

## Antibiotična rezistenca bakterij *Escherichia coli*, izoliranih iz okolja

Atena Ivačič Kolar<sup>1</sup>, Nina Češnovar<sup>2,3</sup>, Jerneja Ambrožič Avguštin<sup>2</sup> in Miha Slapničar<sup>1,3</sup>

[atenaivacickolar@gmail.com](mailto:atenaivacickolar@gmail.com)

<sup>1</sup>BIC Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola, Cesta v Mestni Log 47, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana.

<sup>3</sup>Pedagoška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Kardeljeva ploščad 16, 1000 Ljubljana.

### Izvelek

Po besedah Svetovne zdravstvene organizacije, rezistenca proti protimikrobnim učinkovinam predstavlja eno izmed največjih groženj človeštvu. Rezistentne seve bakterije *Escherichia coli* najdemo v prebavnem traku ljudi in živali in tudi v okolju. Tja se lahko занesejo med drugim tudi zaradi onesnaževanja s fekalnimi iztrebki. Genetski zapisi za rezistenco proti antibiotikom se med bakterijami lahko prenašajo.

**Ključne besede:** *Escherichia coli*, rezistenca proti protimikrobnim učinkovinam, antibiotiki, onesnaževanje okolja

### Uvod

Za zdravje organizma je sestava in delovanje mikrobioma ključnega pomena. To med drugim potrjujejo tudi rezultati raziskav z mišmi, ki so živele brez prisotnosti kakršnih koli koristnih mikroorganizmov [1]. Pomemben del mikrobioma ljudi in ostalih živali s stalno telesno temperaturo je tudi bakterija *Escherichia coli* (*E. coli*), iz družine *Enterobacteriaceae*. *E. coli* je za svojega gostitelja koristna, saj sintetizira vitamine K in B, pomaga pri prebavi, ščiti organizem pred nekaterimi patogenimi mikroorganizmi, ipd. [2]. A obstajajo tudi patogeni sevi *E. coli*, ki lahko povzročajo tudi hude okužbe ter v nekaterih primerih celo smrt organizma [3]. Te okužbe se najučinkoviteje zdravijo s protimikrobnimi učinkovinami. Ker so številni sevi *E. coli* razvili oziroma pridobili mehanizme, ki jim omogočajo rezistenco proti tem učinkovinam, je zdravljenje tovrstnih okužb čedalje bolj problematično. Geni za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam se lahko prenašajo s t. i. horizontalnimi prenosi genov v druge seve *E. coli* ali druge vrste patogenih in nepatogenih bakterij, npr. *Salmonella* spp. Med najpomembnejše horizontalne prenose uvrščamo konjugacijo, transdukcijo in transformacijo [4, 7]. Zaradi onesnaženega okolja, naraščajoče populacije ljudi in posledično večjega antropogenega vpliva na okolje (npr. onesnaževanje voda) ter drugih abiotičnih dejavnikov, kot so vpliv podnebnih sprememb (npr. poplave, višje temperature, itd.), se bakterije *E. coli* (tudi rezistentne) čedalje pogosteje pojavljajo izven prebavnega sistema ljudi in živali – v okolju, kar pripomore k hitrejšemu širjenju genov med patogenimi in nepatogenimi bakterijami v okolju [5]. K hitrejšemu razvoju rezistentnih bakterij pa pripomore tudi nepravilna raba antibiotikov. Na ta problem opozarja Svetovna zdravstvena organizacija (WHO), ki je izdala priporočila za pravilno rabo teh zdravil. V njih so zapisali, da je za zdravljenje vedno potrebno izbrati učinkovit antibiotik, s čim ožjim protimikrobnim spektrom delovanja. Doza in način aplikacije morata biti primerna stanju bolnika, uporaba antibiotika pa v posameznih primerih čim krajša [6, 7]. Zaradi vedno večjega števila rezistentnih bakterij, ki

predstavljajo velik zdravstveni problem, raziskave, ki preučujejo pojavnost takšnih bakterij, pridobivajo na pomenu. V naši raziskavi smo tako preučevali pogostnost rezistentnih sevov bakterije *E. coli*, ki so bili izolirani iz domačega okolja.

