloopornych szczepów *S. aureus* (MRSA)

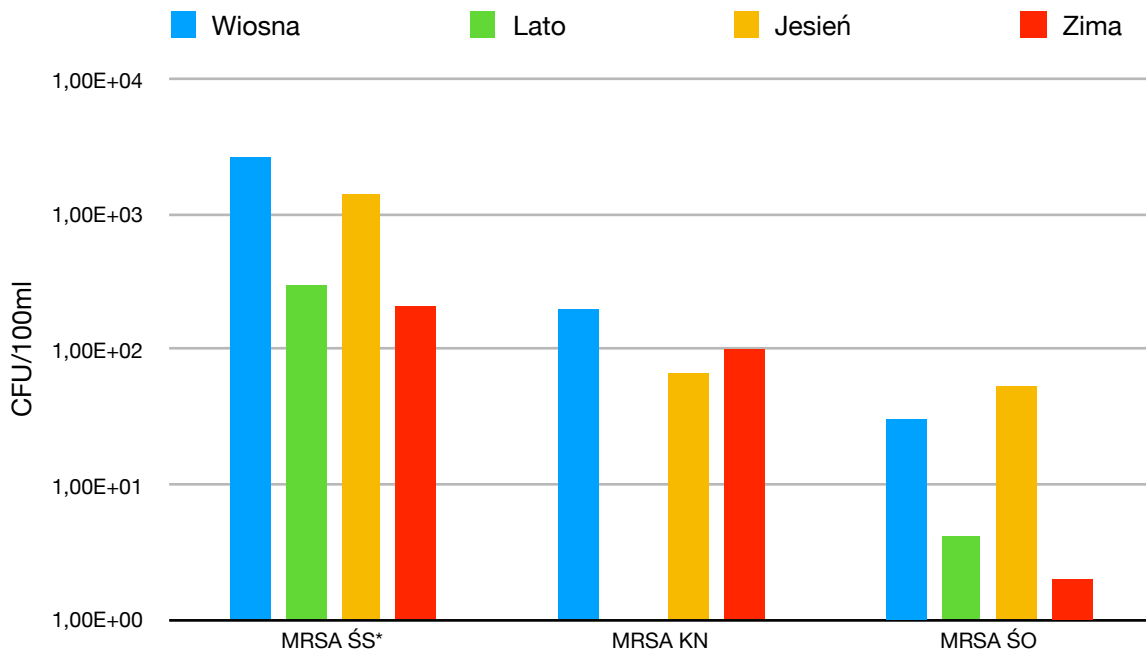
Metycylooporne szczepy *S. aureus* wyizolowano w pięciu poborach: II, V, VI, VII i VIII. Liczba bakterii MRSA mieściła się w przedziale: od 4,0 CFU/100ml w ścieku oczyszczonym do $2,6 \times 10^3$ CFU/100ml w ścieku surowym (Tabela 9). Najwyższą średnią liczbę bakterii MRSA odnotowano w ścieku surowym ($1,2 \times 10^3$ CFU/100ml), z kolei najniższą średnią w ścieku oczyszczonym ($1,8 \times 10^1$ CFU/100ml) (Rycina 17).

Częstość występowania szczepów MRSA obliczono na podstawie stosunku liczby bakterii opornych na metycylinę do liczby bakterii *S. aureus*. Najwyższą średnią częstość występowania MRSA we wszystkich poborach, stwierdzono w ścieku oczyszczonym (1,2%), niższą w ścieku z komory napowietrzania (0,6%), a najniższą w ścieku surowym (0,04%) (Tabela 9).

Tabela 9. Liczba bakterii MRSA i częstość występowania szczepów MRSA wśród *S. aureus* wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii MRSA [CFU/100ml]	Częstość występowania MRSA wśród <i>S. aureus</i> [%]
Ściek surowy	I - marzec 2015	NO*	NO
	II - maj 2015	$2,60 \times 10^3$	0,09630
	V - luty 2016	$1,20 \times 10^3$	0,00750
	VI - lipiec 2016	$3,00 \times 10^2$	0,03000
	VII - listopad 2016	$1,40 \times 10^3$	0,05288
	VIII - styczeń 2017	$4,00 \times 10^2$	0,01646
	Średnia ±SD	$1,18 \times 10^3$ ±$9,28 \times 10^2$	0,04063 ±0,03551
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	NO	NO
	II - maj 2015	$2,00 \times 10^2$	0,02485
	V - luty 2016	0	0
	VI - lipiec 2016	0	0
	VII - listopad 2016	$6,75 \times 10^1$	2,70000
	VIII - styczeń 2017	$2,00 \times 10^2$	0,08696
	Średnia ±SD	$9,35 \times 10^1$ ±$1,01 \times 10^2$	0,56236 ±1,19550
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	NO	NO
	II - maj 2015	$3,00 \times 10^1$	0,46154
	V - luty 2016	0	0
	VI - lipiec 2016	$0,42 \times 10^1$	0,41700
	VII - listopad 2016	$5,25 \times 10^1$	4,56522
	VIII - styczeń 2017	$0,40 \times 10^1$	0,34783
	Średnia ±SD	$1,81 \times 10^1$ ±$2,26 \times 10^1$	1,15832 ±1,91315

*NO – nie oznaczono.



*MRSA ŚS – bakterie MRSA w ścieku surowym,

MRSA KN – bakterie MRSA w ścieku z komory napowietrzania,

MRSA ŚÓ – bakterie MRSA w ścieku oczyszczonym.

Rycina 17. Sezonowe zmiany liczby bakterii MRSA wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.7. Liczba wankomycynoopornych szczepów bakterii *Enterococcus* sp. (VRE)

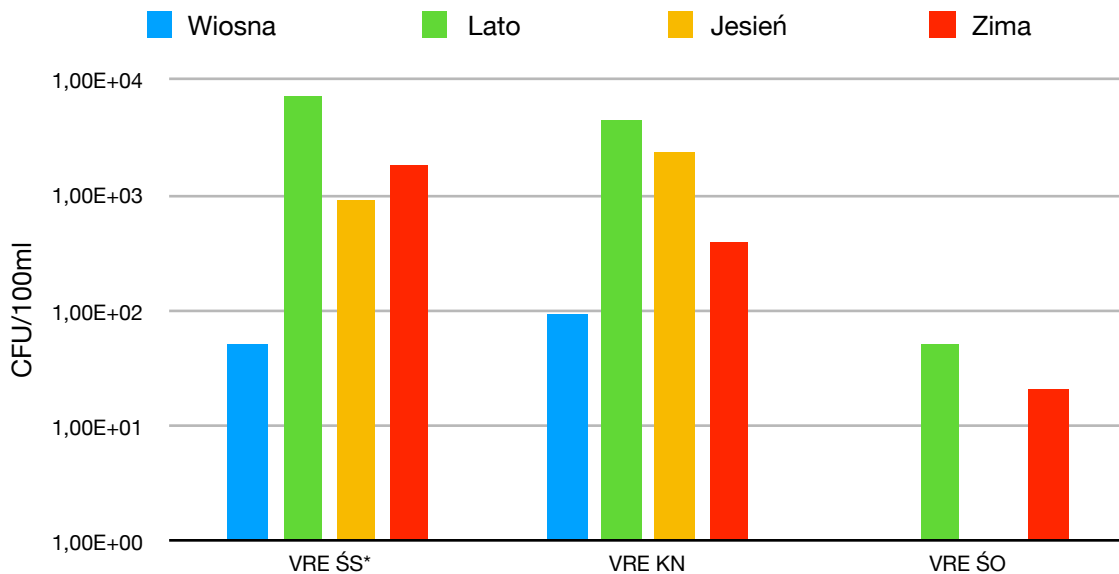
Bakterie z rodzaju *Enterococcus* odporne na wankomycynę wyizolowano w sześciu poborach: I, II, V, VI, VII i VIII. Liczba szczepów VRE, mieściła się w przedziale: od $2,0 \times 10^1$ CFU/100ml w ścieku oczyszczonym do $1,4 \times 10^4$ CFU/100ml w ścieku z komory napowietrzania (Tabela 10). Najwyższą średnią liczbę bakterii VRE odnotowano w ścieku surowym i ścieku z komory napowietrzania ($3,6 \times 10^3$ CFU/100ml), z kolei najniższą w ścieku oczyszczonym ($6,0 \times 10^1$ CFU/100ml) (Rycina 18).

Częstość występowania szczepów VRE obliczono na podstawie stosunku liczby izolatów opornych na wankomycynę do liczby bakterii *Enterococcus* sp. Najwyższą średnią częstość występowania szczepów VRE odnotowano w ścieku z komory napowietrzania (1,0%) (Tabela 10). Zaobserwowano wyższą częstość w ścieku oczyszczonym (0,6%) w stosunku do częstości w ścieku surowym (0,4%).

Tabela 10. Liczba bakterii VRE i częstość występowania szczepów VRE wśród izolatów *Enterococcus* sp. wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii VRE [CFU/100ml]	Częstość występowania VRE wśród <i>Enterococcus</i> sp. [%]
Ściek surowy	I - marzec 2015	0	0
	II - maj 2015	$5,00 \times 10^1$	0,00332
	V - luty 2016	$8,10 \times 10^3$	0,63192
	VI - lipiec 2016	$7,25 \times 10^3$	1,17886
	VII - listopad 2016	$9,00 \times 10^2$	0,15254
	VIII - styczeń 2017	$5,20 \times 10^3$	0,28571
	Średnia ±SD	$3,58 \times 10^3$ ±$3,71 \times 10^3$	0,37539 ±0,45791
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	0	0
	II - maj 2015	$9,00 \times 10^1$	0,01241
	V - luty 2016	$1,35 \times 10^4$	0,73698
	VI - lipiec 2016	$4,50 \times 10^3$	1,80723
	VII - listopad 2016	$2,40 \times 10^3$	2,30769
	VIII - styczeń 2017	$1,00 \times 10^3$	NO*
	Średnia ±SD	$3,58 \times 10^3$ ±$5,14 \times 10^3$	0,97286 ±1,04911
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	$2,00 \times 10^1$	0,14286
	II - maj 2015	0	0
	V - luty 2016	$2,30 \times 10^2$	0,51685
	VI - lipiec 2016	$5,00 \times 10^1$	2,00000
	VII - listopad 2016	0	0
	VIII - styczeń 2017	$6,00 \times 10^1$	0,67416
	Średnia ±SD	$6,00 \times 10^1$ ±$8,69 \times 10^1$	0,55564 ±0,76021

*NO – nie oznaczono.



*VRE ŚS – bakterie VRE w ścieku surowym,
 VRE KN – bakterie VRE w ścieku z komory napowietrzania,
 VRE ŚÓ – bakterie VRE w ścieku oczyszczonym.

Rycina 18. Sezonowe zmiany liczby bakterii VRE wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.8. Liczba bakterii grupy coli wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL)

W celu oznaczenia bakterii grupy coli wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym zastosowano podłoże chromogenne Brilliance ESBL Agar. Bakterie izolowano w sześciu poborach (od marca 2015 do lipca 2016 roku).

Liczba bakterii wytwarzających ESBL wynosiła: od 0,3 CFU/ml w ścieku oczyszczonym do $4,3 \times 10^3$ CFU/ml w ścieku surowym (Tabela 11). Najwyższą średnią liczbę bakterii wytwarzających ESBL odnotowano w ścieku surowym ($2,4 \times 10^3$ CFU/ml), z kolei najniższą w ścieku oczyszczonym ($1,6 \times 10^1$ CFU/ml) (Rycina 19). Szczepy bakterii wytwarzających β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym należały do grupy coli (KESC i *E. coli*).

Częstość występowania szczepów wytwarzających ESBL obliczono na podstawie stosunku liczby bakterii wytwarzających ESBL do liczby bakterii grupy coli. Największą częstość odnotowano w ścieku z komory napowietrzania (0,5%) (Tabela 11).

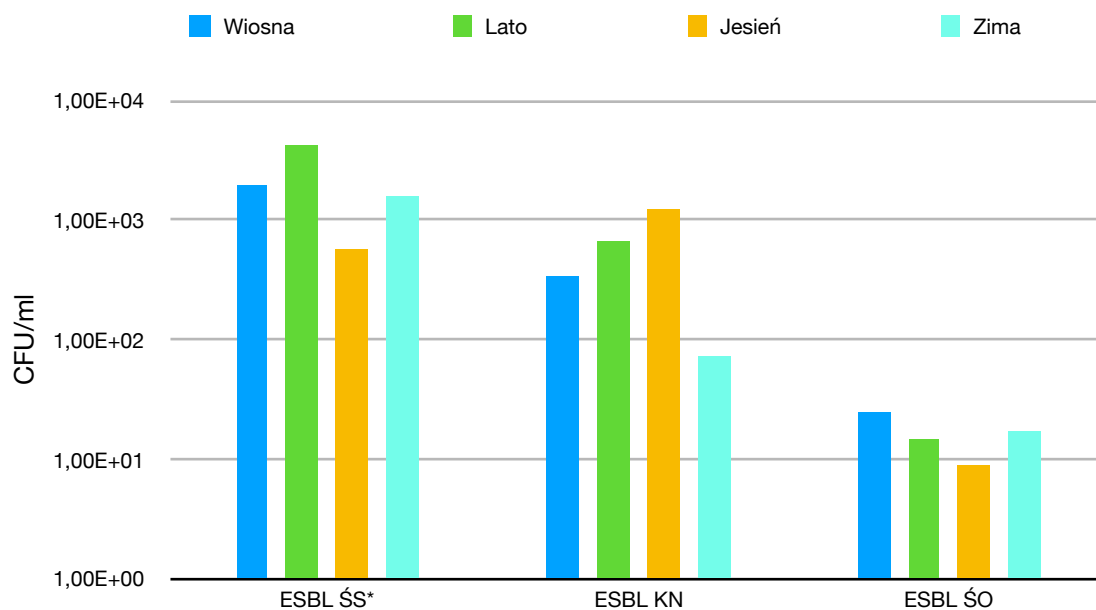
Zaobserwowano wzrost częstości występowania szczepów wytwarzających ESBL w ścieku oczyszczonym (0,4%) w stosunku do ścieku surowego (0,2%) (Tabela 11).

Wyizolowano łącznie 492 szczepy wytwarzające ESBL: 263 ze ścieku surowego, 93 ze ścieku z komory napowietrzania, natomiast ze ścieku oczyszczonego – 136.

Tabela 11. Liczba bakterii wytwarzających ESBL i częstość ich występowania wśród bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii wytwarzających ESBL [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii wytwarzających ESBL wśród bakterii grupy coli [%]
Ściek surowy	I - marzec 2015	1,90×10 ³	0,09543
	II - maj 2015	1,90×10 ³	0,10582
	III - lipiec 2015	4,32×10 ³	0,30850
	IV - listopad 2015	5,60×10 ²	0,02610
	V - luty 2016	1,30×10 ³	0,15714
	VI - lipiec 2016	4,10×10 ³	0,38059
	Średnia ±SD	2,35×10³ ±1,53×10³	0,17893 ±0,13682
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	2,20×10 ¹	0,00830
	II - maj 2015	3,40×10 ²	2,51015
	III - lipiec 2015	2,30×10 ²	0,16606
	IV - listopad 2015	1,20×10 ³	0,27180
	V - luty 2016	1,20×10 ²	0,07253
	VI - lipiec 2016	1,10×10 ³	0,08088
	Średnia ±SD	5,02×10² ±5,14×10²	0,51829 ±0,98005
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	3,30×10 ¹	0,76923
	II - maj 2015	2,40×10 ¹	0,79404
	III - lipiec 2015	0,79×10 ¹	0,20230
	IV - listopad 2015	0,88×10 ¹	0,20927
	V - luty 2016	0,03×10 ¹	0,00335

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii wytwarzających ESBL [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii wytwarzających ESBL wśród bakterii grupy coli [%]
	VI - lipiec 2016	$2,10 \times 10^1$	0,36617
	Średnia \pmSD	$1,58 \times 10^1$ $\pm 1,22 \times 10^1$	0,39073 $\pm 0,32404$



*ESBL ŚS – bakterie wytwarzające ESBL w ścieku surowym,
ESBL KN – bakterie wytwarzające ESBL w ścieku z komory napowietrzania,
ESBL ŚO – bakterie wytwarzające ESBL w ścieku oczyszczonym.

Rycina 19. Sezonowe zmiany liczby bakterii grupy coli wytwarzających ESBL wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.9. Liczba bakterii grupy coli opornych na karbapenemy (CPE i CPE typu OXA-48)

W celu oznaczenia bakterii grupy coli opornych na antybiotyki karbapenemowe (CPE i CPE typu OXA-48) użyto podłoży chromogennych: chromID CARBA i chromID OXA-48. Bakterie izolowano podczas sześciu poborów od marca 2015 do lipca 2016 roku.

Liczba karbapenemoopornych bakterii grupy coli, wahała się odpowiednio: od 2,0 CFU/ml w ścieku oczyszczonym do $2,2 \times 10^4$ CFU/ml w ścieku z komory napowietrzania (Tabela 12). Spośród wszystkich poborów, najwyższą średnią liczbę bakterii karbapenemoopornych odnotowano w ścieku surowym ($5,3 \times 10^3$ CFU/ml), z kolei najniższą średnią w ścieku oczyszczonym ($1,5 \times 10^1$ CFU/ml) (Rycina 20).

Liczba bakterii karbapenemoopornych bakterii grupy coli typu OXA-48, mieściła się w przedziałach odpowiednio: od 0,6 CFU/100ml w ścieku oczyszczonym do $4,0 \times 10^3$ CFU/100ml w ścieku surowym (Tabela 12). Najwyższą średnią liczbę bakterii CPE typu OXA-48 odnotowano w ścieku surowym ($1,4 \times 10^3$ CFU/100ml), z kolei najniższą średnią w ścieku oczyszczonym (3,5 CFU/100ml) (Rycina 20).

Częstość występowania szczepów opornych na karbapenemy obliczono na podstawie stosunku liczby bakterii opornych do liczby bakterii grupy coli. Średnia częstość występowania bakterii CPE, była najwyższa w ścieku z komory napowietrzania (1,0%), następnie w ścieku oczyszczonym (0,4%) i najniższa w ścieku surowym (0,3%) (Tabela 12). W przypadku szczepów karbapenemoopornych typu OXA-48 częstości średnie w poszczególnych poborach były niższe, jednakże zaobserwowano nieco wyższą częstość w ścieku oczyszczonym (0,001%) niż w ścieku surowym (0,0009%) i ścieku z komory napowietrzania (0,00003%) (Tabela 12).

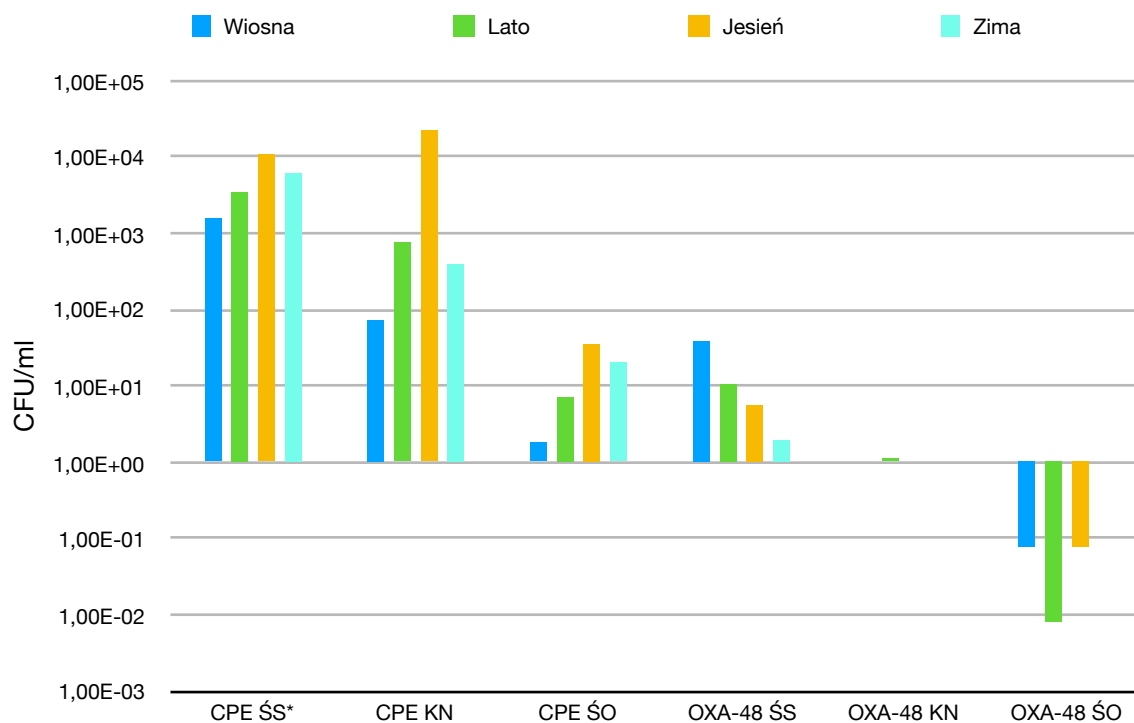
Tabela 12. Liczba bakterii grupy coli opornych na karbapenemy i częstość ich występowania wśród bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii CPE* [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii CPE wśród bakterii grupy coli [%]	Liczba bakterii CPE typu OXA-48 [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii CPE typu OXA-48 wśród bakterii grupy coli [%]
Ściek surowy	I - marzec 2015	$1,12 \times 10^4$	0,56376	$0,20 \times 10^1$	0,00010
	II - maj 2015	$1,60 \times 10^3$	0,08911	$4,00 \times 10^1$	0,00223
	III - lipiec 2015	$5,50 \times 10^3$	0,39286	$1,10 \times 10^1$	0,00079

Miejsce poboru	Czas poboru	Liczba bakterii CPE* [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii CPE wśród bakterii grupy coli [%]	Liczba bakterii CPE typu OXA-48 [CFU/ml]	Częstość występowania bakterii CPE typu OXA-48 wśród bakterii grupy coli [%]
Ściek surowy	IV - listopad 2015	1,11×10 ⁴	0,51877	0,54×10 ¹	0,00025
	V - luty 2016	9,00×10 ²	0,10879	NO*	NO
	VI - lipiec 2016	1,51×10 ³	0,13970	0,98×10 ¹	0,00091
	Średnia ±SD	5,31×10³ ±4,83×10³	0,30217 ±0,21576	1,36×10¹ ±1,52×10¹	0,00086 ±0,00084
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	7,50×10 ²	0,28302	0	0
	II - maj 2015	7,40×10 ¹	0,54633	0	0
	III - lipiec 2015	0	0	0	0
	IV - listopad 2015	2,20×10 ⁴	4,98301	0	0
	V - luty 2016	2,90×10 ¹	0,01753	NO	NO
	VI - lipiec 2016	1,58×10 ³	0,11581	0,22×10 ¹	0,00016
	Średnia ±SD	4,07×10³ ±8,80×10³	0,99095 ±1,96626	4,40×10⁻¹ ±9,84×10⁻¹	0,00003 ±0,00007
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	4,00×10 ¹	0,93240	0	0
	II - maj 2015	0,19×10 ¹	0,06130	8,0×10 ⁻²	0,00265
	III - lipiec 2015	0,50×10 ¹	0,12804	1,0×10 ⁻²	0,00026
	IV - listopad 2015	3,60×10 ¹	0,85612	8,0×10 ⁻²	0,00190
	V - luty 2016	0,50×10 ¹	0,00559	NO	NO
	VI - lipiec 2016	0,90×10 ¹	0,15693	6,0×10 ⁻³	0,00010
	Średnia ±SD	1,54×10¹ ±1,71×10¹	0,35673 ±0,42016	3,52×10⁻² ±4,11×10⁻²	0,00098 ±0,00121

*CPE – bakterie odporne na karbapenemy,

*NO – nie oznaczono.



*CPE ŚS – bakterie CPE w ścieku surowego,

CPE KN – bakterie CPE w ścieku z komory napowietrzania,

CPE ŚO – bakterie CPE w ścieku oczyszczonym,

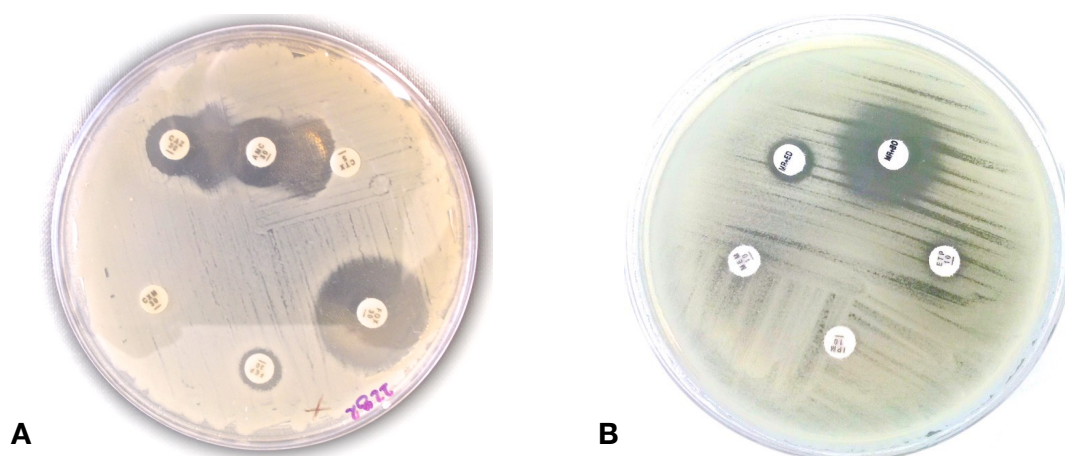
OXA-48 ŚS – bakterie CPE typu OXA-48 w ścieku surowym,

OXA-48 KN – bakterie CPE typu OXA-48 w ścieku z komory napowietrzania,

OXA-48 ŚO – bakterie CPE typu OXA-48 w ścieku oczyszczonym.

Rycina 20. Sezonowe zmiany liczby bakterii grupy coli opornych na karbapenemy wyhodowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowych.

4.10. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki



Rycina 21. A- Oznaczenie wytwarzania ESBL metodą dwóch krążków. Szczep nr 101 wyizolowany ze ścieku oczyszczonego w trakcie poboru VI. **B-** Określenie oporności na karbapenemy. Szczep *K. pneumoniae* nr 38 wyizolowany ze ścieku oczyszczonego w poborze V.

Spośród szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego 53 (20,2%) izolaty wykazywały oporność również na karbapenemy. Stwierdzono najwyższą częstość oporności na meropenem (13,4%), niższą na ertapenem (11,8%), a najniższą zaobserwowano w przypadku imipenemu (3,3%). Ze ścieku z komory napowietrzania, 15 (16,1%) szczepów wytwarzających ESBL, opornych było na karbapenemy. Najwyższą średnią częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe stwierdzono w przypadku meropenemu (20,2%), niższą na ertapenem (7,4%), a najniższą na imipenem (5,2%). Natomiast w przypadku izolatów wytwarzających ESBL ze ścieku oczyszczonego, 26 (19,1%) było opornych na karbapenemy. Zaobserwowano wyższą częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe niż w ścieku z komory napowietrzania. Najwyższą średnią częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe stwierdzono w przypadku ertapenemu (13,9%), następnie na imipenem (7,3%) i meropenem (3,1%). Spośród wszystkich szczepów wytwarzających ESBL, zaobserwowano wzrost oporności na ertapenem i imipenem w ścieku oczyszczonym w stosunku do ścieku surowego i ścieku z komory

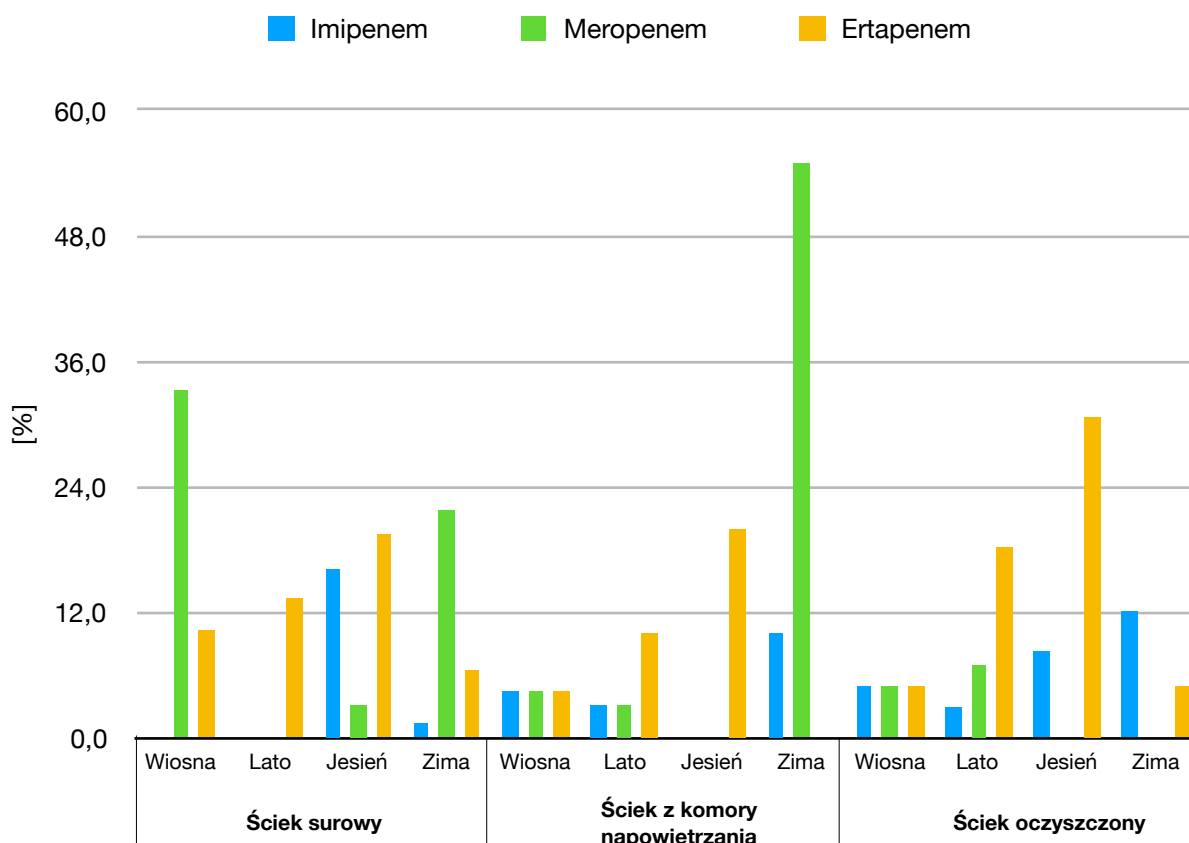
napowietrzania. Najwyższy odsetek szczepów opornych na wszystkie trzy antybiotyki karbapenemowe (imipenem, meropenem i ertapenem) zaobserwowano w ścieku oczyszczonym (69,3%), niższy w ścieku surowym (55,0%), natomiast najniższy w ścieku z komory napowietrzania (51,1%).

Odnotowano istotny statystycznie wzrost średniej oporności bakterii wytwarzających ESBL na ertapenem ($p=0,049$) pomiędzy wiosną a latem i latem a jesienią, oraz spadek oporności ($p=0,049$) pomiędzy latem a zimą oraz jesienią a zimą (Rycina 22). Szczegółowe wyniki oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów wytwarzających ESBL przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]		
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem
I - marzec 2015	Ściek surowy	36	2,8	0	2,8
	Ściek z komory napowietrzania	10	20,0	10,0	0
	Ściek oczyszczony	14	14,3	0	0
Średnia		20	12,4	3,3	0,9
II - maj 2015	Ściek surowy	48	0	33,3	10,4
	Ściek z komory napowietrzania	23	4,3	4,3	4,3
	Ściek oczyszczony	20	5,0	5,0	5,0
Średnia		30	3,1	14,2	6,6
III - lipiec 2015	Ściek surowy	41	0	0	26,8
	Ściek z komory napowietrzania	15	6,7	6,7	20,0
	Ściek oczyszczony	22	0	0	13,6
Średnia		26	2,2	2,2	20,2

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]		
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem
IV - listopad 2015	Ściek surowy	29	17,2	3,4	20,7
	Ściek z komory napowietrzania	5	0	0	20,0
	Ściek oczyszczony	34	8,8	0	32,4
Średnia		23	8,7	1,1	24,3
V - luty 2016	Ściek surowy	39	0	43,6	10,3
	Ściek z komory napowietrzania	8	0	100,0	0,0
	Ściek oczyszczony	10	10,0	0	10,0
Średnia		19	3,3	47,9	6,8
VI - lipiec 2016	Ściek surowy	70	0	0	0
	Ściek z komory napowietrzania	32	0	0	0
	Ściek oczyszczony	36	5,6	13,9	22,2
Średnia		46	1,9	4,6	7,4
Średnia	Ściek surowy	44	3,3	13,4	11,8
	Ściek z komory napowietrzania	16	5,2	20,2	7,4
	Ściek oczyszczony	23	7,3	3,1	13,9



Rycina 22. Sezonowe zmiany częstości oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Kozięłowach.

Spośród wszystkich 59 szczepów karbapenemoopornych wyizolowanych ze ścieku surowego, najwyższą oporność zaobserwowano na ertapenem, która stanowiła 69,0%, niższą na imipenem (55,6%) i najniższą na meropenem (29,9%). W przypadku 66 izolatów ze ścieku z komory napowietrzania, najwyższą oporność odnotowano dla ertapenemu (73,6%), niższą dla meropenemu (44,7%) i najniższą dla imipenemu (20,6%). Natomiast spośród 73 szczepów karbapenemoopornych wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego, najwyższy odsetek szczepów wykazywał oporność na ertapenem (77,7%), następnie na imipenem (50,6%) i najniższy na meropenem (31,6%) (Rycina 21. B). Zaobserwowano wzrost oporności na ertapenem i meropenem w ścieku oczyszczonym w stosunku do ścieku surowego, oraz na imipenem w stosunku do ścieku z komory napowietrzania.

Najwyższy odsetek szczepów opornych na wszystkie trzy antybiotyki karbapenemowe (imipenem, meropenem i ertapenem) zaobserwowano w ścieku surowym

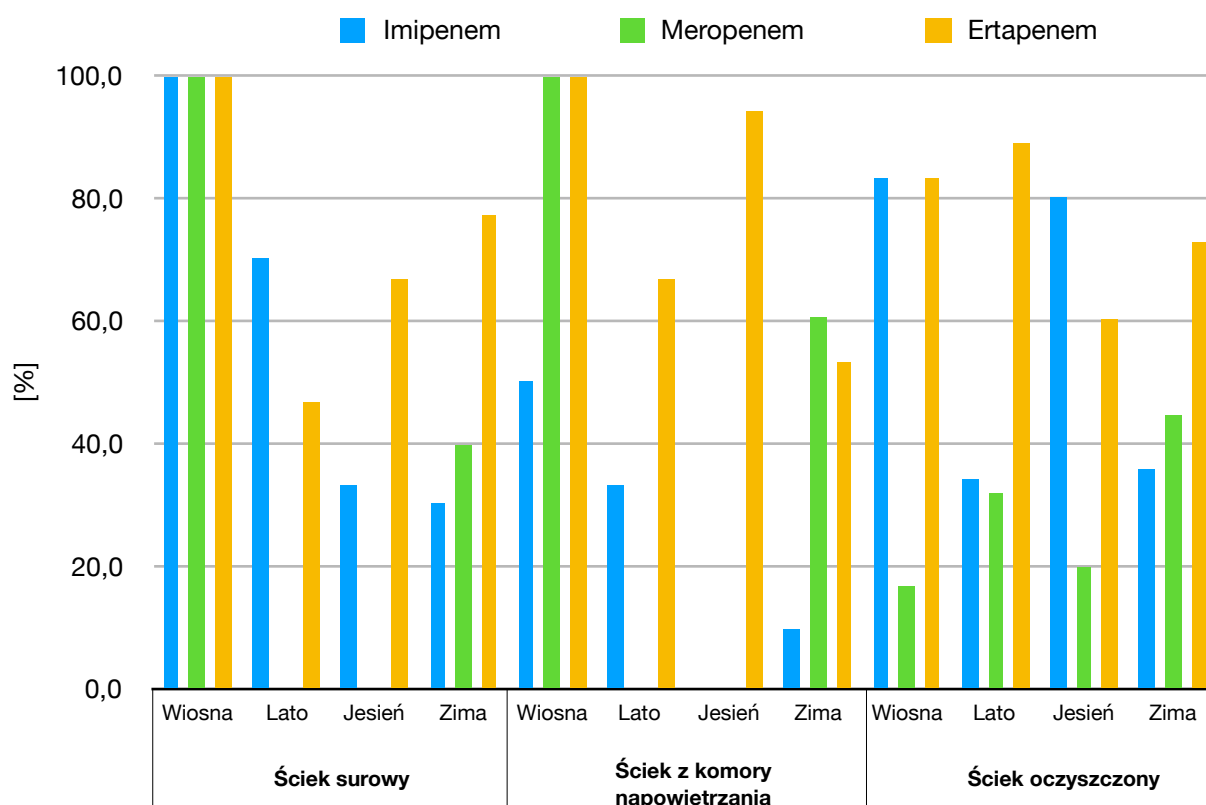
(21,2%), niższy w ścieku oczyszczonym (17,2%), natomiast najniższy w ścieku z komory napowietrzania (11,7%). Szczegółowe wyniki oporności szczepów karbapenemooopornych przedstawiono w tabeli 14 i na rycinie 23.

Tabela 14. Częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]		
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem
I - marzec 2015	Ściek surowy	11	54,5	36,4	90,9
	Ściek z komory napowietrzania	12	16,7	41,7	83,3
	Ściek oczyszczony	23	65,2	39,1	95,7
Średnia		15	45,5	39,1	90,0
II - maj 2015	Ściek surowy	2	100,0	100,0	100,0
	Ściek z komory napowietrzania	2	50,0	100,0	100,0
	Ściek oczyszczony	6	83,3	16,7	83,3
Średnia		3	77,8	72,2	94,4
III - lipiec 2015	Ściek surowy	5	40,0	0	60,0
	Ściek z komory napowietrzania	NO	NO*	NO	NO
	Ściek oczyszczony	6	33,3	16,7	83,3
Średnia		6	36,7	8,3	71,7
IV - listopad 2015	Ściek surowy	3	33,3	0	66,7
	Ściek z komory napowietrzania	16	0	0	93,8
	Ściek oczyszczony	5	80,0	20,0	60,0
Średnia		8	37,8	6,7	73,5
	Ściek surowy	35	5,7	42,9	62,9

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]		
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem
V - luty 2016	Ściek z komory napowietrzania	33	2,3	79,8	23,9
	Ściek oczyszczony	16	6,1	50,0	50,9
Średnia		28	4,7	57,6	45,9
VI - lipiec 2016	Ściek surowy	3	100,0	0	33,3
	Ściek z komory napowietrzania	3	33,3	0	66,7
	Ściek oczyszczony	17	35,3	47,1	94,1
Średnia		8	56,2	15,7	64,7
Średnia	Ściek surowy	10	55,6	29,9	69,0
	Ściek z komory napowietrzania	13	20,6	44,7	73,6
	Ściek oczyszczony	12	50,6	31,6	77,7

*NO – nie oznaczono.



Rycina 23. Sezonowe zmiany częstości oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Kozięglowach.

Spośród 52 szczepów karbapenemoopornych typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, wszystkie (100%) wykazały oporność na ertapenem, 54,6% na imipenem, a na meropenem 54,1%. Prawie wszystkie szczepy odporne były na temocylinę (99,0%). W przypadku pięciu izolatów ze ścieku z komory napowietrzania, wszystkie odporne były na ertapenem (100%) i temocylinę (100%), natomiast na meropenem 60,0% szczepów, a na imipenem 40,0%. Natomiast spośród 10 szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego, najwyższy odsetek szczepów wykazywał oporność na ertapenem (87,5%), następnie na imipenem (75,0%) i najniższy na meropenem (62,5%). Wszystkie szczepy odporne były na temocylinę (100%). Zaobserwowano wzrost oporności na imipenem i meropenem w ścieku oczyszczonym w stosunku do ścieku surowego i ścieku z komory napowietrzania.

Szczepy izolowane ze ścieku oczyszczonego wykazywały najwyższą, 56,3% oporność na wszystkie cztery analizowane antybiotyki (imipenem, meropenem, ertapenem

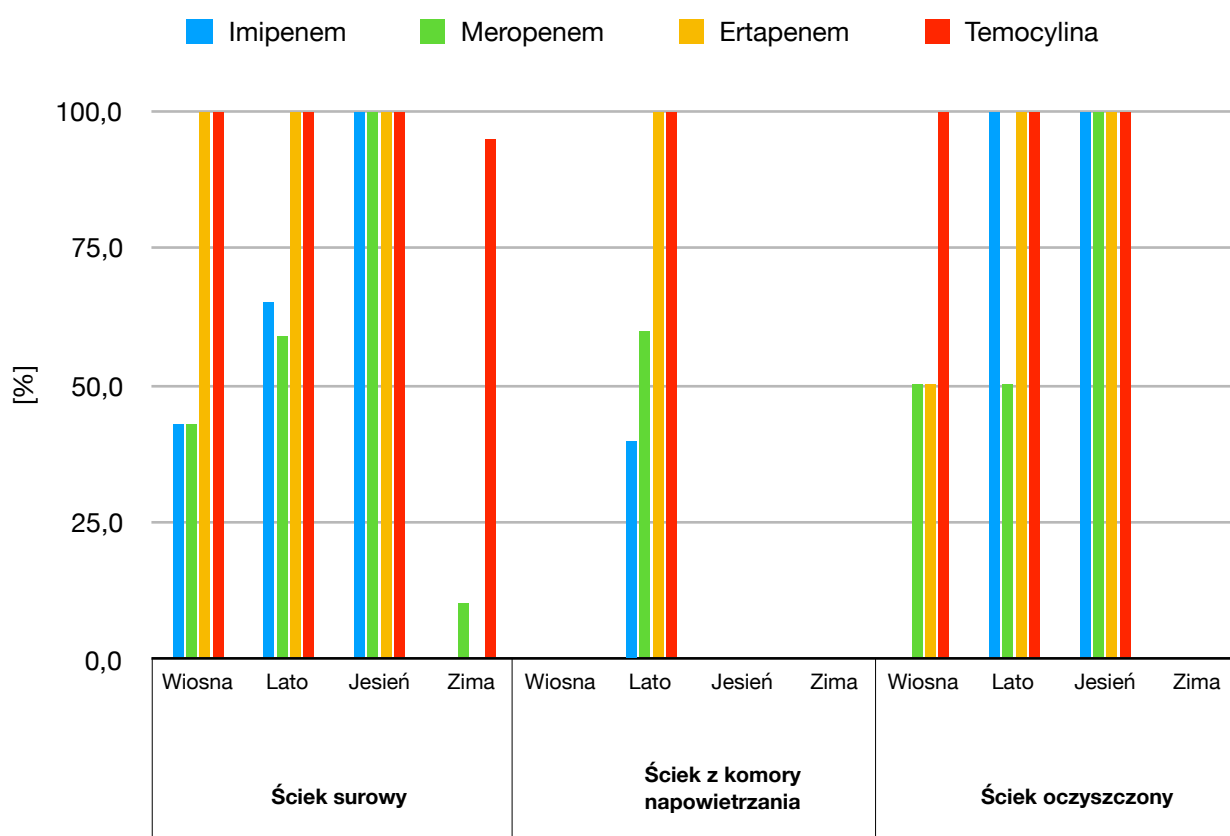
i temocylinę). Spośród szczepów izolowanych ze ścieku z komory napowietrzania 40,0% izolatów opornych było na wszystkie cztery antybiotyki, natomiast ze ścieku surowego 39,3%. Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 15 i na rycinie 24.

Tabela 15. Częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]			
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Temocyлина
I - marzec 2015	Ściek surowy	20	0	10,0	NO	95,0
	Ściek z komory napowietrzania	NO*	NO	NO	NO	NO
	Ściek oczyszczony	NO	NO	NO	NO	NO
Średnia		20	0,0	10,0	NO	95,0
II - maj 2015	Ściek surowy	7	42,9	42,9	100,0	100,0
	Ściek z komory napowietrzania	NO	NO	NO	NO	NO
	Ściek oczyszczony	2	0	50,0	50,0	100,0
Średnia		5	21,4	46,4	75,0	100,0
III - lipiec 2015	Ściek surowy	8	87,5	25,0	100,0	100,0
	Ściek z komory napowietrzania	NO	NO	NO	NO	NO
	Ściek oczyszczony	2	100,0	0	100,0	100,0
Średnia		5	93,8	12,5	100,0	100,0
IV - listopad 2015	Ściek surowy	4	100,0	100,0	100,0	100,0
	Ściek z komory napowietrzania	NO	NO	NO	NO	NO
	Ściek oczyszczony	4	100,0	100,0	100,0	100,0
Średnia		4	100,0	100,0	100,0	100,0
	Ściek surowy	14	42,9	92,9	100,0	100,0

Czas poboru	Miejsce poboru	Liczba szczepów	Oporność na antybiotyki [%]			
			Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Temocylina
VI - lipiec 2016	Ściek z komory napowietrzania	5	40,0	60,0	100,0	100,0
	Ściek oczyszczony	1	100,0	100,0	100,0	100,0
Średnia		7	61,0	84,3	100,0	100,0
Średnia	Ściek surowy	11	54,6	54,1	100,0	99,0
	Ściek z komory napowietrzania	5	40,0	60,0	100,0	100,0
	Ściek oczyszczony	2	75,0	62,5	87,5	100,0

*NO – nie oznaczono.

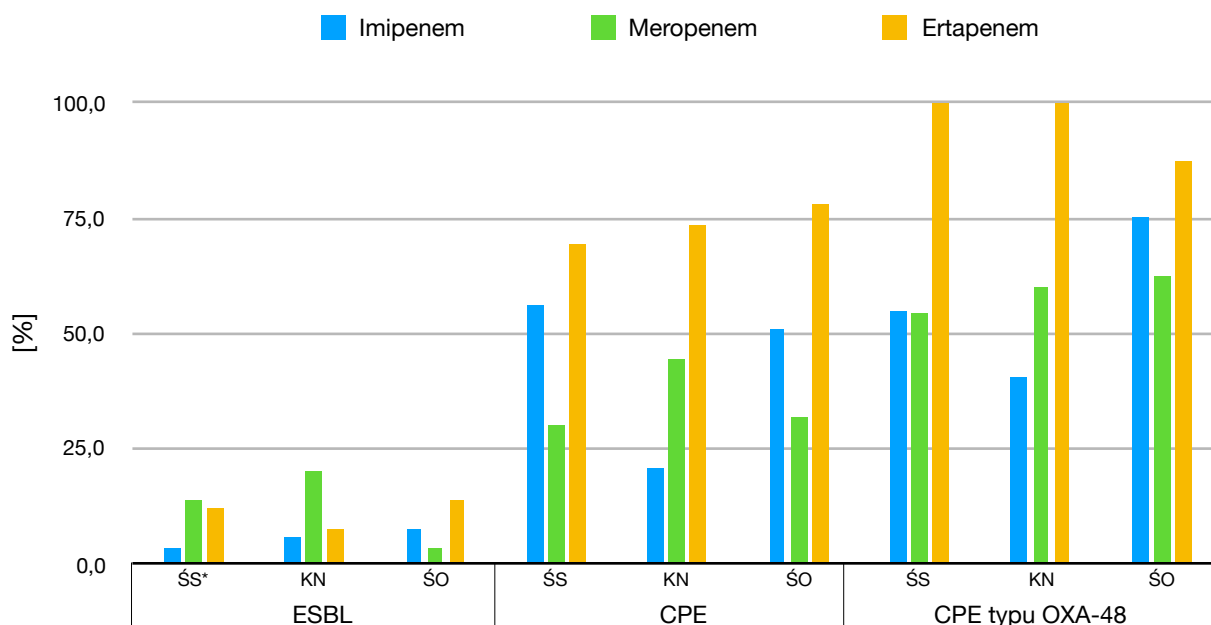


Rycina 24. Sezonowe zmiany częstości oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowych.

