



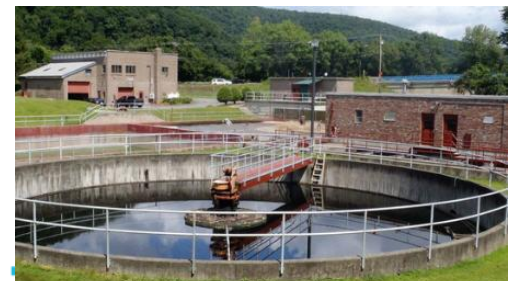
OSTRAVSKÁ UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

HODNOCENÍ VÝSKYTU MULTIREZISTENTNÍCH BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ V ODPADNÍCH VODÁCH

Tereza Stachurová, Nikola Čajková, Kateřina Malachová

Čistírny odpadních vod

- Kumulace a zdroj ARB & ARGs
- Transfer ARGs mezi různými druhy bakterií
- Šíření ARB & ARGs do životního prostředí



Multirezistence

- Bakterie nesoucí geny rezistence vůči několika typům antibiotik
- Nejčastěji identifikované bakteriální kmeny s multirezistentními vlastnostmi
 - *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp.
- Problematika šíření multirezistentních bakterií nejdříve zaznamenána ve zdravotnických institucích
- **Multirezistentní kmeny lze nalézt i v odpadních vodách**
 - Vážné důsledky nejen pro lidské zdraví, ale také dopad na diverzitu běžné vodní mikroflóry

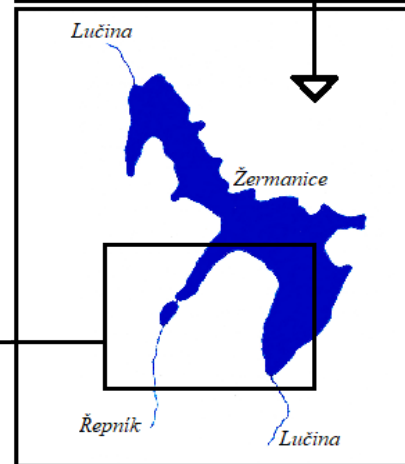
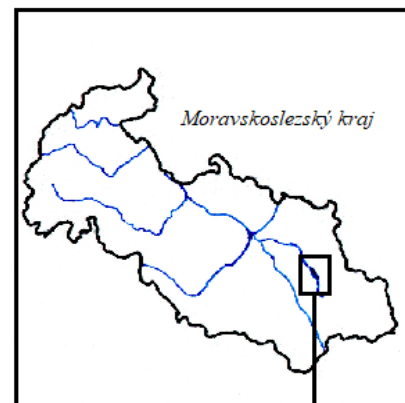
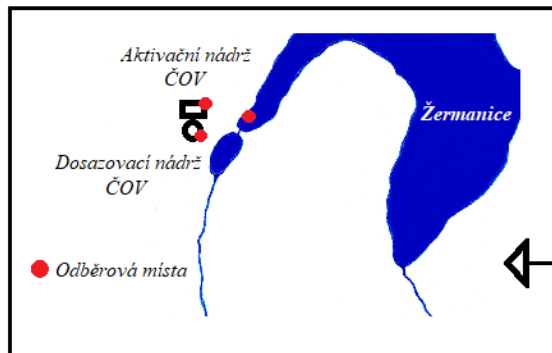