## Metode

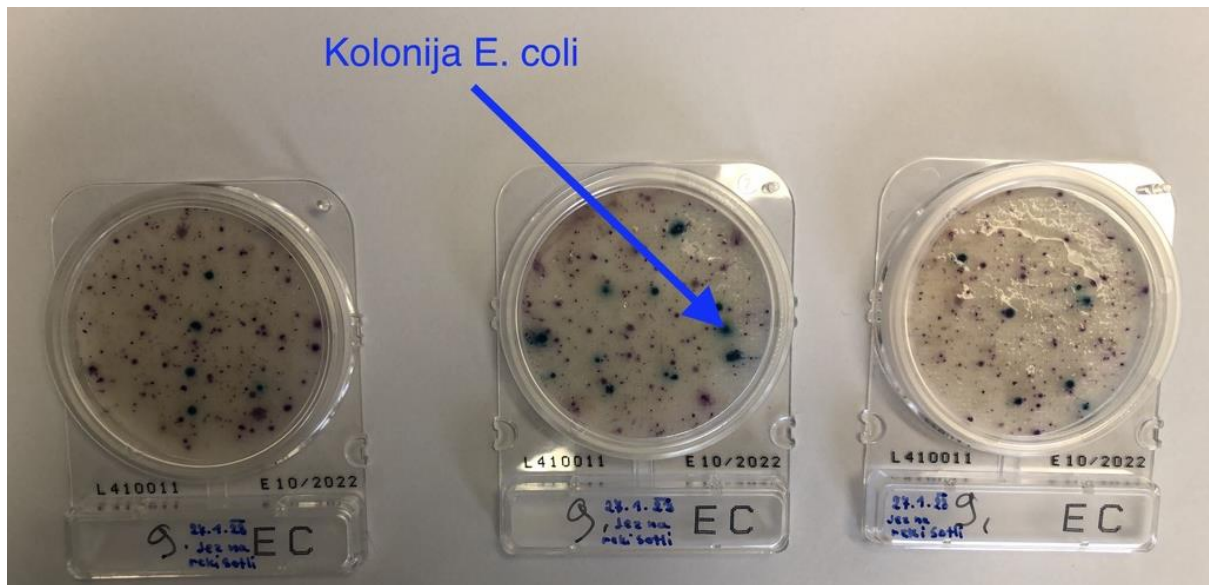
### Opis vzorcev in izolacija *E. coli*

Vzorci za izolacijo sevov *E. coli* smo pridobili iz 11 različnih lokacij, na območju občine Podčetrtek in občine Kozje. Primer ene take lokacije prikazuje slika 1.



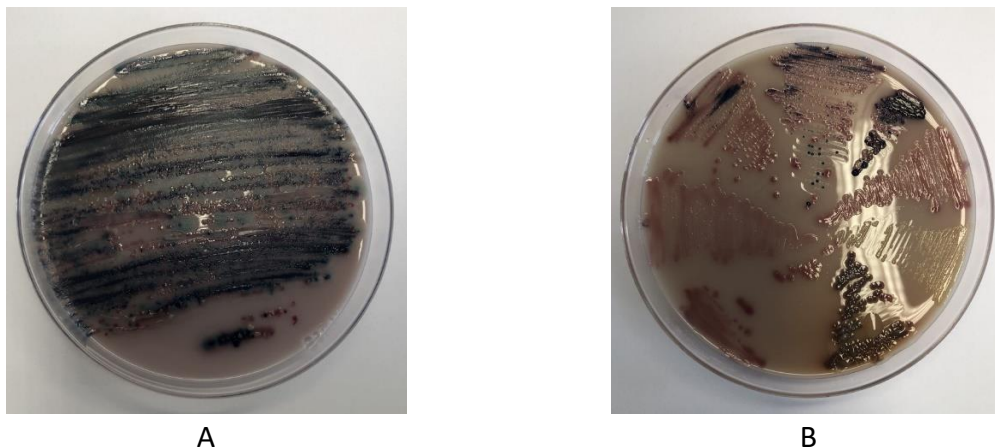
Slika 1: Voda in smeti ob jezu na reki Sotli v Vinarju. Tu so bili odvzeti vzorci, iz katerih smo izolirali najbolj rezistentne seve *E. coli*. Avtor: Atena Ivačič Kolar

Vzorčili smo na dva načina. Vzorce vode smo zajeli v dobro očiščene in predhodno, z vodo, ki smo jo nato zajeli, večkrat splaknjene plastenke. Vzorce s površin smo pridobili s sterilno vatirano palčko – brisom. Po 1 mililiter vsakega vzorca vode smo odpipetirali na gojišča Compact Dry EC (R-Biopharm AG), na katerem se kolonije *E. coli* obarvajo modro (slika 2).



