

# Występowanie gronkowców antybiotykoopornych w powietrzu atmosferycznym na terenie oczyszczalni ścieków

BARBARA BREZA-BORUTA, ZBIGNIEW PALUSZAK

Katedra Mikrobiologii Wydziału Rolniczego ATR Bydgoszcz, ul. Bernardyńska 6/8, 85-029 Bydgoszcz

Breza-Boruta B., Zbigniew Paluszak Z.

## Occurrence of antibiotic resistant staphylococci in the atmospheric air at a sewage treatment plant

### Summary

Microbiological research on bioaerosols was carried out at the Municipal Sewage Treatment Plant in Toruń. The number of staphylococci in the atmospheric air was determined at grit chambers, aeration tanks, and in the vicinity of maturing compost piles. On the basis of Polish Standards, a medium air pollution with staphylococci was reported at the object, the majority of them occurring in the air around the compost piles in summer. The antibiotic-resistance of the 42 tested strains of *Staphylococcus* spp. showed the greatest sensitivity to metacycline (59.6%) and then to erythromycin and vancomycin (40.5%). Novobiocine, to which 66.7% resistant strains were found, appeared to be the least effective antibiotic.

**Keywords:** staphylococci, antibiotic resistance, sewage

Obiekty komunalne stanowiąc mogą potencjalne źródło mikrobiologicznych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego. Zwłaszcza oczyszczalnie ścieków, kompostownie oraz wysypiska gromadzące odpady stałe są źródłem bioaerozoli, będących potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt (11, 13, 23). Zasięg i stopień oddziaływania oczyszczalni zależy od jej wielkości, zastosowanych rozwiązań technologicznych procesów oczyszczania ścieków, przeróbki osadów, staranności eksploatacji i wielu innych (1, 2). Aerozole i mikroorganizmy głównie emitowane są podczas napowietrzania i mieszania ścieków, a także podczas ich rozprowadzania na urządzeniach biologicznych (14, 23). Wśród bakterii wykrywanych w bioaerozolach dominują bakterie Gram-dodatnie, głównie gronkowce i paciorkowce (12).

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* traktowane są jako sanitarne wskaźniki zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego i wskazują na możliwość występowania w nim drobnoustrojów chorobotwórczych (17). Mimo że gronkowce nie wytwarzają form przetrwalnikowych, wykazują zdolność długotrwałego bytowania w powietrzu. Jest to o tyle istotne, że nie wyklucza się rozprzestrzeniania zakażeń drogą aerogenną (16, 18, 24). Szczególną rolę odgrywają szczepy antybiotykooporne zarówno koagulazododatnie, jak i koagulazoujemne, które powstają w następstwie nieracjonalnej terapii antybiotykowej oraz przy zewnętrznym stosowaniu leków sterydowych (6, 18, 19, 22). Anty-

biotykooporność szczepów izolowanych z powietrza atmosferycznego jest dotychczas mało znana.

Dane dotyczące występowania bioaerozoli w środowisku są wciąż niepełne, dlatego istnieje potrzeba wykonywania badań monitoringowych mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza wokół obiektów komunalnych o zwiększonej uciążliwości dla środowiska.

Celem pracy było określenie liczebności bakterii z rodzaju *Staphylococcus* w powietrzu atmosferycznym i stopnia jego skażenia na terenie Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Toruniu oraz na terenie przyległym. Ponadto sprawdzono wrażliwość wyizolowanych szczepów gronkowców na wybrane antybiotyki, co pozwoliło określić stopień ich antybiotykooporności.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na terenie Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Toruniu. Stanowiska do badań wybrano w trzech punktach pomiarowych uważanych za potencjalne emitory zanieczyszczeń mikrobiologicznych, tj.: przy piaskowniku (pkt 1), komorach napowietrzania (pkt 2) oraz wokół przyzmy kompostowych (pkt 3). Czwarte stanowisko znajdowało się w odległości 100 m poza terenem oczyszczalni (pkt 4).

W celu określenia występowania gronkowców próbki powietrza atmosferycznego pobierano raz w miesiącu w okresie od maja do października 2004 roku. Wszystkie pomiary wykonywano w czterech powtórzeniach, metodą zderzeniową za pomocą mikrobiologicznego próbnika

powietrza typu MAS – 100 Eco™ firmy Merck. Przez głowicę aparatu na znajdującą się płytkę Petriego z podłożem agarowym zasysano ściśle określoną objętość powietrza, dostosowaną do pory roku i panujących warunków atmosferycznych.