Cíle výzkumu

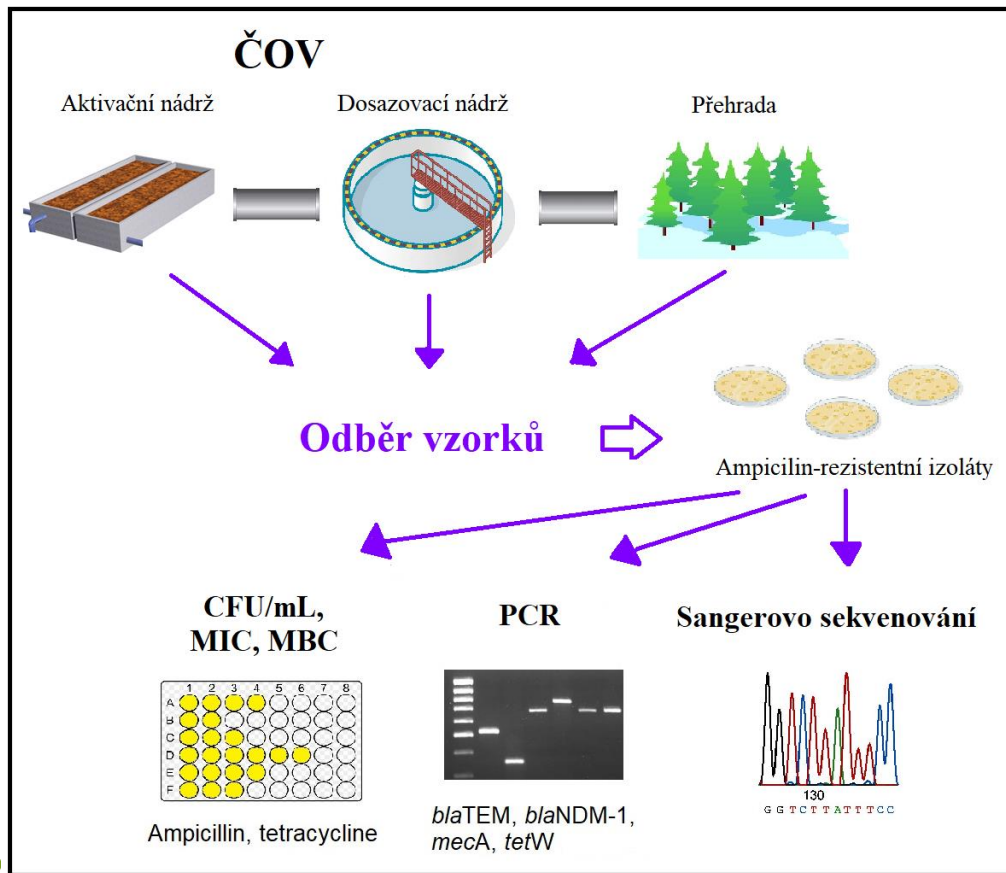
- Izolace ampicilin-rezistentních bakteriálních kmenů
 - Aktivační a dosazovací nádrž ČOV, přehradní voda v blízkosti výtoku ČOV
- Porovnání počtu nerezistentních a ampicilin-rezistentních bakterií
 - Stanovení CFU/mL
- Charakterizace ampicilin-rezistentních bakteriálních kmenů
 - Stanovení MIC a MBC
- Zhodnocení multirezistence u ampicilin-rezistentních izolátů
 - Detekce ARGs pomocí PCR



- Čistírna odpadních vod
 - Mechanické a biologické čištění
 - Komunální a zemědělské odpadní vody
 - PE: 1 980 obyvatel
- Odběrová místa
 - Aktivační a dosazovací nádrž ČOV, přehradní voda