Slika 2: Kolonije *E. coli* iz vzorcev vode so se na gojiščih Compact Dry EC obarvale modro. Avtor: Atena Ivačič Kolar

Brise iz površin smo že na terenu nanesli na gojišča z agarjem Uriselect (Bio-Rad Laboratories), na katerem se kolonije *E. coli* obarvajo rožnato. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Posamezne kolonije bakterij *E. coli* iz različnih vzorcev smo večkrat precepili na gojiščih Uriselect in vsakokrat inkubirali preko noči pri 37 °C, dokler na trdnem gojišču Uriselect nismo dobili morfološko enakih, rožnatih kolonij (slika 3).



Slika 3: Kolonije bakterij so z vsakim precepljanjem postajale vedno čistejše. Slika A prikazuje kolonije različnih bakterij na gojišču Uriselect po prvem precepljanju, slika B pa čistejše kolonije bakterij po več precepljanjih. Avtor: Atena Ivačič Kolar

Seznam vseh pridobljenih izolatov *E. coli* iz vzorcev je v tabeli 1.

Tabela 1: Lokacija, način vzorčenja in izolirani sevi bakterije *E. coli*.

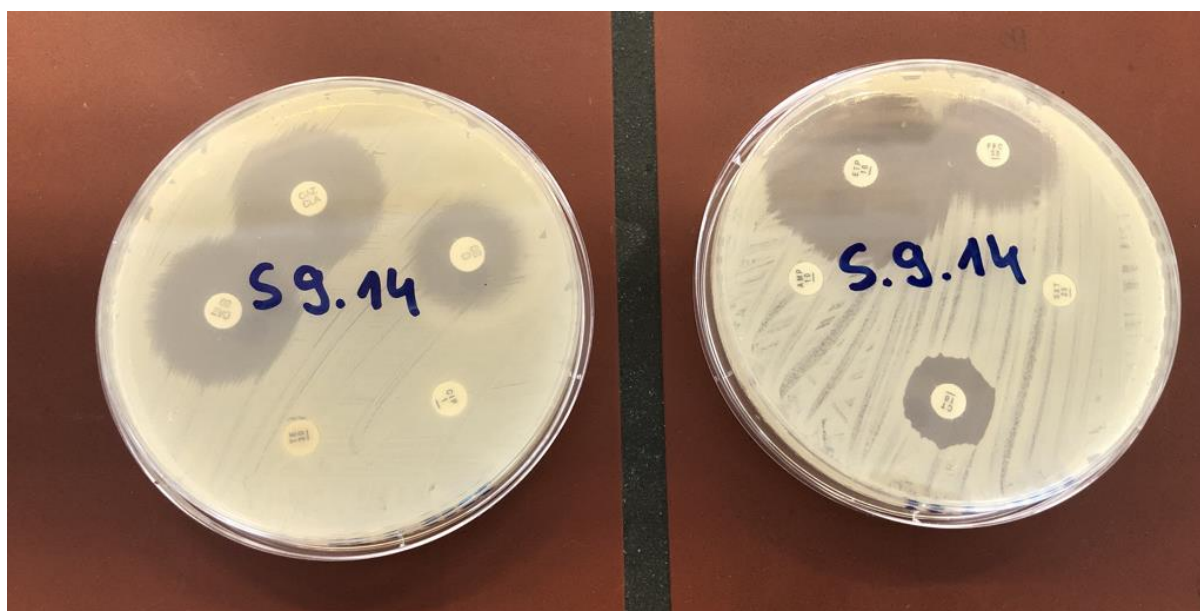
Sevi <i>E. coli</i>	Lokacija vzorčenja	Način vzorčenja
S.C.1	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S.C.2	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.

