INFRASTRUKTURA I EKOLOGIA TERENÓW WIEJSKICH
INFRASTRUCTURE AND ECOLOGY OF RURAL AREAS

Nr I/1/2018, POLSKA AKADEMIA NAUK, Oddział w Krakowie, s. 7-23
Komisja Technicznej Infrastruktury Wsi

DOI: https://doi.org/10.14597/INFRAECO.2018.1.1.001

OCENA TOKSYCZNOŚCI NANOCZĄSTEK SREBRA W STOSUNKU DO LEKOOPORNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* IZOLOWANYCH Z ODPADÓW KOMUNALNYCH

Katarzyna Wolny-Koładka[1], Agnieszka Sikora[1], Dagmara Malina[2]
[1]Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, [2]Politechnika Krakowska

EVALUATION OF SILVER NANOPARTICLES TOXICITY TO DRUG-RESISTANT ESCHERICHIA COLI *STRAINS ISOLATED FROM MUNICIPAL WASTE*

Streszczenie

Celem pracy była ocena bakteriobójczych właściwości nanocząstek srebra w stosunku do bakterii *Escherichia coli*. Ponadto, wykonano analizę wrażliwości bakterii *E. coli* na powszechnie stosowane antybiotyki. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano 51 szczepów izolowanych z odpadów komunalnych. Zastosowano wzrastające stężenia nanosrebra: 5, 10, 15, 30, 60 oraz 125 ppm. Kontrolą pozytywną był antybiotyk – ampicylina, negatywną – woda destylowana. Analizę lekooporności wykonano przy pomocy metody dyfuzyjno-krążkowej. Wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek srebra, wzrastały ich właściwości antybakteryjne. Najmniejszym stężeniem hamującym wzrost niektórych izolatów było 5 ppm, natomiast najskuteczniejsze było stężenie 125 ppm. Analiza lekooporności wykazała, że antybiotykiem hamującym wzrost największej liczby szczepów *E. coli* była amikacyna. Ponadto, wykryto szczepy wielolekooporne stanowiące 22%. Nanosrebro posiada duży potencjał bakteriobójczy i może okazać się pomocne w rozwiązaniu problemu

Artykuł został opublikowany na licencji Creative Commons BY-NC-ND licence
(http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/4.0/)

lekooporności. Jednak, zasadne jest prowadzenie dalszych badań oceniających wpływ toksyczności nanocząstek na środowisko i organizmy wyższe.

Słowa kluczowe: *Escherichia coli*, lekooporność, nanocząstki srebra, toksyczność

Abstract

The aim of the study was to evaluate the bactericidal properties of silver nanoparticles against bacteria Escherichia coli. In addition, a sensitivity analysis was made of E. coli to commonly used antibiotics. In the study were used 51 strains isolated from municipal waste. Applied growing concentrations of nanosilver were used: 5, 10, 15, 30, 60 and 125 ppm. The positive control was an antibiotic – ampicillin, negative control – a distilled water. Drug-resistance analysis was performed by disc-diffusion method. Along with the increase in the concentration of silver nanoparticles their antibacterial properties is also growing. The smallest concentration that inhibited growth of some isolates was 5 ppm, while the most effective concentration was 125 ppm. Analysis of drug resistance showed that the antibiotic inhibits growth of a large number of E. coli strains was amikacin. In addition, 22% of all isolates analyzed were drug-resistant. Nanosilver has a high bactericidal potential and may be helpful in solving the problem of drug resistance. However, it is reasonable to conduct further studies on the effects of toxicity of nanoparticles on the environment and higher organisms.

Key words: *Escherichia coli, drug resistance, silver nanoparticles, toxicity*

WSTĘP

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa nanocząstek uwarunkowana jest m.in. ich stężeniem, rozmiarem, kształtem i technologią wytwarzania (Franci i in. 2015). Nanosrebro posiada szerokie spektrum toksyczności względem bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, grzybów, wirusów, a także pierwotniaków (Russell i Hugo 1994, Cho i in. 2005, Lok i in. 2006).