Średnie częstości oporności dla szczepów wytwarzających ESBL, CPE i CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze wszystkich poborów przedstawiono na rycinie 25. Najwyższą częstość oporności na antybiotyki karbapenemowe wśród szczepów wytwarzających ESBL odnotowano dla meropenemu (12,2%), następnie dla ertapenemu (10,9%), natomiast najniższą dla imipenemu (5,2%). Szczepy CPE wykazały najwyższą oporność na ertapenem (73,4%), natomiast najniższą na meropenem (35,2%). Niemal wszystkie szczepy CPE typu OXA-48 były odporne na temocylinę, stanowiąc 99,7% oporności względem tego antybiotyku. Wysoką częstość oporności odnotowano również w przypadku ertapenemu (95,8%).

Najwięcej szczepów wytwarzających ESBL, CPE i CPE typu OXA-48, opornych na karbapenemy odnotowano w ścieku oczyszczonym, stanowiąc odpowiednio 46,5%, 53,3% i 75,0%, mniej w ścieku surowym (odpowiednio 43,8%, 51,5% i 69,6%), natomiast najmniej w ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 42,9%, 46,1%, 66,7%).

Najwyższą oporność na antybiotyki karbapenemowe odnotowano dla szczepów wytwarzających ESBL w sezonie jesiennym, stanowiąc 47,1%, natomiast najniższą w sezonie wiosennym (41,6%) (Rycina 26). Odwrotne wyniki uzyskano dla szczepów CPE, które wykazywały największą oporność wiosną, stanowiąc 81,5%, natomiast najmniejszą jesienią (39,3%). Szczepy typu OXA-48 wykazały 100% oporności na antybiotyki karbapenemowe jesienią, natomiast najmniejszą oporność zimą (35,0%) (Rycina 26).

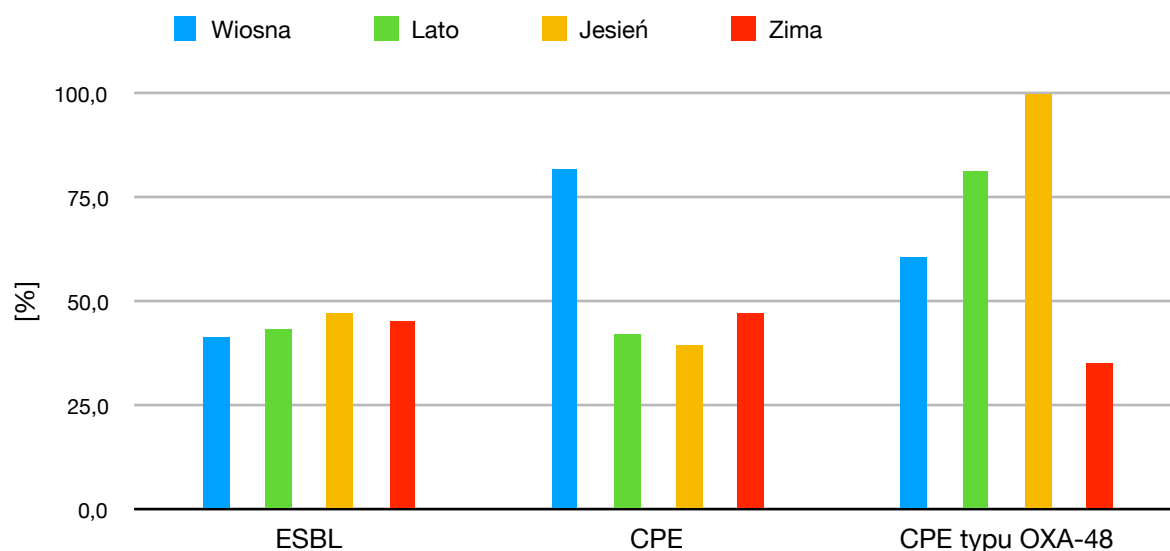


*ŚS – ściek surowy,

KN – ściek z komory napowietrzania,

ŚÓ – ściek oczyszczony.

Rycina 25. Średnie częstości oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL i karbapenemoopornych wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłówek.



Rycina 26. Sezonowe zmiany częstości oporności na antybiotyki karbapenemowe szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL i karbapenemoopornych wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłówek.

4.11. Określanie polimorfizmu genetycznego szczepów metodą ERIC-PCR

W celu wyeliminowania szczepów będących klonami przeprowadzono analizę podobieństwa genetycznego z wykorzystaniem ERIC-PCR, dla 549 szczepów wytwarzających ESBL, 212 szczepów CPE i 117 szczepów CPE typu OXA-48. Szczepy o podobieństwie genetycznym powyżej 95% uznano za identyczne i wyeliminowano z dalszej analizy.

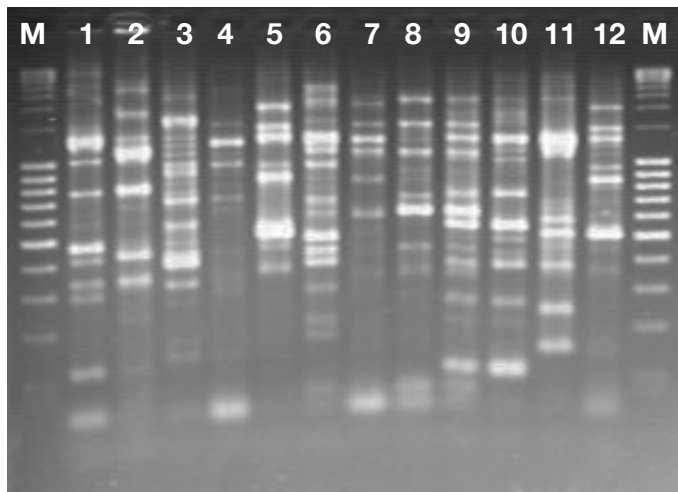
W wyniku reakcji ERIC-PCR otrzymano od dwóch do szesnastu prążków o wielkościach od 200 do 3000 pz. Przykładowy wynik elektroforetycznego rozdziału produktów ERIC-PCR przedstawiono na rycinie 27. Dendrogramy uzyskano przy zastosowaniu współczynnika Dice'a i metody grupowania UPGMA. Przykładowy dendrogram przedstawiono na rycinie 28, pozostałe dendrogramy umieszczono w Załącznikach niniejszej pracy (Załączniki 1-16).

Szczepy należące do jednego skupienia miały taki sam profil ERIC, co wskazuje na to, że są one identyczne genetycznie i traktowane odtąd były jako jeden. W wyniku analizy podobieństwa genetycznego szczepów wytwarzających ESBL, odrzucono łącznie 57 izolatów: osiem szczepów z I poboru, pięć z II poboru, 13 z III poboru, cztery z IV poboru, cztery z V poboru i 23 z poboru VI (Rycina 28, Załączniki 1-5). Po wyeliminowaniu identycznych szczepów pozostało 60 szczepów z I poboru, 91 z II poboru, 78 z III poboru, 68 z IV poboru, 57 z V poboru i 138 z poboru VI, co łącznie stanowi 492 wytwarzających ESBL.

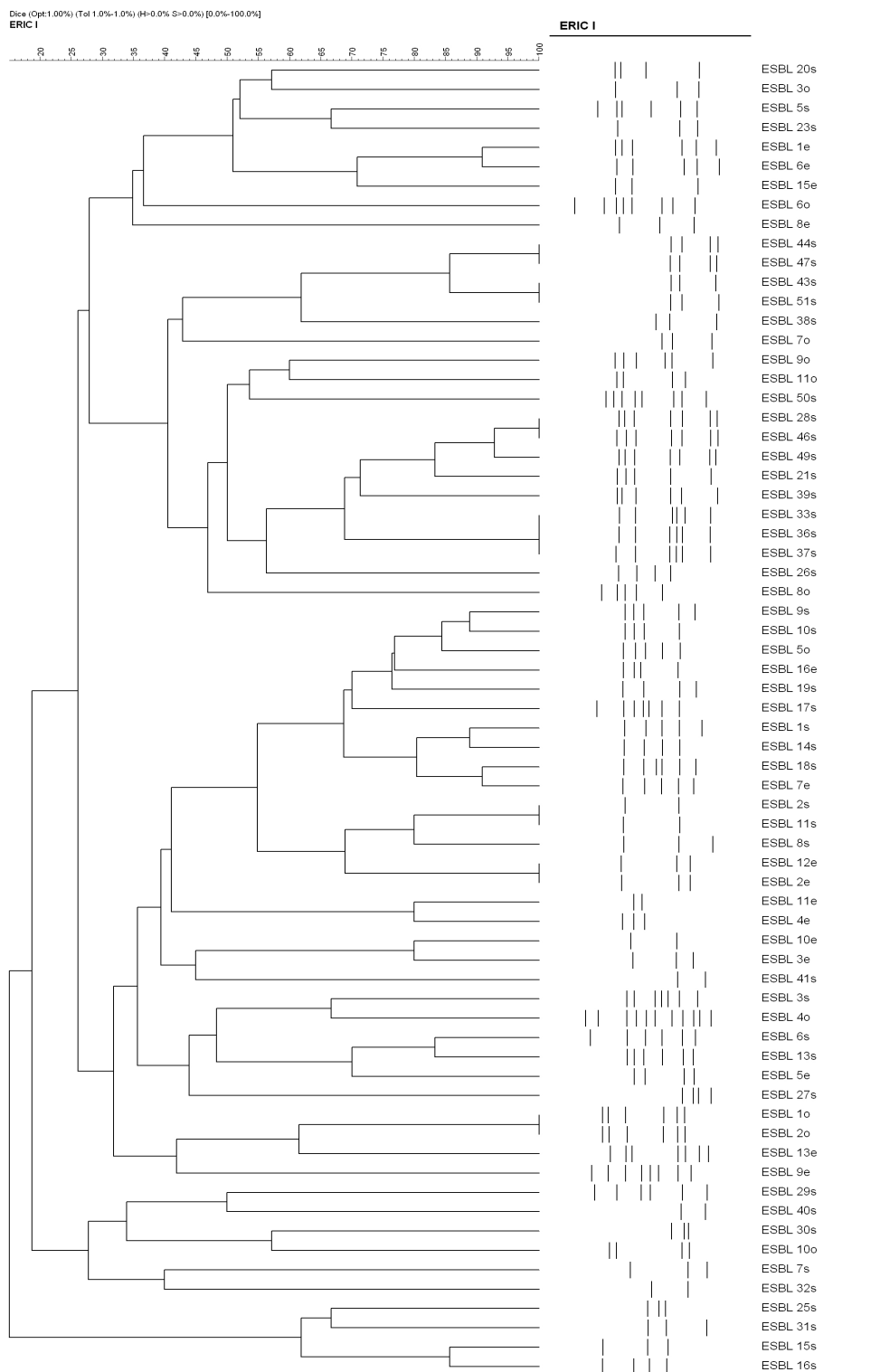
W przypadku szczepów karbapenemoopornych, wyeliminowano łącznie 14 izolatów z dalszych analiz: osiem szczepów z I poboru, jeden z IV poboru i pięć z V poboru (Załączniki 6-11). Po wyeliminowaniu szczepów będących klonami, pozostało 46 szczepów z I poboru, 10 z II poboru, 11 z III poboru, 24 z IV poboru, 84 z V poboru i 23 z poboru VI.

W przypadku szczepów karbapenemoopornych typu OXA-48, odrzucono łącznie 50 izolatów: 12 szczepów z I poboru, dziewięć z II poboru, sześć z III poboru, 13 z IV poboru i 10 z poboru VI (Załączniki 12-16). Po wyeliminowaniu szczepów bakteryjnych będących klonami, pozostało 20 szczepów z I poboru, dziewięć z II poboru, 10 z III

poboru, osiem z IV poboru i 20 z poboru VI. Dalszym analizom poddano łącznie 265 szczepów karbapenemoopornych (198 szczepów CPE i 67 szczepów CPE typu OXA-48).



Rycina 27. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji ERIC-PCR w 2% żelu agarozowym. Ścieżka: M - wzorzec mas (200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1031 pz, 1500 pz, 2000 pz, 2500 pz, 3000 pz, 4000 pz, 5000 pz, 6000 pz, 7000 pz, 8000 pz, 9000 pz i 10000 pz), ścieżki 1 – 12- szczepy wytwarzające ESBL z VI poboru.

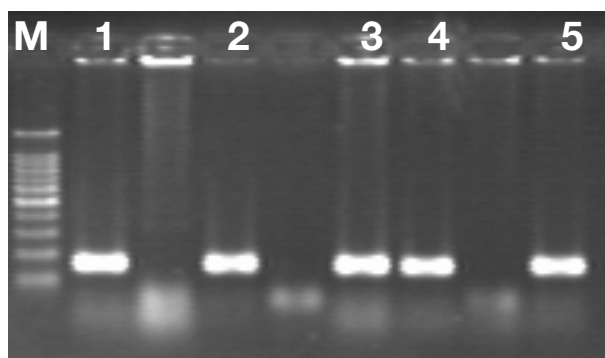


Rycina 28. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w I poborze. Legenda: ESBL – bakterie wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.

4.12. Wykrywanie genów integraz

Obecność integronów w genomach bakterii heterotroficznych oznaczano przygotowując lizaty z wybranych losowo 96 kolonii. Podobnie oznaczono częstość występowania integronów u bakterii grupy coli (siedem poborów), wybierając losowo po 96 kolonii. Lizaty poddane były multipleksowej reakcji PCR z wykorzystaniem starterów komplementarnych do genów trzech klas integraz.

Obecność genów integrazy klasy 1 (Rycina 29) odnotowano w genomach bakterii wyizolowanych ze wszystkich analizowanych próbek ścieków, również ze ścieku oczyszczonego. Nie stwierdzono występowania integronów klasy 2 i 3. Szczegółowe wyniki częstości występowania integronów klasy 1 w genomach bakterii heterotroficznych przedstawiono w tabeli 16.



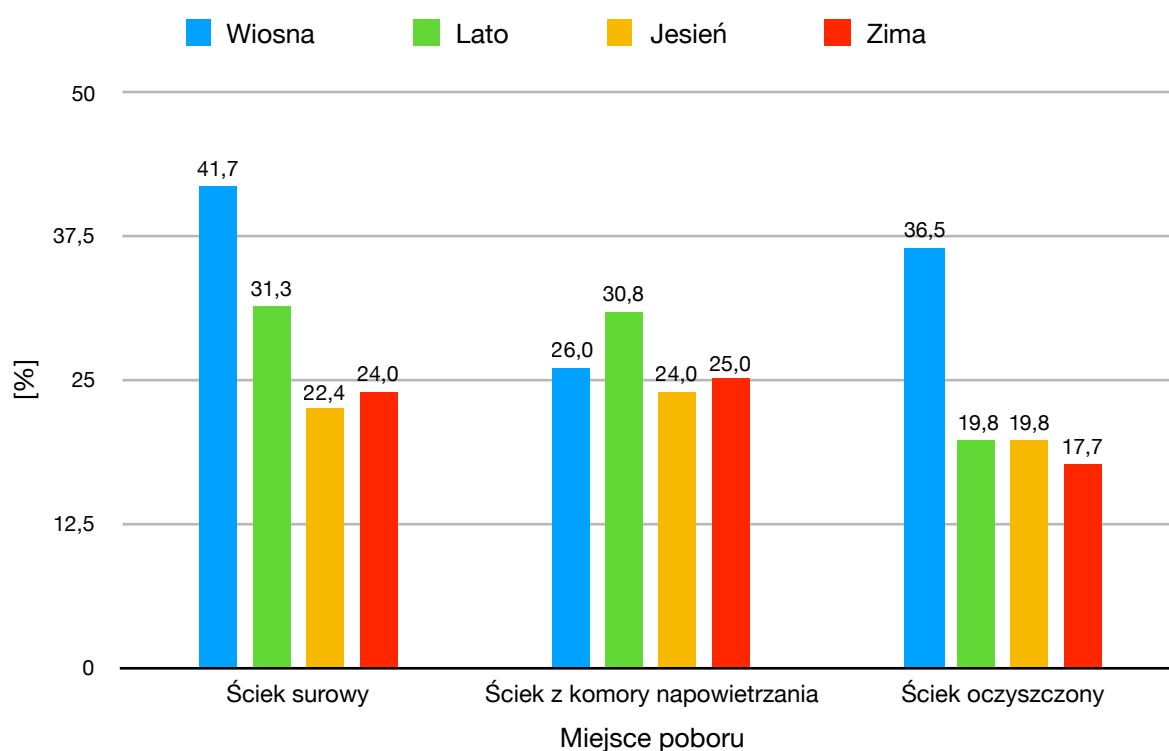
Rycina 29. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji genów trzech klas integraz obecnych w genomach bakterii grupy coli izolowanych z ścieku oczyszczonego. Produkt amplifikacji integrazy klasy 1 o wielkości 160 pz obecny jest w ścieżkach ponumerowanych. M: marker (100 pz, 200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1000 pz, 1500 pz).

Tabela 16. Częstość występowania integronów klasy 1 u bakterii heterotroficznych, a także u bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

	Czas poboru	Częstość występowania integronów klasy 1 [%]	
		Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli
Ściek surowy	I - marzec 2015	24,0	32,3
	II - maj 2015	41,7	49,0
	III - lipiec 2015	44,8	24,0
	IV - listopad 2015	33,3	27,1
	V - luty 2016	26,0	20,8
	VI - lipiec 2016	17,7	24,0
	VII - listopad 2016	11,5	20,8
	VIII - styczeń 2017	21,9	NO*
	Średnia	27,6	28,3
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	27,1	30,2
	II - maj 2015	26,0	27,1
	III - lipiec 2015	34,4	27,1
	IV - listopad 2015	31,3	22,9
	V - luty 2016	18,8	15,6
	VI - lipiec 2016	27,1	27,1
	VII - listopad 2016	16,7	22,9
	VIII - styczeń 2017	29,2	NO
	Średnia	26,3	24,7
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	6,3	27,1
	II - maj 2015	36,5	22,9
	III - lipiec 2015	28,1	21,9
	IV - listopad 2015	31,3	13,5
	V - luty 2016	17,7	35,4
	VI - lipiec 2016	11,5	24,0

	Czas poboru	Częstość występowania integronów klasy 1 [%]	
		Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli
	VII - listopad 2016	8,3	23,0
	VIII - styczeń 2017	29,2	NO
	Średnia	21,1	24,0

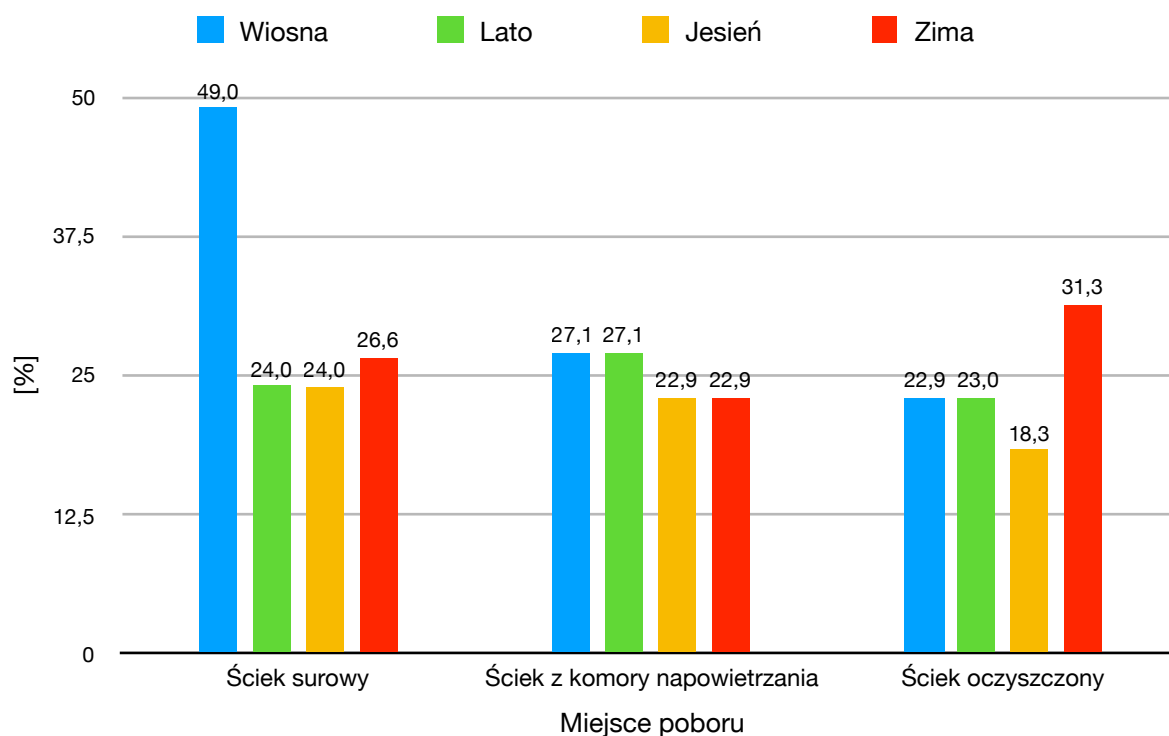
*NO - nie oznaczono.



Rycina 30. Sezonowe zmiany częstości występowania integronów klasy 1 u bakterii heterotroficznych wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Rycina 30 obrazuje sezonowe zmiany częstości występowania integronów klasy 1 u heterotrofów w ścieku na różnych etapach procesu oczyszczania. Najwyższe częstości występowania integronów u bakterii heterotroficznych ze ścieku surowego i ze ścieku oczyszczonego odnotowano wiosną (odpowiednio 41,7% i 36,5%), natomiast ze ścieku z komory napowietrzania latem (30,8%). Najniższe częstości występowania genów integrazy

klasy 1 u bakterii heterotroficznych ze ścieku surowego i ścieku z komory napowietrzania zaobserwowano w sezonie jesiennym (22,4% i 24,0%), natomiast ze ścieku oczyszczonego zimą (17,7%). Jesienią i zimą odnotowano wzrost częstości występowania integronów u bakterii izolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 24,0% i 25,0%) w stosunku do ścieku surowego (odpowiednio 22,4% i 24,0%). Natomiast wiosną, częstość występowania integronów u heterotrofów izolowanych ze ścieku oczyszczonego (36,5%) była wyższa niż w ścieku z komory napowietrzania (26,0%).

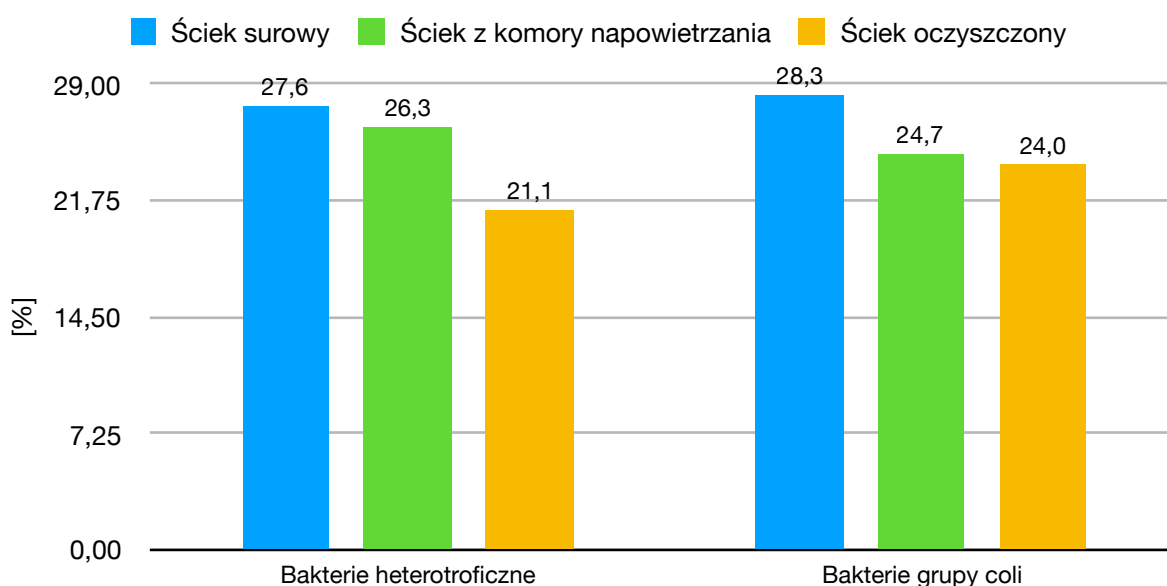


Rycina 31. Sezonowe zmiany częstości występowania integronów klasy 1 u bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w trakcie siedmiu poborów.

Na rycinie 31 przedstawiono sezonowe zmiany częstości występowania integronów klasy 1 u bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku na różnych etapach procesu oczyszczania. Najwyższą częstość występowania integronów u bakterii ze ścieku surowego odnotowano wiosną (49,0%), a najniższą latem i jesienią (24,0%), ze ścieku z komory napowietrzania najwyższą wiosną i latem (27,1%), a najniższą jesienią i zimą (22,9%). W ścieku oczyszczonym najwyższą częstość odnotowano zimą (31,3%), a

najniższą jesienią (18,3%). W miesiącach letnich stwierdzono wyższą częstość występowania genów integraz u bakterii grupy coli izolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (27,1%) w stosunku do ścieku surowego (24,0%).

Najwyższą średnią częstość występowania integronów klasy 1 w genomach bakterii heterotroficznych, biorąc pod uwagę wszystkie pobory, odnotowano u bakterii ze ścieku surowego (27,6%), następnie ze ścieku z komory napowietrzania (26,3%) i ze ścieku oczyszczonego (21,1%). Podobne wyniki uzyskano dla bakterii grupy coli (Tabela 16 i Rycina 32).

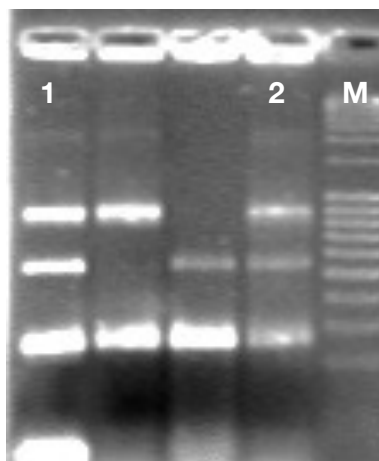


Rycina 32. Średnia częstość występowania integronów klasy 1 u bakterii heterotroficznych, a także u bakterii grupy coli wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.13. Identyfikacja genu *mecA*

Częstość występowania genów *mecA* badano w pięciu poborach, u 41 szczepów *S. aureus* izolowanych na podłożu chromID™ MRSA: cztery szczepy z II poboru, 18 z V, cztery z VI, 12 z VII i trzy z VIII. Lizaty uzyskane z pojedynczych kolonii poddane były multiplexowej reakcji PCR z wykorzystaniem komplementarnych starterów do genów 16S rRNA, *nuc* i *mecA* (Rycina 33). Ostateczną identyfikację szczepów MRSA potwierdziła obecność zarówno genu *mecA* (gen oporności na metycylinę) jak i genu *nuc*,

specyficznego dla szczepów *S. aureus*. Szczegółowe wyniki częstości występowania genów *mecA* przedstawiono w tabeli 17. Produkty amplifikacji analizowanych genów *mecA* poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje nukleotydowe zgodne były z sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie GenBank (KY856922.1).



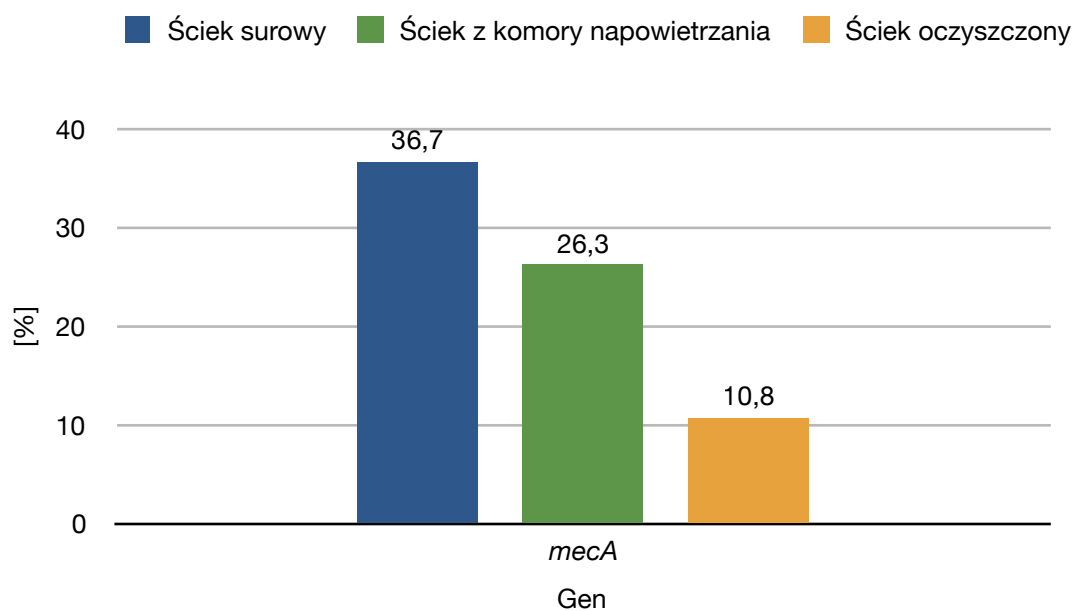
Rycina 33. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji genów 16S rRNA (886 pz), *nuc* (255 pz), *mecA* (527 pz) u szczepów izolowanych ze ścieku surowego w trakcie poboru II. Produkty amplifikacji potwierdzające obecność szczepów MRSA obecne w ścieżkach ponumerowanych. M: marker (200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1031 pz, 1500 pz, 2000 pz, 2500 pz, 3000 pz, 4000 pz, 5000 pz, 6000 pz, 7000 pz, 8000 pz, 9000 pz i 10000 pz).

Najwyższą średnią częstość występowania genów *mecA* w genomach izolatów odnotowano w ścieku surowym (36,7%), następnie w ścieku z komory napowietrzania (26,3%), natomiast najniższą w ścieku oczyszczonym (10,8%) (Tabela 17, Rycina 34). Wśród szczepów z genem *mecA*, 19,8% wyizolowanych ze ścieku surowego miało gen *nuc*, zatem uznano je za szczepy MRSA. Niższą częstość występowania szczepów MRSA odnotowano u gronkowców ze ścieku z komory napowietrzania (8,5%), natomiast najniższą ze ścieku oczyszczonego (7,9%).

Tabela 17. Częstość występowania genów *mecA* u *S. aureus* oraz *vanA* u szczepów *Enterococcus* sp. wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

	Czas poboru	Częstość występowania genów [%]	
		<i>mecA</i>	<i>vanA</i>
Ściek surowy	I - marzec 2015	NO*	0
	II - maj 2015	12,5 (n=2)	12,5 (n=1)
	V - luty 2016	100,0 (n=18)	18,2 (n=2)
	VI - lipiec 2016	15,4 (n=4)	26,3 (n=5)
	VII - listopad 2016	25,0 (n=4)	2,5 (n=1)
	VIII - styczeń 2017	6,3 (n=1)	5,6 (n=2)
	Średnia	36,7	10,9
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	NO	0
	II - maj 2015	25,0 (n=1)	6,3 (n=1)
	V - luty 2016	0	25,0 (n=8)
	VI - lipiec 2016	0	16,7 (n=5)
	VII - listopad 2016	100,0 (n=1)	20,0 (n=3)
	VIII - styczeń 2017	6,3 (n=1)	2,9 (n=1)
	Średnia	26,3	11,8
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	NO	25,0 (n=1)
	II - maj 2015	33,3 (n=1)	0
	V - luty 2016	0	25,0 (n=8)
	VI - lipiec 2016	0	5,6 (n=2)
	VII - listopad 2016	14,3 (n=7)	0
	VIII - styczeń 2017	6,3 (n=1)	14,3 (n=2)
	Średnia	10,8	11,7

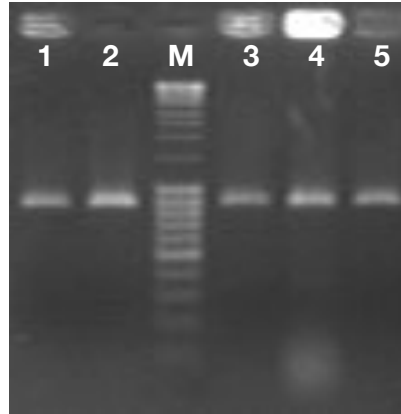
*NO – nie oznaczono.



Rycina 34. Średnia częstość występowania genów *mecA* u szczepów *S. aureus* wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

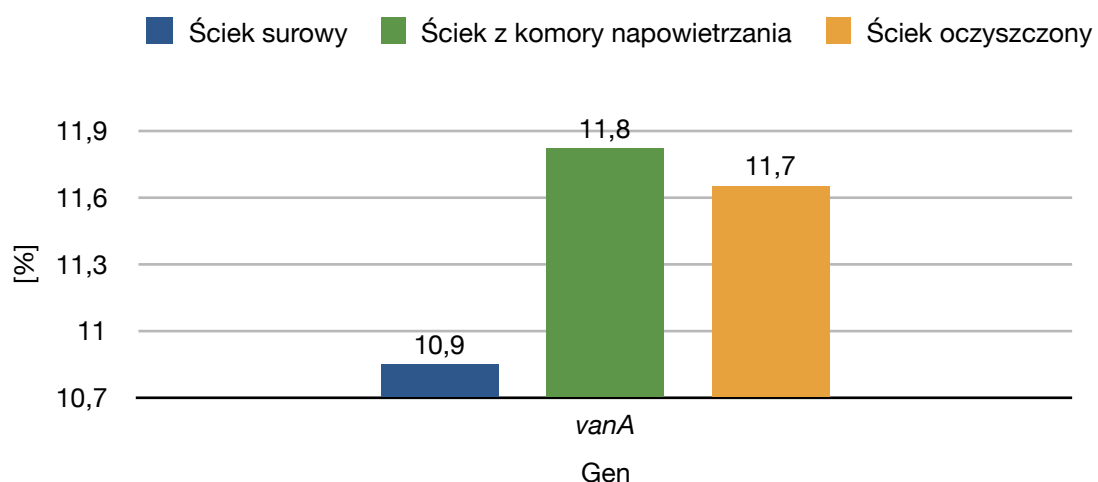
4.14. Identyfikacja genów *vanA*

Obecność genów *van* analizowano u szczepów *Enterococcus* sp. wyizolowanych w sześciu poborach na podłożu chromogennym chromID™ VRE. Wyselekcjonowano jeden szczep z I poboru, dwa z II, 18 z V, 12 z VI, cztery z VII i pięć z VIII, łącznie 42 szczepy VRE, które poddano dalszym analizom. DNA uzyskane z pojedynczych kolonii poddane było reakcji PCR z wykorzystaniem komplementarnych starterów do genów *vanA*, *vanB* i *vanC*. W genomach wszystkich analizowanych szczepów wankomycynoopornych odnotowano wyłącznie gen *vanA* (Rycina 35). Szczegółowe wyniki częstości występowania genów *vanA* w genomach bakterii *Enterococcus* sp. przedstawiono w tabeli 17. Produkty amplifikacji analizowanych genów *vanA* poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje nukleotydowe zgodne były z sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie GenBank (KY856922.1).



Rycina 35. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji genu *vanA* (885 pz) u szczepów izolowanych ze ścieku surowego i ścieku oczyszczonego w trakcie poboru V. Produkty amplifikacji obecne w ścieżkach ponumerowanych. M: marker (200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1031 pz, 1500 pz, 2000 pz, 2500 pz, 3000 pz, 4000 pz, 5000 pz, 6000 pz, 7000 pz, 8000 pz, 9000 pz i 10000 pz).

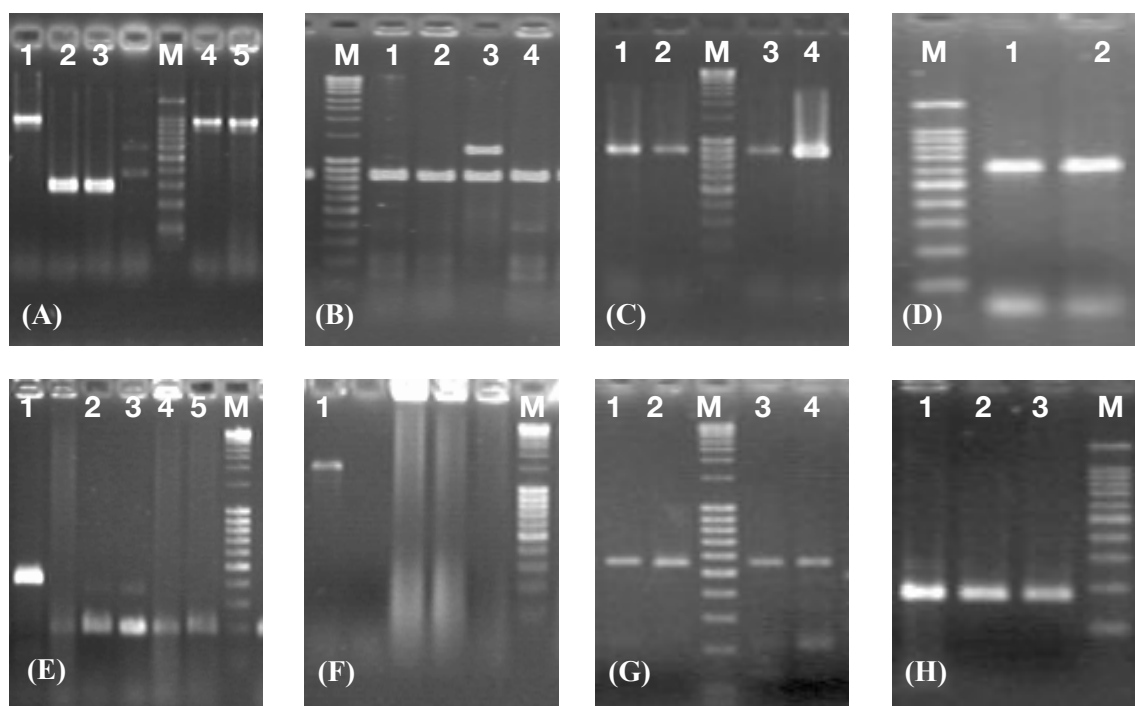
Najwyższą średnią częstość występowania genu *vanA* odnotowano w ścieku z komory napowietrzania (11,8%) i jednocześnie wyższą częstość występowania genu *vanA* u szczepów VRE izolowanych ze ścieku oczyszczonego (11,7%) niż ze ścieku surowego (10,9%) (Rycina 36).



Rycina 36. Średnia częstość występowania genu *vanA* u szczepów *Enterococcus* sp. wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.15. Identyfikacja genów kodujących β -laktamazy i karbapenemazy

Występowanie genów kodujących β -laktamazy, karbapenemazy i cefalosporynazy w genomach bakterii wytwarzających ESBL i opornych na karbapenemy, wyizolowanych w sześciu poborach, analizowano za pomocą reakcji PCR z użyciem starterów komplementarnych do fragmentów badanych genów. W genomach bakterii wytwarzających ESBL oznaczano występowanie siedmiu genów β -laktamaz i trzy geny cefalosporynaz, natomiast u szczepów CPE oznaczano występowanie pięciu genów karbapenemaz, trzech β -laktamaz i trzech genów cefalosporynaz. U szczepów CPE typu OXA-48 oznaczono występowanie pięciu genów karbapenemaz (Tabela 18). Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów amplifikacji ww. genów przedstawiono na rycinie 37.



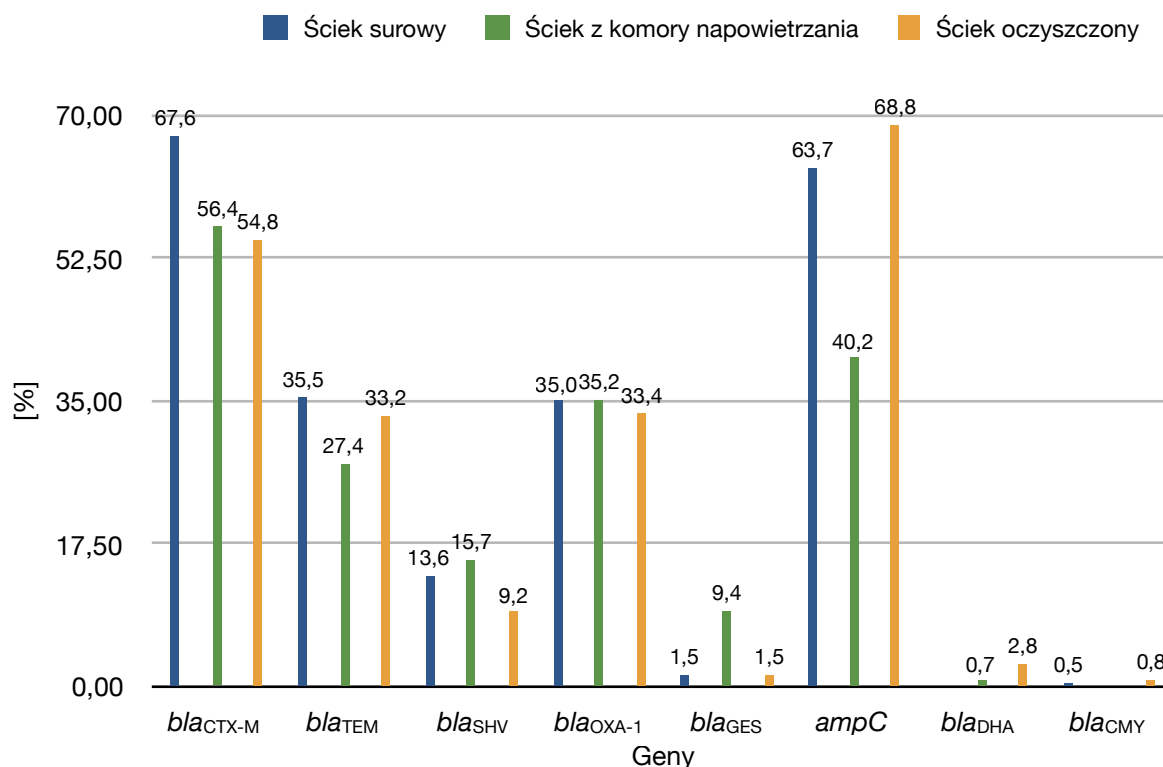
Rycina 37. Rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym produktów amplifikacji genów *bla*_{CTX-M} (1000 pz) i *bla*_{SHV} (300 pz) u szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w trakcie poboru II (A), *bla*_{TEM} (1150 pz) i *bla*_{OXA-1} (813 pz) u szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego w trakcie poboru III (B), *bla*_{GES} (890 pz) u szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego w trakcie poboru III (C), *bla*_{NDM} (621 pz) u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w trakcie poboru V (D), *ampC* (189 pz) i *bla*_{DHA} (404 pz) u szczepów

wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w trakcie poboru I (E) i *bla_{CMY}* (1432 pz) u szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego w trakcie poboru V (F), *bla_{VIM}* (509 pz) u szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego i oczyszczonego w trakcie poboru IV (G), *bla_{OXA-48}* (177 pz) u szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego w trakcie poboru III (H). Produkty amplifikacji obecne w ścieżkach ponumerowanych. M (A, D, H): marker (100 pz, 200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1000 pz, 1500 pz), M (B, C, E, F, G): marker (200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1031 pz, 1500 pz, 2000 pz, 2500 pz, 3000 pz, 4000 pz, 5000 pz, 6000 pz, 7000 pz, 8000 pz, 9000 pz i 10000 pz).

Tabela 18. Częstość występowania genów β-laktamaz i cefalosporynaz w genomach szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

		Częstość występowania genów [%]								
	Czas poboru	Liczba szczepów	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>ampC</i>	<i>bla_{DHA}</i>	<i>bla_{CMY}</i>
Ściek surowy	I - marzec 2015	36	80,1	61,1	8,3	27,8	2,8	52,8	0	2,8
	II - maj 2015	48	50,0	4,2	6,3	29,2	2,1	64,6	0	0
	III - lipiec 2015	41	90,2	34,1	12,2	41,5	0	53,7	0	0
	IV - listopad 2015	29	80,6	29,0	16,1	22,6	0	64,5	0	0
	V - luty 2016	39	74,4	48,7	12,8	33,3	2,6	89,7	0	0
	VI - lipiec 2016	70	30,0	35,7	25,7	55,7	1,4	57,1	0	0
	Średnia	44	67,6	35,5	13,6	35,0	1,5	63,7	0,0	0,5
	I - marzec 2015	10	60,0	20,0	20,0	10,0	20,0	40,0	0	0

		Częstość występowania genów [%]								
	Czas poboru	Liczba szczepów	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{GES}	<i>ampC</i>	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{CMY}
Ściek z komory napowietrzania	II - maj 2015	23	34,8	13,4	0	4,3	0	43,5	4,3	0
	III - lipiec 2015	15	86,7	26,7	13,3	46,7	6,7	33,3	0	0
	IV - listopad 2015	5	60,0	20,0	20,0	0	20,0	40,0	0	0
	V - luty 2016	8	87,5	75,0	25,0	75,0	0	37,5	0	0
	VI - lipiec 2016	32	9,4	9,4	15,6	75,0	9,4	46,9	0	0
	Średnia	16	56,4	27,4	15,7	35,2	9,4	40,2	0,7	0
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	14	57,0	14,3	0	7,1	0	92,9	7,1	0
	II - maj 2015	20	40,0	5,0	10,0	25,0	0	70,0	5,0	5,0
	III - lipiec 2015	22	72,7	45,5	13,6	36,4	9,1	81,8	4,5	0
	IV - listopad 2015	34	75,0	52,8	5,6	27,8	0	61,1	0	0
	V - luty 2016	10	70,0	50,0	20,0	50,0	0	50,0	0	0
	VI - lipiec 2016	39	14,3	31,4	5,7	54,3	0	57,1	0	0
	Średnia	23	54,8	33,2	9,2	33,4	1,5	68,8	2,8	0,8



Rycina 38. Średnie częstości występowania genów β-laktamaz i cefalosporynaz w genomach szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowych.