S.C.3	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S.C.4	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S.C.5	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S.C.6	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S.C.7	Nanos odpadkov ob jezu na Reki Sotli.	Bris z vatirano palčko.
S. 9.1	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.1	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.2	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.3	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.4	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.5	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.6	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.7	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.8	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S. 9.9	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S.9.11	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S.9.12	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S.9.13	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S.9.14	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
S.9.15	Voda ob jezu na reki Sotli, Vonarje.	Zajemanje vzorca vode.
B1	Iztrebek konja.	Bris z vatirano palčko.
A3	Površina kokošjega jajca.	Bris z vatirano palčko.
/	Vodni jarek ob njivi.	Zajemanje vzorca vode.
/	Jezero v Kozjem.	Zajemanje vzorca vode.
/	Rob bazena v Aqualuni.	Bris z vatirano palčko.
/	Smeti ob restavraciji.	Bris z vatirano palčko.
/	Ostanki iz klavnice.	Bris z vatirano palčko.
/	Rečni rokav reke Sotle.	Zajemanje vzorca vode.

Sevov *E. coli* iz vzorcev iz vodnega jarka ob njivi, jezera v Kozjem, roba bazena v Aqualuni, ostankov iz klavnice in rečnega rokava reke Sotle, nismo uspeli izolirati.

### Antibiogram

Za izdelavo antibiogramov smo uporabili izolate iz iztrebka konja, lupine jajca in vode ter površine ob jezu na reki Sotli, saj so bile *E. coli* prisotne le v teh vzorcih. Posamezni izolat, resuspendiran v fiziološki raztopini do gostote 0,5 po Mc Farlandu, smo s sterilno vatenko razmazali preko celotne površine dveh plošč trdnega gojišča Mueller-Hinton. Nato smo na posamezno ploščo s pinceto prenesli diske, prepojene s standardnimi koncentracijami različnih protimikrobnih učinkovin: tetraciklin (TE) – 30 µg, ceftazidim (CAZ) – 30 µg, ceftazidim/klavulanska kislina (CAZ./CLA) – 30/10 µg, kloramfenikol (C) – 30 µg, ciprofloksacin (CIP) – 1 µg, florofenikol (FFC) – 30 µg, trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) – 25 µg, kolistin sulfat (CT) – 10 µg, ampicilin (AMP) – 10 µg in ertapenem (ETP) – 10 µg. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo izmerili in zabeležili cono inhibicije rasti bakterij okoli posameznega diska (slika 4).



Slika 4: Antibiogram seva *E. coli*, izoliranega iz onesnažene vode. Iz obeh prikazanih plošč je razvidna rast seva S9.14 po prekonočni inkubaciji ob prisotnosti komercialnih diskov, prepojenih s standardnimi koncentracijami protimikrobnih učinkovin (TE. 30 – tetraciklin, CAZ. 30 – ceftazidim, CAZ./CLA. - ceftazidim/klavulanska kislina, C.30 – kloramfenikol, CIP.1 – cirpofloksacin, FFC.30 – florofenikol, SXT. 25 - trimetoprim/sulfametoksazol, CT- 10 – kolistin sulfat, AMP. 10 – ampicilin in ETP. 10 – ertapenem). Avtor: Atena Ivačič Kolar

Na podlagi tabele, ki je bila priložena komercialnim diskom za disk difuzijski test in v kateri so bili navedeni značilni premeri con inhibicije rasti za občutljive in rezistentne seve, smo ugotovili, kateri sevi so bili za antibiotike občutljivi, manj občutljivi ali rezistentni.

## Rezultati z diskusijo

Vsi pridobljeni rezultati o rezistenci posameznih izolatov proti različnim uporabljenim protimikrobnim učinkovinam so povzeti v tabeli 2.

Tabela 2: Rezistence posameznih sevov *E. coli*, ugotovljene na podlagi con inhibicije rasti. Izmerjene cone inhibicije rasti za posamezne antibiotike so podane v mm.