Do izolacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus* wykorzystano podłoże Chapmana. Hodowle inkubowano w temp. 37°C przez 24 godziny. Po okresie inkubacji dokonano identyfikacji kolonii z wyodrębnieniem gronkowców mannitolododatnich (z wyraźną żółtą strefą wskazującą na rozkład manitolu) i mannitolujemnych (brak przebarwienia) (9, 17). Następnie wykonano preparaty barwione metodą Grama. U wszystkich wyizolowanych szczepów gronkowców przeprowadzono reakcję na wytwarzanie koagulazy, stosując zliofilizowaną plazmę króliczą.

Wyniki przedstawiono w postaci średnich jtk. Do opracowania wyników wykorzystano tablicę konwersji liczby pozytywnych otworów dla systemu monitorowania powietrza MAS-100, a uzyskaną liczbę kolonii przeliczono na 1 m<sup>3</sup> powietrza atmosferycznego.

Do badań nad antybiotykoopornością wykorzystano 42 szczepy *Staphylococcus spp.*, wyizolowane z powietrza atmosferycznego z poszczególnych stanowisk na terenie MOŚ. Wrażliwość gronkowców na wybrane antybiotyki określano metodą dyfuzyjno-krażkową na podłożu Muellera-Hintona, w stosunku do: erytromycyny (15 µg), gentamycyny (10 µg), streptomycyny (25 µg), linkomycyny (15 µg), metycyliny (5 µg), oksacyliny (1 µg), tetracykliny (30 µg), wankomycyny (30 µg) oraz novobiocyny (5 µg). Do testów używano krążków bibułowych wyprodukowanych przez firmę OXOID.

Interpretację wyników oraz kryterium podziału gronkowców na grupy: oporny, średnio wrażliwy i wrażliwy wykonano zgodnie z rekomendacjami Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (8).

### Wyniki i omówienie

Jak wynika z przeprowadzonych badań (tab. 1 i 2), liczba gronkowców w powietrzu atmosferycznym na terenie i wokół Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Toruniu była zróżnicowana i zależała zarówno od miejsca poboru próbek, jak i terminu wykonywania analiz. Największe zanieczyszczenie bakteriami *Staphylococcus spp.* występowało w pobliżu piaskownika oraz przyzmy kompostowych utworzonych z osadów pościekowych. Przy piaskowniku izolowano najwięcej gronkowców mannitolododatnich w czerwcu i sierpniu – odpowiednio 31,7 i 29,4 jtk · m<sup>-3</sup>, natomiast gronkowców mannitolujemnych w maju i sierpniu, tj. 60 i 63 jtk · m<sup>-3</sup>. Na podstawie Polskich Norm (17) należy przyjąć, że powietrze w tym okresie było silnie zanieczyszczone gronkowcami. W pozostałych terminach badań w pobliżu piaskownika i komór napowietrzania izolowano niewiele gronkowców i powietrze sklasyfikowano jako średnio- lub niezanieczyszczone. Dość silnymi emitorami bioaerozoli okazały się

**Tab. 1. Występowanie gronkowców mannitolododatnich i stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego w okresie od maja do października 2004 r. na badanych stanowiskach (jtk · m<sup>-3</sup>)**

Punkty pomiarowe	Termin analiz					
	maj	czerwiec	lipiec	sierpień	wrzesień	październik
1	22,0*	31,7	13,3	29,4	5,0	13,0
2	0	5,0	12,0	7,3	10,0	24,0
3	12,0	21,7	9,3	108,0	32,0	6,0
4	0	3,3	0	0	0	2,0

Objaśnienia: \* – ocena mikrobiologicznego stopnia skażenia powietrza przez gronkowce wg skali PN-89 Z-04111/02; kolor niebieski – brak komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze nie zanieczyszczone; kolor czarny – 25 i poniżej komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze średnio zanieczyszczone; kolor czerwony – powyżej 25 komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze silnie zanieczyszczone

**Tab. 2. Występowanie gronkowców mannitolujemnych i stopień zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego w okresie od maja do października 2004 r. na badanych stanowiskach (jtk · m<sup>-3</sup>)**

Punkty pomiarowe	Termin analiz					
	maj	czerwiec	lipiec	sierpień	wrzesień	październik
1	60,0*	0	3,3	63,0	31,0	3,0
2	4,0	5,0	0	3,3	2,0	8,0
3	16	8,7	3,3	16,7	6,0	4,0
4	0	0	0	0	7,0	2,0