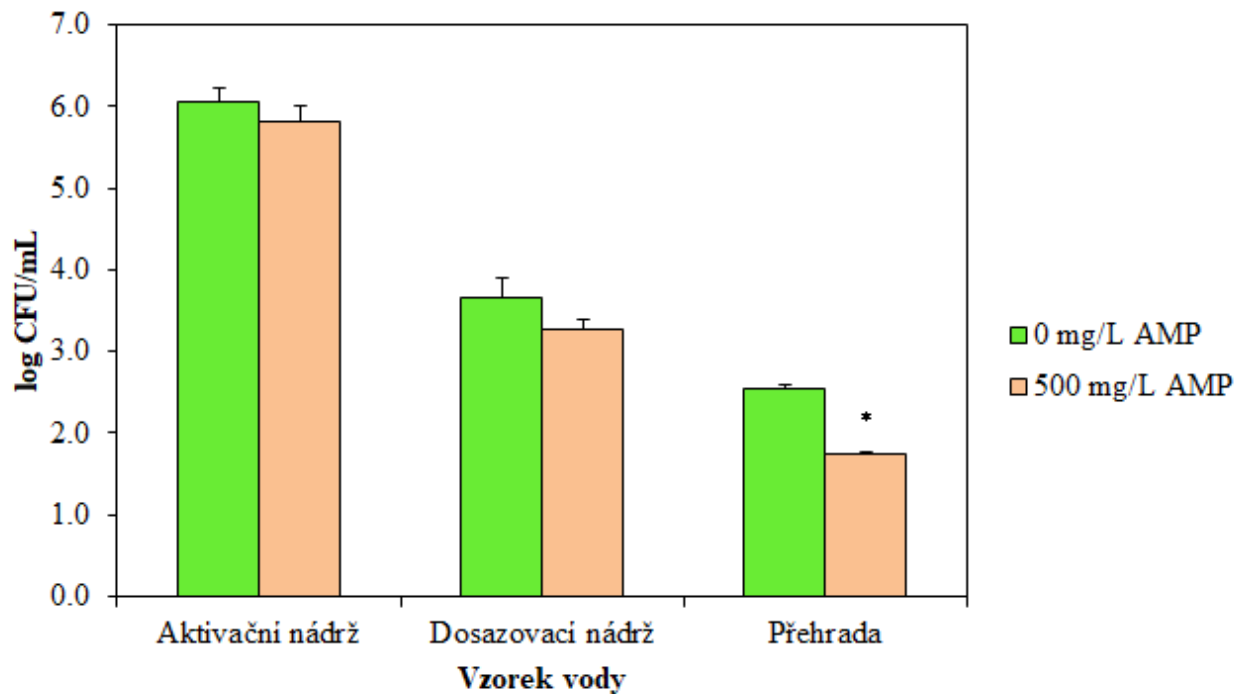
Grafické znázornění metodiky výzkumu



Dosažené výsledky



Srovnání CFU/mL nerezistentních a AMP-rezistentních bakterií



Graf č. 1: Stanovení log CFU/mL ve vzorcích z aktivační a dosazovací nádrže ČOV a přepraha. Výsev proveden na plotny s čistým TSA a TSA s 500 mg/L ampicilinu. Kultivace 24 h, 30 °C. AMP – ampicilin.

Stanovení MIC a MBC pro ampicilin a tetracyklin

Odběrové místo	Rezistentní izolát	MIC AMP [mg/mL]	MBC AMP [mg/mL]	MIC TET [µg/mL]	MBC TET [µg/mL]
Aktivační nádrž ČOV	A1	>20	>20	1	2
	A2	>20	>20	1	2
	A3	10	>20	0.25	1
	A4	>20	>20	0.25	0.5
	A5	10	>20	0.5	1
Dosazovací nádrž ČOV	D1	>20	>20	2	4
	D2	>20	>20	2	>4
	D3	10	20	1	4
	D4	5	10	2	>4
	D5	2.5	5	4	>4
Přehrada	P1	>20	>20	2	>4

Detekce ARGs v rezistentních izolátech

Gen	Primer	PCR kondice
<i>bla</i>TEM	bla-TEM-RX	94°C 2min, 40x(94°C 15s,60°C 30s, 72°C 45s), 72°C 10min
	bla-TEM-FX	
<i>bla</i>NDM-1	NDM-Rm	94°C 2min, 40x(94°C 15s,53°C 30s, 72°C 45s), 72°C 10min
	NDM-Fm	
<i>mecA</i>	mecA-LP	95°C 5min, 35x(94°C 15s,48°C 60s, 72°C 80s), 72°C 4min
	mecA-UP	
<i>tetW</i>	tet(W)-RV	94°C 2min, 40x(94°C 15s,60°C 30s, 72°C 45s), 72°C 10min
	tet(W)-FW	



Zhodnocení multirezistence a identifikace rezistentních izolátů pomocí sekvenční analýzy

Odběrové místo	Rezistentní izolát	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> NDM-1	<i>tet</i> W	Identifikace
Aktivační nádrž ČOV	A1	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	A2	+	+	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	A3	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	A4	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	A5	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
Dosazovací nádrž ČOV	D1	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	D2	+	-	-	<i>Aeromonas</i> sp.
	D3	+	+	+	<i>Aeromonas</i> sp.
	D4	+	-	-	<i>Aeromonas</i> sp.
	D5	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.
Přehrada	P1	+	-	+	<i>Aeromonas</i> sp.