Obecność genów β-laktamaz odnotowano w genomach szczepów wytwarzających ESBL pochodzących ze wszystkich analizowanych próbek ścieków, również w ścieku oczyszczonym. Nie stwierdzono obecności genów *bla*_{VEB} i *bla*_{PER}. Szczegółowe wyniki częstości występowania genów *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{GES}, *ampC*, *bla*_{DHA} i *bla*_{CMY} przedstawiono w tabeli 18 i na rycinach 38 i 40.

Najczęściej występującym genem β-laktamaz u szczepów wytwarzających ESBL był gen *bla*_{CTX-M}. Najwyższą średnią częstość jego występowania odnotowano u izolatów ze ścieku surowego (67,6%), w przypadku szczepów wyosobnionych ze ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego, gen *bla*_{CTX-M} miało odpowiednio, 56,4% i 54,8% izolatów (Rycina 38). Na rycinie 40 przedstawiono sezonowe zmiany częstości występowania genu *bla*_{CTX-M} u bakterii izolowanych ze ścieku na różnych etapach procesu oczyszczania. Najwyższą częstość występowania genu *bla*_{CTX-M} odnotowano u izolatów ze ścieku surowego i ścieku oczyszczonego jesienią (odpowiednio 80,6%, 75,0%), a ze ścieku z komory napowietrzania zimą (73,8%). Najniższą częstość występowania genu *bla*_{CTX-M}

zaobserwowano wiosną zarówno u szczepów wyosobnionych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania jak i ścieku oczyszczonego (odpowiednio 50,0%, 34,8%, 40,0%). W sezonie wiosennym i jesiennym zaobserwowano wyższą częstość występowania genu *bla_{CTX-M}* u szczepów pochodzących ze ścieku oczyszczonego (odpowiednio 40,0% i 75,0%), niż ze ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 34,8% i 60,0%).

Kolejnym genem β -laktamaz występującym z wysoką częstością u szczepów wytwarzających ESBL był gen *bla_{TEM}*. Najwyższą średnią częstość występowania *bla_{TEM}* odnotowano u izolatów ze ścieku surowego (35,5%). Podobną średnią częstość występowania *bla_{TEM}* stwierdzono u bakterii wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (33,2%) i była ona wyższa od wartości uzyskanych dla izolatów ze ścieku z komory napowietrzania (27,4%) (Rycina 38). Najwyższą częstość występowania genu *bla_{TEM}* odnotowano u izolatów ze ścieku surowego i z komory napowietrzania zimą (odpowiednio 54,9% i 47,5%), a ze ścieku oczyszczonego jesienią (52,8%). W sezonie letnim i jesiennym zaobserwowano wyższą częstość występowania genu *bla_{TEM}* u bakterii wytwarzających ESBL izolowanych ze ścieku oczyszczonego (odpowiednio 38,0% i 52,8%) w stosunku do ścieku surowego (odpowiednio 34,9% i 29,0%) i ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 18,1% i 20,0%). Wyższą częstość występowania genu *bla_{TEM}* odnotowano także wiosną dla ścieku z komory napowietrzania (13,4%) w porównaniu ze ściekiem surowym (4,2%) (Rycina 40).

Najwyższą średnią częstość występowania genu *bla_{OXA-1}* zaobserwowano u izolatów z komory napowietrzania (35,2%), następnie u bakterii wytwarzających ESBL izolowanych ze ścieku surowego (35,0%) i ścieku oczyszczonego (33,4%) (Rycina 38). Najwyższe wartości częstości występowania genu *bla_{OXA-1}* odnotowano u izolatów ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego latem (odpowiednio 48,6%, 60,9% i 45,0%). Zarówno latem jak i zimą, częstość występowania genu *bla_{OXA-1}* u szczepów wyizolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 60,9% i 42,5%) była wyższa niż ze ścieku surowego (odpowiednio 48,6% i 30,6%). U bakterii wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku z komory napowietrzania w sezonie jesiennym, nie stwierdzono występowania genu *bla_{OXA-1}*. W tym sezonie zaobserwowano również wyższą częstość występowania genu *bla_{OXA-1}* u bakterii

wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (27,8%) w porównaniu ze ściekiem surowym (22,6%) (Rycina 40).

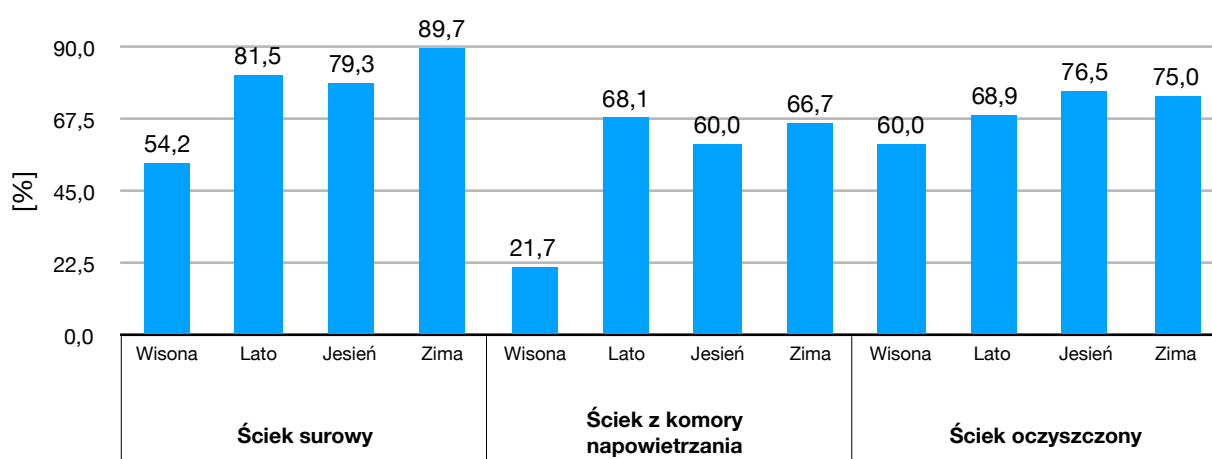
W przypadku genu *bla_{SHV}* najwyższą średnią częstość odnotowano u szczepów wyizolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (15,7%), następnie ze ścieku surowego (13,6%), natomiast najniższą ze ścieku oczyszczonego (9,2%) (Rycina 38). W przypadku sezonowej zmienności, częstość występowania genu *bla_{SHV}* odnotowana u izolatów ze ścieku surowego malała od lata do wiosny, natomiast wzrastała u szczepów ze ścieku z komory napowietrzania od lata do zimy (Rycina 40). Częstość występowania genu *bla_{SHV}* odnotowana u izolatów ze ścieku oczyszczonego utrzymywała się wiosną, latem i zimą na tym samym poziomie (10,0%).

Gen *bla_{GES}* występował u wytwarzających ESBL bakterii grupy coli z najniższą częstością. Najwyższą średnią częstość odnotowano u szczepów wyizolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (9,4%), a identyczną wynoszącą 1,5%, ze ścieku surowego i ścieku oczyszczonego (Rycina 38). Nie stwierdzono *bla_{GES}* u szczepów wyizolowanych jesienią ze ścieku surowego oraz wiosną ze ścieku z komory napowietrzania. Natomiast u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego gen *bla_{GES}* odnotowano jedynie latem i zaobserwowano wtedy wyższą częstość (5,0%) jego występowania niż w ścieku surowym (0,7%). Latem i zimą odnotowano wyższe częstości występowania genu *bla_{GES}* u bakterii wyisobnionych ze ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 8,1% i 10,0%) w porównaniu ze ściekiem surowym (odpowiednio 0,7% i 2,7%) (Rycina 40).

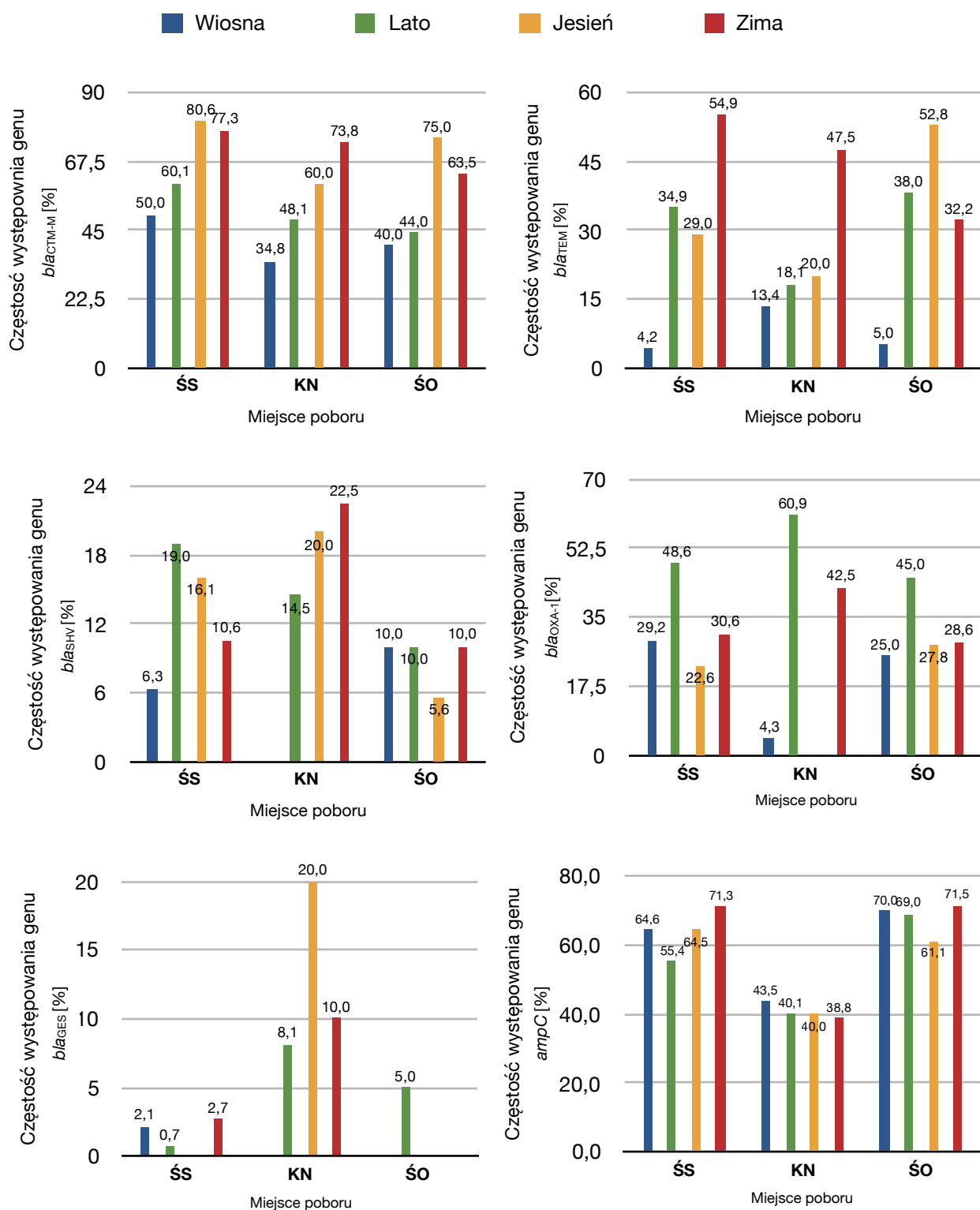
Wiosną, latem i zimą zaobserwowano wyższe częstości występowania genu *amp_C* u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (odpowiednio 70,0%, 69,0% i 71,5%) w porównaniu ze ściekiem surowym (odpowiednio 64,6%, 55,4% i 71,3%) i ściekiem z komory napowietrzania (odpowiednio 43,5%, 40,1%, 38,8%) (Rycina 40).

Geny cefalosporynaz *bla_{DHA}* i *bla_{CMY}* występowały z niewielką częstością. Obecność genu *bla_{DHA}* odnotowano u bakterii wyizolowanych jedynie ze ścieku oczyszczonego z częstością wynoszącą 2,8% i ze ścieku z komory napowietrzania (0,7%). Nie stwierdzono genu *bla_{DHA}* u szczepów wyizolowanych ze ścieku surowego. Natomiast obecność genu *bla_{CMY}* odnotowano u izolatów ze ścieku oczyszczonego (0,8%) z wyższą częstością w porównaniu ze ściekiem surowym (0,5%). Nie stwierdzono genu *bla_{CMY}* u szczepów wyizolowanych ze ścieku z komory napowietrzania (Rycina 38).

U 360 (73,2%) szczepów wytwarzających ESBL stwierdzono występowanie w genomie więcej niż jednego genu β -laktamaz lub cefalosporynaz. Częstość występowania genów u takich szczepów przedstawiono na rycinie 39. Najwyższą częstość występowania dwóch lub więcej genów odnotowano w genomach bakterii wyizolowanych zimą ze ścieku surowego (89,7%). Wiosną odnotowano wyższą częstość występowania przynajmniej dwóch genów u szczepów wyosobnionych ze ścieku oczyszczonego (60,0%) w stosunku do ścieku surowego (54,2%) i ścieku z komory napowietrzania (21,7%). W sezonie letnim, jesiennym i zimowym zaobserwowano wyższą częstość u szczepów wyosobnionych ze ścieku oczyszczonego (odpowiednio 68,9%, 76,5% i 75,0%) niż ze ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 68,1%, 60,0% i 66,7%). U szczepów wykazujących przynajmniej dwa geny β -laktamaz, cztery geny miał jeden szczep (3,8%) ze ścieku surowego w sezonie wiosennym, siedem szczepów (7,7%) w letnim, trzy (13,0%) w jesiennym i sześć (8,6%) w zimowym. W przypadku ścieku z komory napowietrzania, po cztery geny β -laktamaz miały trzy szczepy wyizolowane latem i pięć szczepów wyosobnionych zimą (odpowiednio 9,3% i 41,7%), natomiast w ścieku oczyszczonym latem, jesienią i zimą takich izolatów było odpowiednio siedem (16,6%), trzy (11,5%) i dwa (11,1%), przy czym jeden z nich miał pięciu różnych genów β -laktamaz i gen cefalosporynazy (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} i *bla*_{DHA}).



Rycina 39. Sezonowe zmiany częstości występowania szczepów wytwarzających ESBL z przynajmniej dwoma genami oporności na antybiotyki β -laktamowe u szczepów w zależności od miejsca poboru ścieku i pory roku.



*ŚS – ściek surowy,

KN – ściek z komory napowietrzania,

ŚÓ – ściek oczyszczony.

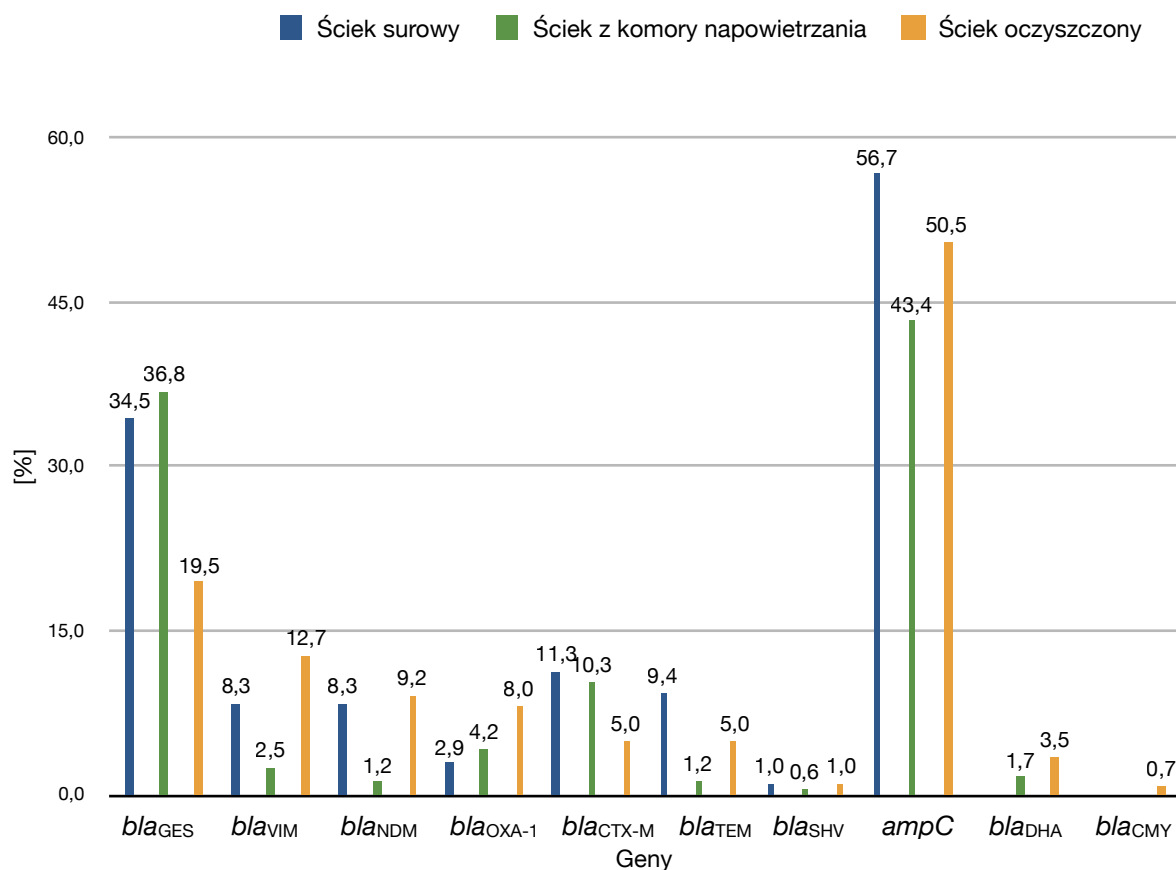
Rycina 40. Sezonowe zmiany częstości występowania genów β -laktamaz i cefalosporynazy AmpC u szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Tabela 19. Częstość występowania genów β -laktamaz, karbapenemaz i cefalosporynaz w genomach szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

	Czas poboru	Liczba szczepów	Częstość występowania genów [%]											
			<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>amp_C</i>	<i>bla_{APH}A</i>	<i>bla_{CMY}</i>		
Ściek surowy	I - marzec 2015	11	15,4	0	0	0	0	0	0	0	0	45,4	0	0
	II - maj 2015	2	100	50,0	50,0	0	0	0	0	0	0	50,0	0	0
	III - lipiec 2015	5	80	0	0	0	0	0	0	0	0	40,0	0	0
	IV - listopad 2015	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	66,7	0	0
	V - luty 2016	35	11,4	0	0	17,1	34,3	22,9	5,7	71,4	0	0	0	
	VI - lipiec 2016	3	0	0	0	0	33,3	33,3	0	66,7	0	0	0	
	Średnia	10	34,5	8,3	8,3	2,9	11,3	9,4	1,0	56,7	0	0		
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	12	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0	25,0	8,3	0
	II - maj 2015	2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	50,0	0	0
	III - lipiec 2015	NO*	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

		Częstość występowania genów [%]										
	Czas poboru	Liczba szczepów	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>amp_C</i>	<i>bla_{DHA}</i>	<i>bla_{CMY}</i>
Ściek z komory napowietrzania	IV - listopad 2015	16	6,3	12,5	0	6,3	0	0	0	43,8	0	0
	V - luty 2016	33	2,9	0	5,9	14,7	18,2	6,1	3,0	64,7	0	0
	VI - lipiec 2016	3	66,7	0	0	0	33,3	0	0	33,3	0	0
	Średnia	13	36,8	2,5	1,2	4,2	10,3	1,2	0,6	43,4	1,7	0
	I - marzec 2015	23	8,7	0	0	0	0	0	0	61,0	4,3	4,3
	II - maj 2015	6	16,7	50,0	10,0	0	0	0	0	16,7	0	0
Ściek oczyszczony	III - lipiec 2015	6	33,3	0	13,6	0	0	0	0	16,7	16,7	0
	IV - listopad 2015	5	40	20,0	5,6	0	0	0	0	80,0	0	0
	V - luty 2016	16	6,3	0	20,0	18,8	6,3	6,3	0	81,3	0	0
	VI - lipiec 2016	17	11,8	5,9	5,7	29,4	23,5	23,5	5,9	47,1	0	0
	Średnia	12	19,5	12,7	9,2	8,0	5,0	5,0	1,0	50,5	3,5	0,7

*NO – nie oznaczono.



Rycina 41. Średnia częstości występowania genów β -laktamaz, karbapenemaz i cefalosporynaz w genomach szczepów CPE wyizolowanych w trakcie wszystkich poborów ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziągłochy.

Szczegółowe wyniki częstości występowania genów *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *ampC*, *bla*_{DHA} i *bla*_{CMY} w genomach bakterii *Enterbacteriaceae* opornych na karbapenemy przedstawiono w tabeli 19 i rycinach 41 i 43. Nie wyosobniono izolatu z genem *bla*_{KPC} w żadnym z poborów.

Najczęściej występującym genem karbapenemaz był *bla*_{GES} (30,3%), kolejno *bla*_{VIM} (7,8%), *bla*_{NDM} (6,2%) i *bla*_{OXA-1} (5,0%). Najwyższą średnią częstość występowania genu *bla*_{GES}, wyższą niż w ścieku surowym (34,5%) i ścieku oczyszczonego (19,5%), odnotowano u izolatów ze ścieku z komory napowietrzania (36,8%) (Rycina 41). Na rycinie 43 przedstawiono sezonowe zmiany częstości występowania genu *bla*_{GES} u bakterii wyizolowanych ze ścieku na różnych etapach procesu oczyszczania. Wszystkie izolaty ze ścieku surowego i ścieku z komory napowietrzania pobierane wiosną, miały gen *bla*_{GES}. W

sezonie jesiennym zaobserwowano wyższą częstość występowania genu *bla_{GES}* u bakterii karbapenemoopornych wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (40,0%) w porównaniu ze ściekiem z komory napowietrzania (6,3%) i ściekiem surowym (0,0%).

W przypadku genu *bla_{VIM}*, najwyższą średnią częstość występowania u analizowanych szczepów CPE stwierdzono u bakterii ze ścieku oczyszczonego (12,7%), w porównaniu ze ściekiem surowym (8,3%) i z komory napowietrzania (2,5%) (Rycina 41). Połowa szczepów CPE (50,0%) wyizolowanych wiosną ze ścieku surowego i ścieku oczyszczonego miała gen *bla_{VIM}* (Rycina 43). W sezonie jesiennym zaobserwowano większą liczbę szczepów z genem *bla_{VIM}* w ścieku oczyszczonym (20,0%) w stosunku do ścieku z komory napowietrzania (12,5%). Natomiast latem szczepy z genem *bla_{VIM}* wyizolowano jedynie ze ścieku oczyszczonego z częstością wynoszącą 3,0%. Nie odnotowano szczepów CPE z genem *bla_{VIM}* w sezonie zimowym.

Najwyższą średnią częstość występowania genu *bla_{NDM}* u szczepów CPE stwierdzono w ścieku oczyszczonym (9,2%), następnie w ścieku surowym (8,3%) i ścieku z komory napowietrzania (1,2%) (Rycina 41). Połowa szczepów CPE (50,0%) wyizolowanych wiosną ze ścieku surowego miała gen *bla_{NDM}* (Rycina 43). W sezonie zimowym zaobserwowano większą liczbę szczepów z genem *bla_{NDM}* w ścieku oczyszczonym (12,5%) w stosunku do ścieku z komory napowietrzania (3,0%). Latem natomiast, szczepy z genem *bla_{NDM}* wyizolowano jedynie ze ścieku oczyszczonego z częstością wynoszącą 3,0%. Nie odnotowano szczepów CPE z genem *bla_{NDM}* w poborach jesiennych.

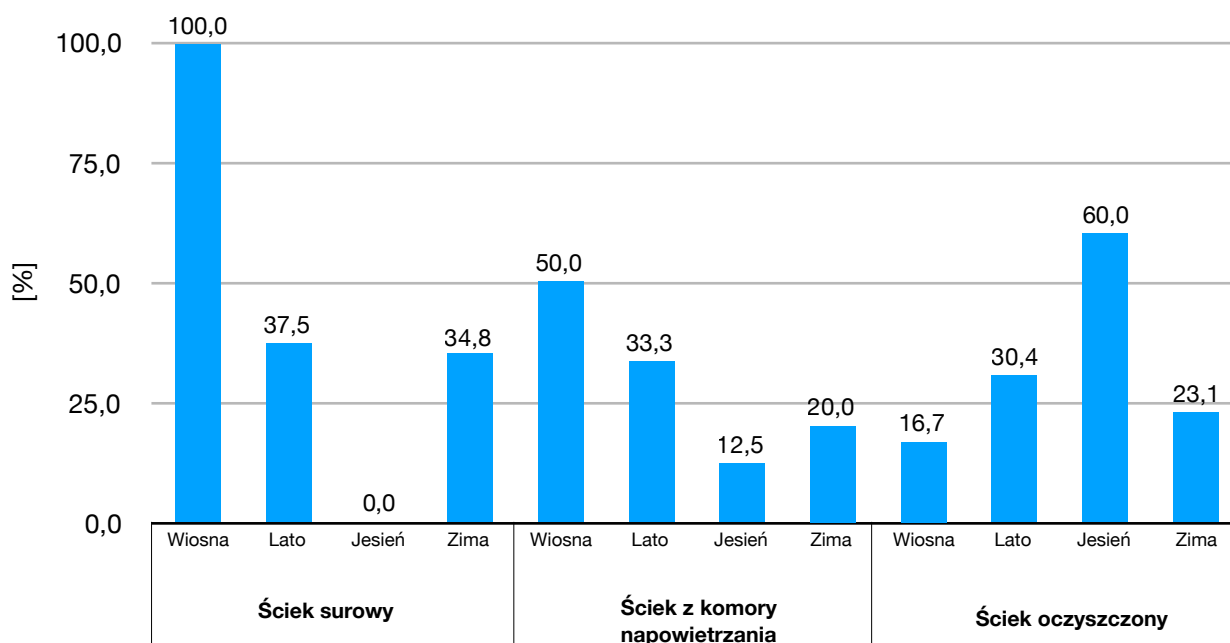
W przypadku genu *bla_{OXA-1}*, stwierdzono najwyższą średnią częstość jego występowania u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (8,0%), kolejno ze ścieku z komory napowietrzania (4,2%) i ścieku surowego (2,9%) (Rycina 41). Latem, szczepy z genem *bla_{OXA-1}* wyizolowano jedynie ze ścieku oczyszczonego z częstością wynoszącą 15,0%, natomiast jesienią, jedynie ze ścieku z komory napowietrzania z częstością wynoszącą 6,3% (Rycina 43). W sezonie zimowym zaobserwowano większą liczbę szczepów z genem *bla_{OXA-1}* w ścieku oczyszczonym (9,4%) niż w ścieku surowym i ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 8,6% i 7,4%). Nie odnotowano szczepów CPE z genem *bla_{OXA-1}* w sezonie wiosennym.

U szczepów opornych na karbapenemy, oprócz obecności genów karbapenemaz, oznaczono również występowanie genów warunkujących wytwarzanie ESBL oraz genów cefalosporynaz. W przypadku genów kodujących ESBL, u największej liczby szczepów (49,5%) stwierdzono obecność genu *bla*_{CTX-M}, następnie *bla*_{TEM} (8,1%) i *bla*_{SHV} (2,0%). Najwyższą średnią częstość występowania *bla*_{CTX-M} odnotowano w ścieku surowym, następnie w ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonym (odpowiednio 11,3%, 10,3% i 5,0%) (Rycina 41). Natomiast najwyższą średnią częstość występowania *bla*_{TEM} odnotowano w ścieku surowym (9,4%), a następnie w ścieku oczyszczonym (5,0%) i w ścieku z komory napowietrzania (1,2%) (Rycina 41). W przypadku genu *bla*_{SHV}, zwiększoną częstość odnotowano u szczepów ze ścieku surowego i ścieku oczyszczonego (1,0%) w stosunku do ścieku z komory napowietrzania (0,6%) (Rycina 41). W przypadku sezonowej analizy częstości, geny *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} i *bla*_{SHV} odnotowano u izolatów latem i zimą. Wyższą częstość występowania *bla*_{CTX-M} zaobserwowano u szczepów opornych na karbapenemy wyisobnionych w sezonie letnim ze ścieku z komory napowietrzania (33,3%) w porównaniu ze ściekiem surowym (16,7%) (Rycina 43). Natomiast w przypadku genu *bla*_{TEM}, zaobserwowano wyższą częstość występowania u szczepów wyizolowanych zimą ze ścieku oczyszczonego (3,2%) niż ze ścieku z komory napowietrzania (3,0%) (Rycina 43). Gen *bla*_{SHV} występował z najwyższą częstością u bakterii wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w sezonie letnim (3,0%) (Rycina 43).

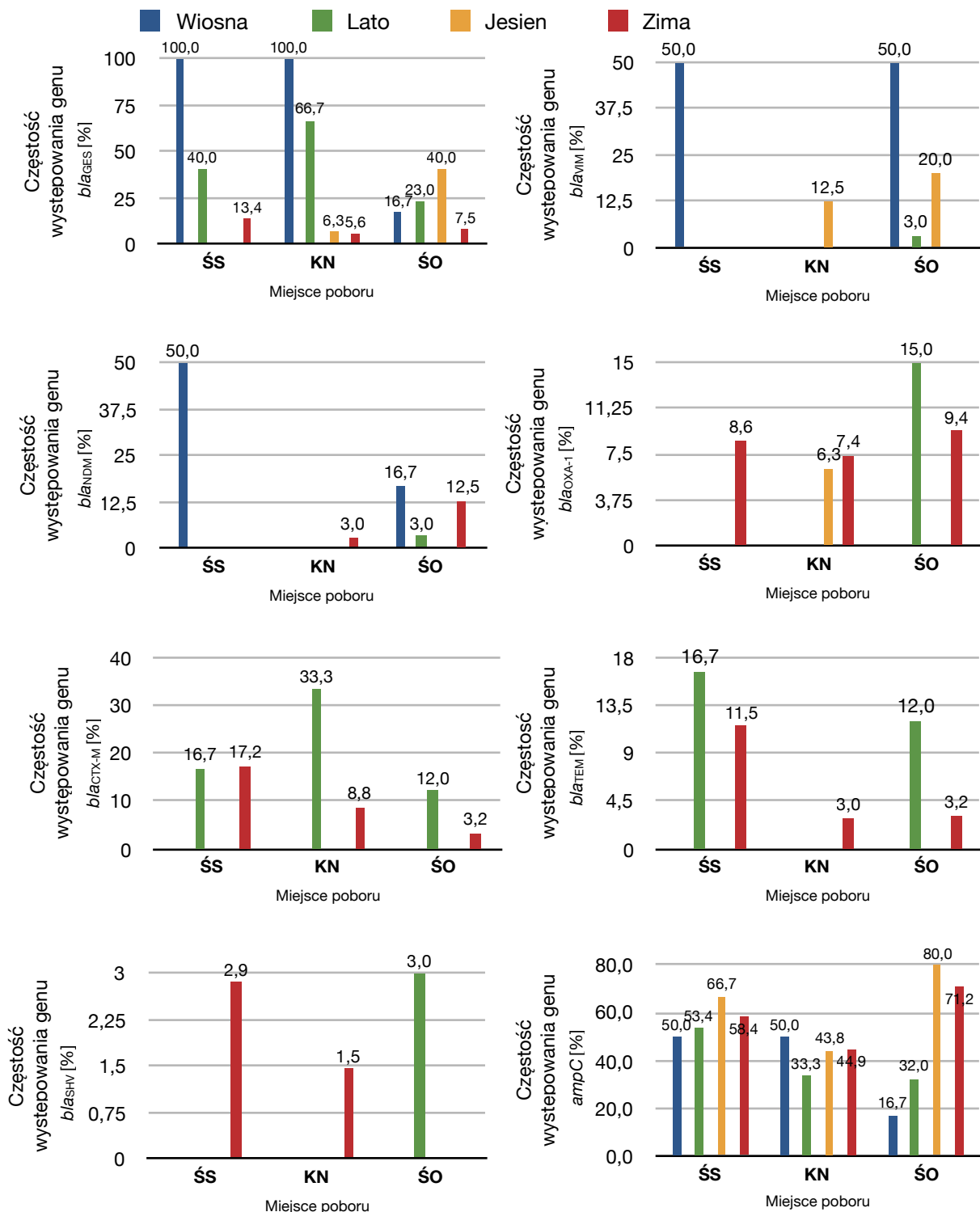
Średnia częstość występowania genu *ampC* wśród szczepów opornych na karbapenemy wynosiła 56,7% u izolatów ze ścieku surowego, 50,5% u szczepów ze ścieku oczyszczonego, a 43,4% ze ścieku z komory napowietrzania (Rycina 41). Jesienią i zimą zaobserwowano wyższą częstość występowania *ampC* u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (odpowiednio 80,0% i 71,2%) w stosunku do ścieku surowego (odpowiednio 66,7% i 58,4%) i ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 43,8% i 44,9%) (Rycina 43).

Geny cefalosporynaz *bla*_{DHA} i *bla*_{CMY} występowały z niższą częstością. Z najwyższą częstością wynoszącą 3,5% *bla*_{DHA} odnotowano u bakterii wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego i ze ścieku z komory napowietrzania (1,7%) (Rycina 41). Nie stwierdzono go u szczepów wyizolowanych ze ścieku surowego. Gen *bla*_{CMY} odnotowano jedynie u izolatów ze ścieku oczyszczonego (0,7%) (Rycina 41).

Częstość występowania dwóch lub więcej genów karbapenemaz, β -laktamaz i cefalosporynaz obecnych w genomach bakterii grupy coli opornych na karbapenemy stwierdzono u 54 (27,3%) szczepów (Rycina 42). W sezonie wiosennym, wszystkie szczepy ze ścieku surowego miały dwa lub więcej genów w genomie, a w ścieku z komory napowietrzania odnotowano o połowę niższą częstość CPE z więcej niż dwoma genami (50,0%). Jesienią odnotowano wzrost częstości przynajmniej dwóch genów u szczepów wyisobnionych ze ścieku oczyszczonego (60,0%) w stosunku do ścieku z komory napowietrzania (12,5%) i ścieku surowego (0,0%). W grupie szczepów wykazujących przynajmniej dwa geny oporności, dwa (12,5%) wyizolowane zimą ze ścieku surowego miały cztery geny oporności (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-1} i *ampC*) i dwa (22,2%) szczepy ze ścieku z komory napowietrzania, również w tym sezonie (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} i *ampC*).



Rycina 42. Częstość występowania szczepów CPE z przynajmniej dwoma genami oporności na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe u szczepów w zależności od miejsca poboru ścieku i pory roku.



*ŚS – ściek surowy,

KN – ściek z komory napowietrzania,

ŚÓ – ściek oczyszczony.

Rycina 43. Częstość występowania genów β -laktamaz, karbapenemaz i cefalosporynaz AmpC u szczepów CPE wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

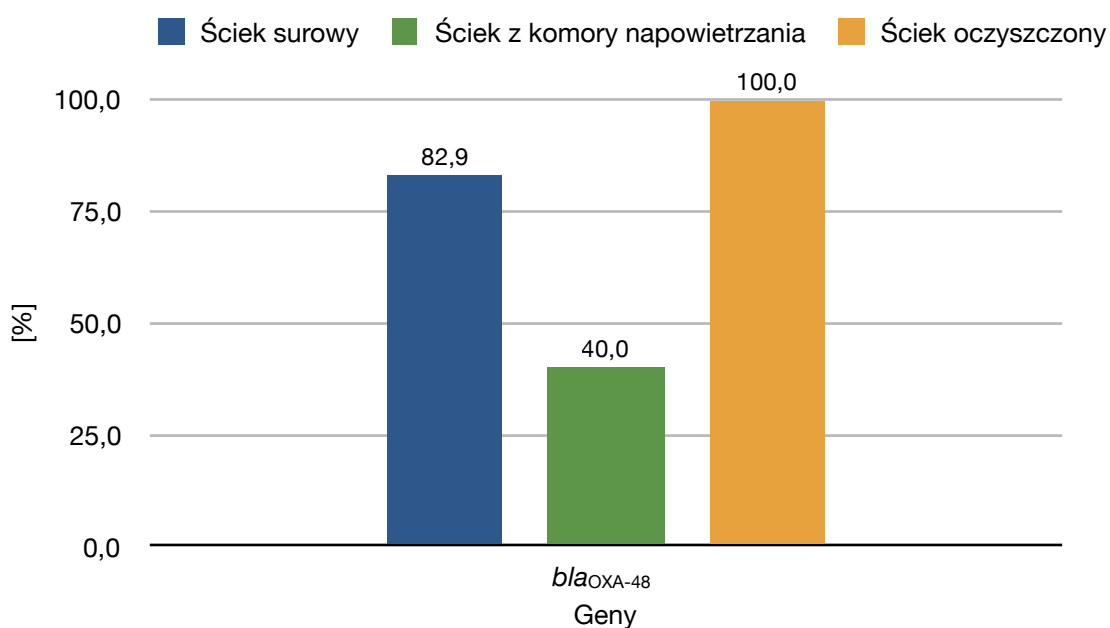
Tabela 20. Częstość występowania genów β -laktamaz i karbapenemaz w genomach szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

	Czas poboru	Liczba szczepów	Częstość występowania genów [%]		
			<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{NDM}
Ściek surowy	I - marzec 2015	20	50,0	0	30,0
	II - maj 2015	7	100,0	0	0
	III - lipiec 2015	8	100,0	0	0
	IV - listopad 2015	4	100,0	0	0
	V - luty 2016	NO*	NO	NO	NO
	VI - lipiec 2016	14	64,3	7,1	14,3
	Średnia	11	82,9	1,4	8,9
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	NO	NO	NO	NO
	II - maj 2015	NO	NO	NO	NO
	III - lipiec 2015	NO	NO	NO	NO
	IV - listopad 2015	NO	NO	NO	NO
	V - luty 2016	NO	NO	NO	NO
	VI - lipiec 2016	5	40,0	0	0
	Średnia	5	40,0	0	0
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	NO	NO	NO	NO
	II - maj 2015	2	100,0	0	0
	III - lipiec 2015	2	100,0	0	0
	IV - listopad 2015	4	100,0	0	0
	V - luty 2016	NO	NO	NO	NO
	VI - lipiec 2016	1	100,0	0	0
	Średnia	2	100,0	0	0

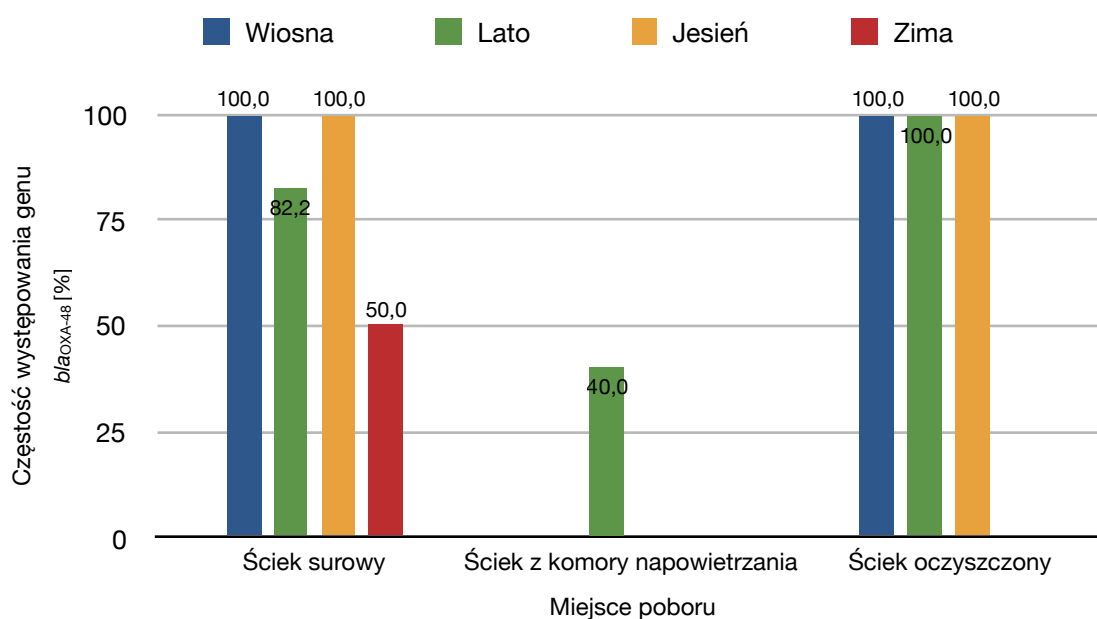
*NO – nie oznaczono.

Częstości występowania genów *bla_{OXA-48}*, *bla_{GES}* i *bla_{NDM}* w genomach bakterii *Enterbacteriaceae* typu OXA-48 przedstawiono w tabeli 20, rycinie 44 i 45. Nie stwierdzono występowania genów *bla_{VIM}* i *bla_{OXA-1}*.

Najczęściej, choć nie w 100%, występującym genem karbapenemaz wśród analizowanych szczepów był gen *bla_{OXA-48}*, następnie *bla_{GES}* i *bla_{NDM}*, przy czym dwa ostatnie geny stwierdzono jedynie u szczepów izolowanych ze ścieku surowego – *bla_{GES}* w sezonie letnim (1,4%), *bla_{NDM}* w sezonie letnim i zimowym (8,9%). U izolatów ze ścieku surowego analizowanych zimą, 20,0% szczepów miało dwa geny kodujące karbapenemazy (*bla_{OXA-48}* i *bla_{NDM}*), natomiast latem, dwa geny miało 10,0% szczepów (jeden szczep miał gen *bla_{OXA-48}* i *bla_{NDM}* oraz jeden szczep miał gen *bla_{OXA-48}* i *bla_{GES}*).



Rycina 44. Średnia częstość występowania genu *bla_{OXA-48}* w genomach szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.



Rycina 45. Sezonowe zmiany częstości występowania genu *bla*_{OXA-48} u szczepów CPE typu OXA-48 wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

4.16. Sekwencjonowanie produktów PCR

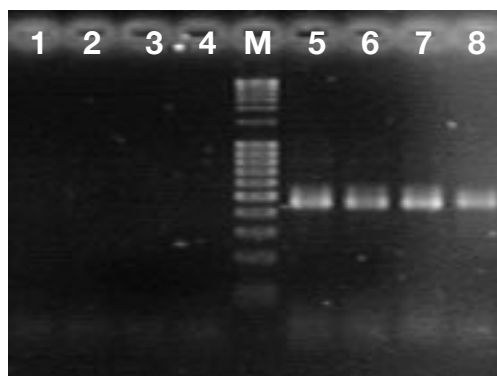
Produkty amplifikacji analizowanych genów β -laktamaz, karbapenemaz i cefalosporynaz poddano sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje nukleotydowe zgodne były z sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie GenBank. Dominującym genem β -laktamaz był *bla*_{CTX-M}. W obrębie grupy genów *bla*_{CTX-M} najczęściej występującym wariantem był gen *bla*_{CTX-M-15} (KY640562.1) (Tabela 21). Ponadto stwierdzono obecność wariantów genów: *bla*_{TEM-1} (AF188200.1), *bla*_{SHV-11} (MF414190.1), *bla*_{OXA-1} (NG_049392.1), *bla*_{GES-1} (AF156486.1) i *bla*_{GES-5} (DQ902344.1), *ampC* (HQ419012.1), *bla*_{DHA-9} (KY115612.1) i *bla*_{CMY-2} (NG_048814.1) (Tabela 21). U szczepów wytwarzających karbapenemazy stwierdzono najczęściej obecność wariantów genów: *bla*_{VIM-1} (KU665641.1), *bla*_{NDM-1} (MF774796.1) i *bla*_{OXA-48} (KY862014.1) (Tabela 21). Na ich podstawie możliwe było zidentyfikowanie pozostałych produktów reakcji PCR. Zidentyfikowane dzięki sekwencjonowaniu produkty przedstawiono na rycinie 53.

Tabela 21. Warianty genów β -laktamaz, karbapenemaz i cefalosporynaz uzyskane w wyniku sekwencjonowania.

Warianty genów								
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{CMY}
<i>bla</i> _{CTX-M-1} , -3, -12, -15, -36, -169	<i>bla</i> _{TEM-1} , -2, -3, -20	<i>bla</i> _{SHV-1} , -11, -12	<i>bla</i> _{OXA-1} , -5	<i>bla</i> _{GES-1} , -5, -7, -11, -14	<i>bla</i> _{VIM-1} , -4	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{DHA-1} , -9	<i>bla</i> _{CMY-2}

4.17. Oznaczenie liczby kopii genów w metagenomowym DNA

W celu wyeliminowania wpływu inhibitorów i uzyskania produktu w reakcji qPCR, wykonano rozcieńczenia metagenomowego DNA i przeprowadzono reakcje amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA w reakcji PCR. Produkty tej reakcji uzyskano przy 20-krotnym rozcieńczeniu metagenomowego DNA wyizolowanego ze ścieku surowego i oczyszczonego i 80-krotnym ze ścieku z komory napowietrzania. Wyniki rozdziału wybranych prób nierozcieńczonego i rozcieńczonego metagenomowego DNA ze ścieku surowego 16S rRNA przedstawiono na rycinie 46.