Objaśnienia: \* – ocena mikrobiologicznego stopnia skażenia powietrza przez gronkowce wg skali PN-89 Z-04111/02; kolor niebieski – brak komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze nie zanieczyszczone; kolor czarny – 50 i poniżej komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze średnio zanieczyszczone; kolor czerwony – powyżej 50 komórek w 1 m<sup>3</sup> – powietrze silnie zanieczyszczone

przyzmy kompostowe, w których leżakował osad ściekowy zmieszany z materiałem strukturotwórczym. Podwyższoną zawartość zwłaszcza gronkowców mannitolododatnich obserwowano w miesiącu sierpniu (108 jtk · m<sup>-3</sup>) i wrześniu (32 jtk · m<sup>-3</sup>). W pozostałych terminach powietrze wokół przyzmy było średnio zanieczyszczone, bowiem liczba gronkowców mannitolododatnich wahała się od 6,0 do 21,7 jtk · m<sup>-3</sup>, a mannitolujemnych od 3,3 do 16,7 jtk · m<sup>-3</sup>.

Należy podkreślić, że pomiary dokonane w odległości 100 m poza terenem oczyszczalni wykazały nieznaną liczbę gronkowców mannitolododatnich w czerwcu i październiku, odpowiednio 3,3 i 2,0 jtk · m<sup>-3</sup>, a mannitolujemnych we wrześniu oraz październiku (7,0 i 2,0 jtk · m<sup>-3</sup>). W pozostałych okresach poza terenem oczyszczalni gronkowców w powietrzu nie izolowano.

W tabeli 3 zestawiono warunki meteorologiczne panujące podczas pobierania próbek powietrza. Średnia temperatura dobową osiągnęła najwyższą wartość w miesiącach sierpniu i wrześniu (18,9-25,2°C). W tym czasie stwierdzono największe mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza zarówno gronkowcami mannitolododatnimi, jak i mannitolujemnymi.

Tab. 3. Warunki meteorologiczne panujące podczas pobierania próbek w okresie od maja do października 2004 r. na terenie Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Toruniu

Data poboru próbek	Ciśnienie (hPa)	Średnia temperatura (°C)	Wilgotność (%)	Kierunek wiatru	Prędkość wiatru (m/s)
14.05.2004	1008,7	10,4	53,3	NW	2
14.06.2004	1011,2	17,8	57,7	W	1
13.07.2004	996,7	15,9	69,5	NW	0,2
11.08.2004	1008,1	24,3	55,2	E	4
07.09.2004	1017,4	19,3	67,6	W	0,5
07.10.2004	1006,9	14,9	75,8	SW	2

Tab. 4. Wrażliwość na wybrane antybiotyki szczepów *Staphylococcus* spp. wyizolowanych z powietrza atmosferycznego

Antybiotyk	Liczba szczepów (%)		
	wrażliwe	średnio wrażliwe	oporne
Metycylina	25 (59,6%)	14 (33,3%)	3 (7,1%)
Oksacylina	13 (31,0%)	18 (42,8%)	11 (26,2%)
Linkomycyna	7 (16,7%)	19 (45,2%)	16 (38,1%)
Erytromycyna	17 (40,5%)	17 (40,5%)	8 (19,0%)
Wankomycyna	17 (40,5%)	22 (52,4%)	3 (7,1%)
Tetracyklina	13 (31,0%)	25 (59,5%)	4 (9,5%)
Nowobiocyna	5 (11,9%)	9 (21,4%)	28 (66,7%)
Streptomycyna	4 (9,5%)	27 (64,3%)	11 (26,2%)
Gentamycyna	8 (19,1%)	28 (66,7%)	6 (14,2%)

Należy dodać, że wszystkie szczepy oznaczone jako mannitolododanie wykazywały cechę koagulazododatności.

Wyniki oceny wrażliwości gronkowców wyizolowanych z powietrza na wybrane antybiotyki przedstawiono w tab. 4. Antybiotykiem najbardziej skutecznym w stosunku do badanych szczepów okazała się metycylina – 59,6% szczepów wrażliwych i 33,3% średnio wrażliwych. Wysoką zdolnością hamowania wzrostu gronkowców charakteryzowała się również erytromycyna i wankomycyna – po 40,5% szczepów wrażliwych. Z kolei na streptomycynę i gentamycynę większość szczepów wykazywała średnią wrażliwość – odpowiednio 64,3% i 66,7%. Również w odniesieniu do działania tetracykliny i oksacyliny stwierdzono najczęściej szczepów o średniej wrażliwości (59,5% i 42,8%). W warunkach *in vitro* najslabiej na testowane gronkowce oddziaływała nowobiocyna. Spośród użytych szczepów było 66,7% opornych na ten antybiotyk i tylko 11,9% wrażliwych. Mało skuteczna była także linkomycyna, na którą oporność wykazywało ponad 38% szczepów.