Závěr

- Zvýšené množství ampicilin-rezistentních bakterií ve všech vzorcích vody
 - Statisticky významný rozdíl v počtu ampicilin-rezistentních a nerezistentních bakterií byl zaznamenán v přehradní vodě, v aktivační a dosazovací nádrži bylo množství rezistentních a nerezistentních bakterií obdobné
- Vysoké hodnoty MIC a MBC izolátů rezistentních na AMP
 - 54.5% rezistentních izolátů hodnoty MIC >20 mg/mL a 72.7% rezistentních izolátů hodnoty MBC >20 mg/mL
- 9 izolátů z 11 obsahovalo dva a více genů rezistence
 - Tři geny *bla*TEM, *bla*NDM-1 a *tetW* byly detekovány u dvou kmenů současně



Závěr

- Za šíření multirezistence ve vodním prostředí jsou zodpovědné především kmeny *Aeromonas* sp.
- Odstranění ARB během čistícího procesu ČOV bylo nedostatečné
 - Významné z hlediska šíření multirezistentních kmenů do životního prostředí
- Výsledky studie ukázaly, že ČOV představují významný rezervoár multirezistentních kmenů a genů rezistence
 - **Šíření multirezistence z tohoto zdroje vyžaduje proto zvýšenou pozornost**



Studie vznikla za podpory SGS grantů PŘF OU

- Vliv antibiotik na antibiotickou rezistenci a tvorbu biofilmu v různých fázích čištění odpadních vod, analýza proteinů související se suchovzdorností rostlin a genů účastnících se syntézy opioidů u máku setého (*Papaver somniferum*) a kvadruplexů (ID: SGS11/PŘF/2021)
- Sledování šíření antibioticky rezistentních bakterií a genů v odpadních vodách a recipientu, studium nekanonických forem nukleových kyselin, zkoumání molekulárních změn u *Papaver somniferum* vystaveného stresovým podmínkám (ID: SGS10/PŘF/2022)



Reference

- AMARASIRI M., SANO D., SUZUKI S. (2020): Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and anti-biotic resistance genes (ARG) in water environments: current knowledge and questions to be answered. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50, 2016-2059.
- COLOMER-LLUCH M., JOFRE J., MUNIESA M. (2011): Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6, e17549.
- HONDA R., TACHI C., YASUDA K., HIRATA T., NOGUCHI M., HARA-YAMAMURA H., YAMAMOTO-IKEMOTO R., WATANABE T. (2020): Estimated discharge of antibiotic-resistant bacteria from combined sewer overflows of urban sewage system. *npj Clean Water* 3, 15.
- composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8, e78906FEMS *Microbiol Ecol* 36, 139-151.
- MARTI E., JOFRE J., BALCAZAR J.L. (2013): Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PLoS One* 8, e78906.
- MBANGA J., AMOAKO D.G., ABIA A.L.K., ALLAM M., ISMAIL A., ESSACK S.Y. (2021): Genomic Insights of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* From Wastewater Sources and Their Association With Clinical Pathogens in South Africa. *Front. Vet. Sci.* 8, 636715.
- MICHAEL I., RIZZO L., MCARDELL C. S., MANAIA C. M., MERLIN C., SCHWARTZ T., DAGOT C., FATTA-KASSINOS D. (2013): Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Res.* 47, 957-995.
- POIREL L., WALSH T.R., CUVILLIER V., NORDMANN P. (2011): Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 119-123.
- RIZZO L., MANAIA C., MERLIN C., SCHWARTZ T., DAGOT C., PLOY M. C., et al. (2013): Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci. Total Environ.* 447, 345-360.
- RODRÍGUEZ E.A., GARZÓN L.M., GÓMEZ I.D., JIMÉNEZ J.N. (2020): Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carba-penem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22, 358-366.
- STACH J. E. M., BATHE S., CLAPP J. P., BURNS R. G. (2001): PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. resistance genes and bacterial community





Děkuji za
pozornost

Katedra biologie a ekologie

Tereza Stachurová
PhD. student

Chittussiho 10
710 00 Ostrava
tel: 732 676 234
e-mail: stachurova.tereza@seznam.cz