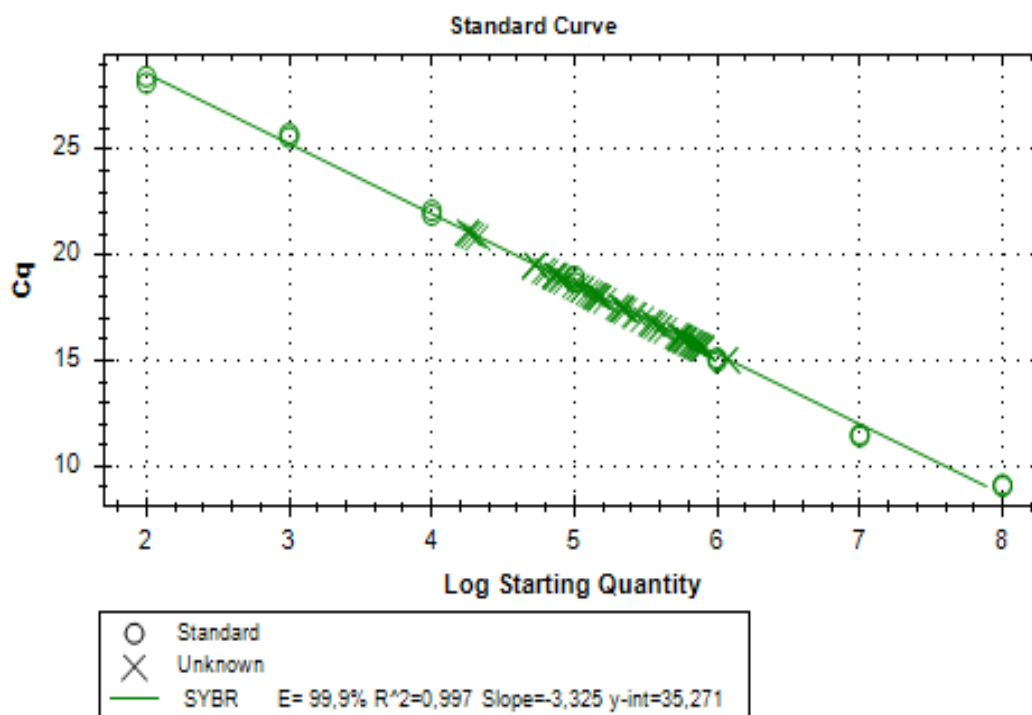


Rycina 46. Rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA o wielkości 464 pz dla ośmiu próbek metagenomowego DNA uzyskanego ze ścieku surowego z V poboru. Ścieżki: 1-4 – nierozcieńczone metagenomowe DNA ze ścieku surowego, 5-8 – metagenomowe DNA ze ścieku surowego rozcieńczone 20-krotnie. M –

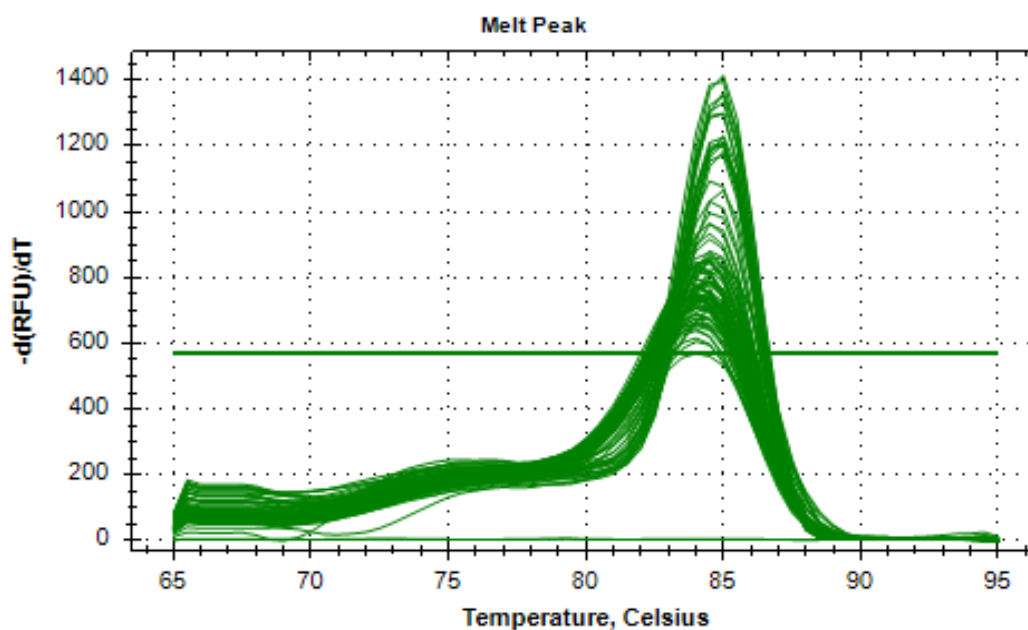
wzorzec mas (od dołu: 100 pz, 200 pz, 300 pz, 400 pz, 500 pz, 600 pz, 700 pz, 800 pz, 900 pz, 1000 pz i 1500 pz).

W celu określenia liczby kopii genów oporności na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydowe metodą qPCR w metagenomowym DNA przygotowywano krzywe standardowe stosując serię rozcieńczeń liniowego fragmentu genu *intI1* oraz plazmidowego DNA z wklonowanym fragmentem badanego genu: *intI1KL*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{GES-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA* i *mecA*. Specyficzność reakcji oceniano na podstawie analizy krzywej topnienia. Pojedynczy pik krzywej topnienia wskazuje na obecność specyficznego produktu, ponieważ każdy dwuniciowy odcinek DNA ma charakterystyczną dla siebie temperaturę topnienia.

Na rycinach 47 i 48 przedstawiono krzywą standardową oraz krzywą topnienia dla reakcji amplifikacji metodą qPCR genu 16S rRNA.

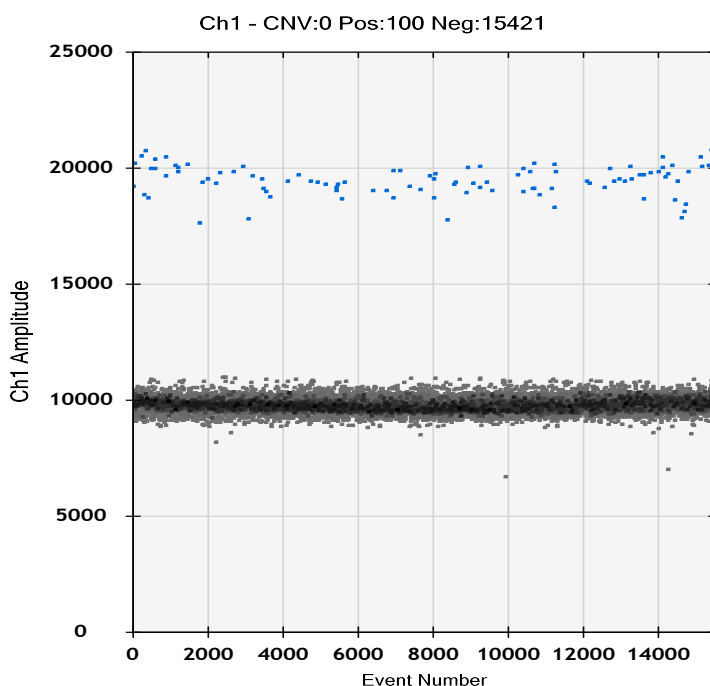


Rycina 47. Krzywa standardowa dla reakcji amplifikacji metodą qPCR genu 16S rRNA.



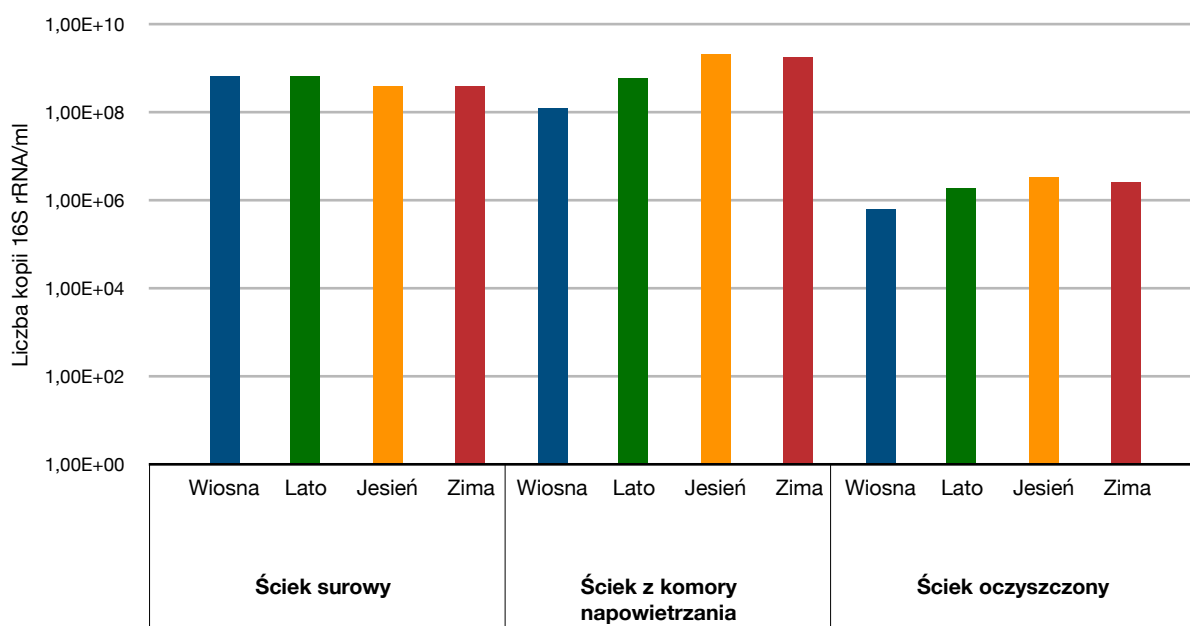
Rycina 48. Krzywa topnienia produktu amplifikacji genu kodującego 16S rRNA metodą qPCR.

Specyficzność reakcji ddPCR oceniano na podstawie analizy bezwzględnej liczby kropli w próbce, w których znajduje się zamplifikowany fragment badanego genu (krople pozytywne) i pozostałych (krople negatywne), mierzonej w oparciu o poziom fluorescencji. Wyraźnie oddzielone krople pozytywne (kolor niebieski) powyżej progowej intensywności, wskazują na obecność specyficznego produktu (Rycina 49).



Rycina 49. Analiza ilościowa genu *bla_{NDM}* metodą ddPCR w metagenomowym DNA wyizolowanym ze ścieku surowego w trakcie poboru IV. Kolorem niebieskim oznaczono pozytywne krople w próbce.

Liczba kopii genu 16S rRNA w metagenomowym DNA mieściła się w przedziałach od $1,9 \times 10^7$ do $9,2 \times 10^8$ kopii/ml w ścieku surowym, od $1,0 \times 10^8$ do $4,1 \times 10^9$ kopii/ml w ścieku z komory napowietrzania oraz od $5,3 \times 10^5$ do $5,4 \times 10^6$ kopii/ml w ścieku oczyszczonym. Szczegółowe dane dotyczące liczby kopii genu 16S rRNA przedstawiono w tabeli 22 i na rycinie 50. Liczby kopii genów *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA* i *mecA* oznaczone metodą qPCR oraz *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* oznaczone metodą ddPCR przedstawiono w tabeli 22 i na rycinie 51.

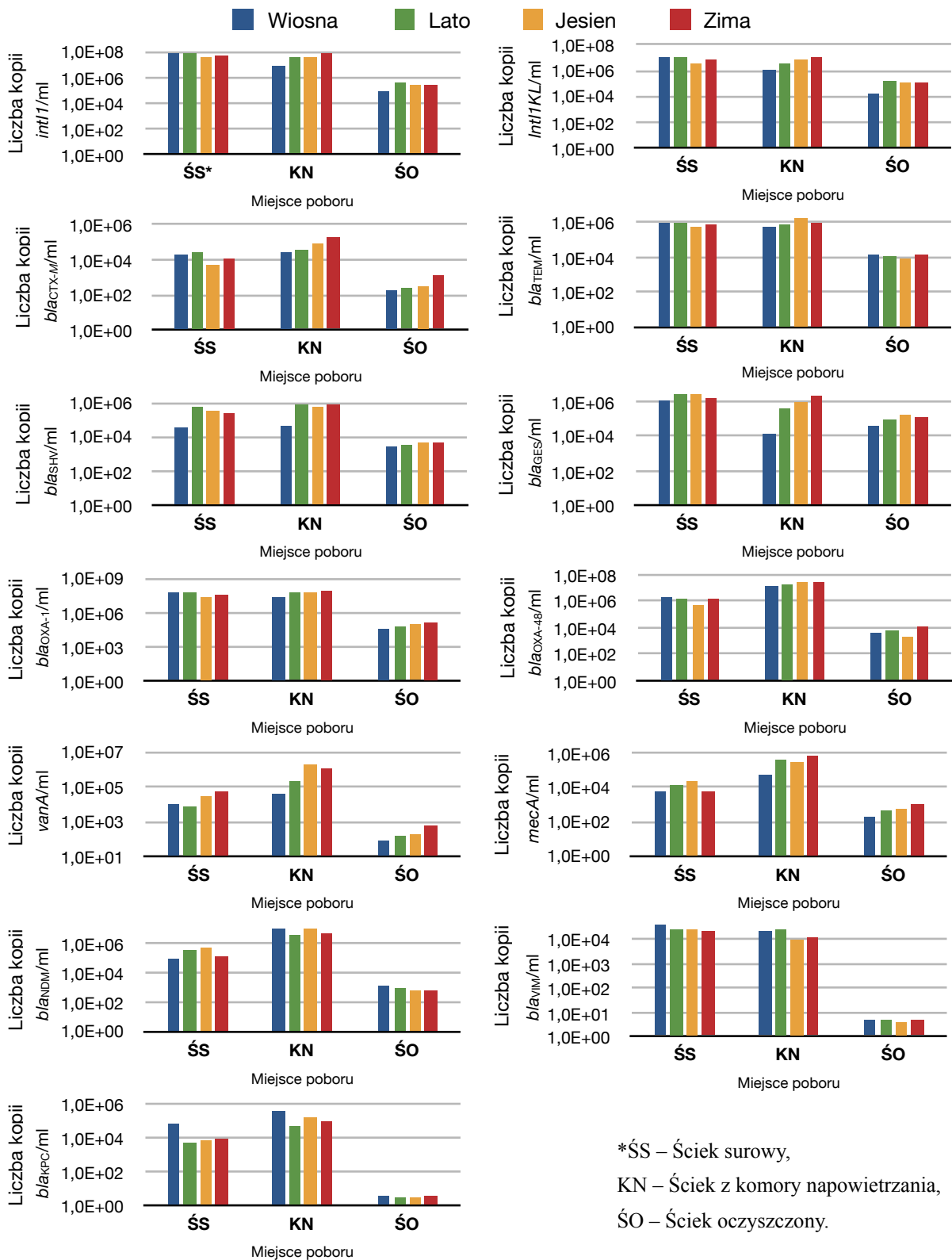


Rycina 50. Liczba kopii genu 16S rRNA w metagenomie ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Liczba kopii genu *intI1* w metagenomie ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego mieściła się kolejno w przedziałach: od $2,1 \times 10^6$ do $1,2 \times 10^8$ kopii/ml, od $7,1 \times 10^6$ do $1,4 \times 10^8$ kopii/ml oraz od $7,2 \times 10^4$ do $6,5 \times 10^5$ kopii/ml. Zakresy liczby kopii genu *intI1KL* wynosiły odpowiednio: $1,2 \times 10^5$ do $1,6 \times 10^7$ kopii/ml, od $9,4 \times 10^5$ do $1,1 \times 10^7$ kopii/ml oraz od $1,7 \times 10^4$ do $2,4 \times 10^5$ kopii/ml. Liczba kopii genu *bla_{CTX-M}* w metagenomie ścieku surowego mieściła się w przedziale od $9,3 \times 10^2$ do $3,7 \times 10^4$, od $2,8 \times 10^4$ do $3,8 \times 10^5$ kopii/ml w ścieku z komory napowietrzania oraz od $1,5 \times 10^2$ do $3,3 \times 10^3$ kopii/ml w metagenomie ścieku oczyszczonego. Zakresy liczby kopii genu *bla_{TEM}* wynosiły: od $6,3 \times 10^4$ do $1,7 \times 10^6$ kopii/ml w ścieku surowym, $5,3 \times 10^5$ do $2,1 \times 10^6$ kopii/ml w ścieku z komory napowietrzania oraz od $4,1 \times 10^3$ do $2,8 \times 10^4$ kopii/ml w ścieku oczyszczonym. Liczba kopii genu *bla_{GES}* mieściła się odpowiednio w przedziałach: od $2,3 \times 10^5$ do $4,7 \times 10^6$ kopii/ml, od $1,4 \times 10^4$ do $3,4 \times 10^6$ oraz od $3,6 \times 10^4$ do $2,5 \times 10^5$ kopii/ml. Zakresy liczby kopii genu *bla_{SHV}* wynosiły odpowiednio: od $1,8 \times 10^4$ do $1,1 \times 10^6$ kopii/ml, od $3,5 \times 10^2$ do $1,4 \times 10^6$ kopii/ml oraz od $2,4 \times 10^3$ do $6,0 \times 10^3$ kopii/ml. Liczba kopii genu *bla_{OXA-1}* mieściła się kolejno w przedziałach: od $2,7 \times 10^6$ do $8,3 \times 10^7$ kopii/ml, od $2,6 \times 10^7$ do $1,3 \times 10^8$ kopii/ml oraz od $2,9 \times 10^4$ do $3,1 \times 10^5$ kopii/ml. Natomiast zakresy liczby kopii

geny *bla*_{OXA-48} wynosiły odpowiednio: $1,2 \times 10^5$ do $3,6 \times 10^6$ kopii/ml, $3,7 \times 10^6$ do $5,7 \times 10^7$ kopii/ml oraz od $1,6 \times 10^3$ do $1,6 \times 10^4$ kopii/ml. Liczba kopii genu *vanA* w metagenomie ścieku surowego mieściła się w przedziale od $5,7 \times 10^3$ do $9,3 \times 10^4$ kopii/ml, od $3,5 \times 10^4$ do $4,5 \times 10^6$ kopii/ml ścieku z komory napowietrzania oraz od $4,9 \times 10^1$ do $7,0 \times 10^2$ kopii/ml ścieku oczyszczonego. Zakresy liczby kopii genu *mecA* wynosiły odpowiednio: $3,1 \times 10^3$ do $3,7 \times 10^4$ kopii/ml, $4,8 \times 10^4$ do $1,7 \times 10^6$ kopii/ml oraz od $1,8 \times 10^2$ do $1,7 \times 10^3$ kopii/ml. Natomiast liczba kopii genu *bla*_{NDM} w metagenomie ścieku surowego, oczyszczonego, ścieku z komory napowietrzania oznaczonego metodą ddPCR mieściła się odpowiednio w przedziałach: od $1,7 \times 10^4$ do $6,9 \times 10^5$ kopii/ml, od $4,8 \times 10^5$ do $4,0 \times 10^7$ kopii/ml oraz od 2,0 do $1,4 \times 10^3$ kopii/ml. Zakresy liczby kopii genu *bla*_{VIM} wynosiły odpowiednio: od $1,1 \times 10^4$ do $4,3 \times 10^4$ kopii/ml, $4,4 \times 10^3$ do $2,5 \times 10^4$ kopii/ml oraz od 3,0 do 7,0 kopii/ml. Liczba kopii genu *bla*_{KPC} mieściła się odpowiednio w przedziałach: od $4,0 \times 10^3$ do $6,6 \times 10^4$ kopii/ml, od $3,5 \times 10^4$ do $3,6 \times 10^5$ kopii/ml oraz od 3,0 do 4,0 kopii/ml.

Odnotowano wzrost liczby kopii genu *intI1* w metagenomie ścieku z komory napowietrzania w stosunku do liczby kopii genu w DNA metagenomowym ścieku surowego w sezonie jesiennym. Podobne wyniki uzyskano dla genu *intI1KL* i *bla*_{TEM} jesienią i zimą, *bla*_{OXA-1} latem, jesienią i zimą, *bla*_{GES} zimą. Natomiast w przypadku genów *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *vanA*, *mecA*, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} i *bla*_{KPC}, wzrost liczby kopii genów w metagenomie ścieku z komory napowietrzania w stosunku do liczby kopii genów w DNA metagenomowym ścieku surowego występował we wszystkich sezonach. Liczba kopii genu *bla*_{VIM} latem była taka sama zarówno w metagenomie ścieku z komory napowietrzania jak i ścieku surowego (Rycina 51).



Rycina 51. Liczba kopii genów *int11*, *int11K/L*, *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*, *blaGES*, *blaOXA-1*, *blaOXA48*, *vanA* i *mecA* oznaczona metodą qPCR oraz *blaNDM*, *blaVIM*, *blaKPC* oznaczona metodą ddPCR w metagenomie ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Tabela 22. Liczba kopii genów 16S rRNA, *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA* i *mecA* oznaczona metodą qPCR oraz *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* oznaczona metodą ddPCR w ml metagenomu ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Czas poboru	16s rRNA	Liczba kopii genów/ml												
		<i>intI1</i>	<i>intI1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>
I - marzec 2015	5,0×10 ⁸	1,2×10 ⁸	1,6×10 ⁷	1,9×10 ⁴	1,7×10 ⁶	1,5×10 ⁶	2,8×10 ⁴	8,3×10 ⁷	3,6×10 ⁶	2,6×10 ⁵	1,1×10 ⁴	6,0×10 ³	3,9×10 ⁴	5,9×10 ³
II - maj 2015	6,6×10 ⁸	7,2×10 ⁷	9,9×10 ⁶	2,0×10 ⁴	9,3×10 ⁵	1,1×10 ⁶	3,1×10 ⁴	4,7×10 ⁷	2,3×10 ⁶	8,0×10 ⁴	4,3×10 ⁴	6,6×10 ⁴	9,7×10 ³	5,4×10 ³
III - lipiec 2015	5,2×10 ⁸	1,1×10 ⁸	1,3×10 ⁷	3,7×10 ⁴	1,2×10 ⁶	1,7×10 ⁶	8,6×10 ⁴	6,9×10 ⁷	5,0×10 ⁵	1,5×10 ⁵	1,5×10 ⁴	8,0×10 ³	5,7×10 ³	9,2×10 ³
IV - listopad 2015	2,7×10 ⁸	3,7×10 ⁷	4,0×10 ⁶	2,3×10 ³	4,5×10 ⁵	1,3×10 ⁶	1,8×10 ⁴	1,9×10 ⁷	5,5×10 ⁵	6,9×10 ⁵	3,6×10 ⁴	6,7×10 ³	2,3×10 ⁴	3,6×10 ³
V - luty 2016	7,2×10 ⁸	4,0×10 ⁷	7,0×10 ⁶	1,8×10 ⁴	6,3×10 ⁵	2,5×10 ⁶	5,4×10 ⁵	2,7×10 ⁷	2,5×10 ⁵	1,7×10 ⁴	2,6×10 ⁴	1,3×10 ⁴	1,5×10 ⁴	7,1×10 ³
VI - lipiec 2016	9,2×10 ⁸	5,6×10 ⁷	8,1×10 ⁶	1,0×10 ⁴	6,8×10 ⁵	3,9×10 ⁶	1,1×10 ⁶	3,5×10 ⁷	2,2×10 ⁶	4,7×10 ⁵	3,5×10 ⁴	4,0×10 ³	1,1×10 ⁴	2,0×10 ⁴
VII - listopad 2016	5,5×10 ⁸	2,2×10 ⁷	2,5×10 ⁶	7,7×10 ³	5,4×10 ⁵	4,7×10 ⁶	5,8×10 ⁵	3,0×10 ⁷	3,3×10 ⁵	1,5×10 ⁵	1,9×10 ⁴	9,3×10 ³	3,0×10 ⁴	3,7×10 ⁴
VIII - styczeń 2017	1,9×10 ⁷	2,1×10 ⁶	1,2×10 ⁵	9,3×10 ²	6,3×10 ⁴	2,3×10 ⁵	9,8×10 ⁴	2,7×10 ⁶	1,2×10 ⁵	8,0×10 ⁴	2,3×10 ⁴	6,0×10 ³	9,3×10 ⁴	3,1×10 ³
Średnia ±SD	5,2×10 ⁸ ±2,8×10 ⁸	5,7×10 ⁷ ±4,1×10 ⁷	7,5×10 ⁶ ±5,2×10 ⁶	1,4×10 ⁴ ±1,2×10 ⁴	7,8×10 ⁵ ±5,1×10 ⁵	2,1×10 ⁶ ±1,5×10 ⁶	3,1×10 ⁵ ±4,0×10 ⁵	3,9×10 ⁷ ±2,6×10 ⁷	1,2×10 ⁶ ±1,3×10 ⁶	2,4×10 ⁵ ±2,3×10 ⁵	2,6×10 ⁴ ±1,1×10 ⁴	1,5×10 ⁴ ±2,1×10 ⁴	2,8×10 ⁴ ±2,9×10 ⁴	1,1×10 ⁴ ±1,2×10 ⁴

		Liczba kopii genów/ml													
Czas poboru	16s rRNA	<i>int11</i>	<i>int11KL</i>	<i>blactx-M</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaGES</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaOXA-48</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	
Ściek z komory napowietrzania	I - marzec 2015	9,4×10 ⁸	1,4×10 ⁸	8,7×10 ⁶	5,8×10 ⁴	8,6×10 ⁵	3,4×10 ⁶	3,5×10 ⁴	1,3×10 ⁸	6,2×10 ⁶	5,3×10 ⁶	3,5×10 ⁴	2,1×10 ⁵	4,3×10 ⁵	
	II - maj 2015	1,3×10 ⁸	7,1×10 ⁶	9,4×10 ⁵	2,8×10 ⁴	5,3×10 ⁵	1,4×10 ⁴	4,1×10 ⁴	2,6×10 ⁷	1,3×10 ⁷	8,2×10 ⁶	3,6×10 ⁵	4,2×10 ⁴	4,8×10 ⁴	
	III - lipiec 2015	3,4×10 ⁸	4,6×10 ⁷	2,9×10 ⁶	4,5×10 ⁴	8,6×10 ⁵	1,6×10 ⁵	4,0×10 ⁴	5,4×10 ⁷	3,7×10 ⁶	4,8×10 ⁵	4,3×10 ⁴	6,2×10 ⁴	4,2×10 ⁵	
	IV - listopad 2015	2,6×10 ⁸	3,6×10 ⁷	3,1×10 ⁶	6,2×10 ⁴	9,1×10 ⁵	2,5×10 ⁵	3,5×10 ⁴	3,0×10 ⁷	1,2×10 ⁷	4,0×10 ⁷	1,9×10 ⁵	3,5×10 ⁴	2,6×10 ⁵	
	V - luty 2016	7,4×10 ⁸	1,1×10 ⁸	8,2×10 ⁶	3,8×10 ⁵	1,1×10 ⁶	8,2×10 ⁵	1,4×10 ⁶	7,3×10 ⁷	6,5×10 ⁶	4,8×10 ⁶	6,0×10 ⁴	7,1×10 ⁴	2,5×10 ⁵	
	VI - lipiec 2016	8,0×10 ⁸	2,1×10 ⁷	2,5×10 ⁶	3,3×10 ⁴	7,3×10 ⁵	5,7×10 ⁵	1,3×10 ⁶	5,9×10 ⁷	3,7×10 ⁷	5,8×10 ⁶	6,7×10 ⁴	3,9×10 ⁵	3,4×10 ⁵	
	VII - listopad 2016	4,1×10 ⁹	4,7×10 ⁷	8,5×10 ⁶	8,0×10 ⁴	2,1×10 ⁶	1,5×10 ⁶	1,2×10 ⁶	7,9×10 ⁷	4,0×10 ⁷	4,3×10 ⁶	1,4×10 ⁴	1,0×10 ⁵	4,5×10 ⁶	4,0×10 ⁵
	VIII - styczeń 2017	1,0×10 ⁹	4,1×10 ⁷	1,1×10 ⁷	1,8×10 ⁵	1,2×10 ⁶	1,6×10 ⁶	1,4×10 ⁶	9,8×10 ⁷	5,7×10 ⁷	2,9×10 ⁶	9,3×10 ³	1,6×10 ⁵	3,0×10 ⁶	1,7×10 ⁶
	Średnia ±SD	1,0×10 ⁹ ±1,3×10 ⁹	5,6×10 ⁷ ±4,5×10 ⁷	5,7×10 ⁶ ±3,7×10 ⁶	1,1×10 ⁵ ±1,2×10 ⁵	1,0×10 ⁶ ±4,7×10 ⁵	1,0×10 ⁶ ±1,1×10 ⁶	6,8×10 ⁵ ±6,9×10 ⁵	6,9×10 ⁵ ±3,6×10 ⁵	6,9×10 ⁷ ±3,6×10 ⁷	2,2×10 ⁷ ±2,0×10 ⁷	9,0×10 ⁶ ±1,3×10 ⁷	1,3×10 ⁵ ±1,1×10 ⁵	1,0×10 ⁶ ±1,7×10 ⁶	4,8×10 ⁵ ±4,9×10 ⁵
	Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	1,9×10 ⁶	1,5×10 ⁵	3,4×10 ⁴	3,3×10 ³	8,0×10 ³	7,0×10 ⁴	2,9×10 ³	9,1×10 ⁴	1,6×10 ⁴	1,0×10 ³	0,3×10 ¹	6,5×10 ²	8,8×10 ²
II - maj 2015		6,4×10 ⁵	7,2×10 ⁴	1,7×10 ⁴	1,9×10 ²	1,3×10 ⁴	3,6×10 ⁴	2,4×10 ³	4,5×10 ⁴	3,4×10 ³	1,2×10 ³	0,4×10 ¹	9,1×10 ¹	1,8×10 ²	

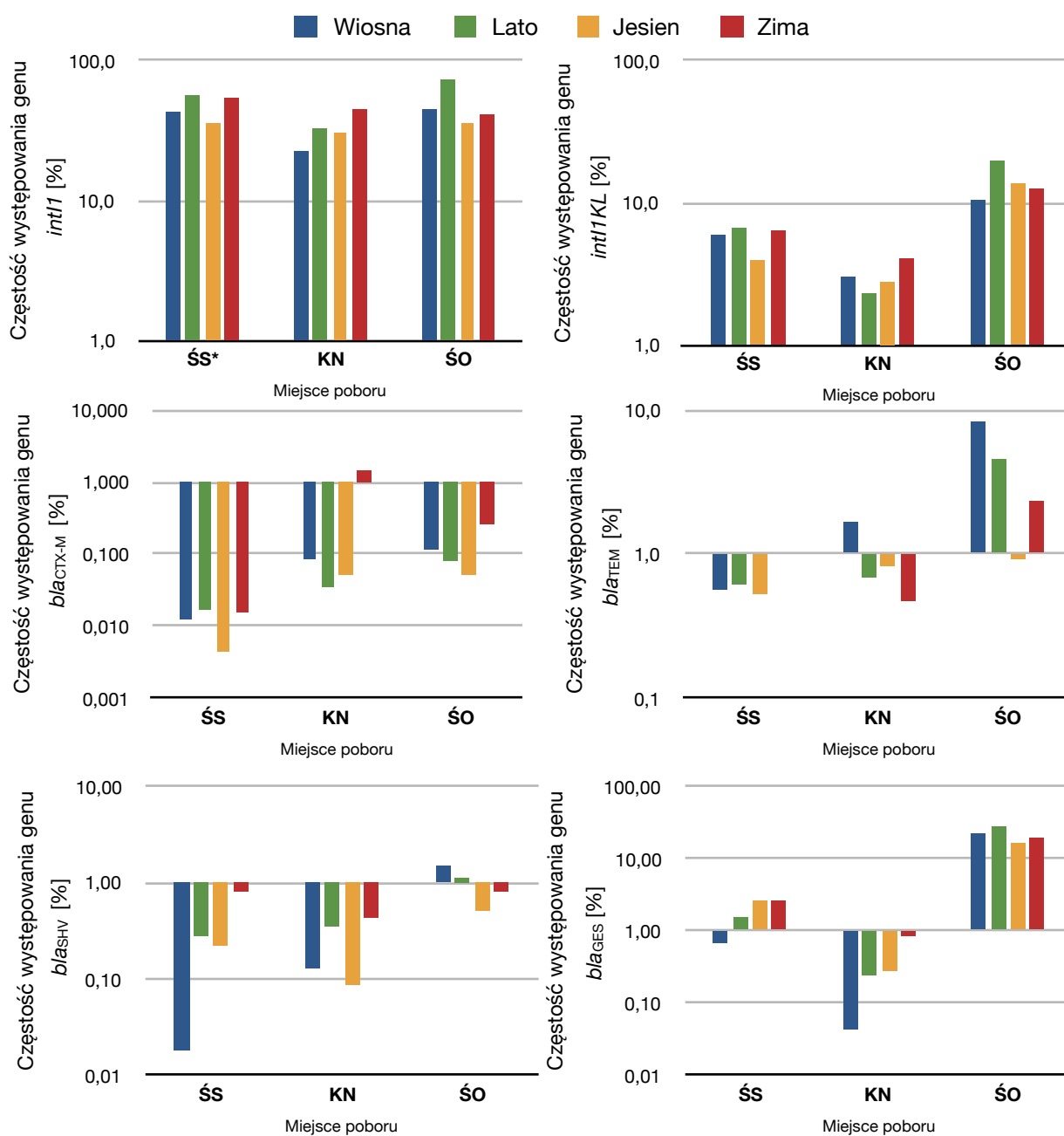
		Liczba kopii genów/ml													
Czas poboru	16s rRNA	<i>int11</i>	<i>int11KL</i>	<i>blactx-M</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blages</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaOXA-48</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	
III - lipiec 2015	5,3×10 ⁵	1,4×10 ⁵	1,7×10 ⁴	1,7×10 ²	1,1×10 ⁴	5,3×10 ⁴	2,5×10 ³	2,9×10 ⁴	3,0×10 ³	0,2×10 ¹	0,5×10 ¹	0,4×10 ¹	4,9×10 ¹	2,0×10 ²	
IV - listopad 2015	1,9×10 ⁶	2,1×10 ⁵	7,9×10 ⁴	3,8×10 ²	4,1×10 ³	8,3×10 ⁴	3,1×10 ³	9,8×10 ⁴	2,9×10 ³	0,5×10 ¹	0,3×10 ¹	0,3×10 ¹	9,5×10 ¹	2,5×10 ²	
V - luty 2016	4,8×10 ⁶	6,5×10 ⁵	2,2×10 ⁵	5,9×10 ²	2,8×10 ⁴	2,5×10 ⁵	6,0×10 ³	3,1×10 ⁵	1,1×10 ⁴	0,5×10 ¹	0,7×10 ¹	0,4×10 ¹	2,8×10 ²	1,7×10 ³	
VI - lipiec 2016	3,6×10 ⁶	6,3×10 ⁵	2,4×10 ⁵	2,5×10 ²	1,1×10 ⁴	1,3×10 ⁵	3,9×10 ³	9,1×10 ⁴	6,5×10 ³	1,4×10 ³	0,5×10 ¹	0,3×10 ¹	2,2×10 ²	6,4×10 ²	
VII - listopad 2016	5,4×10 ⁶	3,5×10 ⁵	1,5×10 ⁵	2,8×10 ²	1,3×10 ⁴	2,0×10 ⁵	5,0×10 ³	1,1×10 ⁵	1,6×10 ³	1,1×10 ³	0,5×10 ¹	0,4×10 ¹	2,9×10 ²	8,1×10 ²	
VIII - styczeń 2017	1,1×10 ⁶	1,0×10 ⁵	3,3×10 ⁴	1,5×10 ²	8,2×10 ³	6,7×10 ⁴	3,5×10 ³	4,5×10 ⁴	3,3×10 ³	8,0×10 ²	0,4×10 ¹	0,4×10 ¹	7,0×10 ²	7,2×10 ²	
Średnia ±SD	2,5×10 ⁶ ±1,9×10 ⁶	2,9×10 ⁵ ±2,4×10 ⁵	9,9×10 ⁴ ±9,3×10 ⁴	6,6×10 ² ±1,1×10 ³	1,2×10 ⁴ ±7,2×10 ³	1,1×10 ⁵ ±7,7×10 ⁴	3,7×10 ³ ±1,3×10 ³	1,0×10 ⁵ ±9,0×10 ⁴	6,0×10 ³ ±5,2×10 ³	6,9×10 ² ±6,0×10 ²	0,5×10 ¹ ±1,0×10 ¹	0,4×10 ¹ ±0,6×10 ¹	3,0×10 ² ±2,5×10 ²	6,7×10 ² ±5,1×10 ²	

Ściek oczyszczony

Częstość występowania poszczególnych genów obliczona została na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA, przy założeniu, że w jednej komórce bakterii występują średnio cztery kopie genu 16S rRNA (Stalder i wsp., 2012) (Materiał i metody 3.4.3.).

W tabeli 23 oraz na rycinach 52 i 53 przedstawiono częstości występowania genów *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *vanA* oraz *mecA* w poszczególnych miesiącach i porach roku w metagenomie ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego, wyrażone w procentach. Najwyższą średnią częstość występowania genu *intI1* stwierdzono w metagenomie ścieku oczyszczonego (48,6%) i jednocześnie zaobserwowano wzrost częstości w ścieku oczyszczonym w stosunku do ścieku surowego (48,1%) i ścieku z komory napowietrzania (35,4%). Najwyższą średnią częstość występowania „klinicznego” genu *intI1* odnotowano w ścieku oczyszczonym (14,4%), z kolei najniższą w ścieku z komory napowietrzania (3,2%). Podobną tendencję wzrostu częstości w metagenomie ścieku oczyszczonego (3,3%) w stosunku do ścieku z komory napowietrzania (0,8%) i ścieku surowego (0,7%) odnotowano dla genu *bla_{TEM}*. Dla genu *bla_{GES}* i *bla_{SHV}* również stwierdzono wzrost częstości występowania w ścieku oczyszczonym (odpowiednio 21,1% i 0,9%) w stosunku do ścieku surowego (odpowiednio 2,1% i 0,4%) i ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 0,4% i 0,3%). W przypadku genów *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48}* oraz *mecA* zaobserwowano najwyższe średnie częstości występowania w ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 0,6%, 12,4% i 0,2%) i w ścieku oczyszczonym (odpowiednio 0,1%, 1,4% i 0,1%) w porównaniu z częstością w ścieku surowym (0,01%, 1,2% i 0,02%). Podobne wyniki uzyskano dla genów *bla_{OXA-1}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* oraz *vanA* - najwyższa częstość w ścieku z komory napowietrzania (odpowiednio 45,4%, 12,3%, 0,2% i 0,3%), następnie w ścieku surowym (odpowiednio 35,7%, 0,4%, 0,03% i 0,3%), najniższa w ścieku oczyszczonym (odpowiednio 18,9%, 0,2%, 0,001% i 0,07%). W przypadku genu *bla_{VIM}* stwierdzono spadek częstości występowania w ścieku oczyszczonym (0,001%) w stosunku do ścieku surowego (0,08%). Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, w metagenomie ścieku surowego odnotowano najwyższą średnią częstość występowania genu *intI1* i *bla_{OXA-1}*, w ścieku z komory napowietrzania z największą częstością występowały *bla_{OXA-1}* i *intI1*, natomiast w ścieku oczyszczonym *intI1* i *bla_{GES}*. Najniższą częstość występowania w ścieku surowym

odnotowano dla genów *bla_{CTX-M}* i *mecA*, w ścieku z komory napowietrzania *bla_{VIM}* i *bla_{KPC}*, natomiast w ścieku oczyszczonym genów *bla_{KPC}* i *bla_{VIM}* (Tabela 23).

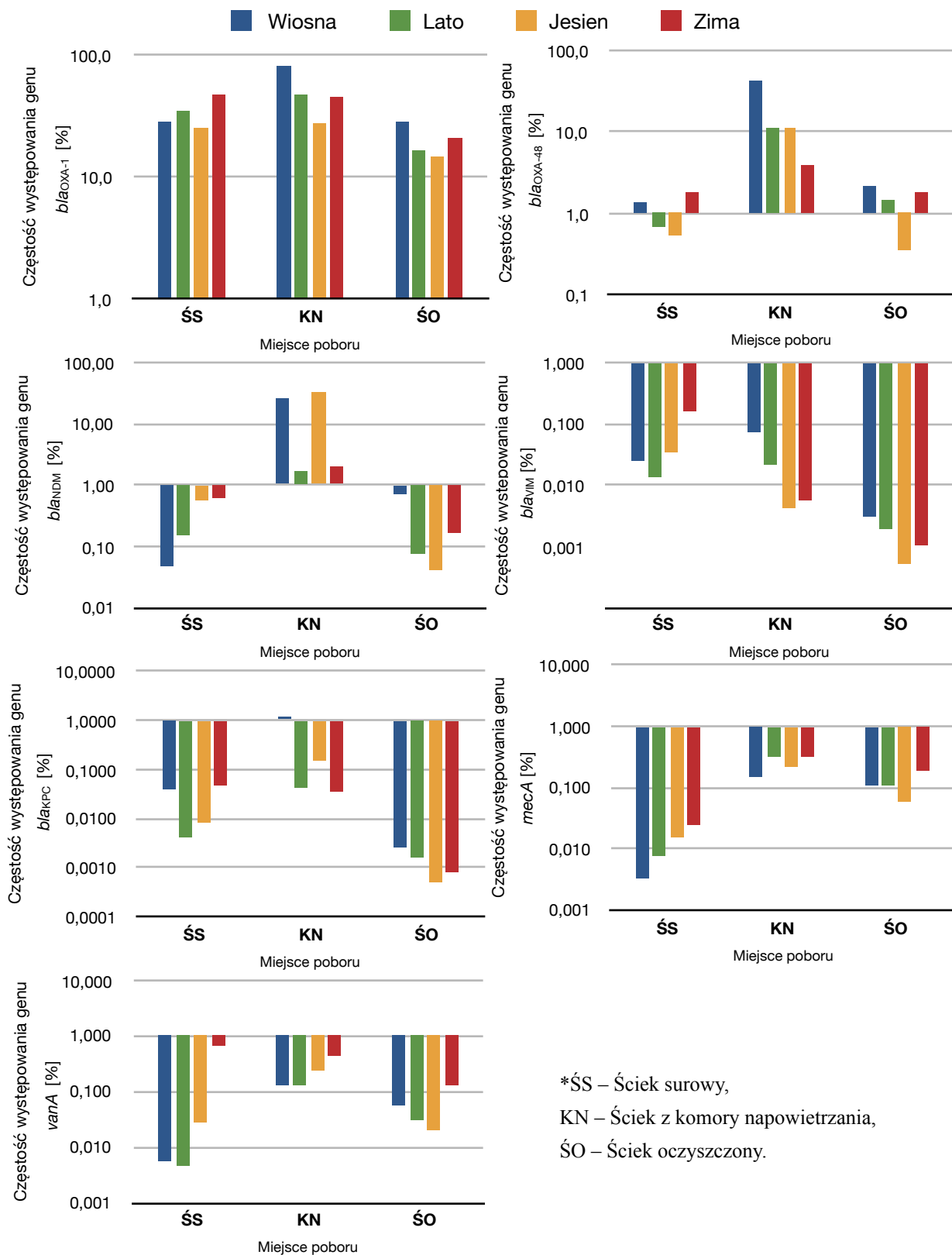


*ŚS – Ściek surowy,

KN – Ściek z komory napowietrzania,

ŚO – Ściek oczyszczony.

Rycina 52. Częstość występowania genów *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SHV}* oznaczona metodą qPCR w ml metagenomu ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłównach.



Rycina 53. Częstość występowania genów *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA* i *mecA* oznaczona metodą qPCR oraz *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* oznaczona metodą ddPCR w ml metagenomu ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

Tabela 23. Częstość występowania genów *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{GES}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *vanA* i *mecA* oznaczona metodą qPCR oraz *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* oznaczona metodą ddPCR w ml metagenomu ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania oraz ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.