Przeprowadzone badania dowodzą, że na terenie oczyszczalni ścieków występowało umiarkowane zagrożenie emisją gronkowców. Największą liczbę bak-

terii stwierdzono przy piaskowniku i przyzmacz kompostu, które uważane za główne emitery zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Potwierdzają to wyniki uzyskane przez innych autorów (14, 15, 23). Według Fernando (4), liczba bakterii w powietrzu emitowanych z komór napowietrzania i pozostałych stanowisk maleje w miarę oddalania się od źródła emisji. Jest ona wypierana przez mikroflorę autochtoniczną, bakterie pigmentowe i grzyby pleśniowe. Również Bauer (1) i Brandi (2) wskazują, że liczba bakterii dostających się do powietrza ulega znacznemu zmniejszeniu w miarę oddalania się od źródła emisji. W badaniach własnych także zaobserwowano zmniejszanie się ilości gronkowców wraz ze zwiększającą się odległością od stanowisk pomiarowych. Występowanie gronkowców poza terenem oczyszczalni stwierdzono tylko w dwóch terminach i kształtowało się ono na bardzo niskim poziomie. Zatem MOŚ w Toruniu nie wpływa negatywnie na jakość mikrobiologiczną powietrza wokół obiektu. Zastosowana technologia oczyszczania ścieków przy odpowiednim obciążeniu oczyszczalni nie przyczynia się do rozprzestrzeniania gronkowców w powietrzu.

Najwięcej badanych szczepów *Staphylococcus* charakteryzowało się średnią wrażliwością w stosunku testowanych antybiotyków. Zaskakującym wynikiem jest tylko 40,5% szczepów wrażliwych na wankomycynę. Z danych piśmiennictwa wynika, że do tej pory wykryto i opisano nieliczne przypadki wieloopornych gronkowców na wankomycynę (5, 20). Natomiast wielu autorów wskazuje na gwałtownie zmniejszającą się wrażliwość szczepów *Staphylococcus* spp. na metycylinę (3, 6, 22, 25). Oporność na ten antybiotyk w praktyce oznacza oporność na wszystkie antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Wyniki własne potwierdzają dla wszystkich szczepów opornych na metycylinę brak wrażliwości na należącą do  $\beta$ -laktamów oksacylinę. U badanych szczepów zauważono większą oporność w stosunku do oksacyliny niż metycyliny. Szczepy MRSA, według Hryniewicz (7), są zazwyczaj wrażliwe na gentamycynę i wykazują oporność rzędu 10-15% na makrolidy i linkozamidy oraz 20-30% na tetracykliny. Testowane szczepy oporne na metycylinę charakteryzowały się na ogół średnią wrażliwością zarówno na gentamycynę, jak i na tetracyklinę. Natomiast wszystkie szczepy oporne na metycylinę okazały się wrażliwe na erytromycynę. Badania przeprowadzone nad gronkowcami przez Dzierżanowską (3) oraz Khana (10) wykazują, że większość klinicznych izolatów *S. aureus* wrażliwych na metycylinę wykazuje też wrażliwość na erytromycynę, a metycylinooporne szczepy *S. aureus* (MRSA) są zwykle oporne na erytromycynę.

Większość danych piśmiennictwa dotyczy szczepów szpitalnych, które często są niewrażliwe na antybiotyki: tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, chloramfenikol i inne (3, 7, 8). Natomiast szczepy izolowane z innych źródeł są wrażliwe na więk-

szość antybiotyków, a odporne jedynie na metycylinę i tetracykliny (7). W zaprezentowanych badaniach wykazano obecność w powietrzu atmosferycznym oczyszczalni ścieków występowanie gronkowców opornych na wiele antybiotyków.

Na podstawie przeprowadzonych testów należy stwierdzić, że poza szczepami szpitalnymi i pochodzącymi od chorych zwierząt, również wielooporne gronkowce rozpowszechnione są w środowisku naturalnym. Zjawisko to szczególnie niebezpieczne może być dla pracowników o obniżonej odporności, np. w oczyszczalni ścieków.

Należy podkreślić, że duża zmienność gronkowców, wyrażona, między innymi, opornością na antybiotyki, zróżnicowaniem gatunków, produkowaniem metabolitów, chorobotwórczością, rozprzestrzenianiem się i dużą wytrzymałością na czynniki zewnętrzne, czyni tę grupę bakterii potencjalnie niebezpieczną przy zakażeniu ludzi lub zwierząt (19, 21, 22).