Według Rai in. (2009) trójkątne nanocząstki srebra odznaczają się dużo większymi bakteriobójczymi właściwościami niż struktury sferyczne. Nie bez znaczenia jest także rozmiar nanostruktur. Najwyższy potencjał bakteriobójczy przypisywany jest cząsteczkom nanosrebra o średnicy 1-10 nm (Tolaymat i in. 2010). Toksyczność nanosrebra względem komórek bakteryjnych jest wielowymiarowa. Wśród najważniejszych mechanizmów warunkujących bakteriobójcze działanie nanosrebra wymienia się zdolność wiązania jonów do osłon komór-

kowych, zaburzanie funkcji błon cytoplazmatycznych, inaktywację kluczowych enzymów, zakłócanie procesów metabolicznych i oddechowych, oddziaływanie z kwasami nukleinowymi oraz wytwarzanie wolnych rodników (Durán i in. 2016, El-Sheekh i El-Kassas 2016).

Produkty zawierające nanosrebro są skuteczne w stosunku do bardzo dużej liczby mikroorganizmów, w tym chorobotwórczych bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, a także grzybów: *Candida albicans*, *Phoma glomerata*, *Trichoderma* sp. (Kędziora i Sobik 2013). Szczególne właściwości nanostruktur powstałych w oparciu o srebro metaliczne i jego związki sprawiły, że są one obecnie często stosowane w wielu gałęziach przemysłu (np. chemicznym, odzieżowym, spożywczym, elektronicznym i elektrotechnicznym), a także w medycynie w procesie leczenia poparzeń, lub jako środki antyseptyczne. Związki zawierające nanocząstki srebra uważane są za najskuteczniejsze środki dezynfekcyjne i stanowią składnik wielu preparatów służących do odkażania powierzchni poprzez eliminację mikroorganizmów (Guo i in. 2013, El-Sheekh i El-Kassas 2016).

W niniejszej pracy testowano bakteriobójcze właściwości nanosrebra w stosunku do bakterii *Escherichia coli*, które są niezwykle często izolowane z odpadów komunalnych (Wolny-Koładka i in. 2016). *E. coli* to pałeczki gram-ujemne, które naturalnie żyją w przewodzie pokarmowym człowieka oraz innych kręgowców. Biorą udział w syntetyzowaniu niektórych witamin, m.in. B i K oraz są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesów trawiennych. Mikroorganizmy te są więc pożyteczne, kiedy wchodzą w skład bakteryjnej flory jelitowej. Natomiast, gdy znajdą się poza ich naturalnym środowiskiem, np. w wodzie, stają się szkodliwe i po wniknięciu do organizmu drogą pokarmową mogą powodować szereg chorób układu trawiennego i moczowego (Libudzisz 2009). Mając na uwadze rozprzestrzenianie się zjawiska lekooporności drobnoustrojów, poszukuje się nowych i bardziej skutecznych metod zwalczania patogenów. Stąd niezwykle interesująca jest perspektywa zastosowania nanosrebra w walce z wielolekoopornymi szczepami bakterii (Ibrahim i in. 2012, Franci i in. 2015).

W odpadach komunalnych i ściekach często wykrywa się wielolekooporne szczepy bakterii, które stanowią olbrzymie zagrożenie epidemiologiczne dla pracujących przy ich przetwarzaniu i oczyszczaniu ludzi (Ibrahim i in. 2012). Dlatego celem niniejszych badań była ocena bakteriobójczych właściwości nanocząstek srebra w porównaniu do powszechnie stosowanych antybiotyków na przykładzie bakterii *Escherichia coli* izolowanych z odpadów komunalnych. Ponadto, planowano określić w jakim stopniu poszczególne stężenia nanosrebra hamują wzrost i rozwój *E. coli*.