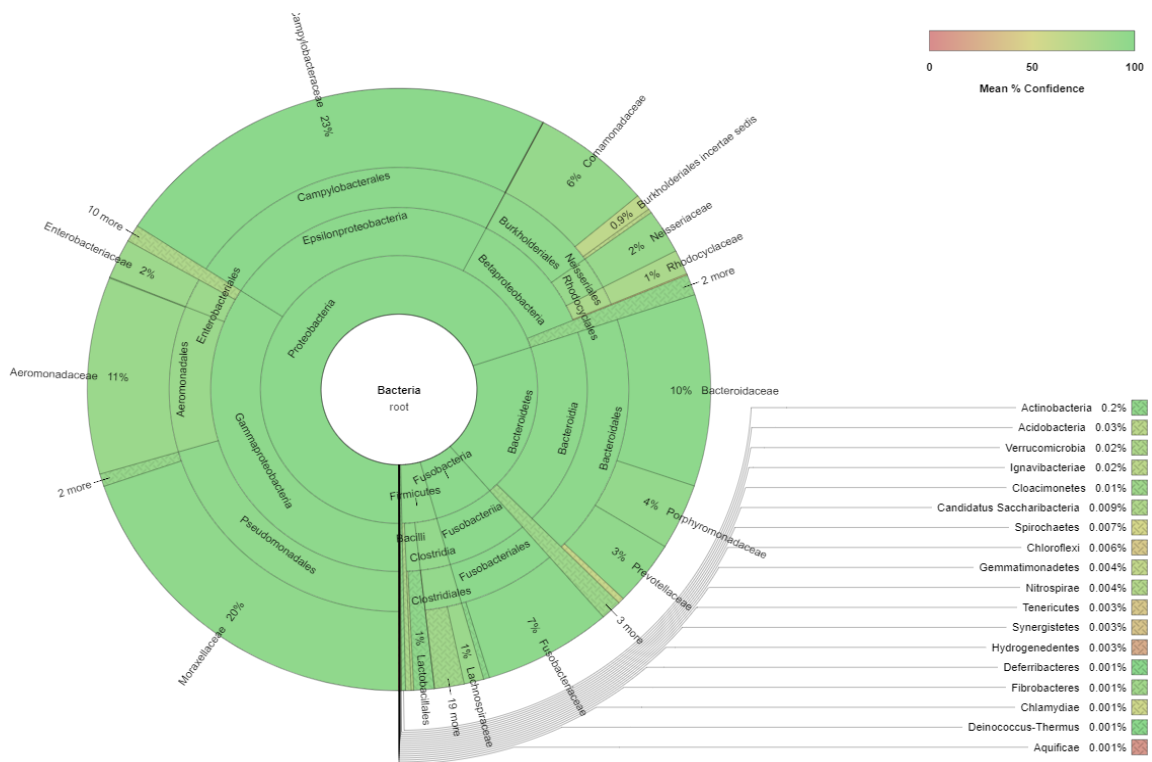
Czas poboru	Częstość występowania genów [%]													
	<i>intI1</i>	<i>intI1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	
Ściek surowy	I - marzec 2015	92,1430	12,5876	0,0154	1,3848	1,2250	0,0222	66,0269	2,8815	0,2077	0,0091	0,0048	0,0312	0,0047
	II - maj 2015	43,4940	5,9799	0,0120	0,5622	0,6827	0,0186	28,4070	1,3920	0,0482	0,0257	0,0398	0,0058	0,0032
	III - lipiec 2015	85,9596	9,7037	0,0283	0,9274	1,2881	0,0665	53,4478	0,3852	0,1134	0,0113	0,0062	0,0044	0,0071
	IV - listopad 2015	55,2112	5,9818	0,0035	0,6661	1,8890	0,0271	27,8708	0,8162	1,0240	0,0537	0,0099	0,0338	0,0053
	V - luty 2016	22,1303	3,8901	0,0100	0,3526	1,3943	0,3026	15,2269	0,1368	0,0096	0,0144	0,0070	0,0082	0,0039
VI - lipiec 2016	24,5044	3,5472	0,0046	0,2954	1,7240	0,4842	15,1478	0,9592	0,2041	0,0155	0,0017	0,0049	0,0086	
VII - listopad 2016	15,6739	1,8208	0,0056	0,3944	3,4044	0,4186	21,5819	0,2408	0,1114	0,0136	0,0068	0,0221	0,0266	
VIII - styczeń 2017	45,3428	2,5877	0,0199	1,3333	4,9031	2,0780	57,9196	2,5660	1,7021	0,4823	0,1277	1,9811	0,0666	
Ściek z komory napowietrzania	Średnia ±SD	48,0574 ±28,6235	5,7623 ±3,7079	0,0124 ±0,0086	0,7395 ±0,4321	2,0638 ±1,3972	0,4272 ±0,6934	35,7036 ±20,2970	1,1722 ±1,0449	0,4276 ±0,6090	0,0782 ±0,1639	0,0255 ±0,0430	0,2614 ±0,6949	0,0158 ±0,0219
	I - marzec 2015	60,1026	3,6991	0,0246	0,3692	1,4564	0,0150	57,0940	2,6355	2,2564	0,0051	0,0148	0,0909	0,1855
	II - maj 2015	22,4000	2,9492	0,0877	1,6639	0,0439	0,1304	80,8269	42,1278	25,7154	0,0735	1,1345	0,1314	0,1513
	III - lipiec 2015	54,4000	3,3797	0,0524	1,0150	0,1861	0,0475	63,7594	4,3872	0,5639	0,0298	0,0509	0,0729	0,4934
IV - listopad 2015	56,4000	4,8251	0,0978	1,4295	0,3987	0,0543	46,4451	18,8489	63,1975	0,0069	0,2926	0,0552	0,4130	

		Częstość występowania genów [%]												
	Czas poboru	<i>int1</i>	<i>int1/KL</i>	<i>blactx-M</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blagES</i>	<i>blashV</i>	<i>blaOXA-1</i>	<i>blaOXA-48</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>
Ściek z komory napowietrzania	V - luty 2016	58,4475	4,4357	0,2074	0,5862	0,4479	0,7610	39,6347	3,5199	2,6093	0,0087	0,0326	0,0386	0,1344
	VI - lipiec 2016	10,6004	1,2215	0,0163	0,3650	0,2825	0,6608	29,4632	18,5050	2,8628	0,0123	0,0331	0,1934	0,1672
	VII - listopad 2016	4,5763	0,8318	0,0078	0,2025	0,1506	0,1157	7,7103	3,9003	0,4206	0,0014	0,0097	0,4381	0,0386
	VIII - styczeń 2017	16,1000	4,1800	4,1800	0,4830	0,6230	0,5350	38,5000	5,5700	1,1300	0,0037	0,0627	1,1800	0,6500
	Średnia ±SD	35,3783 ±24,0604	3,1903 ±1,4635	0,5843 ±0,0645	0,7643 ±0,5420	0,4486 ±0,4468	0,2900 ±0,3082	45,4292 ±22,3154	12,4368 ±13,8182	12,3445 ±22,2261	0,0177 ±0,0242	0,2039 ±0,3871	0,2751 ±0,3886	0,2792 ±0,2130
Ściek oczyszczony	I - marzec 2015	32,6033	7,2585	0,6921	1,6871	14,6856	0,6204	19,2528	3,4367	0,2108	0,0012	0,0007	0,1366	0,1855
	II - maj 2015	44,9028	10,3583	0,1178	8,1694	22,2361	1,5125	28,0278	2,1250	0,7500	0,0032	0,0025	0,0569	0,1103
	III - lipiec 2015	78,8000	13,1763	0,1260	8,0269	40,3534	1,8814	22,2634	2,2465	0,0014	0,0035	0,0029	0,0371	0,1547
	IV - listopad 2015	45,9546	16,8231	0,0803	0,8858	17,8211	0,6525	21,0526	0,6154	0,0011	0,0007	0,0007	0,0203	0,0532
	V - luty 2016	53,9098	18,6201	0,0490	2,3367	20,7912	0,4994	25,9246	0,9376	0,0004	0,0005	0,0004	0,0233	0,1415
	VI - lipiec 2016	69,7436	26,3736	0,0278	1,1873	14,3346	0,4308	9,9634	0,7179	0,1538	0,0005	0,0003	0,0238	0,0708
	VII - listopad 2016	26,0278	10,6962	0,0205	0,9386	14,8075	0,3689	8,3047	0,1156	0,0835	0,0004	0,0003	0,0216	0,0595
	VIII - styczeń 2017	36,9352	11,5756	0,0517	2,8998	23,5756	1,2338	16,0550	1,1780	0,2829	0,0014	0,0015	0,2476	0,2537
	Średnia ±SD	48,6096 ±18,1529	14,3602 ±6,0559	0,1457 ±0,2242	3,2665 ±3,0614	21,0756 ±8,5813	0,8999 ±0,5672	18,8555 ±7,0603	1,4216 ±1,0941	0,1855 ±0,2514	0,0014 ±0,0013	0,0011 ±0,0010	0,0709 ±0,0814	0,1286 ±0,0696

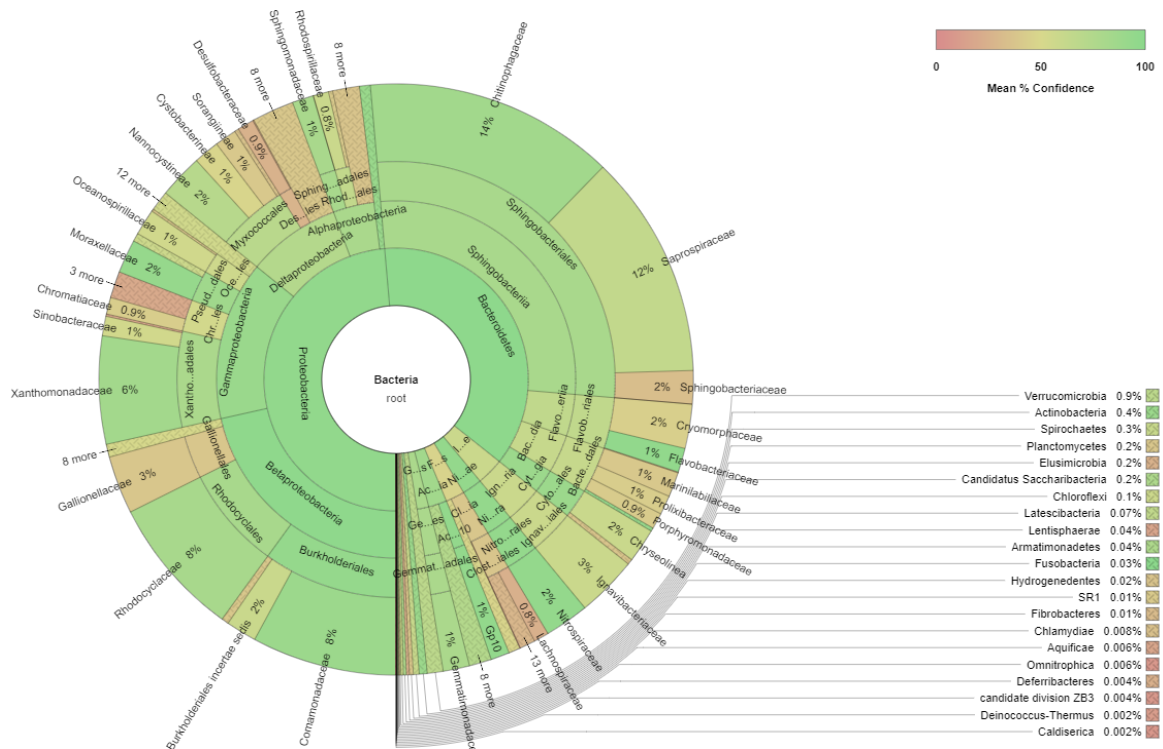
4.18. Wyniki analizy składu populacji mikroorganizmów występujących w ściekach

Stopień zróżnicowania sekwencji regionu zmiennego V4 genu 16S rRNA, który jest obecny u wszystkich bakterii, umożliwił określenie składu mikrobiologicznego w badanych próbkach do poziomu rodzin i rodzajów. Analiza tych sekwencji pozwoliła na określenie składu populacji bakterii występujących w danych próbkach i oznaczenie procentowego udziału poszczególnych taksonów w ściekach na różnych etapach procesu oczyszczania.

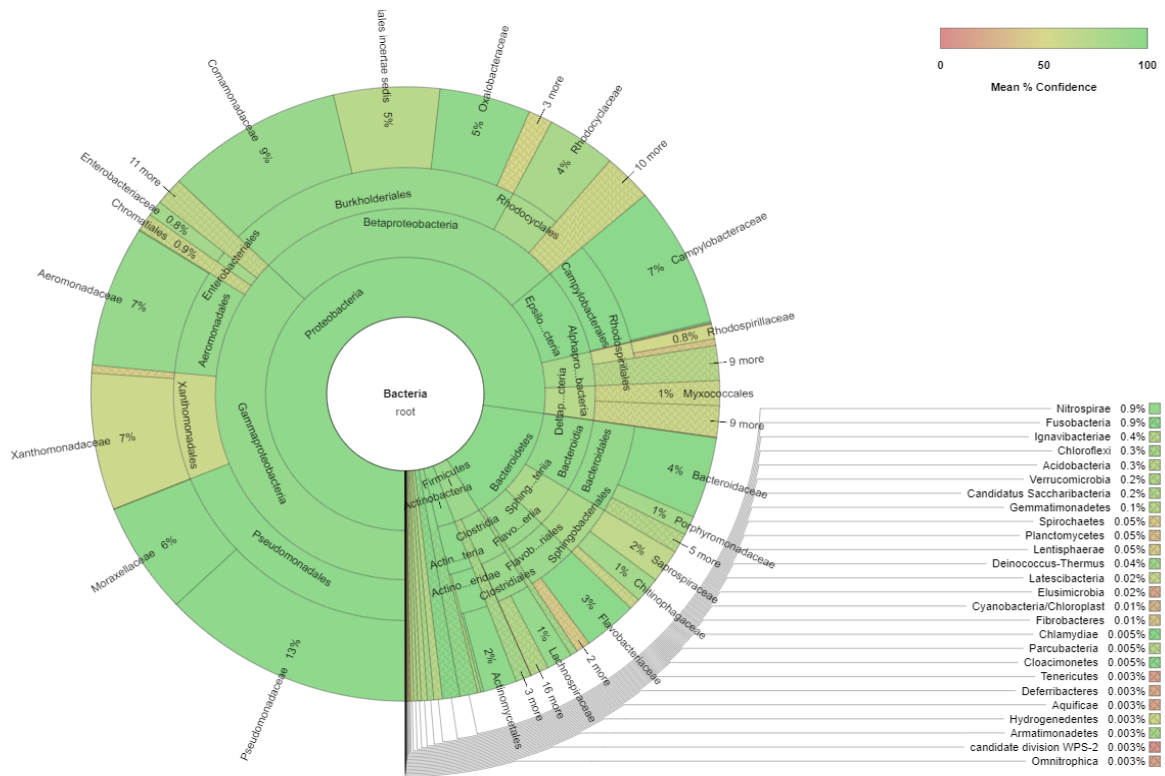
Analiza danych NGS wykazała, że łącznie uzyskano 645 779 dobrej jakości odczytów sekwencji genu 16S rRNA, co stanowiło łącznie 73% użytecznych sekwencji. Na podstawie analiz podobieństwa sekwencji 16S rRNA, które przedstawiono na rycinach 54, 55 i 56, określono procentową zawartość poszczególnych taksonów w próbkach (Rycina 57). Uzyskane wyniki wykazały, że populacja mikroorganizmów występujących w próbkach ścieku surowego ze wszystkich poborów, składała się z 31 rodzin w obrębie czterech dominujących typów bakterii, które stanowiły ponad 1% taksonów bakterii występujących w badanej próbce. Dominującymi rodzinami w próbkach ścieku surowego były *Campylobacteraceae*, *Moraxellaceae* (*Proteobacteria*) (Rycina 57). Wyniki uzyskane dla próbek ścieku z komory napowietrzania wykazały, że populacja mikroorganizmów w próbkach ze wszystkich poborów, składała się z 29 rodzin w obrębie pięciu dominujących typów bakterii. Dominującymi rodzinami bakterii w próbkach ścieku z komory napowietrzania były *Chitinophagaceae* i *Sapromonadaceae* (*Bacteroidetes*), choć najczęściej występującym typem były *Proteobacteria* (Rycina 57). Wyniki uzyskane dla próbek ścieku oczyszczonego wykazały największą liczbę taksonów i jednocześnie największe ich zróżnicowanie. Populacja mikroorganizmów występujących w ścieku oczyszczonym w próbkach ze wszystkich poborów, składała się z 49 rodzin w obrębie pięciu dominujących typów bakterii. Najczęściej notowano rodziny *Pseudomonadaceae* i *Comamonadaceae* (*Proteobacteria*) (Rycina 57). Szczegółowe dane procentowego udziału poszczególnych taksonów bakterii w próbkach na różnych etapach procesu oczyszczania ścieków przedstawiono na rycinie 57.



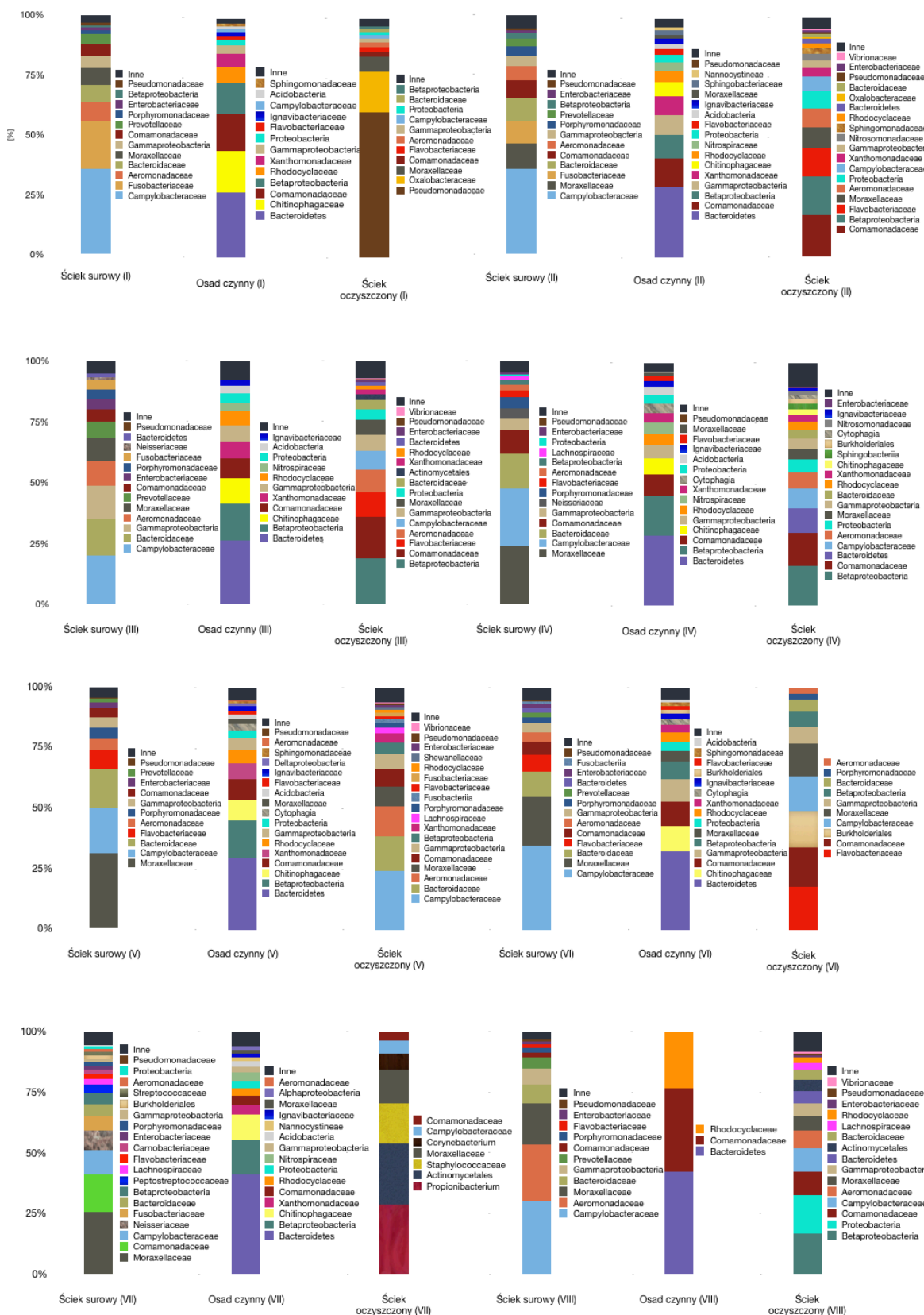
Rycina 54. Procentowa zawartość liczby odczytów sekwencji genów 16S rRNA w metagenomie ścieku surowego CO₂ w Koziegłowach.



Rycina 55. Procentowa zawartość liczby odczytów sekwencji genów 16S rRNA w metagenomie ścieku z komory napowietrzania CO₂ w Koziegłowach.



Rycina 56. Procentowa zawartość liczby odczytów sekwencji genów 16S rRNA w metagenomie ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach.



Rycina 57. Procentowy udział taksonów bakterii występujących w badanych próbkach ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w trakcie ośmiu poborów.

4.19. Analiza statystyczna

Test Kruskala-Wallisa nie wykazał związku pomiędzy liczbą bakterii hodowalnych, a także liczbą bakterii z mechanizmami oporności, a poborami i porami roku. Test ten nie wykazał również związku między częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności a poborami i porą roku, a także pomiędzy częstością występowania genów a poborami. Odnotowano różnice istotne statystycznie ($P < 0,05$) w ogólnej liczbie bakterii hodowalnych i bakterii z mechanizmami oporności pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym. Liczba bakterii heterotroficznych malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p=0,001$) oraz pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,005$). Liczba bakterii grupy coli malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,020$), ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p < 0,001$), a także pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem oczyszczonym ($p < 0,001$). Liczba bakterii *E. coli* malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,030$), ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p < 0,001$), a także pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem oczyszczonym ($p < 0,001$). Liczba bakterii *Enterococcus* sp. malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p < 0,001$), a także pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,010$). Liczba bakterii *S. aureus* malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,005$), pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,005$), a także pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p < 0,001$). Liczba bakterii CPE malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem oczyszczonym ($p=0,002$). Liczba bakterii CPE typu OXA-48 malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,020$), a także pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p=0,008$). Liczba bakterii MRSA malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,008$), a także pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p=0,008$). Liczba bakterii wytwarzających ESBL malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,009$), ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,009$), a także pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem oczyszczonym ($p=0,002$).

Zaobserwowano różnice istotne statystycznie w częstości występowania bakterii CPE typu OXA-48 pomiędzy miejscami poboru, których częstość malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym, a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,020$).

Częstość występowania genu *bla_{CTX}* u szczepów wytwarzających ESBL malała istotnie ($p=0,049$) pomiędzy sezonem zimowym a wiosennym, zimowym a letnim, a także jesiennym a wiosennym. Częstość występowania genu *bla_{OXA-1}* u szczepów wytwarzających ESBL wzrastała istotnie ($p=0,049$) pomiędzy zimą a latem, jesienią a zimą, wiosną a latem oraz malała pomiędzy latem a jesienią.

Różnice istotne statystycznie odnotowano także dla częstości występowania genu *ampC* u szczepów wytwarzających ESBL, która malała pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania ($p=0,004$), natomiast wzrastała pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,004$).

Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy liczbą bakterii hodowlanych i liczbą bakterii z mechanizmami oporności przedstawiono w tabeli 24. Stwierdzono występowanie korelacji umiarkowanych (r od 0,475 do 0,579), silnych (r od 0,604 do 0,795) i bardzo silnych (r od 0,803 do 0,917).

Tabela 24. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między liczbą bakterii hodowlanych i liczbą bakterii z mechanizmami oporności. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Liczba bakterii [CFU/ml]										
	Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i>	*CPE	CPE typu OXA-48	MRSA	VRE	ESBL
Bakterie heterotroficzne	1,000									
Bakterie grupy coli	0,870	1,000								
<i>E.coli</i>	0,795	0,917	1,000							
<i>Enterococcus</i> sp.	0,772	0,760	0,689	1,000						
<i>S. aureus</i>	0,791	0,763	0,781	0,803	1,000					
CPE	0,604	0,736	0,631	0,697	0,546	1,000				

Liczba bakterii [CFU/ml]										
	Bakterie heterotroficzne	Bakterie grupy coli	<i>E.coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>S. aureus</i>	*CPE	CPE typu OXA-48	MRSA	VRE	ESBL
CPE typu OXA-48	0,328	0,561	0,579	0,375	0,380	0,406	1,000			
MRSA	0,371	0,445	0,429	0,359	0,733	0,203	0,486	1,000		
VRE	0,102	0,346	0,475	0,348	0,308	0,561	0,389	0,068	1,000	
ESBL	0,676	0,809	0,785	0,619	0,819	0,617	0,565	0,695	0,259	1,000

*CPE – bakterie karbapenemooporne,
 CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,
 MRSA – bakterie *S. aureus* oporne na metycylinę,
 VRE – bakterie *Enterococcus* sp. oporne na wankomycynę,
 ESBL – bakterie wytwarzające ESBL.

Wartości korelacji rang Spearmana pomiędzy liczbą bakterii, a parametrami fizykochemicznymi wody przedstawiono w tabeli 25. Umiarkowane korelacje odnotowano między liczbą bakterii z grupy coli a przewodnością, a także między liczbą *S. aureus* a przewodnością, TDS i zasoleniem oraz pomiędzy liczbą bakterii wytwarzających ESBL a zasoleniem. Z kolei silne korelacje zaobserwowano pomiędzy liczbą MRSA a przewodnością, TDS i zasoleniem oraz pomiędzy liczbą bakterii wytwarzających ESBL a przewodnością. Ujemne korelacje odnotowano pomiędzy liczbą bakterii heterotroficznych, *E. coli*, CPE i wytwarzających ESBL a pH.

Tabela 25. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między liczbą bakterii hodowalnych i liczbą bakterii z mechanizmami oporności, a parametrami fizykochemicznymi wody. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Liczba bakterii [CFU/ml]				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
Bakterie heterotroficzne	-0,378	0,290	0,167	0,144
Bakterie grupy coli	-0,491	0,419	0,259	0,243
<i>E.coli</i>	-0,454	0,386	0,334	0,320
<i>Enterococcus</i> sp.	-0,256	0,385	0,239	0,198
<i>S. aureus</i>	-0,250	0,498	0,442	0,448

Liczba bakterii [CFU/ml]				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
*CPE	-0,484	0,333	0,041	0,012
CPE typu OXA-48	-0,230	0,322	0,355	0,365
MRSA	-0,094	0,630	0,674	0,787
VRE	-0,404	0,320	0,171	0,075
ESBL	-0,683	0,611	0,439	0,523

*CPE – bakterie karbapenemooporne,
 CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,
 MRSA – bakterie *S. aureus* oporne na metycylinę,
 VRE – bakterie *Enterococcus* sp. oporne na wankomycynę,
 ESBL – bakterie wytwarzające ESBL.

Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności przedstawiono w tabeli 26. Odnotowano silną korelację pomiędzy częstością występowania bakterii wytwarzających ESBL a szczepami MRSA. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy częstością występowania pozostałych analizowanych bakterii.

Nie odnotowano również korelacji pomiędzy częstością występowania szczepów z mechanizmami oporności a parametrami fizykochemicznymi wody (Tabela 27).

Tabela 26. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania bakterii [%]					
	*CPE	CPE typu OXA-48	ESBL	MRSA	VRE
CPE	1,000				
CPE typu OXA-48	-0,393	1,000			
ESBL	0,335	0,084	1,000		
MRSA	0,322	0,543	0,712	1,000	
VRE	-0,183	0,017	-0,049	-0,219	1,000

*CPE – bakterie karbapenemooporne,
 CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,
 ESBL – bakterie wytwarzające ESBL,

MRSA – bakterie *S. aureus* odporne na metycylinę,

VRE – bakterie *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę.

Tabela 27. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania bakterii z mechanizmami oporności, a parametrami fizykochemicznymi wody. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania bakterii [%]				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
*CPE	-0,205	-0,280	-0,264	-0,199
CPE typu OXA-48	0,201	0,069	0,189	0,215
ESBL	0,033	-0,009	0,094	0,248
MRSA	0,142	-0,391	-0,280	-0,039
VRE	-0,187	-0,124	-0,180	-0,233

*CPE – bakterie karbapenemooporne,

CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,

ESBL – bakterie wytwarzające ESBL,

MRSA – bakterie *S. aureus* odporne na metycylinę,

VRE – bakterie *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę.

Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy częstością występowania genów w genomach bakterii hodowlanych z poszczególnymi mechanizmami oporności przedstawiono w tabeli 28. Umiarkowane korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *bla*_{CTX-M} a *bla*_{TEM} u szczepów wytwarzających ESBL, *bla*_{VIM} a *bla*_{NDM} u szczepów CPE oraz pomiędzy *bla*_{DHA} u szczepów wytwarzających ESBL a *bla*_{DHA} u szczepów CPE, *bla*_{DHA} u szczepów wytwarzających ESBL a *bla*_{CMY} u szczepów CPE, *bla*_{OXA-1} a *bla*_{CTX-M} u szczepów CPE, *bla*_{TEM} a *ampC* u szczepów CPE. Silne korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *bla*_{OXA-1} u szczepów wytwarzających ESBL a *bla*_{CTX-M} i *bla*_{TEM} u szczepów CPE, *bla*_{OXA-1} a *bla*_{TEM} i *bla*_{SHV} u szczepów CPE, *bla*_{CTX-M} a *bla*_{SHV} u szczepów CPE, *bla*_{TEM} a *bla*_{SHV} u szczepów CPE oraz *ampC* u szczepów wytwarzających ESBL a *bla*_{OXA-48} u szczepów CPE typu OXA-48. Bardzo silne korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *bla*_{CTX-M} a *bla*_{TEM} u szczepów CPE oraz pomiędzy *ampC* u szczepów CPE a *vanA* u szczepów VRE. Ujemne korelacje pomiędzy

częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *int11* u bakterii heterotroficznych a *bla_{CTX-M}* i *bla_{TEM}* u szczepów CPE, *bla_{SHV}* u szczepów wytwarzających ESBL a *bla_{GES}* u szczepów CPE, *bla_{GES}* a *bla_{TEM}* u szczepów CPE, *mecA* u szczepów MRSA a *bla_{OXA-1}* u szczepów wytwarzających ESBL oraz pomiędzy *bla_{CMY}* u szczepów wytwarzających ESBL a *vanA* u szczepów VRE. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy częstościami występowania pozostałych genów.

Tabela 28. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania genów w genomach bakterii hodowlanych. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania genów		<i>int1</i> u bakterii heterotroficznych	<i>int1</i> u bakterii grupy coli	*ESBL <i>bla</i> _{CTX-M}	ESBL <i>bla</i> _{TEM}	ESBL <i>bla</i> _{SHV}	ESBL <i>bla</i> _{OXA-1}	ESBL <i>bla</i> _{GES}	ESBL <i>ampC</i>	ESBL <i>bla</i> _{DHA}	ESBL <i>bla</i> _{CNY}	CPE <i>bla</i> _{ES}	CPE <i>bla</i> _{VIM}	CPE <i>bla</i> _{NDM}	CPE <i>bla</i> _{CTX-M}	CPE <i>bla</i> _{TEM}	CPE <i>bla</i> _{SHV}	CPE <i>ampC</i>	CPE <i>bla</i> _{DHA}	CPE <i>bla</i> _{CNY}	CPE typu OXA-48 <i>bla</i> _{OXA-48}	MRSA <i>mecA</i>	VRE <i>vana</i>
<i>int1</i> u bakterii heterotroficznych	1,000																						
<i>int1</i> u bakterii grupy coli	0,100	1,000																					
ESBL <i>bla</i> _{CTX-M}	0,325	-0,196	1,000																				
ESBL <i>bla</i> _{TEM}	-0,353	-0,371	0,591	1,000																			
ESBL <i>bla</i> _{SHV}	-0,050	-0,070	0,157	0,269	1,000																		
ESBL <i>bla</i> _{OXA-1}	-0,212	-0,125	0,013	0,378	0,373	1,000																	
ESBL <i>bla</i> _{GES}	0,166	0,143	-0,099	-0,159	0,373	-0,052	1,000																
ESBL <i>ampC</i>	-0,009	-0,176	-0,158	-0,076	-0,423	-0,169	-0,282	1,000															
ESBL <i>bla</i> _{DHA}	-0,084	-0,114	-0,276	-0,369	-0,440	-0,411	-0,233	0,462	1,000														
ESBL <i>bla</i> _{CNY}	0,121	0,066	-0,017	-0,028	-0,203	-0,190	-0,053	0,149	0,282	1,000													
CPE <i>bla</i> _{ES}	0,427	0,095	-0,184	-0,370	-0,689	-0,050	-0,002	0,151	0,246	0,114	1,000												
CPE <i>bla</i> _{VIM}	0,429	-0,171	-0,260	-0,359	-0,324	-0,214	-0,078	0,187	0,020	0,258	0,290	1,000											
CPE <i>bla</i> _{NDM}	-0,014	0,199	-0,171	-0,122	0,008	0,305	-0,353	0,011	-0,035	0,185	0,034	0,489	1,000										

CPE <i>bla_{OXA-1}</i>	-0,444	-0,216	0,033	0,381	0,244	0,314	-0,118	-0,201	-0,347	-0,231	-0,382	0,041	0,415	1,000									
CPE <i>bla_{CTX-M}</i>	-0,521	-0,193	-0,290	0,264	0,386	0,735	0,048	-0,075	-0,393	-0,261	-0,298	-0,269	0,123	0,568	1,000								
CPE <i>bla_{TEM}</i>	-0,623	-0,196	-0,155	0,440	0,365	0,602	-0,191	-0,015	-0,347	-0,231	-0,487	-0,168	0,291	0,701	0,827	1,000							
CPE <i>bla_{SHV}</i>	-0,404	-0,420	0,042	0,347	0,018	0,414	-0,170	0,016	-0,253	-0,168	-0,198	-0,009	0,253	0,752	0,628	0,674	1,000						
CPE <i>ampC</i>	-0,372	-0,038	0,225	0,453	0,038	0,132	-0,451	0,105	-0,343	-0,366	-0,376	-0,120	0,096	0,364	0,352	0,513	0,236	1,000					
CPE <i>bla_{DHA}</i>	-0,136	0,051	-0,001	-0,084	-0,016	-0,253	0,324	0,228	0,495	-0,168	-0,044	-0,292	-0,292	-0,291	-0,330	-0,291	-0,212	-0,396	1,000				
CPE <i>bla_{CMY}</i>	-0,409	0,129	-0,102	-0,204	-0,384	-0,307	-0,221	0,409	0,549	-0,091	-0,102	-0,158	-0,158	-0,179	-0,158	-0,158	-0,115	0,102	0,460	1,000			
CPE typu OXA-48 <i>bla_{OXA-48}</i>	0,498	-0,353	0,181	0,241	-0,062	0,315	-0,419	0,637	-0,036	0,184	0,245	0,370	0,406	-0,218	-0,126	-0,004	0,036	0,027	-0,213	-0,362	1,000		
MRSA <i>mecA</i>	0,010	-0,421	0,183	-0,252	-0,252	-0,682	0,153	0,625	0,548	0,429	0,166	0,130	-0,279	-0,362	-0,049	-0,077	-0,093	0,017	NO	NO	0,118	1,000	
VRE <i>vanA</i>	-0,237	-0,079	0,057	0,312	0,381	0,465	-0,291	0,099	-0,093	-0,589	-0,572	-0,420	-0,016	0,236	0,523	0,530	0,084	0,835	-0,109	0,310	-0,121	-0,172	1,000

*NO – nie określono,

ESBL – bakterie wytwarzające ESBL,

CPE – bakterie karbapenemooporne,

CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,

MRSA – bakterie *S. aureus* oporne na metycylinę,

VRE – bakterie *Enterococcus* sp. oporne na wankomycynę.

Wartości korelacji rang Spearmana pomiędzy częstością występowania genów w genomach bakterii hodowlanych, a parametrami fizykochemicznymi wody przedstawiono w tabeli 29. Zaobserwowano umiarkowane korelacje pomiędzy częstością występowania genu *ampC* u szczepów wytwarzających ESBL a wartościami pH.

Tabela 29. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania genów w genomach bakterii hodowlanych, a parametrami fizykochemicznymi wody. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania genów [%]				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
<i>int11</i> u bakterii heterotroficznych	-0,122	-0,020	0,022	0,037
<i>int11</i> u bakterii grupy coli	-0,115	0,235	0,252	0,196
*ESBL <i>bla</i> _{CTX-M}	-0,006	0,118	-0,007	-0,084
ESBL <i>bla</i> _{TEM}	0,277	0,052	0,028	-0,096
ESBL <i>bla</i> _{SHV}	-0,167	-0,047	-0,107	-0,199
ESBL <i>bla</i> _{OXA-1}	-0,004	0,211	0,195	0,138
ESBL <i>bla</i> _{GES}	-0,240	0,029	0,200	0,225
ESBL <i>ampC</i>	0,534	-0,009	0,293	0,320
ESBL <i>bla</i> _{DHA}	0,360	-0,238	0,040	0,126
ESBL <i>bla</i> _{CMY}	0,270	0,087	0,087	0,159
CPE <i>bla</i> _{GES}	-0,192	0,081	0,264	0,362
CPE <i>bla</i> _{VIM}	0,136	-0,163	-0,212	-0,132
CPE <i>bla</i> _{NDM}	0,246	0,154	0,041	-0,030
CPE <i>bla</i> _{OXA-1}	0,253	-0,026	-0,196	-0,299
CPE <i>bla</i> _{CTX-M}	0,045	0,254	0,123	0,088
CPE <i>bla</i> _{TEM}	0,268	0,293	0,187	0,102
CPE <i>bla</i> _{SHV}	0,253	0,162	-0,090	-0,055
CPE <i>ampC</i>	0,110	0,225	-0,001	-0,154
CPE <i>bla</i> _{DHA}	0,291	-0,193	0,145	0,129
CPE <i>bla</i> _{CMY}	0,077	0,102	0,102	0,102
CPE typu OXA-48 <i>bla</i> _{OXA-48}	0,338	-0,152	0,064	0,082
MRSA <i>mecA</i>	0,005	0,072	0,107	0,257
VRE <i>vanA</i>	-0,186	0,118	0,060	-0,107

*ESBL – bakterie wytwarzające ESBL,

CPE – bakterie karbapenemooporne,
 CPE typu OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48,
 MRSA – bakterie *S. aureus* odporne na metycylinę,
 VRE – bakterie *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę.

Odnotowano różnice istotne statystycznie ($P < 0,05$) w liczbie kopii genu 16S rRNA pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym. Liczba kopii genu 16S rRNA malała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym ($p < 0,001$) oraz pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p < 0,001$). Test Kruskala-Wallisa nie wykazał różnic istotnych statystycznie w liczbie kopii pozostałych genów w metagenomowym DNA ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego. Test ten nie wykazał również związku między liczbą kopii genów a porą poboru.

W tabeli 30 przedstawiono zależności między liczbą kopii poszczególnych genów *intI1*, *intI1KL*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *vanA* oraz *mecA*. Nie stwierdzono korelacji między liczbą kopii genu *bla_{GES}* a *bla_{KPC}*. Natomiast korelacje pomiędzy liczbą kopii pozostałych genów były umiarkowane (r od 0,407 do 0,598), silne (r od 0,603 do 0,793) lub bardzo silne (r od 0,801 do 0,921).

Tabela 30. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między liczbą kopii genów w metagenomowym DNA. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Liczba kopii genów/ml													
	<i>intI1</i>	<i>intI1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>
<i>intI1</i>	1,000												
<i>intI1KL</i>	0,897	1,000											
<i>bla_{CTX-M}</i>	0,823	0,777	1,000										
<i>bla_{TEM}</i>	0,861	0,902	0,867	1,000									
<i>bla_{GES}</i>	0,660	0,790	0,532	0,658	1,000								
<i>bla_{SHV}</i>	0,603	0,643	0,768	0,724	0,667	1,000							
<i>bla_{OXA-1}</i>	0,882	0,903	0,891	0,917	0,736	0,771	1,000						
<i>bla_{OXA-48}</i>	0,712	0,701	0,909	0,828	0,444	0,757	0,828	1,000					
<i>vanA</i>	0,633	0,593	0,805	0,724	0,482	0,817	0,808	0,872	1,000				

Liczba kopii genów/ml													
	<i>intI1</i>	<i>intI1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>
<i>mecA</i>	0,773	0,703	0,921	0,793	0,587	0,821	0,877	0,910	0,885	1,000			
<i>bla_{NDM}</i>	0,682	0,604	0,826	0,712	0,407	0,702	0,734	0,912	0,831	0,858	1,000		
<i>bla_{VIM}</i>	0,595	0,542	0,492	0,524	0,527	0,634	0,517	0,561	0,534	0,542	0,551	1,000	
<i>bla_{KPC}</i>	0,641	0,604	0,845	0,769	0,381	0,732	0,715	0,905	0,801	0,857	0,844	0,598	1,000

Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy częstością występowania genów w metagenomowym DNA przedstawiono w tabeli 31. Umiarkowane korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *intI1* a *intI1KL*, *bla_{TEM}*; *bla_{CTX-M}* a *bla_{SHV}*; *bla_{GES}* a *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}* a *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}* i *bla_{VIM}*; *vanA* a *bla_{KPC}* oraz pomiędzy *mecA* a *bla_{NDM}*. Natomiast silne korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *intI1KL* a *bla_{TEM}* i *bla_{GES}*; *bla_{CTX-M}* a *bla_{TEM}* i *mecA*; *bla_{OXA-1}* a *bla_{KPC}*; *bla_{OXA-48}* a *vanA*, *mecA*, *bla_{NDM}* i *bla_{KPC}*; *vanA* a *mecA* i *bla_{NDM}* oraz pomiędzy *bla_{NDM}* a *bla_{KPC}*; i *bla_{VIM}* a *bla_{KPC}*. Ujemne korelacje pomiędzy częstościami występowania genów odnotowano w przypadku: *intI1KL* a *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* i *bla_{KPC}* oraz pomiędzy *bla_{GES}* a *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* i *bla_{KPC}*. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy częstością występowania genu *bla_{SHV}* a pozostałymi genami.

Tabela 31. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania genów w metagenomowym DNA. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania genów [%]													
	<i>intI1</i>	<i>intI1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>
<i>intI1</i>	1,000												
<i>intI1KL</i>	0,593	1,000											
<i>bla_{CTX-M}</i>	0,292	0,353	1,000										
<i>bla_{TEM}</i>	0,434	0,600	0,650	1,000									
<i>bla_{GES}</i>	0,213	0,671	0,162	0,498	1,000								
<i>bla_{SHV}</i>	-0,181	0,145	0,432	0,343	0,517	1,000							

Częstość występowania genów [%]													
	<i>intl1</i>	<i>intl1KL</i>	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{GES}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>vanA</i>	<i>mecA</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{KPC}</i>
<i>bla_{OXA-1}</i>	0,385	-0,225	0,246	0,202	-0,460	-0,243	1,000						
<i>bla_{OXA-48}</i>	-0,094	-0,424	0,400	0,087	-0,614	-0,003	0,550	1,000					
<i>vanA</i>	-0,253	-0,383	0,301	0,178	-0,202	0,309	0,257	0,731	1,000				
<i>mecA</i>	-0,007	-0,055	0,661	0,357	-0,039	0,295	0,244	0,617	0,672	1,000			
<i>bla_{NDM}</i>	-0,074	-0,540	0,183	-0,042	-0,563	-0,041	0,539	0,748	0,685	0,485	1,000		
<i>bla_{VIM}</i>	-0,090	-0,633	-0,380	-0,290	-0,523	-0,283	0,557	0,218	0,006	-0,259	0,363	1,000	
<i>bla_{KPC}</i>	-0,132	-0,695	-0,010	-0,237	-0,753	-0,258	0,691	0,670	0,431	0,217	0,697	0,731	1,000

Wartości korelacji rang Spearmana pomiędzy liczbą kopii genów a parametrami fizykochemicznymi wody przedstawiono w tabeli 32. Zaobserwowano ujemną korelację między liczbą kopii analizowanych genów, z wyjątkiem genu *bla_{VIM}*, a wartościami pH. Umiarkowaną korelację odnotowano pomiędzy wartościami przewodności a liczbą kopii genów *bla_{GES}* i *bla_{VIM}*. Nie zaobserwowano korelacji między wartościami TDS i zasolenia, a liczbą kopii badanych genów.

Tabela 32. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między liczbą kopii genów w metagenomowym DNA, a parametrami fizykochemicznymi wody. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Liczba kopii genów/ml				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
<i>intl1</i>	-0,518	0,361	0,154	0,127
<i>intl1KL</i>	-0,584	0,366	0,171	0,151
<i>bla_{CTX-M}</i>	-0,728	0,173	-0,081	-0,091
<i>bla_{TEM}</i>	-0,683	0,306	0,125	0,124
<i>bla_{GES}</i>	-0,439	0,417	0,278	0,245
<i>bla_{SHV}</i>	-0,717	0,397	0,166	0,157
<i>bla_{OXA-1}</i>	-0,688	0,330	0,101	0,087
<i>bla_{OXA-48}</i>	-0,727	0,117	-0,077	-0,063
<i>vanA</i>	-0,672	0,230	-0,008	0,010

Liczba kopii genów/ml				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
<i>mecA</i>	-0,721	0,198	-0,011	-0,011
<i>bla_{NDM}</i>	-0,698	0,008	-0,241	-0,187
<i>bla_{VIM}</i>	-0,392	0,487	0,346	0,346
<i>bla_{KPC}</i>	-0,744	0,157	-0,012	0,001

Wartości korelacji rang Spearmana pomiędzy częstością występowania genów, a parametrami fizykochemicznymi wody przedstawiono w tabeli 33. Zaobserwowano ujemne korelacje pomiędzy częstością występowania genów *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}* i *bla_{KPC}* a wartościami pH, umiarkowaną pomiędzy częstością genu *bla_{TEM}* a pH oraz silną korelację między częstością występowania genu *int11KL* i *bla_{GES}* a pH ścieków. Umiarkowane korelacje odnotowano także pomiędzy częstością genu *bla_{VIM}* a wartościami przewodności, TDS i zasolenia.

Tabela 33. Wartości współczynnika korelacji rang Spearmana między częstością występowania genów w metagenomowym DNA, a parametrami fizykochemicznymi wody. Kolorem czerwonym zaznaczono istotne korelacje ($P < 0,05$).

Częstość występowania genów, obliczona na podstawie 16S rRNA [%]				
	pH	Przewodność	TDS	Zasolenie
<i>int11</i>	0,343	-0,148	-0,064	-0,121
<i>int11KL</i>	0,605	-0,304	-0,153	-0,214
<i>bla_{CTX-M}</i>	0,186	-0,313	-0,261	-0,280
<i>bla_{TEM}</i>	0,493	-0,240	-0,047	-0,062
<i>bla_{GES}</i>	0,712	-0,155	0,080	0,044
<i>bla_{SHV}</i>	0,269	-0,089	0,036	0,023
<i>bla_{OXA-1}</i>	-0,270	0,222	0,150	0,136
<i>bla_{OXA-48}</i>	-0,408	-0,118	-0,161	-0,139
<i>vanA</i>	-0,184	-0,164	-0,200	-0,160
<i>mecA</i>	-0,066	-0,313	-0,274	-0,281
<i>bla_{NDM}</i>	-0,477	-0,095	-0,326	-0,257
<i>bla_{VIM}</i>	-0,318	0,492	0,434	0,461
<i>bla_{KPC}</i>	-0,561	0,196	0,084	0,116

Wielowymiarowa analiza wariancji wykazała różnice istotne statystycznie ($p=0,003$) w składzie taksonomicznym pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym, jak również w częstości występowania genów ($p<0,001$) w trzech miejscach poboru. Częstość występowania genu *bla_{NDM}* (t-test, $p=0,041$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania. Częstość występowania genów *bla_{GES}* (t-test, $p<0,001$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym. Natomiast częstość występowania genów *bla_{GES}* (t-test, $p<0,001$), *mecA* (t-test, $p<0,001$), *intI1KL* (t-test, $p=0,002$), *bla_{TEM}* (t-test, $p=0,018$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym.

Analiza PCoA jest metodą przedstawiania wielowymiarowych danych w postaci zbiorów w przestrzeni zredukowanej do dwóch wymiarów, której celem jest wyrażenie zróżnicowania przy pomocy malej liczby współrzędnych (Kenkel, 2006). Wynikiem analizy PCoA są wykresy przedstawiające rozmieszczenie badanych próbek: struktury populacji bakteryjnej (Rycina 59 A) i częstości występowania genów (Rycina 59 B), w przestrzeni dwóch współrzędnych głównych. Natomiast analiza klastrowania hierarchicznego polega na podziale danych na grupy skupień, względem bliskości podobieństwa, przedstawionych w postaci dendrogramu (Rycina 59 A i B). Na podstawie przestrzennego rozmieszczenia badanych próbek (PCoA) oraz klastrowania hierarchicznego możliwe było określenie stopnia zróżnicowania, a także powiązań pomiędzy częstością występowania genów jak i składem populacji bakteryjnych w próbkach metagenomowego DNA ścieków na różnych etapach procesu oczyszczania.

Na podstawie wykresów rozmieszczenia analizowanych danych w układzie dwóch współrzędnych głównych, stwierdzono, że struktura taksonomiczna populacji bakteryjnych dzieliła się na trzy grupy (Rycina 59 A). Grupy te wyraźnie korelują z podziałem próbek ze względu na miejsce poboru, tj. pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym. Najbardziej homogeniczną, pod względem składu taksonomicznego, grupę stanowił ściek z komory napowietrzania, natomiast skład populacji w dwóch pozostałych grupach był nieco bardziej zróżnicowany. W grupie stanowiącej głównie próbki ścieku surowego znajdowała się również próbka ścieku oczyszczonego z poboru V (E5), co wskazuje na podobieństwo składu populacji w

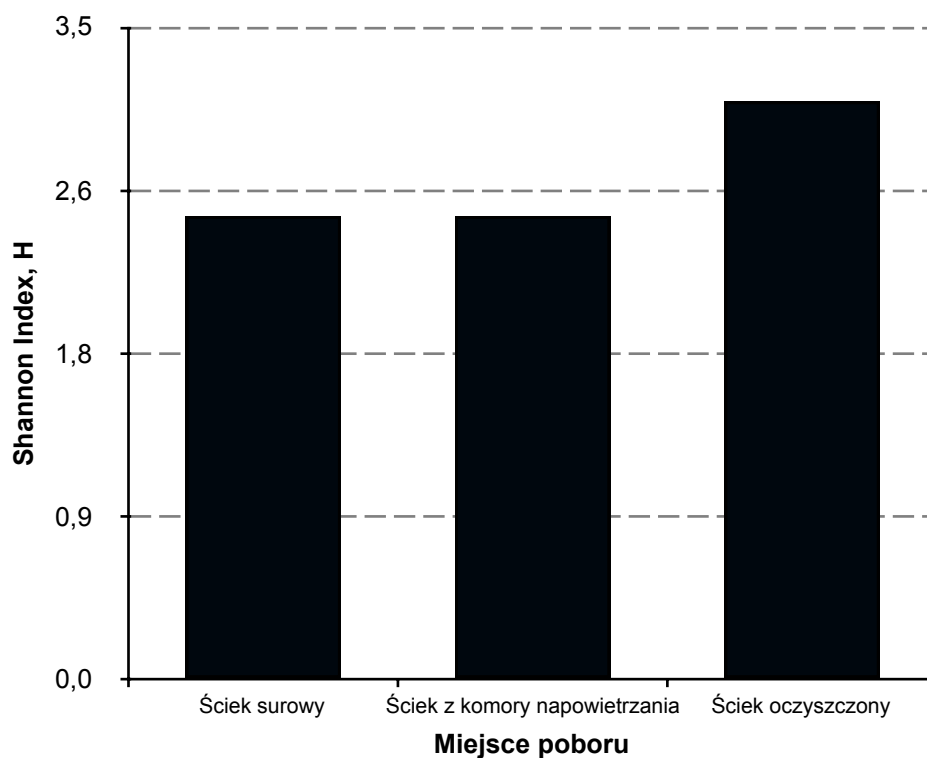
stosunku do populacji w ścieku surowym. Natomiast w grupie, w której dominowały próbki ścieku oczyszczonego, znalazła się także próbka ścieku surowego (S7), świadcząca o niewielkim stopniu zróżnicowania składu populacji, względem ścieku oczyszczonego. Zupełnie odrębną próbką pod względem różnorodności taksonomicznej był ściek z komory napowietrzania z poboru V.