Na konieczność monitorowania i aktywnego zwalczania lekooporności wskazują Światowa Organizacja Zdrowia i Komisja Europejska. Istnieją bowiem przesłanki wskazujące na to, że proces powstawania mikroorganizmów opornych na antybiotyki można zahamować przez rozważne stosowanie tych leków oraz ciągłe monitorowanie oporności w wybranym regionie czy też całym kraju (3, 7).

### Piśmiennictwo

1. Bauer H., Fuerhacker M., Zibuschka F., Schmid H., Puxbaum H.: Bacteria and fungi in aerosols generated by two different types of wastewater treatment. *Water Res.* 2002, 36, 3965-3970.
2. Brandi G., Sisti M., Amagliani G.: Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration systems. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 845-852.
3. Dzierżanowska D., Pawińska A., Kamińska A., Patzer J.: Lekooporne drobnoustroje w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* 2004, 43, 81-105.
4. Fernando N. L., Fedorak P. M.: Changes at an activated sludge sewage treatment plant alter the numbers of airborne aerobic microorganisms. *Water Res.* 2005, 39, 4597-4608.
5. Harimatsu K.: The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am. J. Med.* 1998, 29, 7-10.
6. Hedberg C. W., Mac Donald K. L., Osterholm M. T.: Changing epidemiology of food-borne diseases. A Minnesota Prospective. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 18, 671-683.
7. Hryniewicz W., Sulikowska A., Szczypa K., Gniadkowski M., Skoczyńska A.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Post. Mikrobiol.* 2005, 44, 175-192.
8. Hryniewicz W., Sulikowska A., Szczypa K., Krzysztoń-Russjan J., Gniadkowski M.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Mikrobiol. Medycyna* 2002, 3, 12-39.
9. Kędzia W., Koniar H.: Diagnostyka mikrobiologiczna. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1980, 21-27.
10. Khan S. A., Nawaz M. S., Khan A. A., Cerniglia C. E.: Transfer of erythromycin resistance from poultry to human clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microb.* 2000, 38, 1832-1838.
11. Lighthart B.: The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol Ecology* 1997, 23, 263-274.
12. Lebkowska M.: Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w powietrzu obiektów komunalnych i przemysłowych. Inżynieria i ochrona środowiska 2001, 4, 3-4.
13. Pascual L., Pérez-Luz S., Yáñez M. A., Santamaria A., Gibert K., Salgit M., Apraiz D., Catalán V.: Bioaerosol emission from wastewater treatment plants. *Aerobiologia* 2003, 19, 261-270.
14. Petrycka H., Godlewska-Zablocka E., Kolasa M.: Mikroflora powietrza atmosferycznego na obszarze oczyszczalni ścieków w Tychach-Urbanowicach. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 1995, 8, 272-274.
15. Piekarska K., Traczewska T. M.: Wpływ oczyszczalni ścieków na jakość mikrobiologiczną powietrza. *Ochrona powietrza i Problemy Odpadów* 2002, 36, 19-25.
16. Pillai S., Ricke S. C.: Bioaerosols from municipal and animal wastes: background and contemporary. *Can. J. Microbiol.* 2002, 48, 681-696.
17. PN-89 Z-04111/02. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
18. Rywotycki R.: Patogenność gronkowców koagulazoujemnych dla zarodków indyjskich. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 356-360.
19. Sachanowicz J., Jakubczak A., Piechota M.: Właściwości fenotypowe i genotypowe szczepów *Staphylococcus aureus* wyizolowanych z mleka krów chorych na mastitis. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1370-1373.
20. Srinivasan A., Dick J. D., Perl T. M.: Vancomycin resistance in staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 430-438.
21. Szewczyk E. M.: Diagnostyka bakteriologiczna. PWN, Warszawa 2005, 19-27.
22. Szymańska K., Buczek J.: Charakterystyka mechanizmów chorobotwórczości gronkowców. *Medycyna Wet.* 1999, 55, 590-594.
23. Taha M. P. M., Drew G. H., Longhurst P. J., Smith R., Pollard S. J. T.: Bioaerosol releases from compost facilities: Evaluating passive and active source terms at a green waste facility for improved risk assessments. *Atmospheric Environment* 2006, 40, 1159-1169.
24. Wawron W., Szczubiał M., Piech T., Krzyżanowski J., Wrona Z., Krakowski L.: Ocena wrażliwości na antybiotyki bakterii wyizolowanych z przypadków mastitis u krów. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 675-679.
25. Werner G., Cuny C., Schmitz F. J., Witte W.: Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 3586-3590.

Adres autora: dr inż. Barbara Breza-Boruta, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz; e-mail: mikro@atr.bydgoszcz.pl