Sevi <i>E. coli</i>	TE. 30	CAZ. 30	CAZ./CLA.	C. 30	CIP. 1	FFC. 30	SXT. 25	CT. 10	AMP. 10	ETP. 10
S.C.1	/	33 - S	35 - S	25 - S	36 - S	21 - S	34 - S	17 - S	18 - S	40 - S
S.C.2	27 - S	32 - S	33 - S	26 - S	32 - S	25 - S	31 - S	17 - S	18 - S	32 - S
S.C.3	23 - S	29 - S	32 - S	26 - S	33 - S	23 - S	32 - S	11 - S	19 - S	36 - S
S.C.4	26 - S	31 - S	33 - S	23 - S	30 - S	15 - I	32 - S	11 - S	16 - I	32 - S
S.C.5	30 - S	35 - S	34 - S	29 - S	33 - S	26 - S	31 - S	11 - S	18 - S	37 - S
S.C.6	29 - S	34 - S	36 - S	26 - S	35 - S	23 - S	32 - S	18 - S	17 - S	35 - S
S.C.7	21 - S	31 - S	33 - S	26 - S	33 - S	23 - S	31 - S	17 - S	16 - I	41 - S
S. 9.1	27 - S	34 - S	34 - S	26 - S	32 - S	28 - S	32 - S	17 - S	19 - S	31 - S
S. 9.1	28 - S	31 - S	32 - S	29 - S	33 - S	28 - S	34 - S	17 - S	16 - I	33 - S
S. 9.2	27 - S	33 - S	36 - S	35 - S	35 - S	33 - S	34 - S	17 - S	19 - S	35 - S
S. 9.3	/	31 - S	32 - S	25 - S	35 - S	22 - S	0 - R	16 - S	0 - R	31 - S
S. 9.4	24 - S	30 - S	30 - S	23 - S	34 - S	23 - S	30 - S	16 - S	16 - I	31 - S

S. 9.5	25 - S	27 - S	30 - S	24 - S	31 - S	22 - S	30 - S	11 - S	11 - R	34 - S
S. 9.6	16 - S	34 - S	35 - S	22 - S	35 - S	22 - S	33 - S	19 - S	13 - R	37 - S
S. 9.7	26 - S	32 - S	33 - S	24 - S	33 - S	24 - S	29 - S	17 - S	16 - I	39 - S
S. 9.8	/	33	35 - S	25 - S	36 - S	22 - S	31 - S	17 - S	16 - I	36 - S
S. 9.9	/	29 - S	30 - S	21 - S	35 - S	21 - S	31 - S	16 - S	16 - I	33 - S
S.9.11	/	25 - S	22 - S	20 - S	29 - S	22 - S	31 - S	19 - S	19 - S	32 - S
S.9.12	/	27 - S	29 - S	21 - S	35 - S	23 - S	30 - S	16 - S	17 - S	35 - S
S.9.13	22 - S	29 - S	30 - S	24 - S	29 - S	21 - S	30 - S	15 - S	14 - I	32 - S
S.9.14	0 - R	26 - S	25 - S	17 - I	0 - R	21 - S	0 - R	15 - S	0 - R	33 - S
S.9.15	23 - S	29 - S	29 - S	21 - S	34 - S	22 - S	29 - S	15 - S	17 - S	36 - S
B1	/	24 - S	27 - S	19 - S	29 - S	19 - S	28 - S	14 - S	11 - R	33 - S
A3	/	29 - S	30 - S	26 - S	33 - S	23 - S	30 - S	17 - S	16 - I	33 - S

Legenda: S – Susceptible (občutljiv), I – Intermediate (manj občutljiv), R – Resistant (rezistenten), / – sev za antibiotik ni bil testiran.