Podobne wyniki rozmieszczenia przestrzennego otrzymano dla częstości występowania genów w próbkach ścieków, które również dzieliły się na 3 grupy (Rycina 59 B). Grupy te wykazują wyraźne zróżnicowanie częstości występowania genów pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym. Najbardziej jednorodną grupę stanowił ściek oczyszczony, natomiast skład populacji w dwóch pozostałych grupach był znacznie zróżnicowany. W grupie stanowiącej głównie próbki ścieku surowego znajdowały się również dwie próbki ścieku z komory napowietrzania (O1 i O5), co wskazuje na podobieństwo częstości występowania genów w stosunku do populacji w ścieku surowym. Natomiast w grupie, w której dominowały próbki ścieku z komory napowietrzania, znalazły się także próbki ścieku surowego (S5, S6, S7), świadczące o niewielkim stopniu zróżnicowania, w stosunku do ścieku z komory napowietrzania. Zupełnie odrębnymi próbkami pod względem różnorodności genowej był ściek z komory napowietrzania z poboru VII i VIII.

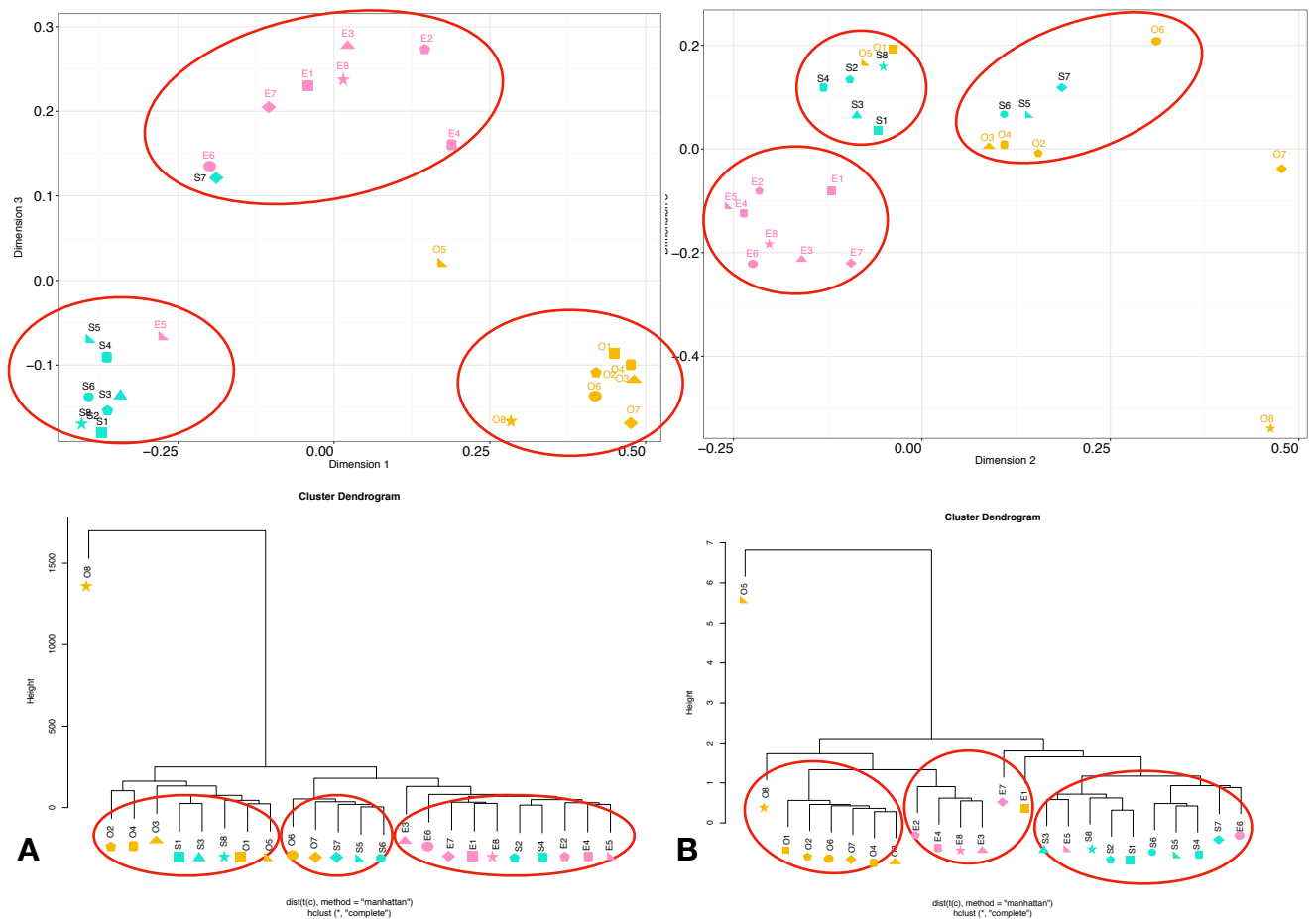
Dendrogramy klastrowania hierarchicznego wykazały trzy główne klastry zarówno w przypadku składu populacji jak i częstości występowania genów, których, pojedyncze skupienia wykazują podobieństwo między sobą i jednocześnie zdecydowanie większe zróżnicowanie względem grup powstałych w wyniku analizy PCoA. Na podstawie dendrogramu częstości występowania genów i wykresu PCoA dla zmienności taksonomicznej, zaobserwowano związek zmiany składu populacji bakteryjnych ze zmiennością częstości występowania genów w poszczególnych próbkach i odwrotnie.

Stopień zróżnicowania składu populacji bakteryjnych pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym określono przy pomocy wskaźnika różnorodności biologicznej Shannona (ang. Shannon diversity index). Stwierdzono, że w trakcie procesu oczyszczania ścieków dochodzi do zwiększenia zróżnicowania składu taksonomicznego, gdyż najbardziej zróżnicowanym (największa wartość H), pod względem składu populacji jest ściek oczyszczony, którego wartość w

teście Shannona wynosiła 3,107. Niższe wskaźniki różnorodności uzyskano dla ścieku surowego (2,489) i ścieku z komory napowietrzania (2,486) (Rycina 58).



Rycina 58. Stopień zróżnicowania składu populacji bakteryjnych pomiędzy miejscami poboru określony przy pomocy wskaźnika różnorodności biologicznej Shannona.



Rycina 59. A- Wykres PCoA analizy składu taksonomicznego w próbkach ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego, dla ośmiu poborów oraz dendrogram klastrowania hierarchicznego częstości występowania genów w ww. próbkach metagenomowego DNA. **B-** Wykres PCoA analizy częstości występowania genów w próbkach metagenomowego DNA ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego, dla ośmiu poborów oraz dendrogram klastrowania hierarchicznego składu taksonomicznego w ww. próbkach metagenomowego DNA. Legenda: S – ściek surowy, O – ściek z komory napowietrzania, E – ściek oczyszczony, 1-8 – numer poboru. Kolorowe symbole przy oznaczeniach prób obrazują wspólne próby zarówno dla wykresów PCoA jak i dendrogramów. Na czerwono zaznaczono wyodrębnione grupy na wykresach PCoA oraz grupy klastrow na dendrogramach.

5. DYSKUSJA

Nadużywanie i nieracjonalne stosowanie antybiotyków spowodowało gwałtowne narastanie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe wśród klinicznie istotnych bakterii, rozprzestrzeniających się również w środowisku, szczególnie wodnym (Van Boeckel i wsp., 2014; Turano i wsp., 2016; Conte i wsp., 2017; Lamba i wsp., 2017; Osińska i wsp., 2017). Obecność w środowisku bakterii opornych na antybiotyki, genów oporności i integronów stanowi zanieczyszczenie biotyczne oraz bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia publicznego (Martinez, 2009; Nascimento i wsp., 2017). Analiza występowania ARG i integronów – markerów wielooporności w genomach bakterii hodowlanych w połączeniu z analizą ilościową ARG obecnych w metagenomowym DNA i analizą składu populacji bakteryjnych na różnych etapach oczyszczania ścieków miała na celu dostarczenie informacji na temat rodzaju i częstości występowania istotnych dla zdrowia publicznego determinant oporności, jak również identyfikację drogi rozprzestrzeniania się oporności i potencjalnego udziału ścieku oczyszczonego w zwiększaniu różnorodności i częstości występowania genów rezystomu środowiskowego.

Proces oczyszczania ścieków znacząco obniża liczbę bakterii, lecz nie eliminuje ich zupełnie (Munir i wsp., 2011; Mokracka i wsp., 2012; Turolla i wsp., 2018). W przeprowadzonych badaniach, najwyższą średnią liczbę bakterii heterotroficznych odnotowano w ścieku surowym ($6,7 \times 10^6$ CFU/ml), najniższą w ścieku oczyszczonym ($2,1 \times 10^5$ CFU/ml), natomiast w ścieku z komory napowietrzania średnia ta była nieznacznie niższa niż w ścieku surowym i wynosiła $4,0 \times 10^6$ CFU/ml. W procesie oczyszczania ścieku redukcja liczby bakterii heterotroficznych wynosiła średnio 96,7%. Odnotowano istotny spadek ($p=0,001$) ogólnej liczby bakterii heterotroficznych pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym oraz pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym. Powyższe wyniki są porównywalne z wcześniejszymi badaniami dotyczącymi tej samej oczyszczalni, jak również innych polskich oczyszczalni (Koczura i wsp., 2012; Bondarczuk i Piotrowska-Seget, 2017; Osińska i wsp., 2017; Piotrowska i wsp., 2017; Korzeniewska i Harnisz, 2018). W dwóch oczyszczalniach ścieków z okręgu brukselskiego liczba bakterii heterotroficznych w ścieku surowym i ścieku oczyszczonym była o rząd wielkości wyższa niż w COŚ, co wiązać się może z wielkością populacji i systemem operacyjnym tychże oczyszczalni (Lorenzo i wsp., 2018). Bardziej efektywną

redukcję liczby bakterii w ścieku oczyszczonym (99,5%), zaobserwował Turolla i wsp. (2018) w trzech oczyszczalniach w Mediolanie, przy czym nie odnotowano znaczącego wpływu dodatkowych metod dezynfekcji na liczbę bakterii heterotroficznych w ścieku oczyszczonym ($1 \pm 1,1 \times 10^4$ CFU/ml).

Interesującym było porównanie liczby bakterii heterotroficznych uzyskanych z zastosowaniem metod hodowlanych z liczbą bakterii szacowanych na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA w metagenomowym DNA. W badaniach własnych największą średnią liczbę kopii 16S rRNA odnotowano w ścieku z komory napowietrzania, ($1,0 \times 10^9$ kopii/ml), natomiast najmniejszą w ścieku oczyszczonym ($2,5 \times 10^6$ kopii/ml). Średnia redukcja liczby kopii genu 16S rRNA w procesie oczyszczania ścieku była istotna statystycznie i wynosiła 99,5%. W badaniach dotyczących zielonogórskiej mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków uzyskano podobny procent redukcji przy zbliżonej średniej liczbie kopii genu 16S rRNA w ścieku surowym i o rząd niższej w ścieku oczyszczonym, co prawdopodobnie ma związek z równoważną liczbą mieszkańców (Makowska i wsp., 2016). Podobny rząd wielkości liczby kopii genu 16S rRNA w ścieku surowym oczyszczalni w Żywcu został istotnie zredukowany w procesie oczyszczania, choć w ścieku oczyszczonym był o dwa rzędy większy niż w badaniach własnych (Bondarczuk i Piotrowska-Seget, 2019). Jednak redukcja liczby kopii genu 16S rRNA nie zawsze jest statystycznie istotna. W ścieku oczyszczonym 13 oczyszczalni z terenu Warmii i Mazur, uzyskano od $2,1 \times 10^6$ do $3,0 \times 10^7$ kopii/ml i nie odnotowano istotnego zmniejszenia liczby kopii 16S rRNA w procesie oczyszczania ścieków (Korzeniewska i Harnisz, 2018). O rząd wielkości wyższe wartości liczby kopii genu 16S rRNA w ścieku oczyszczonym ($2,83 \pm 0,6 \times 10^7$ kopii/ml) wykazano w oczyszczalni ścieków w Tianjin (Yang i wsp., 2016b). W badaniach przyszpitalnej oczyszczalni ścieków w Royal Oak w stanie Michigan, USA, liczba kopii genu 16S rRNA w ścieku oczyszczonym była wyższa o dwa rzędy wielkości (Walia i wsp., 2016). Podobnie w oczyszczalni w Jinan w Chinach, uzyskano znacznie wyższą liczbę kopii genu 16S rRNA w ścieku oczyszczonym (10^{10} kopii/ml) (Wang i wsp., 2017).

Porównując liczbę bakterii hodowlanych ze ścieku surowego i ścieku z komory napowietrzania z liczbą mikroorganizmów szacowaną na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA (liczba kopii genu 16S rRNA/4), stwierdzono różnice odpowiednio, o dwa i trzy

rzędy wielkości. Różnice podobnego rzędu stwierdzano dla prób wód powierzchniowych i ścieku z oczyszczalni ścieków (Czekalski i wsp., 2012; Gao i wsp., 2012; Makowska i wsp., 2016). Liczba bakterii hodowalnych ze ścieku oczyszczonego była niższa o rząd wielkości od liczby bakterii szacowanej na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA. Uzyskane wyniki wskazują, że tak jak w przypadku wielu środowisk, większość mikroorganizmów pochodzących z oczyszczalni ścieków jest niehodowalna w warunkach laboratoryjnych (Amann i wsp., 1995).

Bakterie grupy coli są mikroorganizmami wskaźnikowymi do oceny poziomu zanieczyszczenia ścieków bakteriami, również chorobotwórczymi, związanymi z człowiekiem i zwierzętami. Średnia liczba bakterii tej grupy wyizolowanych ze ścieku surowego ($1,2 \times 10^6$ CFU/ml) stanowiła aż 82,1% liczby bakterii heterotroficznych. Średnio o rząd niższe wartości CFU/ml zaobserwowano dla bakterii grupy coli izolowanych ze ścieku z komory napowietrzania ($3,1 \times 10^5$ CFU/ml), a o trzy rzędy ze ścieku oczyszczonego ($5,2 \times 10^3$ CFU/ml). Stopień redukcji liczby bakterii grupy coli w procesie oczyszczania był istotny i wynosił 98,3%. Nieco mniejsze wielkości liczby bakterii grupy coli notowano wcześniej dla tej samej oczyszczalni, a porównywalne z innymi oczyszczalniami na terenie Polski (Mokracka i wsp., 2012; Korzeniewska i Harnisz, 2013). Liczby bakterii grupy coli wyizolowane ze ścieku oczyszczonego oczyszczalni z odmiennych regionów klimatycznych są porównywalne do uzyskanych w badaniach własnych np. oczyszczalnia ścieków w Tunezji ($6,7 \pm 0,8 \times 10^3$ CFU/ml), bądź niższe: średnio o 1-2 rzędy wielkości w ścieku oczyszczonym z pięciu oczyszczalni ścieków na południu Afryki (Osuolale i Okoh, 2017; Souissi i wsp., 2018).

Liczba bakterii *E. coli* w badaniach własnych była średnio najwyższa w ścieku z komory napowietrzania, a stopień redukcji w trakcie procesu oczyszczania wynosił 99,5%. Stwierdzono istotny spadek liczby bakterii grupy coli i *E. coli*, ($p < 0,001$) pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym. Skuteczność redukcji tych bakterii była na podobnym poziomie dla innych oczyszczalni mechaniczno-biologicznych w Polsce (ponad 99%), choć bezwzględna liczba *E. coli* w ścieku oczyszczonym w oczyszczalniach ścieków Gdańsk Wschód i Gdańsk Dębogórze oraz w Toruniu i na Warmii i Mazurach była wyższa (Paluszak i wsp. 2003; Kotlarska i wsp., 2015; Korzeniewska i Harnisz, 2018). Niższe wartości odnotowano w badaniach Łuczkiwicz i wsp. (2010). Badania prowadzone w

miejskiej i szpitalnej oczyszczalni ścieków w Japonii, wskazują niemal identyczną liczbę *E. coli* w ścieku oczyszczonym ($2,4 \times 10^2$ CFU/ml - $5,3 \times 10^2$ CFU/ml), podobnie jak w najnowszych doniesieniach pochodzących z Brukseli, które w mechaniczno-biologicznej oczyszczalni wykazują zbliżoną redukcję wynoszącą 99,1% ($4,6 \times 10^4$ CFU/ml i $4,3 \times 10^2$ CFU/ml) (Yamashita i wsp., 2017; Lorenzo i wsp., 2018). Ponadto Turolla i wsp. (2018) wykazali, że stosowanie dodatkowych metod dezynfekcji (kwasu nadoctowego, promieniowania UV i podchlorynu sodu) w oczyszczalni ścieków w Mediolanie całkowicie redukuje liczbę bakterii *E. coli* w ścieku oczyszczonym ($3 \pm 1,2 \times 10^4$ CFU/ml w ścieku surowym, $5 \pm 5,9 \times 10$ CFU/ml przed dezynfekcją i brak *E. coli* w ścieku po dezynfekcji).

Średnia liczba bakterii z rodzaju *Enterococcus* i *S. aureus* w ścieku surowym była o 2 rzędy wielkości niższa od liczby bakterii grupy coli (odpowiednio $1,6 \times 10^4$ CFU/ml i $5,5 \times 10^4$ CFU/ml) i była zredukowana odpowiednio o 98,9% i 97,0%. Stwierdzono istotny spadek ($p < 0,001$) liczby *Enterococcus* sp. oraz *S. aureus* pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym. Podobne wartości liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* i nieco wyższy stopień redukcji odnotowano w badaniach prowadzonych w oczyszczalniach ścieków w Toruniu i w Gdańsku (odpowiednio 99,5%, 99,9%) (Paluszak i wsp., 2003; Łuczkiwicz i wsp., 2013). Analiza statystyczna wykazała umiarkowane korelacje pomiędzy liczbą bakterii grupy coli a przewodnością, a także liczbą *S. aureus* a przewodnością, zawartością substancji stałych rozpuszczonych i zasoleniem. Nie wykazano związku pomiędzy liczbą bakterii hodowalnych, a poszczególnymi poborami i porami roku.

W badaniach własnych we wszystkich poborach wyizolowano łącznie 840 szczepów z istotnymi mechanizmami oporności, w tym 492 szczepy wytwarzające ESBL, 198 szczepów CPE, 67 szczepów CPE typu OXA-48, 42 szczepy VRE i 41 szczepów MRSA.

Oporność na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe stwarza ogromne problemy w medycynie, wynikające z braku pozytywnego skutku działania β -laktamów, które stosowane są w leczeniu najpoważniejszych infekcji wywoływanych przez bakterie Gram-ujemne. Ponadto, oporność na β -laktamy często związana jest również z opornością na inne grupy antybiotyków takie jak aminoglikozydy i fluorochinolony, co znacznie ogranicza możliwości terapeutyczne (Naquin i wsp., 2017). Bakterie grupy coli

wytwarzające ESBL, obecne były w ścieku na wszystkich badanych etapach oczyszczania, i co istotne, również w ścieku oczyszczonym, w którym występowały ze zwiększoną częstością w stosunku do ogólnej liczby bakterii grupy coli (0,39%), w porównaniu ze ściekiem surowym (0,18%). Podobny trend wzrostu częstości uzyskano dla szczepów CPE i CPE typu OXA-48: częstość w ścieku oczyszczonym wynosiła odpowiednio 0,36% i 0,001%, natomiast w ścieku surowym 0,30% i 0,0009%. W ścieku oczyszczonym odnotowano również zwiększenie częstości występowania szczepów VRE i MRSA (odpowiednio 0,56% i 1,16%) w stosunku do liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* i liczby *S. aureus* w porównaniu do ścieku surowego (odpowiednio 0,38% i 0,04%). Tak więc, mechaniczno-biologiczna oczyszczalnia ścieków nie tylko nie eliminuje bakterii z ww. mechanizmami oporności, ale zwiększa częstość ich występowania w ścieku zrzucanym do Warty, jednej z trzech największych rzek w Polsce. Zwiększająca się częstość występowania bakterii opornych w ścieku oczyszczonym związana może być z obecnością biofilmu, który wg. Lépesovej i wsp. (2018) w dużej części tworzony jest przez bakterie grupy coli, a z kolei szczególny potencjał do jego tworzenia mają bakterie wielooporne. Ponadto zjawisko rosnącej częstości szczepów lekoopornych w ścieku oczyszczonym wskazywać też może na selekcję i procesy HGT w ścieku na wcześniejszym etapie oczyszczania czyli w komorze napowietrzania, co z kolei związane jest z niewielkimi stężeniami antybiotyków, chemioterapeutyków i innych zanieczyszczeń (Michael i wsp., 2013; Mao i wsp., 2015).

Analiza lekowrażliwości wskazuje, że wśród szczepów wytwarzających ESBL, największą częstość oporności zaobserwowano w przypadku cefotaksymu (92,6%) i ceftazydymu (85,0%) co znajduje uzasadnienie w rodzaju i częstości genów warunkujących ESBL. Uzyskane wyniki są wyższe od wyników przedstawionych przez Ojer-Usoz i wsp. (2014), które wykazywały 81,3% szczepów opornych na cefotaksym i 67,2% opornych na ceftazydym wśród szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w Navarra w Hiszpanii. Ponadto szczepy izolowane ze ścieku oczyszczonego charakteryzowały się wyższą opornością na te antybiotyki niż izolaty ze ścieku surowego. Odnotowano wzrost oporności bakterii wytwarzających ESBL na ertapenem ($p=0,049$) pomiędzy wiosną a latem i latem a jesienią, oraz spadek oporności ($p=0,049$) pomiędzy latem a zimą oraz jesienią a zimą. W

przypadku szczepów CPE najwyższą oporność i jednoczesny wzrost oporności u izolatów ze ścieku oczyszczonego w stosunku do ścieku surowego obserwowano dla ertapenemu (77,7%), natomiast u szczepów CPE typu OXA-48 dla imipenemu (75,0%) i meropenemu (62,5%).

Początkowo uważano, że integrony odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się wielolekooporności głównie w środowiskach szpitalnych (Cambray i wsp., 2010; Lupo i wsp., 2012). Obecnie wiadomo, że szczepy z integronami występują z wysoką częstością w środowisku naturalnym (Gillings i wsp., 2008a; 2014; 2015). Ze wszystkich analizowanych prób ścieku w ośmiu poborach, wyizolowano łącznie 4 320 szczepów, w tym 2 304 szczepy bakterii heterotroficznych (po 96 izolatów z każdej próbki ścieku i każdego poboru) i 2 016 szczepów bakterii z grupy coli, u których badano występowanie integronów. Dominującą klasą integronów u szczepów środowiskowych były integrony klasy 1, nie stwierdzono integronów klasy 2 i 3. Obecność integronu klasy 1 w genomie związana jest ze zjawiskiem wielooporności u bakterii (Leverstein-van Hall i wsp., 2003). Bakterie z integronami obecne były w próbkach ze wszystkich rodzajów ścieku, jednakże w trakcie procesu oczyszczania dochodziło do zmniejszenia ich częstości w genomach bakterii heterotroficznych i bakterii grupy coli. Największą częstości występowania genów integraz klasy 1 w genomach bakterii heterotroficznych odnotowano w ścieku surowym (27,6%), natomiast najmniejszą, choć nadal na wysokim poziomie, w ścieku oczyszczonym (21,1%). Podobne wyniki uzyskano dla bakterii grupy coli, choć częstość integronów w genomach bakterii izolowanych ze ścieku oczyszczonego była nieco wyższa (24,0%) niż u bakterii heterotroficznych. Znacznie niższe częstości występowania integronów u bakterii *Enterobacteriaceae* odnotowano w tej samej oczyszczalni ścieków w 2012 roku (Mokracka i wsp., 2012). Wyniki z oczyszczalni ścieków w Zielonej Górze wskazują niższe częstości występowania integronów zarówno u bakterii heterotroficznych jak i grupy coli ze ścieku oczyszczonego (Makowska i wsp., 2016). W badaniach dotyczących integronów u *E. coli* izolowanych z dwóch mechaniczno-biologicznych oczyszczalni ścieków w Gdańsku, stwierdzono występowanie zarówno integronów klasy 1 i klasy 2, z czego integrony klasy 1 występowały z nieco wyższą częstością niż w badaniach własnych (odpowiednio 28,6% i 38,3% u izolatów ze ścieku surowego oraz

26,5% i 37,1% ze ścieku oczyszczonego) (Kotlarska i wsp., 2015). Podobny trend redukcji częstości występowania genów integraz odnotowała Osińska i wsp. (2017).

Analiza statystyczna wykazała, że częstość występowania integronów była ujemnie skorelowana z genami *bla*_{CTX-M} i *bla*_{TEM} u szczepów CPE. Oznaczać to może, że te geny u szczepów CPE nie występują w strukturze integronów i jeżeli szczep ma w genomie *bla*_{CTX-M} i *bla*_{TEM} to raczej nie ma integronu. Analiza statystyczna nie wykazała związku pomiędzy częstością występowania integronów u bakterii hodowlanych, a poszczególnymi poborami i porami roku, choć zwiększoną częstość występowania integronów w wodach powierzchniowych wiązano z niższą temperaturą i porą zimową (Koczura i wsp., 2016). Pomimo tego, że proces oczyszczania ścieków zmniejsza częstość występowania bakterii z integronami oporności, to jednak w ścieku oczyszczonym nadal pozostają na wysokim poziomie, co wskazuje na ryzyko związane z rozprzestrzenianiem się determinant wielooporności w środowisku (Ben i wsp., 2017).

Analiza dotycząca ARG w genomach bakterii z istotnymi mechanizmami oporności wykazała ich obecność u szczepów izolowanych ze wszystkich próbek, również ze ścieku oczyszczonego. Wśród pałeczek grupy coli wytwarzających ESBL, dominującym (59,6%) był gen *bla*_{CTX-M}. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach Conte i wsp. (2017) dotyczących szczepów *E. coli* wytwarzających ESBL izolowanych z przyszpitalnej oczyszczalni ścieków w Paran w Brazylii. W badaniach własnych ponad połowa szczepów wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego miała ten gen (54,8%). Istnieje wiele doniesień o bardzo szerokim rozprzestrzenianiu się genów z rodziny *bla*_{CTX-M} z bakterii pochodzących ze szpitali do środowisk wodnych, poprzez ścieki (Taco i wsp., 2012; Pico et al., 2013; Oliveira i wsp., 2014; De Araujo i wsp., 2016; Dropa i wsp., 2016; Turano i wsp., 2016; Campana i wsp., 2017; Yang i wsp., 2017). W badaniach własnych dominującym wariantem genetycznym był *bla*_{CTX-M-15}, który jest najczęściej występującym genem u szczepów klinicznych izolowanych z ludzkich zakażeń (Zarfel i wsp., 2013; Ben Said i wsp., 2016; Borgogna i wsp., 2016). Gen *bla*_{CTX-M-15} pojawił się prawdopodobnie w wyniku mutacji genu *bla*_{CTX-M-3} (Poirel i wsp., 2002). β -laktamazy CTX-M obecnie dominują w Polsce i były po raz pierwszy zidentyfikowane w 1990 roku jako CTX-M-3 (Gniadkowski i wsp., 1998b; Livermore i wsp., 2007). Produkt

genu *bla*_{CTX-M-15} wykazuje 100 razy większą aktywność wobec ceftazydymu niż β -laktamaza CTX-M-3 (Cartelle i wsp., 2004).

U szczepów wytwarzających ESBL stwierdzono wysoką średnią częstość genów *bla*_{OXA-1} (34,5%), *bla*_{TEM} (32,0%), *bla*_{SHV} (12,8%), *bla*_{GES} (4,1%), *bla*_{DHA} (1,2%) i *bla*_{CMY} (0,4%), wśród których dominowały warianty: *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{DHA-9} i *bla*_{CMY-2}. Wysokiej częstości występowania genów gatunkowo-specyficznych cefalosporynaz *ampC* (58,2%) towarzyszył wzrost częstości ich występowania u szczepów pochodzących ze ścieku oczyszczonego (68,8%) w stosunku do ścieku surowego (63,7%). Gen naturalnie występującej cefalosporynazy *ampC*, odnotowany był w badaniach Manageiro i wsp. (2014) u 20% szczepów identyfikowanych jako *E. coli*, pochodzących ze ścieku oczyszczonego w oczyszczalni ścieków w Portugalii. W genomach 20% szczepów *C. freundii* stwierdzono również występowanie genu nabytej cefalosporynazy *bla*_{CMY-2} (Manageiro i wsp., 2014). Amador i wsp. (2015) i Galán-Sánchez i wsp. (2014) odnotowali współwystępowanie mechanizmów wytwarzania ESBL i AmpC u izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów hiszpańskich szpitali. W badaniach Galán-Sánchez i wsp. (2014) zaobserwowano, że spośród wszystkich szczepów wytwarzających ESBL, 78,2% wytwarzało też AmpC przy obecności genów: *bla*_{TEM} (51,9%), *bla*_{SHV} (6,3%), *bla*_{OXA-1} (3,8%) i *bla*_{CTX-M} (3,8%). Autorzy stwierdzili także, że najpowszechniej rozprzestrzeniającymi się cefalosporynazami wśród szczepów klinicznych są *bla*_{DHA} i *bla*_{CMY} (każdy z częstością 1,9%), które z nieco mniejszymi częstościami odnotowano również u szczepów ESBL w badaniach własnych.

W badaniach dotyczących genów β -laktamaz u szczepów *Enterobacteriaceae* wytwarzających ESBL wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego w Navarra w Hiszpanii odnotowano wyższe częstości genów *bla*_{CTX-M} (67,4%), *bla*_{TEM} (47%) i *bla*_{SHV} (17,4%) oraz znacznie niższe genu *bla*_{OXA-1} (8,3%) (Ojer-Usoz i wsp., 2014). W doniesieniach pochodzących z Czech, dotyczących ARG obecnych u szczepów wytwarzających ESBL izolowanych ze ścieku oczyszczonego przyszpitalnej, mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków z dezynfekcją dwutlenkiem chloru, stwierdzono znacznie wyższe częstości występowania genów *bla*_{TEM} (57,1%) i *bla*_{SHV} (19,0%) oraz o wiele niższe *bla*_{CTX-M} (33,3%) (Röderová i wsp., 2016). Natomiast w oczyszczalni ścieków w Wietnamie dominującym był gen *bla*_{TEM}, który występował u niemal wszystkich szczepów

wytwarzających ESBL (97%), wysoką częstość stwierdzono również dla genu *bla*_{CTX-M} (76%) (Lien i wsp., 2017).

W analizach dotyczących ARG u szczepów CPE zidentyfikowano geny: *bla*_{GES-5}, ze średnią częstością (30,3%), a także *bla*_{VIM-1} (7,8%) i *bla*_{NDM-1} (6,2%). Geny *bla*_{VIM-1} i *bla*_{NDM-1} z największą częstością wykryte były u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego. Gen *bla*_{VIM-1}, najczęściej odnotowywany jest w strukturze integronu klasy 1 (Walsh i wsp., 2003). Karbapenemaza GES-5, raportowana była u 25% szczepów zidentyfikowanych jako *K. pneumoniae* wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego zrzuconego do rzeki w Portugalii (Manageiro i wsp., 2014). Z dużo niższą częstością (3,8%) stwierdzono występowanie genu *bla*_{GES-5} u szczepów *K. pneumoniae* wytwarzających ESBL wyosobnionych ze szpitalnych ścieków oczyszczonych w Brazylii (Conte i wsp., 2017). W badaniach prowadzonych przez Zurfluh i wsp. (2017) odnotowano gen *bla*_{VIM-1} (7,8%) u szczepów CPE w ścieku surowym, przy czym nie zaobserwowano zwiększenia częstości w ścieku oczyszczonym. Szczepy CPE z genami *bla*_{NDM-1} odnotowano także w ścieku oczyszczonym oczyszczalni ścieków w Chinach (Yang i wsp., 2016b). Niepokojące jest to, że były one identyfikowane nie tylko u bakterii *Enterobacteriaceae* tj. *E. coli* i *Shigella sonnei*, ale także u *E. faecium*, *Acinetobacter seohaensis* i *Wautersiella falsenii*, co świadczy o szerokim rozprzestrzenianiu się tego genu wśród oportunistycznych patogenów należących do różnych rodzajów i rodzin, stwarzając poważne konsekwencje dla zdrowia publicznego (Yang i wsp., 2016b). W badaniach własnych w genomach szczepów CPE stwierdzono również występowanie genów warunkujących mechanizm ESBL, a mianowicie: *bla*_{CTX-M-15} (8,8%), *bla*_{TEM} (5,2%), *bla*_{OXA-1} (5,0%) i *bla*_{SHV} (0,9%). Ponadto zaobserwowano obecność naturalnie występujących genów *ampC* (50,2%) i ich nabytych wariantów *bla*_{DHA} (1,7%) oraz *bla*_{CMY} (0,2%), które występowały ze zwiększoną częstością u szczepów izolowanych ze ścieku oczyszczonego.

Zwiększoną częstość występowania genów *bla*_{OXA-48} odnotowano u izolatów CPE typu OXA-48 izolowanych ze ścieku oczyszczonego (100%) w porównaniu do ścieku surowego (82,9%). Wzrost częstości występowania genów *bla*_{OXA-48} u izolatów CPE ze ścieku oczyszczonego odnotowano także w badaniach Zurfluh i wsp. (2017). Nieliczne

doniesienia dotyczące CPE typu OXA-48, dotyczą obecności bakterii z genami *bla*_{OXA-48} w ścieku oczyszczonym w stanie Luizjana w USA (Naquin i wsp. 2017).

Stwierdzono, że prawie 70% szczepów wytwarzających ESBL i ponad 32% szczepów CPE wykazywało obecność przynajmniej dwóch genów β-laktamaz. Ponadto zaobserwowano znaczne zwiększenie częstości występowania przynajmniej czterech genów oporności na antybiotyki β-laktamowe wśród szczepów wytwarzających ESBL izolowanych ze ścieku oczyszczonego (13,7%), w porównaniu do ścieku surowego (7,8%). Jeden szczep wyisobniony ze ścieku oczyszczonego wykazywał obecność pięciu różnych genów β-laktamaz (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{OXA-1} i *bla*_{DHA-9}). Współwystępowanie genów różnych β-laktamaz odnotowano także we wcześniejszych badaniach, co wskazuje na występowanie jednocześnie różnych mechanizmów oporności na antybiotyki (Ojer-Usoz i wsp., 2014; Nascimento i wsp., 2017; Zurfluh i wsp., 2017).

W badaniach niniejszej pracy, dotyczących analizy genów oporności u szczepów *Enterococcus* sp. odnotowano zwiększoną częstość występowania genu *vanA* w genomach bakterii wyisobnionych ze ścieku oczyszczonego (11,7%) w stosunku do ścieku surowego (10,9%). Szczepy VRE izolowano także ze ścieku oczyszczonego oczyszczalni ścieków w Brnie, w których stwierdzono znacznie wyższą częstość genu *vanA* (86,0%) u enterokoków (Oravcova i wsp., 2017). W badaniach własnych, w przypadku szczepów *S. aureus*, częstość występowania genu *mecA* u szczepów wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (10,8%) była niższa niż w ścieku surowym (36,7%). Uzyskane wyniki korespondują z badaniami mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków z dezynfekcją chlorem lub promieniowaniem UV w USA, w których również zaobserwowano silną redukcję genów *mecA* u szczepów *S. aureus* wyizolowanych ze ścieku oczyszczonego (Rosenberg Goldstein i wsp., 2012).

Analiza statystyczna wykazała, że częstości występowania badanych genów były umiarkowanie, silnie, bardzo silnie i ujemnie ze sobą skorelowane. Ponadto stwierdzono, że częstości występowania genów *ampC* i *bla*_{DHA} u bakterii wytwarzających ESBL były umiarkowanie skorelowane z wartościami pH. Nie odnotowano związku pomiędzy częstością występowania genów u bakterii hodowlanych, a poszczególnymi poborami. Częstość występowania genu *bla*_{CTX} u szczepów wytwarzających ESBL malała ($p=0,049$) pomiędzy zimą a wiosną, zimą a latem, a także jesienią a wiosną. Częstość występowania

genu *bla_{OXA-1}* u szczepów wytwarzających ESBL wzrastała ($p=0,049$) pomiędzy zimą a latem, jesienią a zimą, wiosną a latem oraz malała pomiędzy latem a jesienią. Istotne różnice odnotowano także dla częstości występowania genu *ampC* u szczepów wytwarzających ESBL, która malała pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania, natomiast wzrastała pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym ($p=0,004$).

Obecność bakterii z integronami i genami oporności w ścieku oczyszczonym wskazuje na istnienie drogi rozprzestrzeniania się ARG w środowisku, wiodącą poprzez oczyszczalnię ścieków. Geny β -laktamaz, a także *vanA* i *mecA* kodowane plazmidowo, ulegają transmisji wśród szczepów ze środowisk szpitalnych do wód powierzchniowych na drodze HGT (Dropa i wsp., 2016; Conte i wsp., 2017; Yamashita i wsp., 2017). Liczne badania wykazały, że geny *bla_{CTX-M-15}*, a co najistotniejsze również *bla_{KPC}* i *bla_{NDM-1}*, zlokalizowane są w obrębie grupy plazmidów IncF, odpowiedzialnych za pojawienie się i globalne rozprzestrzenianie genów kodujących β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) i karbapenemazy, a także wirulencję bakterii (Coque i wsp., 2008; Gonullu i wsp., 2008; Carattoli, 2009; Wibberg i wsp., 2013; Calisto i wsp., 2011; Kumarasamy i Kalyanasundaram, 2012; Bevan i wsp., 2017). Niepokojący jest fakt, że plazmidy te są stabilne i utrzymują się w komórce bakteryjnej nawet pomimo braku presji selekcyjnej, wywoływanej obecnością antybiotyków (Carattoli, 2009). Najczęściej występują u klinicznych szczepów pałeczek *Enterobacteriaceae*, w tym u *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis*, ale także rozprzestrzeniają się wśród szczepów środowiskowych (Carattoli i wsp., 2001; Szczepanowski i wsp., 2005; Marcadé i wsp., 2009; García-Fernández i wsp., 2010; Villa i wsp., 2010; Yang i wsp., 2016b). Dodatkowo niektóre geny oporności, w tym *bla_{CTX-M}* czy *bla_{CMY}* występować mogą w sąsiedztwie sekwencji *ISEcp1* bądź pokrewnych, które to zawierając silny promotor zwiększają ekspresję genów zlokalizowanych poniżej (Poirel i wsp., 2008). Sekwencje typu *ISEcp1* mogą inicjować transpozycję tych fragmentów i w konsekwencji zwiększać rozprzestrzenianie genów oporności (Partridge, 2011).

Ze względu na ograniczenia metod hodowlanych, które nie dają pełnej charakterystyki rezystomu środowiskowego, przeprowadzono analizy ilościowe ARG i integronów oporności obecnych w metagenomie ściekowym. Ilościowe oznaczenia ARG w

metagenomowym DNA wskazują rzeczywiste częstości występowania istotnych ARG na poszczególnych etapach oczyszczania, zwłaszcza w ścieku oczyszczonym. Geny integrazy klasy 1, β -laktamaz, a także *mecA* i *vanA* stwierdzono we wszystkich próbkach metagenomowego DNA, również w ścieku oczyszczonym. Spośród analizowanych genów największe średnie liczby kopii uzyskano dla genu *intI1* i *bla_{OXA-1}*, które w ścieku surowym i w ścieku z komory napowietrzania były mniejsze o rząd wielkości od szacowanej liczby bakterii na podstawie genu 16S rRNA. W ścieku oczyszczonym największą średnią liczbę kopii genu stwierdzono dla *intI1*, *bla_{GES}* i *bla_{OXA-1}*, które występowały u 11,4% i 4,4%, 4,1% szacowanej liczby bakterii w ścieku oczyszczonym. Geny integrazy *intI1* obecne są w środowisku naturalnym i wykazują pewne zróżnicowanie sekwencji (Gillings i wsp., 2008b). Ilościowe wyniki uzyskane z wykorzystaniem uniwersalnych starterów, mogły zawyżyć faktyczne ilości integronów oporności w metagenomowym DNA ścieku. Ze względu na wysoką liczbę kopii genu *intI1* w metagenomie ścieku, zdecydowano się na analizy ilościowe genów integraz typowych dla bakterii klinicznych *intI1KL*. Najmniejszą średnią liczbę kopii w metagenomie ścieku oczyszczonego odnotowano dla genu *bla_{VIM}* i *bla_{KPC}*. Pozostałe geny różniły się od szacowanej liczby bakterii o 2-4 rzędy wielkości w ścieku surowym oraz o 1-3 w ścieku z komory napowietrzania i w ścieku oczyszczonym. Najwyższą liczbę kopii genów *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *vanA* i *mecA* odnotowano w ścieku z komory napowietrzania, natomiast najniższą w ścieku oczyszczonym. W przypadku genu *intI1*, *intI1KL*, *bla_{GES}* i *bla_{VIM}* najwyższa liczba kopii stwierdzona została w ścieku surowym, najniższa w ścieku oczyszczonym. Liczba kopii genu *intI1* w zielonogórskiej oczyszczalni ścieków była niższa o trzy rzędy wielkości w ścieku surowym i o dwa rzędy wielkości w ścieku oczyszczonym (Makowska i wsp., 2016). W ścieku oczyszczonym przyszpitalnej oczyszczalni ścieków w Michigan, USA, stwierdzono występowanie genów *bla_{CTX-M}* w wyższej koncentracji (10^3 kopii/ml), *bla_{TEM}* na podobnym poziomie (10^4 kopii/ml) i *bla_{SHV}* w niższej liczbie kopii genu (10^2 kopii/ml) (Walia i wsp., 2016). W badaniach dotyczących ARG obecnych w metagenomie oczyszczalni ścieków w Indiach zaobserwowano znacznie wyższe wartości liczby kopii genów *intI1*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* i *bla_{NDM}* w ścieku surowym i oczyszczonym (Lamba i Ahammad, 2017). Potwierdza to, że Indie są głównym regionem występowania genów oporności na β -laktamy i karbapenemy

w wysokiej koncentracji, ze względu na sprzyjający klimat, przeludnienie i niski poziom warunków sanitarnych (Nordmann i Poirel, 2014). Wyższą liczbę kopii genu *bla_{NDM}* odnotowano także w ścieku oczyszczonym oczyszczalni ścieków w Tianjin w Chinach (10^3 kopii/ml) (Yang i wsp., 2016b). W badaniach dotyczących genów oporności na karbapenemy prowadzonych w Katalonii, w hiszpańskiej oczyszczalni ścieków odnotowano o rząd wielkości niższe liczby kopii genów *bla_{KPC}* i *bla_{NDM}* w ścieku surowym oraz o dwa rzędy wielkości wyższe wartości liczby kopii ww. genów w ścieku oczyszczonym, natomiast genu *bla_{OXA-48}* nie zidentyfikowano (Subirats i wsp., 2017). Genu *bla_{OXA-48}* podobnie jak *bla_{VIM}* nie udało się także zidentyfikować w Chinach (Yang i wsp., 2016a). Liczbę kopii genu *bla_{KPC}* w tej samej oczyszczalni odnotowano na wyższym poziomie w ścieku oczyszczonym (10^3 kopii/ml), natomiast genu *bla_{GES}* na podobnym poziomie (10^5 kopii/ml) (Yang i wsp., 2016a). W badaniach dotyczących genów karbapenemaz w ściekach oczyszczonych pochodzących z tunezyjskich szpitali zaobserwowano znacznie wyższe liczby kopii genu *bla_{KPC}* ($9,3 \times 10^4 - 8,5 \times 10^5$ kopii/ml), *bla_{NDM}* ($3,7 \times 10^6 - 2,6 \times 10^7$ kopii/ml) i *bla_{OXA-48}* ($6,4 \times 10^4 - 1,6 \times 10^7$ kopii/ml) (Nasri i wsp., 2017).

Analiza genu *mecA* w oczyszczalni ścieków w Gothenburgu w Szwecji wykazała dużo niższą liczbę kopii genu, która wynosiła $6,0 \times 10^1$ kopii/ml w ścieku surowym i $0,5 \times 10$ kopii/ml w ścieku oczyszczonym (Börjesson i wsp., 2009). Redukcja liczby kopii genu *mecA* w trakcie procesu oczyszczania ścieków obserwowana była również w regionie Środkowoatlantyckim i Środkowo-Zachodnim Stanów Zjednoczonych (Rosenberg Goldstein i wsp., 2012). Natomiast w badaniach McConnell i wsp. (2018) prowadzonych w Kanadzie Atlantyckiej w mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków, gen *mecA* odnotowano w podobnej koncentracji (10^2 kopii/ml) w ścieku oczyszczonym, natomiast *vanA* stwierdzono poniżej poziomu detekcji, w przeciwieństwie do badań własnych, gdzie liczba kopii genu *vanA* była na wysokim poziomie i wahała się od $2,8 \times 10^4$ kopii/ml w ścieku surowym do $3,0 \times 10^2$ kopii/ml w ścieku oczyszczonym.

Analiza statystyczna wykazała, że liczby kopii badanych genów były umiarkowanie, silnie i bardzo silnie ze sobą skorelowane, oprócz *bla_{GES}* i *bla_{KPC}*. Ponadto zaobserwowano, że liczba kopii genów była ujemnie skorelowana z pH ścieków. Nie

zaobserwowano natomiast istotnego związku między miejscem poboru, porą roku, a liczbą kopii genów oporności.

Reasumując stwierdzono, że w trakcie oczyszczania ścieków zmniejsza się liczba kopii badanych genów w metagenomowym DNA w ścieku oczyszczonym w stosunku do ścieku surowego. Jednakże ściek oczyszczony stanowić może rezerwuar genów oporności, które rozprzestrzeniają się w środowisku (Berglund i wsp., 2015; Xu i wsp., 2015; Bondarczuk i Piotrowska-Seget, 2019).

W badaniach własnych stwierdzono, że najczęściej występującymi genami były: *intI1* > *bla_{GES}* > *intI1KL* > *bla_{TEM}* > *bla_{OXA-48}* > *bla_{SHV}* > *bla_{CTX-M}* > *mecA*. Częstość ich, obliczona w odniesieniu do liczby kopii genu 16S rRNA, wzrastała w metagenomie ścieku oczyszczonego w stosunku do ścieku surowego. Ponadto, zaobserwowano, że wzrost częstości genów *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-48}* i *mecA* ma miejsce już w metagenomym DNA ścieku z komory napowietrzania, co może wskazywać na to, że właśnie tam zachodzą wzmożone procesy HGT i selekcji izolatów z genami oporności. Procesy selekcji związane są z obecnością w ściekach antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych, śladowych stężeń metali ciężkich czy innych związków np. triklosanu (Michael i wsp., 2013; Kulkarni i wsp., 2017). W niniejszych badaniach nie analizowano ich zawartości w ściekach, wiadomym jednak jest, że już niewielkie ich stężenia stymulują selekcję (Tello i wsp., 2012; Gullberg i wsp., 2014; Bengtsson-Palme i Larsson, 2016b). Częstość występowania genów *bla_{OXA-1}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* i *vanA*, wzrasta w komorze napowietrzania, jednak maleje w metagenomie ścieku oczyszczonego. Zwiększona częstość występowania genów *intI1* oraz *intI1KL* podkreśla rolę integronów w rozprzestrzanianiu się wielolekooporności w środowisku na drodze HGT. Geny *intI1KL* powszechnie występujące u szczepów klinicznych różnią się nieznacznie sekwencją nukleotydową od genów integraz występujących wśród szczepów środowiskowych, od których pochodzą (Gillings i wsp., 2015; 2017). Zarówno „kliniczne” integrony jak i środowiskowe stanowią wskaźnik zanieczyszczenia antropogenicznego. Jednakże integrony kliniczne są uniwersalnymi markerami presji selekcyjnej wywoływanej przez zanieczyszczenia pochodzenia antropogenicznego (Gillings i wsp., 2015). Dodatkowo występowanie ich na elementach mobilnych oraz zawartość genów oporności na środki dezynfekcyjne i metale ciężkie, a także obecność determinant oporności na szeroki zakres antybiotyków, stwarza możliwość

nieograniczonego rozprzestrzeniania się wśród szczepów bytujących najczęściej w środowisku związanym z człowiekiem, a co najistotniejsze, także w środowiskach szpitalnych (Gillings i wsp., 2015; 2017).

We wcześniejszych badaniach dotyczących ARG w zielonogórskiej oczyszczalni ścieków odnotowano wzrost częstości występowania integronów oporności w ścieku oczyszczonym, jednakże wartość ta była znacznie niższa ($5,14\% \pm 7,27\%$) niż w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach (Makowska i wsp., 2016). W badaniach tych stwierdzono również, że ściek oczyszczony ma wpływ na zwiększenie częstości występowania integronów w wodzie odbiornika (Makowska i wsp., 2016). Zwiększenie częstości genu *intI1*, *bla_{TEM}* i *bla_{CTX-M}* w trakcie oczyszczania ścieków, obserwowano także w badaniach Borgogna i wsp. (2016) i Wang i wsp. (2017). Przy czym wartości te nigdzie nie osiągały tak wysokiego poziomu jak w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach. Dużo niższe wartości liczby kopii *bla_{CTX-M}/16S* rRNA (10^{-4}), *bla_{TEM}/16S* rRNA (10^{-5}) oraz *bla_{SHV}/16S* rRNA (10^{-5}) obserwowano w szpitalnym ścieku oczyszczonym w Michigan, USA (Walia i wsp., 2016). W badaniach prowadzonych w szpitalnej, mechaniczno-biologicznej z dezynfekcją chlorem, oczyszczalni ścieków w Rumunii, również stwierdzono niższe rezultaty wartości liczby kopii *bla_{SHV}/16S* rRNA (10^{-3}) i *bla_{VIM}/16S* rRNA (10^{-5}) w ścieku oczyszczonym (Szekeres i wsp., 2017). Wyniki najnowszych badań przeprowadzonych przez Freeman i wsp. (2018) w Kanadzie, wskazują większy udział genu *intI1* w porównaniu z *bla_{CTX-M}* w metagenomie ścieku oczyszczonego i jednoczesny wzrost częstości ww. genów w wodzie rzeki odbiornika ścieku oczyszczonego. W badaniach tych nie stwierdzono zwiększenia częstości występowania genów *vanA* i *mecA* w metagenomie ścieku oczyszczonego (Freeman i wsp., 2018). Ilościowa analiza ARG obecnych w metagenomie ścieku oczyszczonego w Hiszpanii, wykazała kumulację genów *bla_{KPC}* i *bla_{NDM}* determinujących oporność na karbapenemy, w przeciwieństwie do badań własnych, w których odnotowano spadek częstości ww. genów (Subirats i wsp., 2017). W badaniach tych nie stwierdzono również występowania genu *bla_{OXA-48}*, w miejskiej oczyszczalni ścieków, natomiast zaobserwowano w szpitalnym ścieku oczyszczonym na znacznie niższym poziomie niż w badaniach własnych, w których odnotowano kumulację genu *bla_{OXA-48}* w metagenomie ścieku oczyszczonego (Subirats i wsp., 2017).

Wielowymiarowa analiza wariancji wykazała różnice istotne statystycznie w częstości występowania genów ($p < 0,001$) pomiędzy miejscami poboru. Częstość genu *bla_{NDM}* (t-test, $p = 0,041$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a ściekiem z komory napowietrzania, częstość genów *bla_{GES}* (t-test, $p < 0,001$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem z komory napowietrzania a ściekiem oczyszczonym. Natomiast częstość genów *bla_{GES}* (t-test, $p < 0,001$), *mecA* (t-test, $p < 0,001$), *intI_{IKL}* (t-test, $p = 0,002$), *bla_{TEM}* (t-test, $p = 0,018$) wzrastała istotnie pomiędzy ściekiem surowym a oczyszczonym. Ilościowa analiza ARG i integronów w metagenomowym DNA wykazała, że geny *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *vanA* oraz *mecA* są umiarkowanie, silnie i ujemnie skorelowane ze sobą i co najistotniejsze, z genami *intI_I* i *intI_{IKL}*, które najczęściej występują u szczepów klinicznych. Ze względu na to, że geny te często zlokalizowane są na plazmidach i w strukturze integronów, wskazuje to na możliwość współwystępowania ww. ARG i rozprzestrzeniania się ich na drodze HTG za pośrednictwem integronów (Wang i wsp., 2017). Obecność ARG w środowisku może być zatem silnie skorelowana z występowaniem integronów (Gillings i wsp., 2015).

Uzyskane wyniki wskazują, że w trakcie oczyszczania ścieków dochodzi do zwiększenia częstości występowania integronów środowiskowych i klinicznych, a także istotnych dla zdrowia publicznego genów oporności na antybiotyki β -laktamowe i karbapenemowe. Jednocześnie badania te dowodzą skutecznego usuwania niektórych genów oporności, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Yang i wsp., 2014a).

Wyniki sekwencjonowania nowej generacji genu 16S rRNA w metagenomie ścieków, wskazują na przewagę bakterii należących do typu *Proteobacteria*, w tym głównie klasy *Gammaproteobacteria* (rodziny *Campylobacteraceae*, *Moraxellaceae*, *Aeromonadaceae*) w ścieku surowym. Rodziny *Campylobacteraceae* i *Moraxellaceae* zostały określone jako dominujące taksony w ścieku surowym w oczyszczalni ścieków w Szwecji (Bengtsson-Palme i wsp., 2016a). McLellan i wsp. (2010) oraz Ye i Zhang (2013) stwierdzili, że *Proteobacteria* stanowią ponad połowę mikroorganizmów obecnych w ścieku surowym w USA i Hong Kongu. Dodatkowo McLellan i wsp. (2010) oraz Novo i wsp., (2013) zaobserwowali, że wśród *Proteobacteria*, dominującą klasę stanowi *Gammaproteobacteria*, podobnie ją w badaniach własnych. W metagenomie ścieku z komory napowietrzania dominował typ *Bacteroidetes* (rodzina *Chitinophagaceae*), a także

Proteobacteria i należąca do niego klasa *Betaproteobacteria* (rodzina *Comamonadaceae*). Podobne rezultaty otrzymano z analizy próbek pochodzących z oczyszczalni ścieków w Chinach (Ye i Zhang, 2013). W metagenomie ścieku oczyszczonego również dominował typ *Proteobacteria*, a wśród nich klasa *Betaproteobacteria* oraz należąca do niej rodzina *Comamonadaceae*, rodzina *Pseudomonadaceae* należąca do klasy *Gammaproteobacteria* i rodzina *Campylobacteraceae* należąca do klasy *Epsilonproteobacteria*. Najczęściej dominujące taksony pokrywają się z oznaczonymi w ściekach oczyszczonych w Szwecji i Chinach (Ye i Zhang, 2013; Yang i wsp., 2014; Bengtsson-Palme i wsp., 2016a; Tang i wsp., 2016). Wysoki udział *Proteobacteria* w ściekach na różnych etapach oczyszczania, wynika przede wszystkim z obecności przedstawicieli rodzin *Campylobacteraceae*, *Moraxellaceae* i *Comamonadaceae*, które stanowią bakterie środowisk wodnych i glebowych, bakterie komensalne, a także oportunistyczne patogeny związane z człowiekiem i zwierzętami (Lastovica i wsp., 2014; Teixeira i Merquior, 2014; Willems, 2014).

Na podstawie analiz metagenomicznych stwierdzono, że populacje bakteryjne wszystkich próbek z ośmiu poborów składały się z bakterii należących do: 31 rodzin w obrębie czterech dominujących typów w ścieku surowym, 29 rodzin w obrębie pięciu dominujących typów w ścieku z komory napowietrzania oraz 49 rodzin w obrębie pięciu dominujących typów w ścieku oczyszczonym. Na podstawie wyników wielowymiarowej analizy wariancji stwierdzono, że badane próbki metagenomowego DNA różniły się statystycznie ($p=0,003$) pod względem składu taksonomicznego pomiędzy ściekiem surowym, ściekiem z komory napowietrzania i ściekiem oczyszczonym. Wyniki analizy PCoA i hierarchicznego klastrowania wskazują na związek między zmianą składu populacji bakteryjnych i częstością występowania genów na różnych etapach procesu oczyszczania ścieków. Określenie stopnia zróżnicowania populacji bakteryjnych wskaźnikiem bioróżnorodności Shannon, pomiędzy trzema miejscami poboru, pozwoliło na wskazanie ścieku oczyszczonego jako najbardziej zróżnicowanego pod względem składu populacji bakteryjnych. Podobne rezultaty odnotowano w oczyszczalni ścieków w Chinach (Tang i wsp., 2016). Zwiększenie zróżnicowania taksonomicznego w trakcie procesu oczyszczania ścieków może być związane z tworzeniem się biofilmów w środowisku oczyszczalni ścieków (Wakelin i wsp., 2008; Peng i wsp., 2017).

6. PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki wskazują na istnienie dróg rozprzestrzeniania się opornych bakterii i ARG oraz integronów wiodących od szpitali, poprzez ścieki szpitalne, ścieki miejskie, do wód powierzchniowych. Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy, wykazano znaczny udział oczyszczalni ścieków i uwalnianych ścieków oczyszczonych w zwiększaniu rezystomu środowiskowego. Proces oczyszczania ścieków zmniejsza ogólną liczbę bakterii i liczbę bakterii grupy coli, enterokoków i *S. aureus* jednak nie eliminuje bakterii opornych, ponieważ presja selekcyjna i procesy horyzontalnego transferu genów prowadzą do zwiększenia w ścieku oczyszczonym częstości występowania bakterii stwarzających największe zagrożenie dla zdrowia publicznego, a mianowicie: bakterii zawierających integrony, wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), wytwarzających karbapenemazy (CPE), metalo- β -laktamazy, a także szczepów VRE i MRSA. Ponadto, proces oczyszczania ścieków prowadzi do zwiększania częstości występowania genów integraz klasy 1 oraz *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48} i *mecA* w metagenomie ścieku oczyszczonego, który zasila rezystom wód powierzchniowych. W badaniach stwierdzono, że częstość występowania genów ma związek ze zmianami składu populacji mikroorganizmów.

Analiza i kontrola dróg rozprzestrzeniania się wielolekooporności w środowisku wodnym, poprzez ścieki, jest kluczowym elementem oceny zagrożenia dla zdrowia publicznego, jakie niosą obecne w ścieku oczyszczonym bakterie z genami oporności, integrony i determinanty oporności na antybiotyki ostatniej szansy, stosowane przy leczeniu najpoważniejszych infekcji bakteryjnych. Wyniki badań metagenomicznych w połączeniu z analizą opartą na metodach hodowlanych dostarczają szczegółowych informacji na temat ograniczonej skuteczności procesów oczyszczania ścieków przy usuwaniu zanieczyszczeń biotycznych, wskazując tym samym na potrzebę opracowania skutecznej strategii i wdrożenia dodatkowych metod dezynfekcji ścieków, w celu ograniczenia narastania i rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki w środowisku.

7. WNIOSKI

1. W ścieku oczyszczonym obecne są bakterie z genami stwarzającymi największe zagrożenie dla zdrowia publicznego, m.in. warunkującymi wytwarzanie β -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL) – *bla*_{CTX-M-15}, karbapenemaz- *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GES} i *bla*_{OXA-48}, *vanA* i *mecA*.
2. W trakcie oczyszczania ścieków następuje zwiększenie częstości występowania bakterii wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), karbapenemazy, szczepów VRE i MRSA.
3. Proces oczyszczania ścieków w oczyszczalni mechaniczno-biologicznej prowadzi do zwiększenia częstości integronów klasy 1 i niektórych genów oporności: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48} i *mecA* w rezystomie ścieku oczyszczonego.
4. Zwiększanie częstości występowania genów *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *vanA* i *mecA* w metagenomie ścieku zachodzi w komorze napowietrzania, co może wskazywać na wzmożoną selekcję i procesy horyzontalnego transferu genów w osadzie czynnym.
5. Istotne korelacje między częstością występowania genów w metagenomowym DNA, wskazują, że w procesie horyzontalnego transferu, geny oporności mogą być przenoszone wraz z innymi genami istotnymi dla zdrowia publicznego, za pośrednictwem integronów.
6. W trakcie procesu oczyszczania ścieków dochodzi do zmian składu taksonomicznego w ścieku oczyszczonym.
7. Występuje związek między składem populacji bakteryjnych, a rezystomem ścieku.
8. Obecność bakterii wieloopornych i genów oporności w ścieku oczyszczonym wskazuje na istnienie drogi rozprzestrzeniania się antybiotykooporności w środowisku wiodącej poprzez oczyszczalnie ścieków.

8. LITERATURA

- Acinas SG, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *FEMS Microbiol Ecol.* 1997;24:27-40.
- Aharonowitz Y, Cohen G, Martin JF. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:461-495.
- Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J. Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 2009;3(2):243-251.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(4):251-259.
- Amador PP, Fernandes RM, Prudêncio MC, Barreto MP, Duarte IM. Antibiotic resistance in wastewater: occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of class A and class C β -lactamases. *J Environ Sci Heal-Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng.* 2015;50(1):26-39.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995;59(1):143-169.
- Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B.* 1980;289:321-331.
- Amos GCA, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1785-1791.
- Aragón LM, Mirelis B, Miró E, Mata C, Gómez L, Rivera A, Coll P, Navarro F. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1029-1032.
- Arthur M, Molinas C, Dutka-Malen S, Courvalin P. Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene.* 1991;103(1):133-134.
- Atlas RM, Parks LC. *Handbook of Microbiological Media.* CRC Press, Inc. London. 1993.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006;14(4):176-182.
- Barlow M, Hall BG. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob Agents Ch.* 2002;46(5):1190-1198.
- Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, Ang O, Bal C, Casellas JM. Characterization of beta-Lactamase gene bla PER-2 , which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(3):616-620.
- Ben Said L, Jouini A, Alonso CA, Klibi N, Dziri R, Boudabous A, Ben Slama K, Torres C. Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* of water samples in Tunisia. *Sci Total Environ.* 2016;550:1103-1109.
- Ben W, Wang J, Cao R, Yang M, Zhang Y, Qiang Z. Distribution of antibiotic resistance in the effluents of ten municipal wastewater treatment plants in China and the effect of treatment processes. *Chemosphere.* 2017;172:392-398.
- Bengtsson-Palme J, Hammarén R, Pal C, Östman M, Björleinius B, Flach CF, Fick J, Kristiansson E, Tysklind M, Larsson DGJ. Elucidating selection processes for antibiotic resistance in sewage treatment plants using metagenomics. *Sci Total Environ.* 2016a;572:697-712.
- Bengtsson-Palme J, Larsson DG. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int.* 2016b;86:140-149.
- Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 2010;12(9):2385-2397.
- Berglund C, Ito T, Ma XX, Ikeda M, Watanabe S, Söderquist B, Hiramatsu K. Genetic diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying type IV SCCmec in Orebro County and the western region of Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(1):32-41.
- Berglund B, Khan GA, Lindberg R, Fick J, Lindgren PE. Abundance and dynamics of antibiotic resistance genes and integrons in lake sediment microcosms. *PLoS One.* 2014;9(9).

- Berglund B, Fick J, Lindgren PE. Urban wastewater effluent increases antibiotic resistance gene concentrations in a receiving northern European river. *Environ Toxicol Chem.* 2015;34(1):192-196.
- Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2145-2155.
- Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(1):42-51.
- Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. Microbial diversity and antibiotic resistance in a final effluent-receiving lake. *Sci Total Environ.* 2019;650:2951-2961.
- Borgogna TR, Borgogna J-L, Mielke JA, Brown CJ, Top EM, Botts RT, Cummings DE. High diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in municipal wastewater and urban wetlands. *Microb Drug Resist.* 2016;22(4):312-320.
- Börjesson S, Melin S, Matussek A, Lindgren P. A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 2009;43(4):925-932.
- Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2667-2672.
- Brandt JJ, Chatwood LL, Crowder MW. Analysis of three overexpression systems for VanX, the Zinc(II) dipeptidase required for high-level vancomycin resistance in bacteria. *Protein Expr Purif.* 2000;20(2):300-307.
- Brown-Jaque M, Calero-Cáceres W, Espinal P, Rodríguez-Navarro J, Miró E, González-López JJ, Cornejo T, Hurtado JC, Navarro F, Muniesa M. Antibiotic resistance genes in phage particles isolated from human faeces and induced from clinical bacterial isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):434-442.
- Burch TR, Sadowsky MJ, LaPara TM. Fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons in soil microcosms following the application of treated residual municipal wastewater solids. *Environ Sci Technol.* 2014;48(10):5620-5627.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-1233.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.
- Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277(1):84-90.
- Calisto F, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. INCF plasmids responsible by dissemination of *bla_{KPC}* gene among *Enterobacteriaceae*. *BMC Proc.* 2011;5:P132.
- Cambray, G, Guerout, A-M, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet.* 2010;44(1):141-166.
- Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picão RC. NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(1):119-121.
- Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-475.
- Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:144-153.
- Carattoli A, Villa L, Pezzella C, Bordi E, Visca P. Expanding drug resistance through integron acquisition by IncFI plasmids of *Salmonella enterica* *Typhimurium*. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):444-447.
- Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-2238.
- Cartelle M, del Mar Tomas M, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2308-2313.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):686-707.
- Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell.* 2014;159(6):1300-1311.

- Conte D, Palmeiro JK, da Silva Nogueira K, de Lima TM, Cardoso MA, Pontarolo R, Degaut Pontes FL, Dalla-Costa LM. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;136:62-69.
- Coque TM, Novais A, Carattoli A, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P. Dissemination of clonally related *E. coli* strains expressing ESBL CTX-M-15. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(14):195-200.
- Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2005;294(8):479-486.
- Czekalski N, Berthold T, Caucci S, Egli A, Bürgmann H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front Microbiol.* 2012;3:1-18.
- Czekalski N, Gascón Díez E, Bürgmann H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* 2014;8(7):1381-1390.
- D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):305-317.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 2006;311(5759):374-377.
- De Araujo CFM, Silva DM, Carneiro MT, Ribeiro S, Fontana-Maurell M, Alvarez P, Asensi MD, Zahner V, Carvalho-Assef AP. Detection of carbapenemase genes in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(7):4380-4383.
- De Champs C, Poirel L, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J, Nordmann P. Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3031-3034.
- Dillon B, Thomas L, Mohmand G, Zelynski A, Iredell J. Multiplex PCR for screening of integrons in bacterial lysates. *J Microbiol Methods.* 2005;62(2):221-232.
- Ding H, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Wang A, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(10):915-921.
- Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, da Silva QM, Matté GR, Sato MI, Matté MH. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23(5):4953-4958.
- Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing *bla*_{GES-1} and a fused product of *aac(3)-Ib/aac(6')-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(3):638-645.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(1):24-27.
- Eggleston K, Zhang R, Zeckhauser RJ. The global challenge of antimicrobial resistance: Insights from economic analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(8):3141-3149.
- El-Gamal MI, Oh CH. Current status of carbapenem antibiotics. *Curr Top Med Chem.* 2010;10(18):1882-1897.
- EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. 2016.
- Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241-263.
- Fatemi SM, Shokri D, Mohammadi S, Koupahi H. Investigation of NDM metallo-beta-lactamase and CMY-2 AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. isolated from human. *Comp Clin Path.* 2018;27(4):1007-1015.
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science.* 2012;337(6098):1107-1111.
- Freeman CN, Scriver L, Neudorf KD, Truelstrup Hansen L, Jamieson RC, Yost CK. Antimicrobial resistance gene surveillance in the receiving waters of an upgraded wastewater treatment plant. *Facets.* 2018;3(1):128-138.
- Galán-Sánchez F, Aznar-Marín P, Marín-Casanova P, Rodríguez-Iglesias M. Diversity of *bla* genes and low incidence of CTX-M in plasmid-mediated AmpC-producing *Escherichia coli* clinical isolates. *APMIS.* 2014;122(9):796-799.

- Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Sci Total Environ*. 2012;421-422:173-183.
- García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. An ertapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4178-4184.
- Garner E, Chen C, Xia K, Bowers J, Engelthaler D, McLain J, Edwards MA, Pruden A. Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in full-scale reclaimed water distribution systems and corresponding potable systems. *Environ Sci Technol*. 2018;52(11):6113-6125.
- Gholizadeh Y, Courvalin P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16:11-17.
- Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, Holley M, Stokes HW. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol*. 2008a;190(14):5095-5100.
- Gillings MR, Krishnan S, Worden PJ, Hardwick SA. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2008b;287(1):56-62.
- Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. *Front Microbiol*. 2013;4:1-10.
- Gillings MR. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(2):257-277.
- Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu YG. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J*. 2015;9(6):1269-1279.
- Gillings MR. Class 1 integrons as invasive species. *Curr Opin Microbiol*. 2017;38:10-15.
- Gillings, M. R. DNA as a pollutant: the clinical class 1 integron. *Curr Pollution Rep*. 2018;4(1):49-55.
- Gilliver MA, Bennett M, Begon M, Hazel SM, Hart CA. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*. 1999;401(6750):233-234.
- Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26(2):163-171.
- Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P. Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum β -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):175-182.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):578-579.
- Gniadkowski M, Pałucha A, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998a;42(12):3079-3085.
- Gniadkowski M, Schneider I, Pałucha A, Jungwirth R, Mikiewicz B, Bauernfeind A. Cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998b;42(4):827-832.
- Gniadkowski M, Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Warszawa. 2009.
- Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, Walsh TR. Dissemination of CTX-M-15 β -lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol*. 2008;46(3):1110-1112.
- Götz F, Bannerman T, Schleifer KH. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. 1, 5-75. W: Dworkin M, Falkow S, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer. 2006.
- Grape M, Farra A, Kronvall G, Sundström L. Integrons and gene cassettes in clinical isolates of co-trimoxazole-resistant Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(3):185-192.

- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*. 2011;7(7):1-9.
- Gullberg E, Albrecht LM, Karlsson C, Sandegren L, Andersson DI. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio*. 2014;5:e01918-14.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chem Biol*. 1998;5(10).
- Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(4):669-685.
- Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(6):1011-1014.
- Hanssen AM, Ericson Sollid JU. *SCCmec* in staphylococci: Genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;46(1):8-20.
- Harnisz M, Korzeniewska E, Ciesielski S, Gołaś I. Tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Sci Total Environ*. 2015;505:704-711.
- Harrigan W F, McCance ME. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*, revised ed. Academic Press. London, UK. 1976.
- Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 1998;317(7159):657-660.
- Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:i3-10.
- Hennequin C, Chlilek A, Beyrouthy R, Bonnet R, Robin F. Diversity of DHA-1-encoding plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 16 French hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):2981-2989.
- HMSO. Report on microbial antibiotic resistance in relation to food safety by the Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. The Stationery Office. London. 1999.
- Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):3203-3206.
- Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(9):3045-3049.
- Jacoby GA, Bush K. β -Lactam Resistance in the 21 Century. W: White DG, Alekshun MN, Mcdermott PF, Levy SB. (eds) *Frontiers in Antimicrobials Resistance*, ASM Press, USA. 2005;53-65.
- Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-182.
- Jevons M.P. Methicillin-resistant staphylococci. *Brit Med J*. 1961;1:24-25.
- Jiang X, Ellabaan MMH, Charusanti P, Munck C, Blin K, Tong T, Weber T, Sommer MOA, Lee SY. Dissemination of antibiotic resistance genes from antibiotic producers to pathogens. *Nat Commun*. 2017;8:1-7.
- Johnson JR, Brown JJ. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal (a1- 4) Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1996;173:920-926.
- Jones BV, Sun F, Marchesi JR. Comparative metagenomic analysis of plasmid encoded functions in the human gut microbiome. *BMC Genomics*. 2010;11:46.
- Juda M, Malm A. Mechanizmy oporności pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* na karbapenemy. *Forum Zakazeń*. 2013;4(1):53-57.
- Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T, Nickerson KW. Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(11):4615-4619.
- Kawalec M, Pietras Z, Daniłowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, Willems RJL. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: Characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):147-153.

- Kim C, Mwangi M, Chung M, Milheiriço C, de Lencastre H, Tomasz A. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. *PLoS One*. 2013;8(12):e82814.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):1-11.
- Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. W: Manual of Clinical Microbiology. Murray PR, Baron E, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover R. ASM Press, Washington D.C. 1999.
- Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol*. 2010;44:580-587.
- Knoth H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cfoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-317.
- Koczura R, Mokracka J, Jabłońska L, Gozdecka E, Kubek M, Kaznowski A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci Total Environ*. 2012;414:680-685.
- Koczura R, Mokracka J, Taraszewska A, Łopacinska N. Abundance of class 1 integron-integrase and sulfonamide resistance genes in river water and sediment is affected by anthropogenic pressure and environmental factors. *Microb Ecol*. 2016;72(4):909-916.
- Korzeniewska E, Harnisz M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *J Environ Manage*. 2013;128:904-911.
- Korzeniewska E, Harnisz M. Relationship between modification of activated sludge wastewater treatment and changes in antibiotic resistance of bacteria. *Sci Total Environ*. 2018;639:304-315.
- Kotlarska E, Łuczkiwicz A, Pisowacka M, Burzyński A. Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environ Sci Pollut Res*. 2015;22(3):2018-2030.
- Krawczyk B, Samet A, Bronk M, Hellmann A, Kur J. Emerging linezolid-resistant, vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient of a haematological unit in Poland. *Polish J Microbiol*. 2004;53(3):193-196.
- Kulkarni P, Olson ND, Raspanti GA, Rosenberg Goldstein RE, Gibbs SG, Sapkota A, Sapkota AR. Antibiotic concentrations decrease during wastewater treatment but persist at low levels in reclaimed water. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(6):pii:E668.
- Kumar A, Mukherjee S, Chakraborty R. Characterization of a novel trimethoprim resistance gene, *dfrA28*, in class 1 integron of an oligotrophic *Acinetobacter johnsonii* strain, MB52, isolated from River Mahananda, India. *Microb Drug Resist*. 2010;16(1):29-37.
- Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(1):243-244.
- Lamba M, Ahammad SZ. Performance comparison of secondary and tertiary treatment systems for treating antibiotic resistance. *Water Res*. 2017;127:172-182.
- Lang KS, Anderson JM, Schwarz S, Williamson L, Handelsman J, Singer RS. Novel florfenicol and chloramphenicol resistance gene discovered in Alaskan soil by using functional metagenomics. *Env Microbiol*. 2010;76(15):5321-5326.
- Lastovica AJ, On SLW, Zhang L. The Family *Campylobacteraceae*. W: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.
- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemioth*. 2011;55:4606-4612.
- Lépesová K, Kraková L, Pangallo D, Medved'ová A, Olejníková P, Mackuřák T, Tichý J, Grabic R, Birošová L. Prevalence of antibiotic resistant coliform bacteria, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. in wastewater sewerage biofilm. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;14:145-151.
- Leverstein-van Hall MA, M Blok HE, T Donders AR, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis*. 2003 Jan 15;187(2):251-259.

- Lien LTQ, Lan PT, Chuc NTK, Hoa NQ, Nhung PH, Thoa NTM, Diwan V, Tamhankar AJ, Stålsby Lundborg C. Antibiotic resistance and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Vietnam. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(7):1-11.
- Livermore DM. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(4):557-584.
- Livermore DM, Woodford N. The b-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006;14(9).
- Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):165-174.
- Lorenzo P, Adriana A, Jessica S, Carles B, Marinella F, Marta L, Luis BJ, Pierre S. Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*. 2018;206:70-82.
- Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol*. 2012;3:1-13.
- Łuczkiwicz A, Fudala-Ksiażek S, Jankowska K, Quant B, Olańczuk-Neyman K. Diversity of fecal coliforms and their antimicrobial resistance patterns in wastewater treatment model plant. *Water Sci Technol*. 2010;61(6):1383-1392.
- Łuczkiwicz A, Felis E, Ziembinska A, Gnida A, Kotlarska E, Olanczuk-Neyman K, Surmacz-Gorska J. Resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. to selected antimicrobial agents present in municipal wastewater. *J Water Health*. 2013;11:600-612.
- Ma L, Zhang XX, Zhao F, Wu B, Cheng S, Yang L. Sewage treatment plant serves as a hot-spot reservoir of integrons and gene cassettes. *J Environ Biol*. 2013;34:391-399.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(3):190-212.
- Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39(1):81-86.
- Magiorakos A, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-281.
- Makowska N, Koczura R, Mokracka J. Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*. 2016;144:1665-1673.
- Manageiro V, Ferreira E, Caniça M, Manaia CM. GES-5 among the β -lactamases detected in ubiquitous bacteria isolated from aquatic environment samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;351(1):64-69.
- Mao D, Yu S, Rysz M, Luo Y, Yang F, Li F, Hou J, Mu Q, Alvarez PJ. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res*. 2015;85:458-466.
- Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(1):67-71.
- Markiewicz Z, Kwiatkowski ZA. Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wyd. Nauk. PWN 2010.
- Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Society*. 2000;44(7):1771-1777.
- Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci*. 2009;276(1667):2521-2530.
- Martínez JL. Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Front Microbiol*. 2012;2:265.
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(8):608-620.
- McConnell MM, Truelstrup Hansen L, Jamieson RC, Neudorf KD, Yost CK, Tong A. Removal of antibiotic resistance genes in two tertiary level municipal wastewater treatment plants. *Sci Total Environ*. 2018;643:292-300.
- McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:3224-3228.

- McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreihcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol.* 2010;12(2):378-392.
- Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.* 1997;24:19-45.
- Méndez-Alvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. *Int Microbiol.* 2000;3(2):71-80.
- Mendonça N, Ferreira N, Louro D, Canica M. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;34(1):29-37.
- Michael I, Rizzo L, McArdell CS, Manaia CM, 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. 2013;47:957-995.
- Międzobrodzki J, Małachowa N, Markiewski T, Białecka A, Kasprowicz A. Differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates based on phenotypical characters. *Postępy Hig Med Dosw.* 2008;62:322-327.
- Mitchell JM, Clasman JR, June CM, Kaitany KC, LaFleur JR, Taracila MA, Klinger NV, Bonomo RA, Wymore T, Szarecka A, Powers RA, Leonard DA. Structural basis of activity against aztreonam and extended spectrum cephalosporins for two carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Biochemistry.* 2015;54(10):1976-1987.
- Młynarczyk A, Młynarczyk G. Molekularne mechanizmy oporności na leki przeciwbakteryjne u *Staphylococcus aureus*. *Post Mikrobiol.* 2008;47(3):423-429.
- Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 2012;46(10):3353-3363.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):906-909.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):513-522.
- Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water Res.* 2011;45(2):681-693.
- Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *Am J Med.* 1997;102(3):284-293.
- Naas T, Poirel L, Karim A, Nordmann P. Molecular characterization of In50, a class 1 integron encoding the gene for the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;176(2):411-419.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;1:42-52.
- Nagulapally SR, Ahmad A, Henry A, Marchin GL, Zurek L, Bhandari A. Occurrence of ciprofloxacin-, trimethoprim-sulfamethoxazole-, and vancomycin-resistant bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Water Environ Res.* 2009;81(1):82-90.
- Naquin T, Robichaux K, Belding C, Bergeron S, Boopathy R. Presence of sulfonamide and carbapenem resistance genes in a sewage treatment plant in southeast Louisiana, USA. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017;124:10-16.
- Nascimento T, Cantamessa R, Melo L, Fernandes MR, Fraga E, Dropa M, Sato MIZ, Cerdeira L, Lincopan N. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Sci Total Environ.* 2017;598:910-915.
- Nasri E, Subirats J, Sánchez-Melsió A, Mansour HB, Borrego CM, Balcázar JL. Abundance of carbapenemase genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{OXA-48}*) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. *Environ Pollut.* 2017;229:371-374.
- Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M. Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post Mikrobiol.* 2013;52(3):261-271.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Dupont C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(5):962-969.
- Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(9):821-830.

- Novo A, André S, Viana P, Nunes OC, Manaia CM. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Res.* 2013;47(5):1875-1887.
- O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist.* 2015;8:217-230.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 2000;405(6784):299-304.
- Ojer-Usoz E, González D, García-Jalón I, Vitas AI. High dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 2014;56:37-47.
- Oladipo IC, Sanni A, Swarnakar S. Phenotypic and genomic characterization of *Enterococcus* species from some Nigerian fermented foods. *Food Biotechnol.* 2013;27(1):39-53.
- Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, Matté MH, Mamizuka EM, Sato MI, Pestana de Castro AF, Lincopan N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(3):849-852.
- Önnberg A, Mölling P, Zimmermann J, Söderquist B. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS.* 2011;119(4-5):287-295.
- Oravcova V, Mihalcin M, Zakova J, Pospisilova L, Masarikova M, Literak I. Vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene in treated municipal wastewater and their association with human hospital strains. *Sci Total Environ.* 2017;609:633-643.
- Osińska A, Korzeniewska E, Harnisz M, Niestępski S. The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Sci Total Environ.* 2017;577:367-375.
- Osterblad M, Norrdahl K, Korpimäki E, Huovinen P. Antibiotic resistance - How wild are wild mammals? *Nature.* 2001;409:37-38.
- Osuolale O, Okoh A. Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa. *J Infect Public Health.* 2017;10(5):541-547.
- Paluszak Z, Ligocka A, Breza-Boruta B. Effectiveness of sewage treatment based on selected faecal bacteria elimination in municipal wastewater treatment plant in Toruń. *Pol J Environ Stud.* 2003;12:345-349.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33:757-784.
- Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):820-855.
- Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1997;35(3):703-707.
- Patel R, Piper K, Cockerill FR, Steckelberg JM, Yousten AA. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):705-709.
- Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2013;4:48.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases : a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):657-686.
- Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M. Identification of bla (IMP-22) in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical characterization of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(5):901-908.
- Penders J, Stobberingh EE, Savelkoul PH, Wolffs PF. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Front Microbiol.* 2013;4:87.
- Peng Y, Li J, Lu J, Xiao L, Yang L. Characteristics of microbial community involved in early biofilms formation under the influence of wastewater treatment plant effluent. *J Environ Sci.* 2018;66:113-124.

- Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. 2002;40(6):2153-2162.
- Perry JA, Wright GD. The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol.* 2013;4:138.
- Petroni A, Corso A, Melano R, Cacace ML, Bru AM, Rossi A, Galas M. Plasmidic extended-spectrum β -lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1462-1468.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(1):1-11.
- Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FV, Assis DM, Juliano L, Gales AC. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: Focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and *Enterobacteriaceae* in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(1):80-85.
- Piotrowska M, Przygodzińska D, Matyjewicz K, Popowska M. Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant. *Front Microbiol.* 2017;8:863
- Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Nordmann P. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Antimicrob. Chemother.* 2005;56:52–59.
- Poeta P, Costa D, Igrejas G, Rojo-Bezarez B, Sáenz Y, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. Characterization of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars (*Sus Scrofa*). *Microb Drug Resist.* 2007;13(3):151-156.
- Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Carvalho C, Rodrigues J, Vinué L, Somalo S, Torres C. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum β -lactamases. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(23):7439-7441.
- Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(3):573-581.
- Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622-632.
- Poirel L, Kämpfer P, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. 2002;46(12):4038-4040.
- Poirel L, Liard A, Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P. *Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1118-1121.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:75-81.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-1606.
- Poulsen AB, Skov R, Pallesen LV. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(2):419-421.
- Predari SC, Ligozzi M, Fontana R. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(12):2568-2573.
- Przybylski M. Enterococci odporne na wankomycynę II. Mechanizmy oporności, epidemiologia. *Post Mikrobiol.* 2007;46(4):317-334.
- Qin X, Zerr DM, Weissman SJ, Englund JA, Denno DM, Klein EJ, Tarr PI, Kwong J, Stapp JR, Tulloch LG, Galanakis E. Prevalence and mechanisms of broad-spectrum β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae*: a Children’s Hospital Experience. 2008;52(11):3909-3914.
- Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez OR, Carlos R V, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *J Food Prot.* 2009;72(6):1279-1282.
- Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* 2004;6(9):981-989.

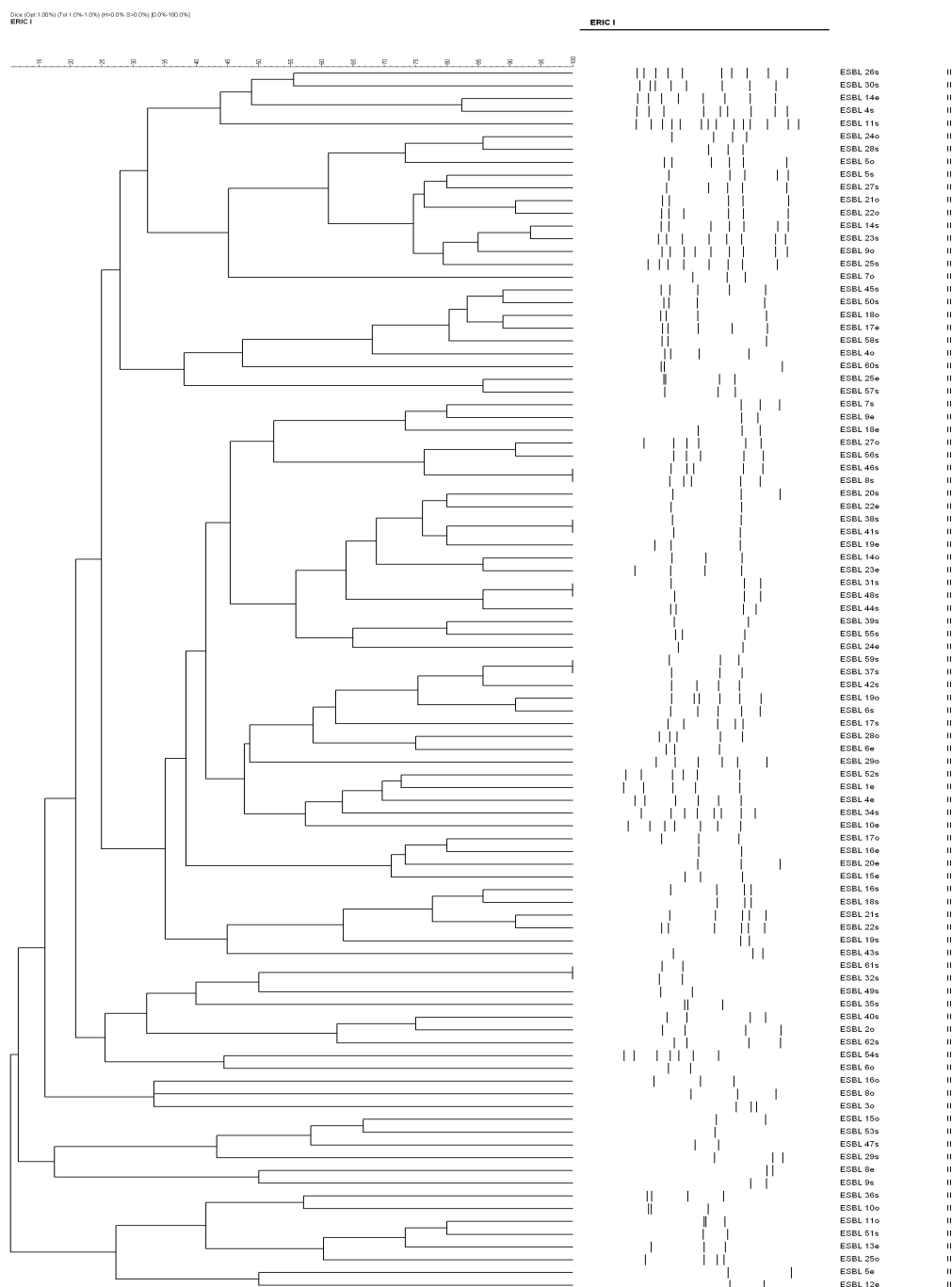
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment : a review. *Sci Total Environ*. 2013;447:345-360.
- Röderová M, Sedláková MH, Pudová V, Hricová K, Silová R, Imwensi PE, Bardoň J, Kolář M. Occurrence of bacteria producing broad-spectrum beta-lactamases and *qnr* genes in hospital and urban wastewater samples. *New Microbiol*. 2016;39(2):124-133.
- Rokosz A, Sawicka-Grzelak A, Mielczarczyk J, Mészáros J, Łuczak M. Wrażliwość ESBL-dodatnich szczepów klinicznych pałeczek G- na beta-laktamowe i nie-beta-laktamowe leki przeciwbakteryjne. *Med Dośw Mikrobiol*. 2001;53:373-378.
- Rosenberg Goldstein RE, Micallef SA, Gibbs SG, Davis JA, He X, George A, Kleinfelter LM, Schreiber NA, Mukherjee S, Sapkota A, Joseph SW, Sapkota AR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants. *Environ Health Perspect*. 2012;120(11):1551-1558.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365-386.
- Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1990;28(3):435-437.
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):3996-4001.
- Satta G, Massidda O, D'Andrea L. The mechanism of staphylococci resistance to methicillin: a critical analysis of dominant opinions. *J. Chemother*. 1991;1:144-148.
- Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol*. 2012;7(1):73-89.
- Shi P, Jia S, Zhang XX, Zhang T, Cheng S, Li A. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Res*. 2013;47(1):111-120.
- Shore AC, Coleman DC. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6-7):350-359.
- Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*. 2009;325(5944):1128-1131.
- Souissi M, Laabidi R, Aissa P, Pringault O, Said O Ben. Influence of Bizerte city wastewater treatment plant (WWTP) on abundance and antibioresistance of culturable heterotrophic and fecal indicator bacteria of Bizerte Lagoon (Tunisia). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;148:201-210.
- Spink W, Ferris V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strain of *Staphylococcus*. *Science*. 1945;102:102-221.
- Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol*. 2012;3:119.
- Stalder T, Barraud O, Jové T, Casellas M, Gaschet M, Dagot C, Ploy MC. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J*. 2014;8(4):768-777.
- Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(5):790-819.
- Subirats J, Royo E, Balcázar JL, Borrego CM. Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{OXA-48}*) in environmental samples. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(7):6710-6714.
- Sunde M. Class I integron with a group II intron detected in an *Escherichia coli* strain from a free-range reindeer. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2512-2514.
- Suzuki M, Koyano S, Okugawa S, Okazaki M, Seki G, Moriya K. Diversity of vancomycin-resistant enterococci in a low endemicity area. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014;2(2):115-118.

- Szczepanowski R, Braun S, Riedel V, Schneiker S, Krahn I, Pühler A, Schlüter A. The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology*. 2005;151(4):1095-1111.
- Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, Gartemann KH, Gützkow T, Eichler W, Pühler A, Schlüter A. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*. 2009;155(7):2306-2319.
- Szekeres E, Baricz A, Maria C, Farkas A, Opris O, Soran ML, Andrei AS, Rudi K, Balcázar JL, Dragos N, Coman C. Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. *Environ Pollut*. 2017;225:304-315.
- Szewczyk EM. Ziarenkowce Gram-dodatnie–*Staphylococcus*, *Streptococcus* i inne. 2, 19-40. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo PWN, Warszawa. 2005.
- Tacão M, Correia A, Henriques I. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: Anthropogenic activities modulate the dissemination of blaCTX-M-like genes. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(12):4134-4140.
- Tang J, Bu Y, Zhang XX, Huang K, He X, Ye L, Shan Z, Ren H. Metagenomic analysis of bacterial community composition and antibiotic resistance genes in a wastewater treatment plant and its receiving surface water. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016;132:260-269.
- Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Canton R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45:1171-1178.
- Taylor NG, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol Evol*. 2011;26(6):278-284.
- Teixeira LM, Merquior VLC. The Family *Moraxellaceae*. W: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.
- Tello A, Austin B, Telfer TC. Selective pressure of antibiotic pollution on bacteria of importance to public health. *Environ Health Perspect*. 2012;120(8):1100-1106.
- Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. 2005;3:711-721.
- Tribuddharat C, Fennewald M. Integron-mediated rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(4):960-962.
- Turano H, Gomes F, Medeiros M, Oliveira S, Fontes LC, Sato MI, Lincopan N. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(1):80-82.
- Turolla A, Cattaneo M, Marazzi F, Mezzanotte V, Antonelli M. Antibiotic resistant bacteria in urban sewage: Role of full-scale wastewater treatment plants on environmental spreading. *Chemosphere*. 2018;191:761-769.
- Vahaboglu H, Öztürk R, Aygün G, Coşkun F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M. Widespread detection of per-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(10):2265-2269.
- Vahaboglu H, Saribaş S, Akbal H, Ozturk R, Yucel A. Activities of cefepime and five other antibiotics against nosocomial PER-1-type and/or OXA-10-type beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42(2):269-270.
- Vahaboglu H, Coskun F, Tansel O. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol*. 2001;50:642-645.
- Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(8):742-750.
- Verner-Jeffreys DW, Welch TJ, Schwarz T, Pond MJ, Woodward MJ, Haig SJ, Rimmer GS, Roberts E, Morrison V, Baker-Austin C. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS One*. 2009;4(12):e8388.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(24):6823-6831.
- Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(12):2518-2529.