Izolati iz iztrebka konja in vode ob jezu na reki Sotli so bili rezistentni proti štirim različnim antibiotikom. Največkrat proti ampicilinu. Najbolj rezistenten izolat (S.9.14) je bil rezistenten proti ampicilinu (betalaktamski antibiotiki), kombinaciji učinkovin trimetoprim/sulfametoksazol (sulfonamidi), tetraciklinu in ciprofloksacinu (fluorkinoloni). Pri ostalih izolatih nismo ugotovili rezistence proti tetraciklinu in ciprofloksacinu. Izolat S.9.14 je bil izoliran iz vode, ki je bila zajeta ob jezu na mejni reki Sotli v Vonarju. Voda na tem območju je že na videz izgledala onesnažena. To kaže na možno povezavo med onesnaženostjo okolja in prisotnostjo proti antibiotikom rezistentnih bakterij ter možnostjo širjenja rezistenčnih genov na druge, tudi okoljske bakterije. Od 24 testiranih sevov smo pri 5 potrdili rezistenco proti ampicilinu (sevi iz reke Sotle – S.9.3., S.9.5., S.9.6., S.9.14., ter sev iz iztrebka konja – B1). Rezistenco proti trimetoprim/sulfametoksazolu smo potrdili pri izolatih S.9.3. in S.9.14, rezistenco proti tetraciklinu in ciprofloksacinu pa pri izolatu S.9.14. V raziskavi smo tako ugotovili, da je bila pogostost rezistence proti ampicilinu 21 %, proti trimetoprim/sulfametoksazolu 8 %, proti tetraciklinu 4 % in proti ciprofloksacin 4 %.

Pomanjkljivost raziskave je, da so bili vzorci odvzeti meseca januarja pri nizkih temperaturah. Bolje bi namreč bilo, da bi vzorčili v poletnih mesecih, saj so višje temperature za preživetje in namnoževanje bakterij vrste *E. coli* ugodnejše in bi verjetno lahko pridobili večje število izolatov. V prihodnosti bi lahko še več raziskav namenili ugotavljanju prisotnosti rezistentnih bakterij in rezistentnih genov v okolju, možnosti njihovega širjenja v (še) neokrnjena okolja načinom kako bi to preprečili.

## Zaključek

Vedno večje število rezistentnih mikroorganizmov predstavlja velik zdravstveni problem. Trend naraščanja rezistence je mogoče pripisati vse večjemu vplivu podnebnih sprememb na okolje, naraščajoči populaciji ljudi ter predvsem onesnaževanju okolja. Problematiko rezistentnih bakterij iz človeškega in živalskega rezervoarja v okolju potrjuje tudi večkratno rezistenten izolat *E. coli*, ki je bil najden v, že na videz, onesnaženi vodi ob jezu na reki Sotli. Sicer je bila pri največ izolatih potrjena rezistenca proti ampicilinu.

Med nastajanjem raziskovalne naloge so se odprla mnoga vprašanja o načinih preprečevanja širjenja genskih zapisov za rezistenco ter čedalje bolj oteženega/neuspešnega zdravljenja okužb, povezanih z bakterijami, rezistentnimi proti antibiotikom. Velik pomen pri reševanju problema proti antibiotikom rezistentnih mikroorganizmov pa ima tudi ozaveščanje javnosti o pravilni rabi antibiotikov.

**Zahvala:** Raziskavo je podprl ERASMUS+ projekt 'Diversity in Science toward Social Inclusion – Non-formal Education in Science for Students` Diversity (DiSSI)' (612103-EPP-1-2019-1-DE-EPPKA3-IPI-SOC-IN), ki ga financira Evropska Unija.

## Viri

1. Kennedy EA, King KY, Baldrige MT. *Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria*. *Front. Physiol.* <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01534/full>; 2018.
2. Filipič M. Koevolucija bakterij in bakteriofagov v bioreaktorju [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=102939&lang=slv&prip=rul:11217167:r1>; 2018.
3. Budič M. Virulentni dejavniki sevov bakterije *Escherichia coli* izoliranih iz blata goveda. [Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta]. Repozitorij UL. <https://repozitorij.uni-lj.si/lzpisGradiva.php?id=118402&lang=slv>; 2011.
4. Hasudungan A. *Microbiology - Bacteria Antibiotic Resistance* [video]. Youtube. <https://youtu.be/057phDG4mKU>; 2014.
5. United Nations Environment Programme. *Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. Geneva. <https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action>; 2023.
6. Mikrobiologija. In: Orožen Adamič A, Sernec K. *Učbenik za farmacevtske in kozmetične tehnike*. DZS; 2017.
7. *Osnove farmakologije*. Grah E. Biotehniški izobraževalni center Ljubljana; 2010.