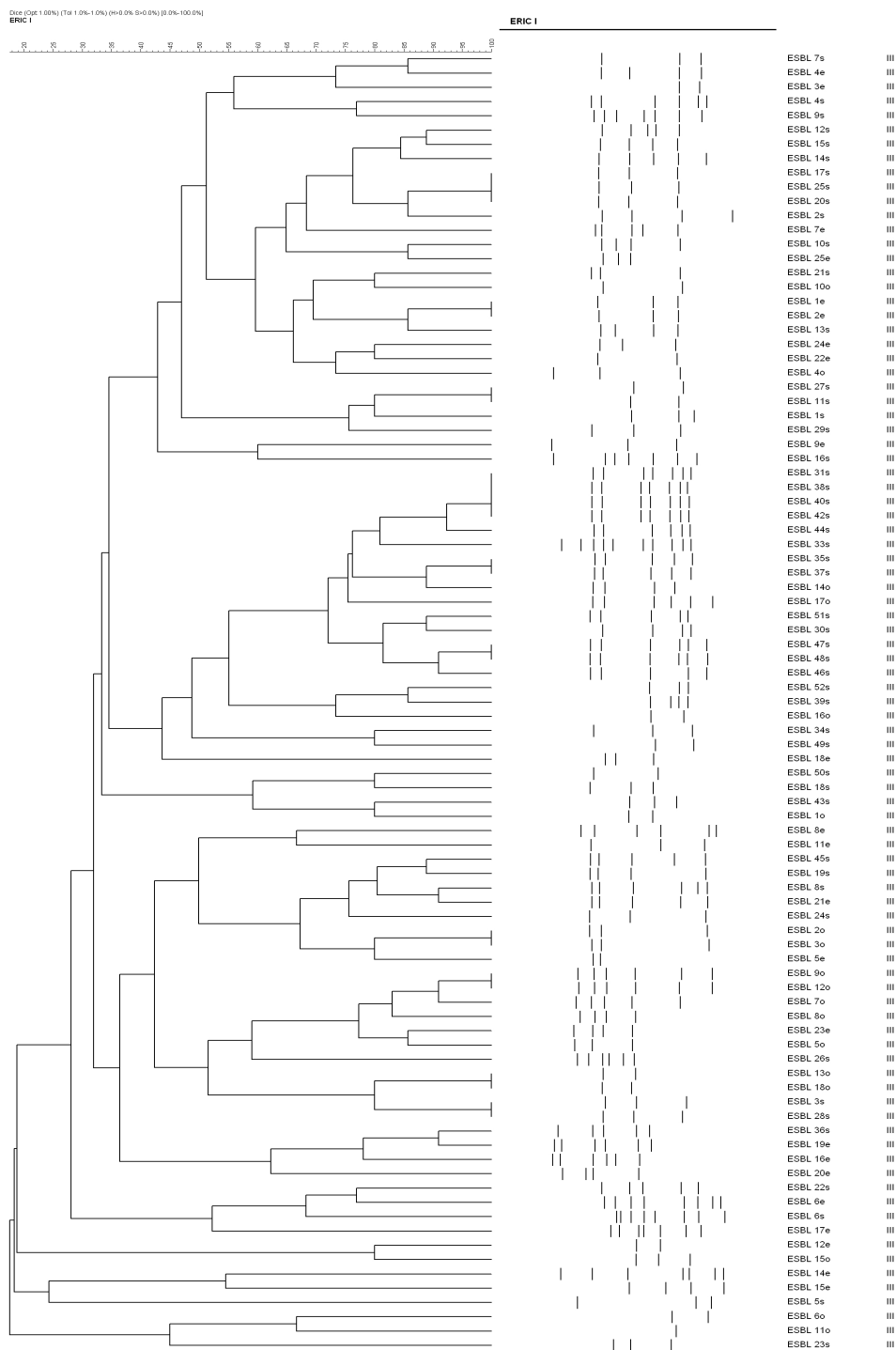
- Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S, Obst U. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J Microbiol Methods*. 2004;56:277-286.
- Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;234(2):209-213.
- Wakelin SA, Colloff MJ, Kookana RS. Effect of wastewater treatment plant effluent on microbial function and community structure in the sediment of a freshwater stream with variable seasonal flow. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(9):2659-2668.
- Walia S, Murleedham C, Band J, Kanwar M, Kumar A. Quantitation of antibiotic resistance genes pollution in hospital waste water effluent and Urban Clinton River Water, Michigan, USA. *Curr Med Res Pract*. 2016;6(4):149-151.
- Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):116-119.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? 2005;18(2):306-325.
- Wan MT, Chou CC. Spreading of β -lactam resistance gene (*mecA*) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through municipal and swine slaughterhouse wastewaters. *Water Res*. 2014;64:288-295.
- Wang M, Shen W, Yan L, Wang X-H, Xu H. Stepwise impact of urban wastewater treatment on the bacterial community structure, antibiotic contents, and prevalence of antimicrobial resistance. *Environ Pollut*. 2017;231:1578-1585.
- Werner G, Coque TM, Hammerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(47):1-11.
- WHO. Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food: Report of a WHO Consultation. World Health Organization. Geneva Switzerland. WHO/CDS/CSR/APH/2000.4. 2000
- WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2015.
- WHO. Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline, Including Tuberculosis. World Health Organization. WHO/EMP/IAU/2017.11. 2017a.
- WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 2017b.
- Wibberg D, Szczepanowski R, Eikmeyer F, Pühler A, Schlüter A. The IncF plasmid pRSB225 isolated from a municipal wastewater treatment plant's on-site preflouder combining antibiotic resistance and putative virulence functions is highly related to virulence plasmids identified in pathogenic *E. coli* isolates. *Plasmid*. 2013;69(2):127-137.
- Wilhelm MP, Estes L. Symposium on antimicrobial agents-Part XII. Vancomycin. *Mayo Clin Proc*. 1999;74(9):928-935.
- Willems A. The Family *Comamonadaceae*. W: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.
- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(3):175-186.
- Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(5):589-594.
- Wright GD. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun (Camb)*. 2011;47(14):4055-4061.
- Wu D, Dolfing J, Xie B. Bacterial perspectives on the dissemination of antibiotic resistance genes in domestic wastewater bio-treatment systems: beneficiary to victim. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102(2):597-604.
- Xi C, Zhang Y, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(17):5714-5718.
- Xia R, Guo X, Zhang Y, Xu H. qnrVC-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3471-3474.
- Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4643-4647.

- 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;119:1379-1385.
- Yamashita N, Katakawa Y, Tanaka H. Occurrence of antimicrobial resistance bacteria in the Yodo River basin, Japan and determination of beta-lactamases producing bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017;143:38-45.
- Yan J-J, Tsai S-H, Chuang C-L, Wu J-J. OXA-type beta-lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006;39(2):130-134.
- Yang CW, Chang YT, Chao WL, Shiung II, Lin HS, Chen H, Ho SH, Lu MJ, Lee PH, Fan SN. An investigation of total bacterial communities, culturable antibiotic-resistant bacterial communities and integrons in the river water environments of Taipei city. *J Hazard Mater*. 2014;277:159-168.
- Yang F, Mao D, Zhou H, Luo Y. Prevalence and fate of carbapenemase genes in a wastewater treatment plant in northern China. *PLoS One*. 2016a;11(5):1-14.
- Yang F, Mao D, Zhou H, Wang X, Luo Y. Propagation of New Delhi metallo- β -lactamase genes (*bla_{NDM-1}*) from a wastewater treatment plant to its receiving river. *Environ Sci Technol Lett*. 2016b;3(4):138-143.
- Yang F, Huang L, Li L, Yang Y, Mao D, Luo Y. Discharge of KPC-2 genes from the WWTPs contributed to their enriched abundance in the receiving river. *Sci Total Environ*. 2017;581-582:136-143.
- Ye L, Zhang T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(6):2681-2690.
- Young HK. Antimicrobial resistance spread in aquatic environments. *J Antimicrob Chemother*. 1993;31(5):627-35.
- Zarfel G, Galler H, Feierl G, Haas D, Kittinger C, Leitner E, Grisold AJ, Mascher F, Posch J, Pertschy B, Marth E, Reinthaler FF. Comparison of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. *Environ Pollut*. 2013;173:192-199.
- Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82:397-414.
- Zong Z. Discovery of *bla_{OXA-199}*, a Chromosome-Based *bla_{OXA-48}*-Like Variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PLoS One*. 2012;7: e48280.
- Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P, Alt M, Schulze J, Fanning S, Stephan R, Nüesch-Inderbinnen M. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;50(3):436-440.

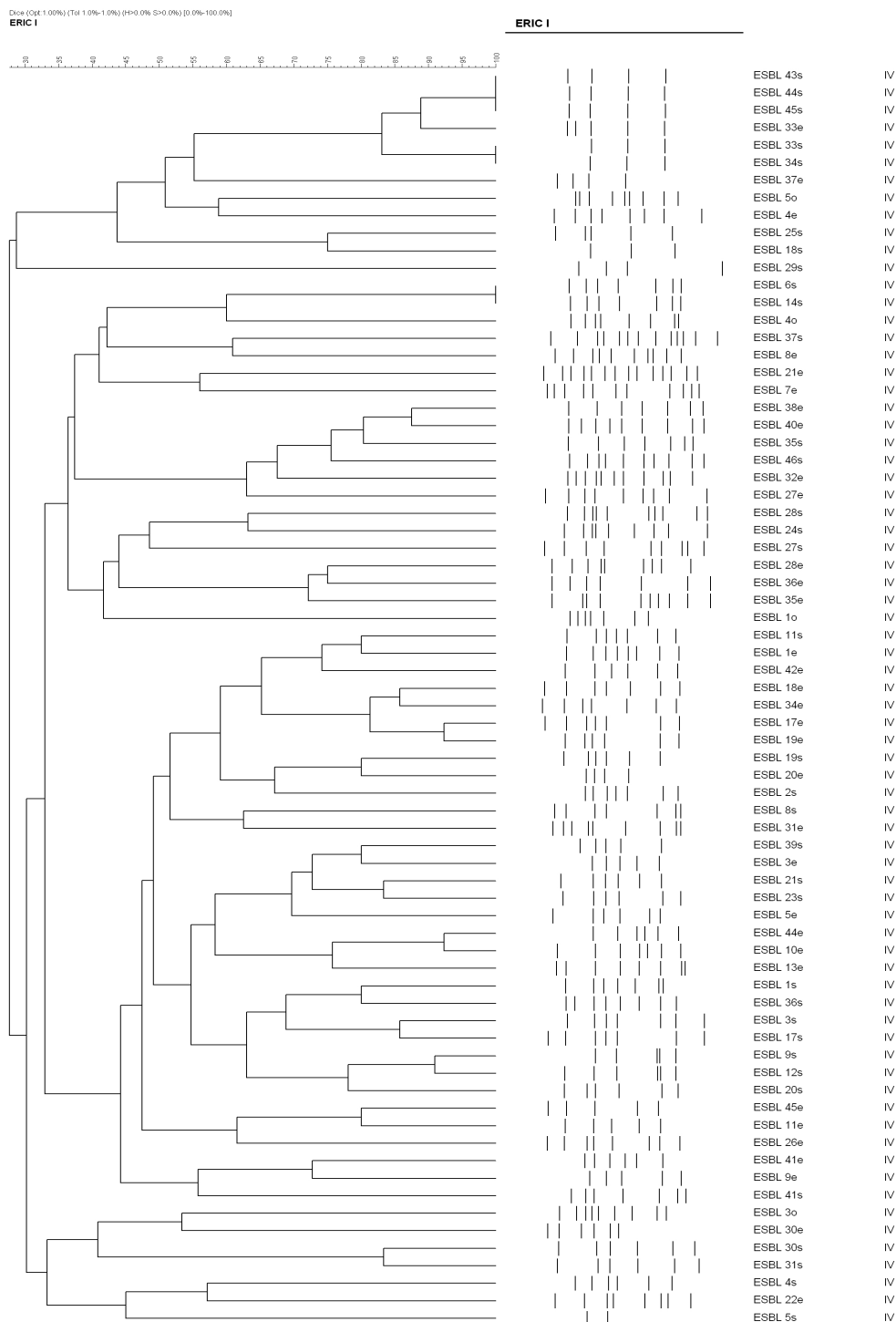
9. ZAŁĄCZNIKI



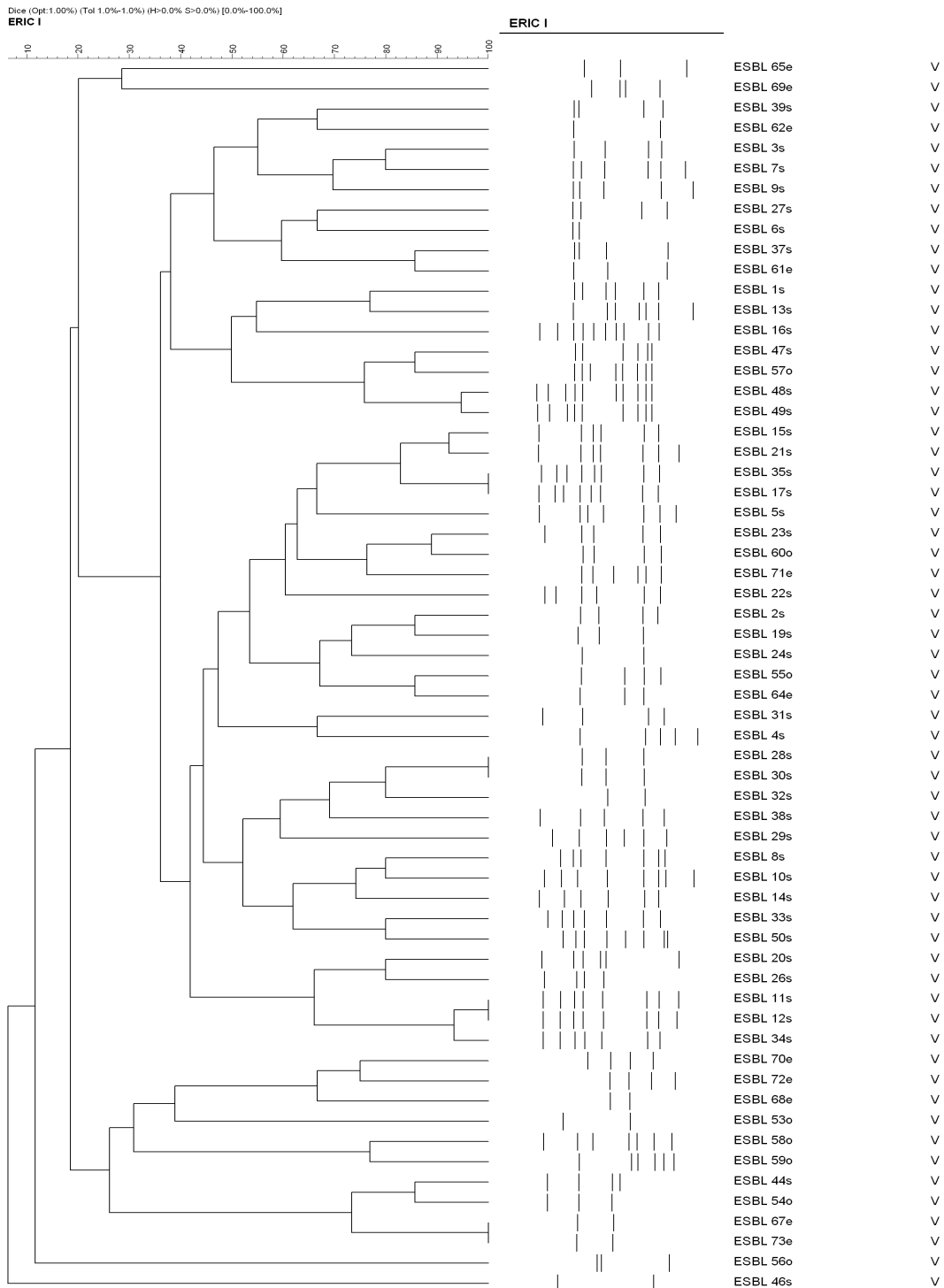
Załącznik 1. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w II poborze. Legenda: ESBL – bakterie wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



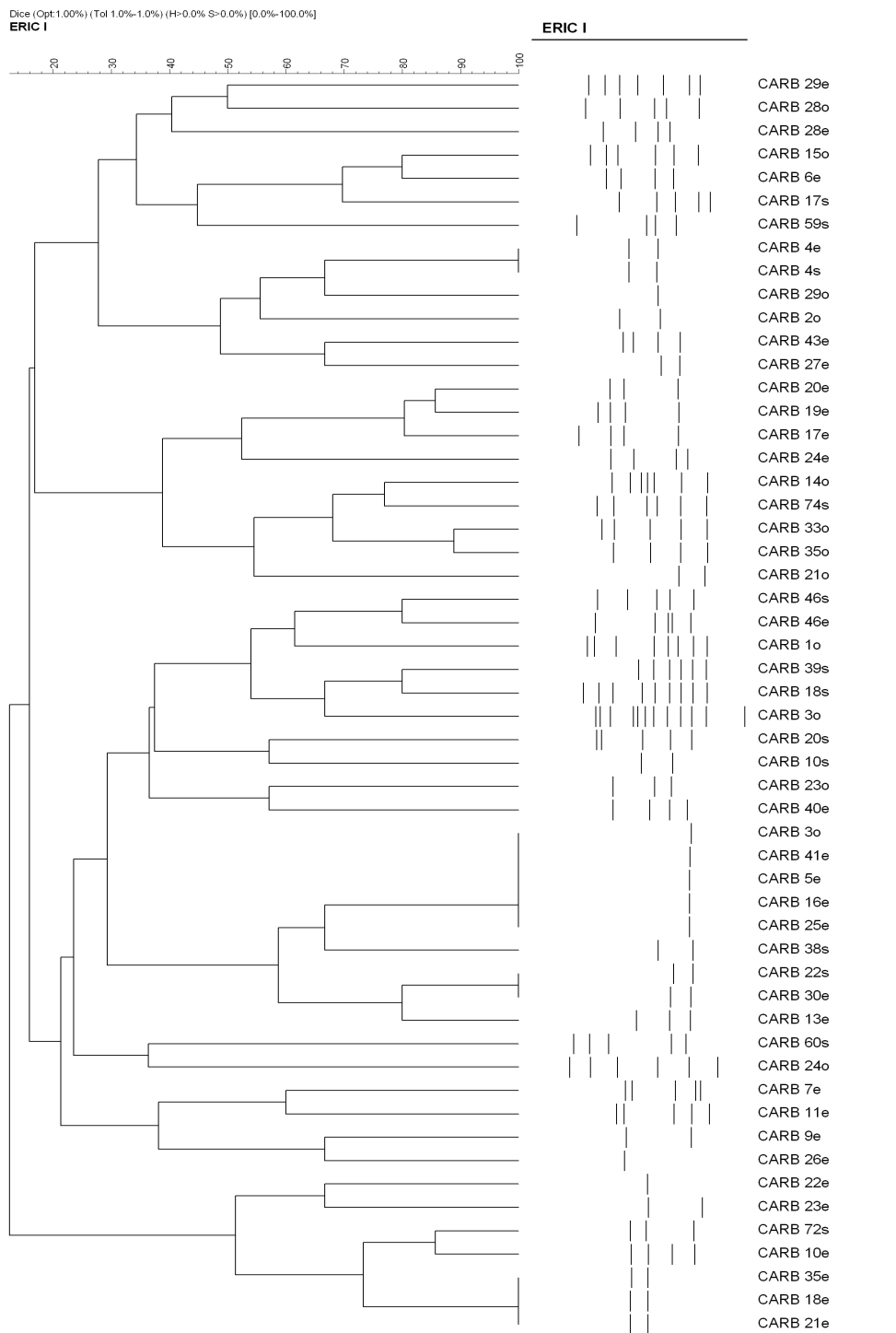
Załącznik 2. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w III poborze. Legenda: ESBL – bakterie wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



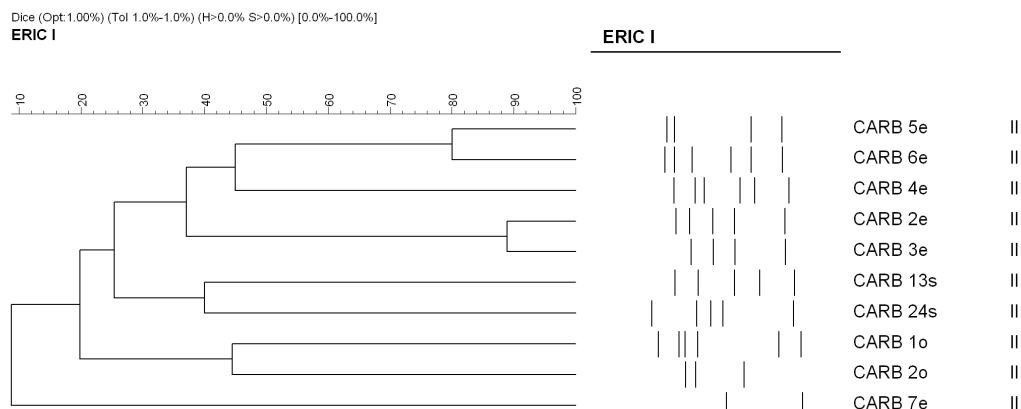
Załącznik 3. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w IV poborze. Legenda: ESBL – bakterie wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



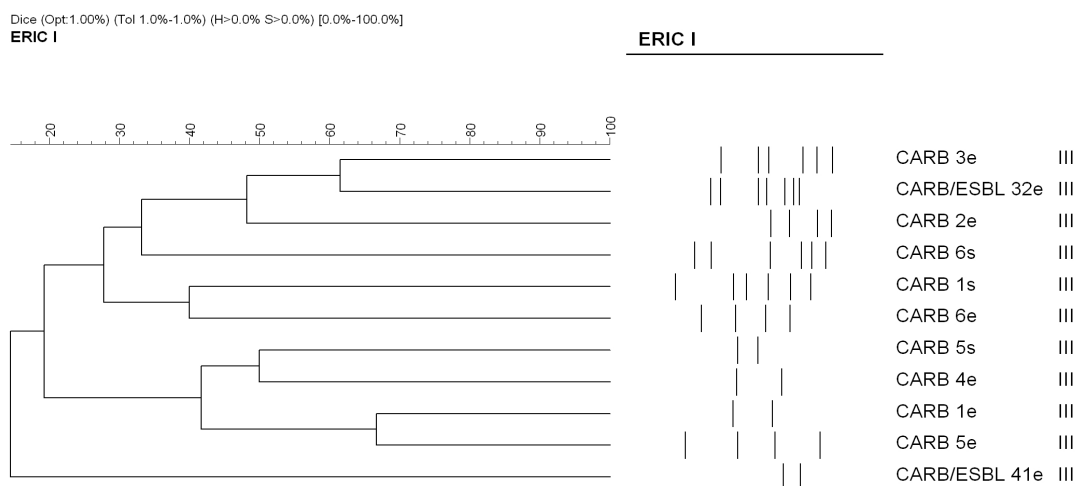
Załącznik 4. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów bakterii grupy coli wytwarzających ESBL, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w V poborze. Legenda: ESBL – bakterie wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



Załącznik 6. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w I poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



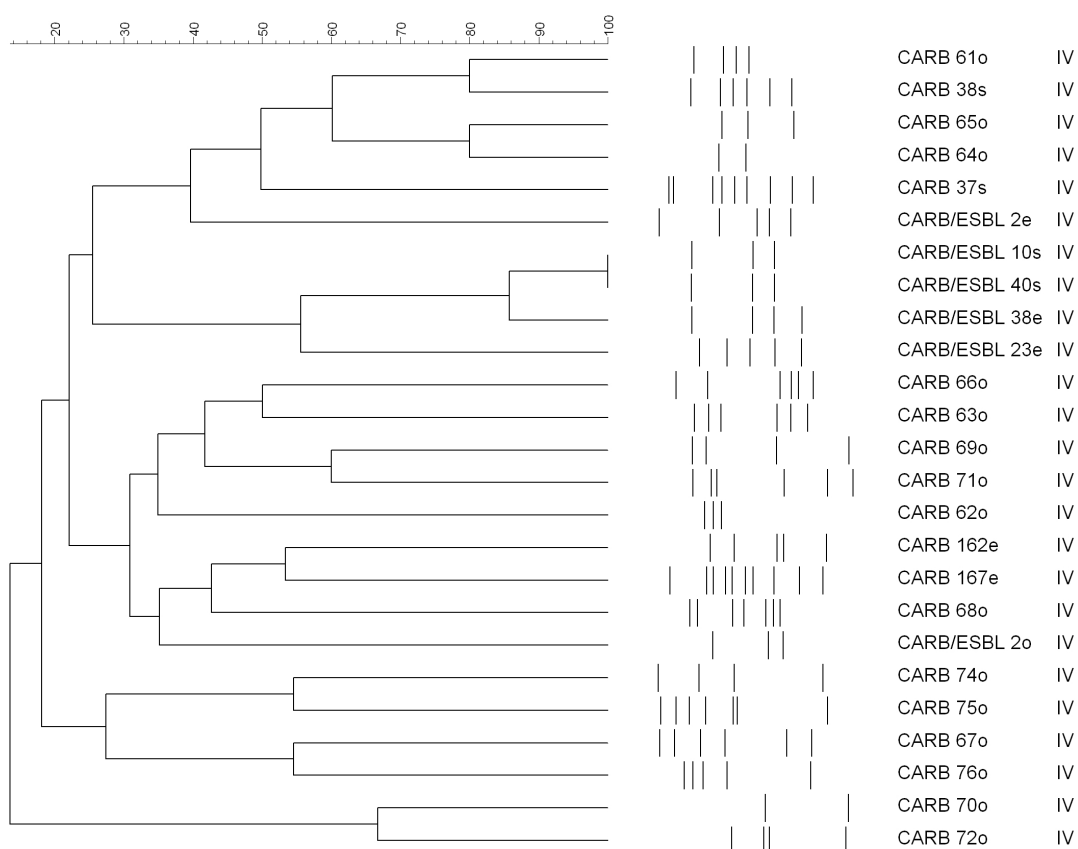
Załącznik 7. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w II poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



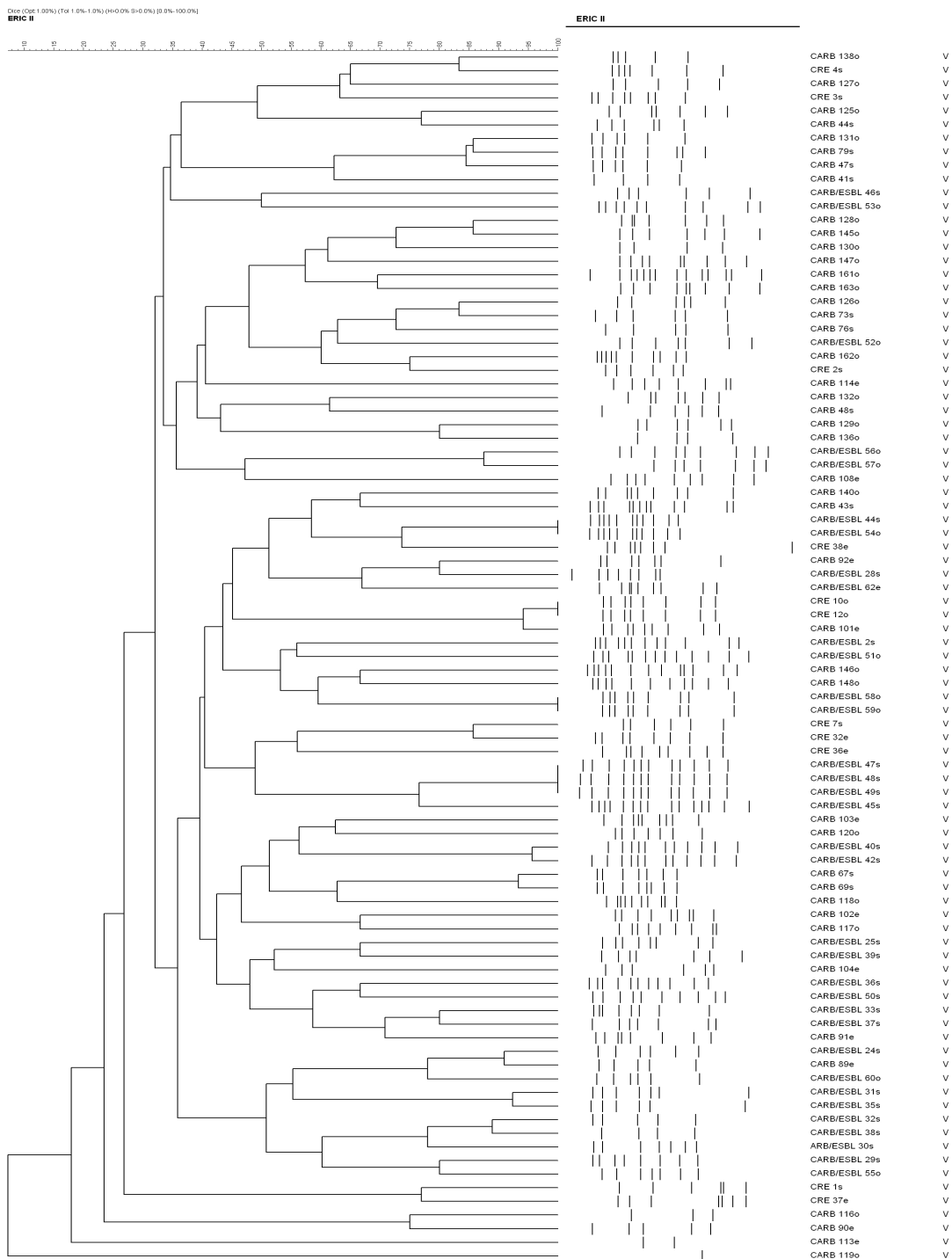
Załącznik 8. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w III poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, CARB/ESBL – bakterie karbapenemooporne i wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
ERIC I

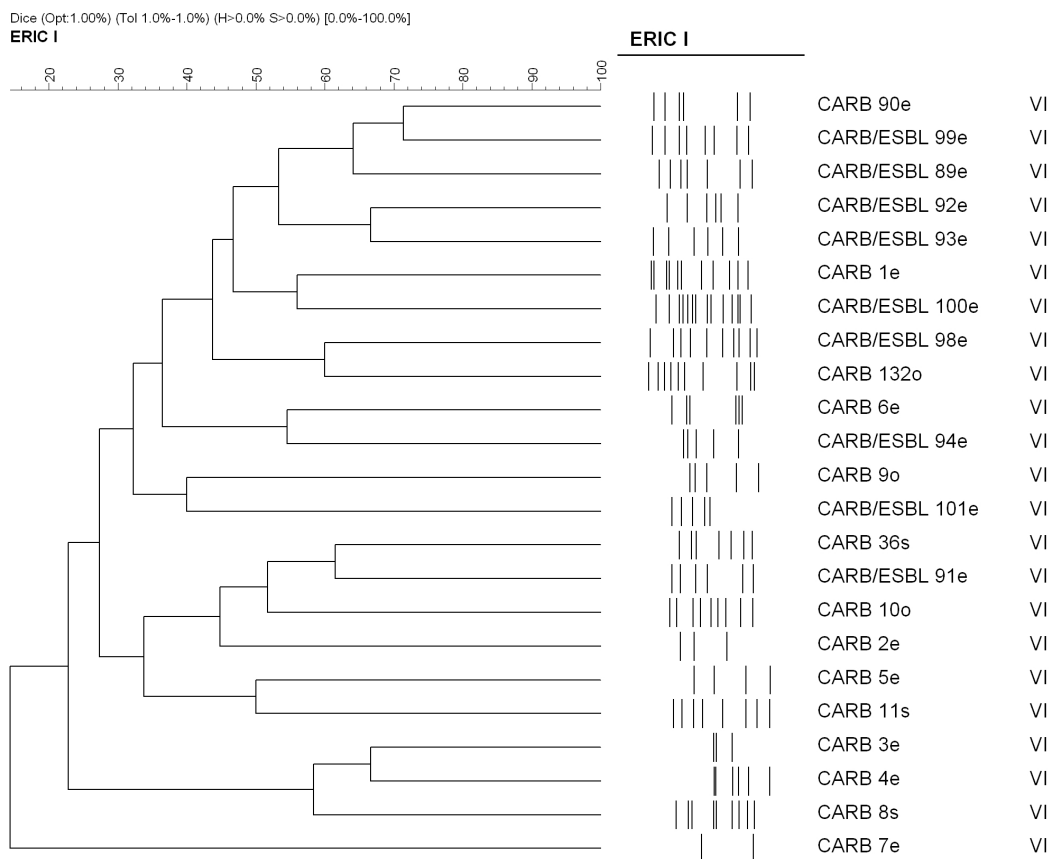
ERIC I



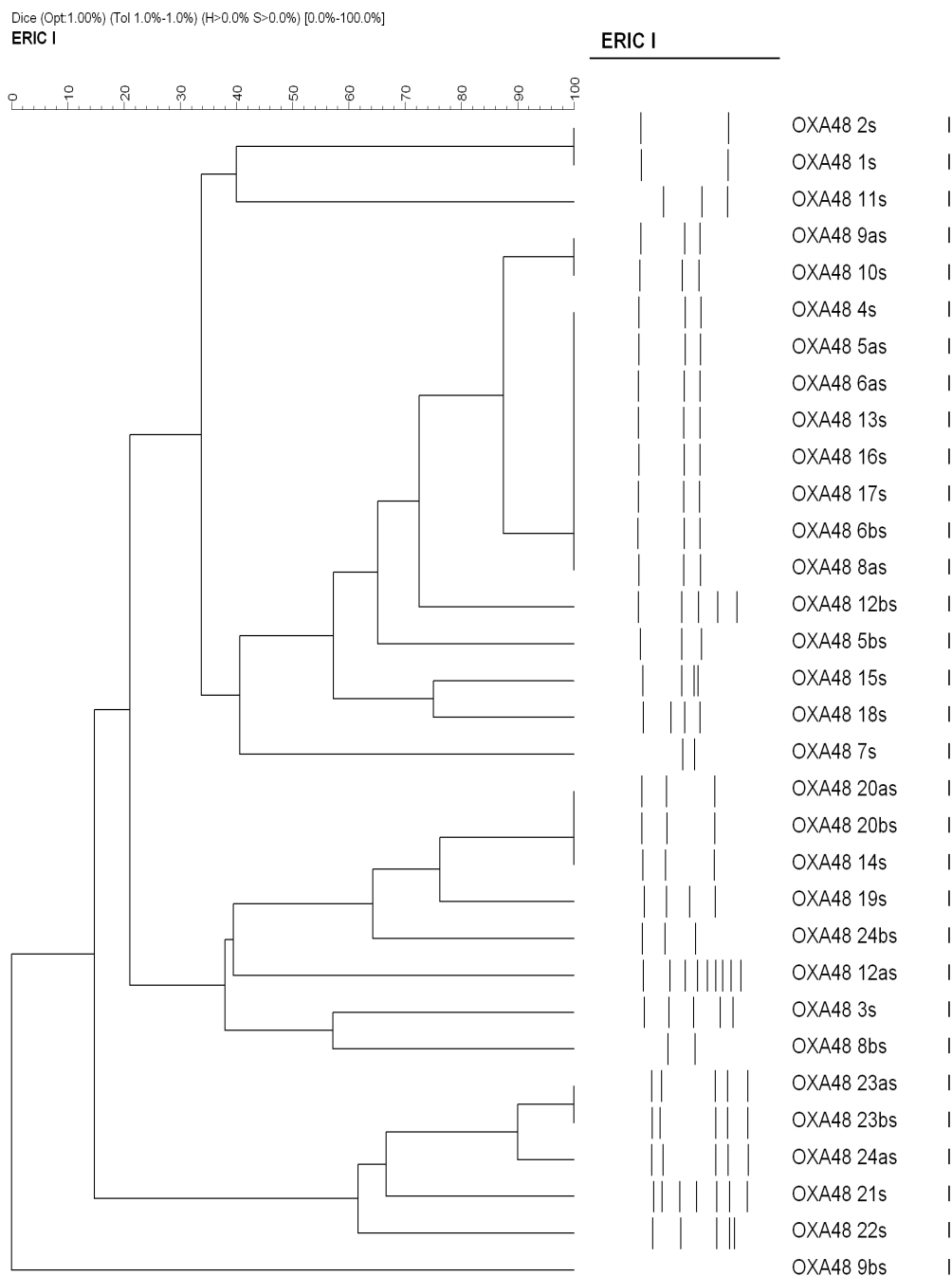
Załącznik 9. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w IV poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, CARB/ESBL – bakterie karbapenemooporne i wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



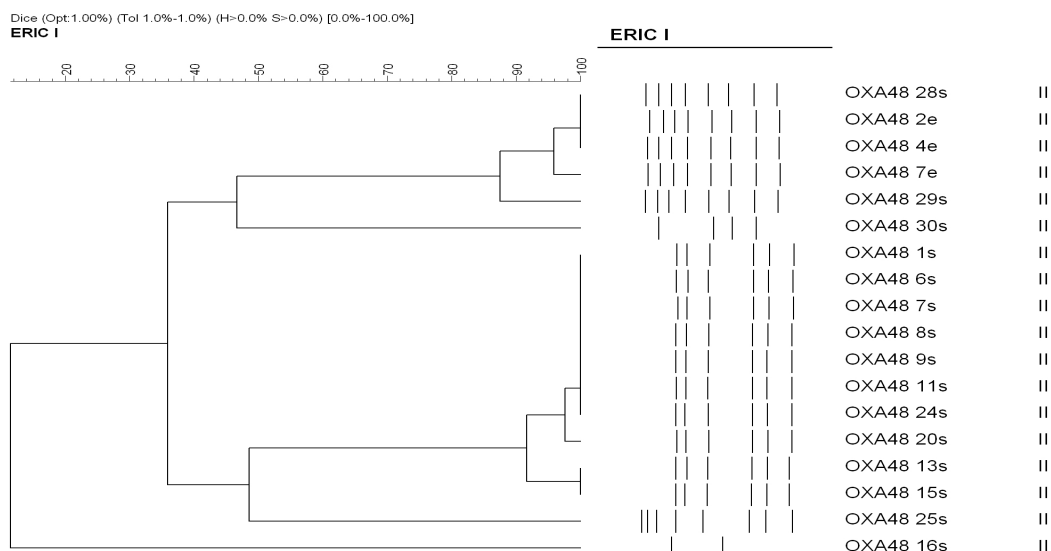
Załącznik 10. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w V poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, CRE – bakterie karbapenemooporne, CARB/ESBL – bakterie karbapenemooporne i wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



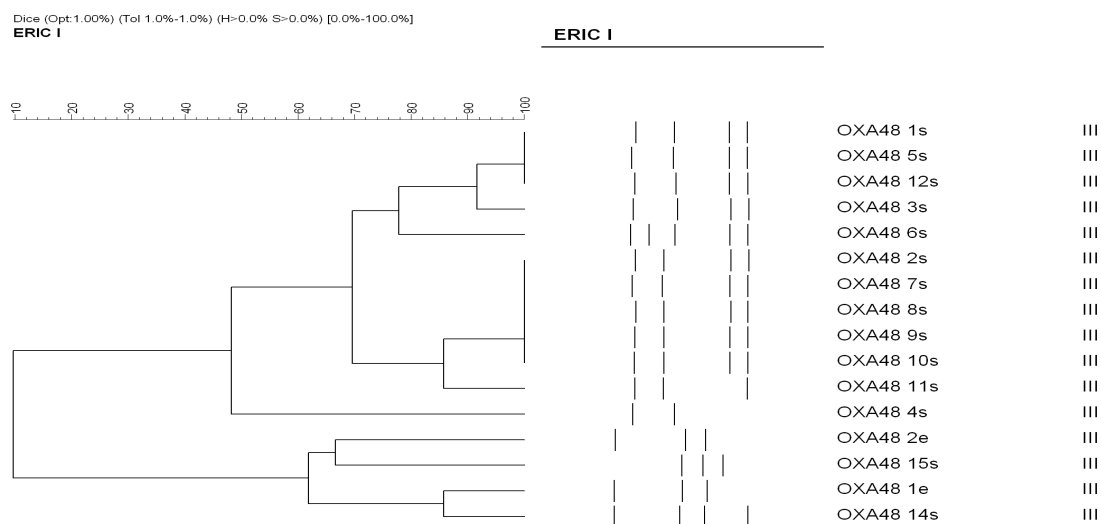
Załącznik 11. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w VI poborze. Legenda: CARB – bakterie karbapenemooporne, CARB/ESBL – bakterie karbapenemooporne i wytwarzające ESBL, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



Załącznik 12. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w I poborze. Legenda: OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



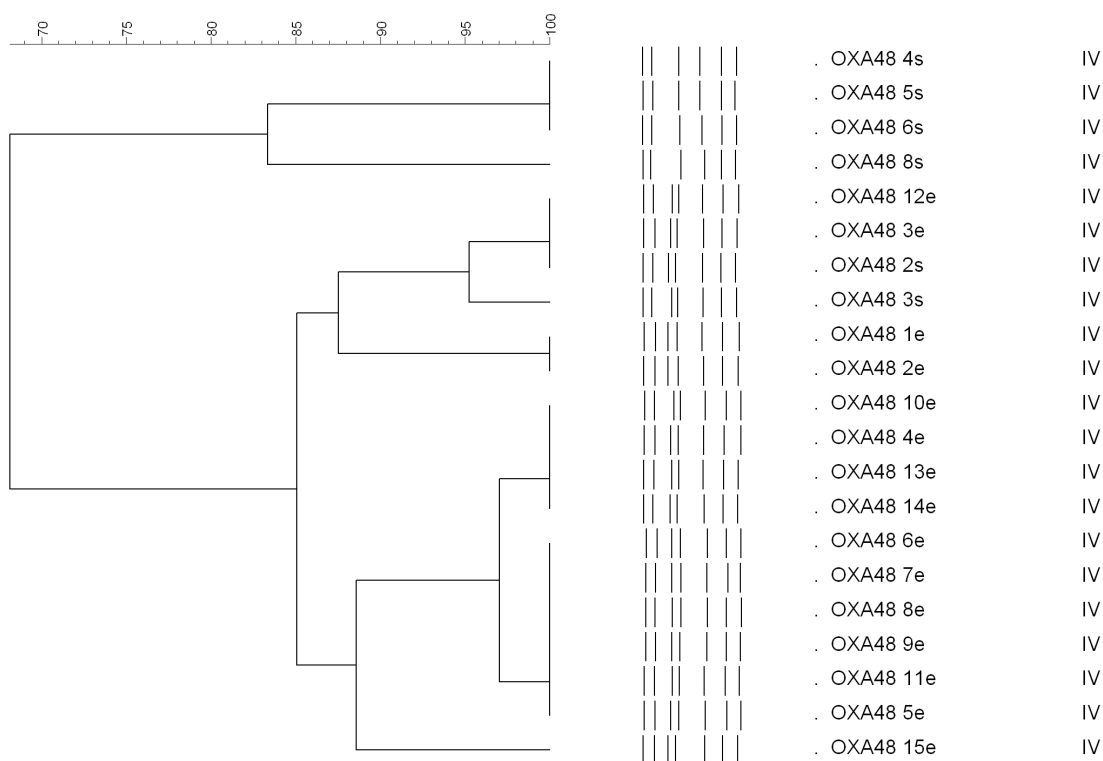
Załącznik 13. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w II poborze. Legenda: OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



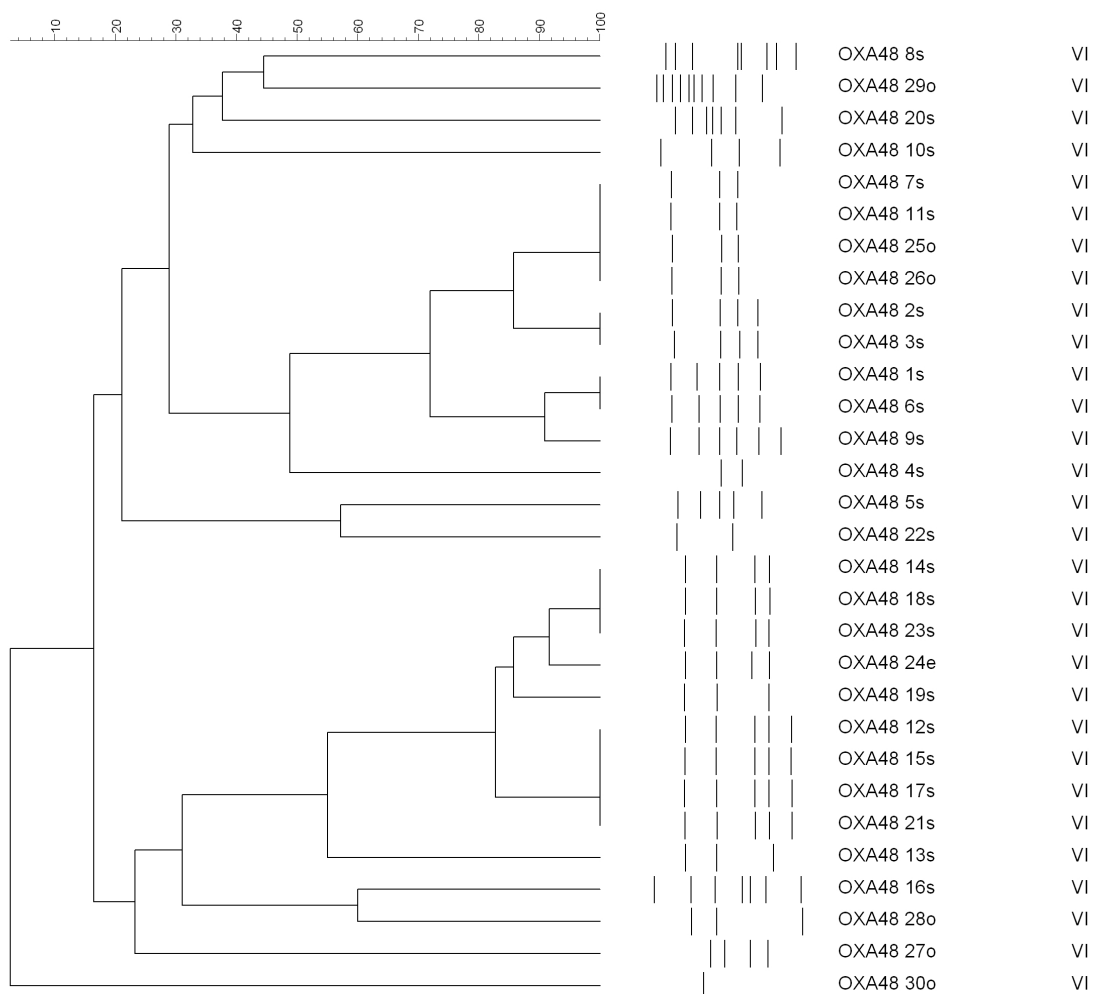
Załącznik 14. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w III poborze. Legenda: OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
ERIC I

ERIC I



Załącznik 15. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w IV poborze. Legenda: OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.



Załącznik 16. Dendrogram ukazujący podobieństwo genetyczne szczepów CPE typu OXA-48, wyizolowanych ze ścieku surowego, ścieku z komory napowietrzania i ścieku oczyszczonego COŚ w Koziegłowach w VI poborze. Legenda: OXA-48 – bakterie karbapenemooporne typu OXA-48, s – ściek surowy, o – ściek z komory napowietrzania, e – ściek oczyszczony.