MATERIAŁY I METODY

Wykorzystano 51 szczepów *Escherichia coli* pochodzących z kolekcji własnej. Szczepy *E. coli* zostały wyizolowane z odpadów komunalnych składowanych na terenie jednej z krakowskich firm zajmujących się ich przetwarzaniem. Odpady składowane w pryzmie pobierano do jałowych pojemników o pojemności 500 ml i niezwłocznie transportowano do laboratorium, gdzie prowadzono dalsze analizy. Do testów wybrano pałeczki *E. coli*, ponieważ to mikroorganizmy często izolowane z odpadów komunalnych oraz wywołujące zakażenia u ludzi. Na poniższym schemacie (Rysunek 1) przedstawiono kolejne etapy badań. Etapy nr 2-4 odnoszą się do analizy toksyczności nanocząstek srebra (Shahverdi i in. 2007, Sheehy i in. 2015), natomiast 5-7 – do analizy lekooporności przy pomocy antybiogramu (Gniadkowski i in. 2009). Etap nr 1 jest wspólny dla obu doświadczeń.

1 – Niebiesko-zielone kolonie *E. coli* przy pomocy jałowej bagietki pobrano z szalek z pożywką TBX i przeniesiono do probówki z 0,9% r-r NaCl w takiej ilości, aby gęstość optyczna zawiesiny komórek wyniosła 0,5 McFarland.

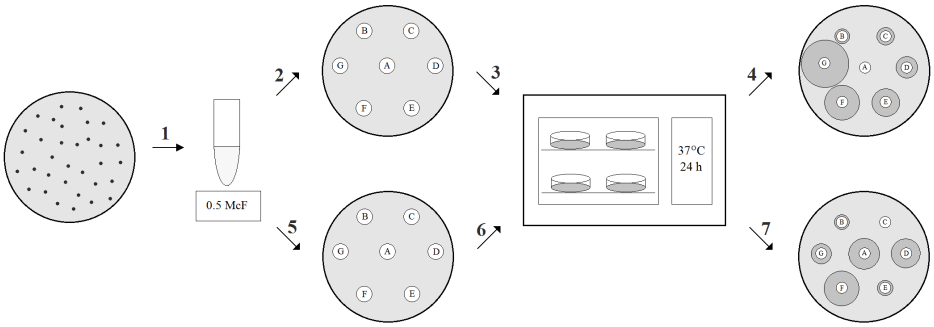
2 – Inokulum wysiano na szalki z podłożem MHA, nałożono jałowe krążki bibułowe i przy pomocy pipety naniesiono odpowiednie stężenia nanocząstek srebra (po 10 µl) oraz jałową wodę destylowaną (kontrola negatywna) na poszczególne krążki (A – woda destylowana, B-G – odpowiednie stężenia roztworu nanocząstek srebra (5, 10, 15, 30, 60, 125 ppm)). Zastosowano nanocząstki srebra o średnim rozmiarze 30,77 ± 0,67 nm i sferycznym kształcie, syntetyzowane na drodze redukcji chemicznej.

5 – Inokulum wysiano na szalki z podłożem MHA i z użyciem dyspensera nałożono krążki antybiotykowe. Analizowano 20 różnych antybiotyków (Tabela 1), szczególną uwagę zwracano na mechanizm ESBL, układając antybiotyki w kolejności cefotaksym, amoksycylina/kwas klawulanowy, ceftazydym w odległości 2 cm od siebie. Pozytywny wynik testu na obecność mechanizmu ESBL obserwuje się w przypadku powiększonych stref zahamowania wzrostu wokół ceftazydymu lub cefotaksymu w kierunku krążka z amoksycyliną/kwasem klawulanowym.

3, 6 – Szalki umieszczono w cieplarce (37°C) i inkubowano przez 24 h.

4, 7 – Po inkubacji zmierzono strefy zahamowania wzrostu wokół krążków bibułowych lub antybiotykowych. Wyniki oceny wrażliwości testowanych szczepów na antybiotyki interpretowano w oparciu o wytyczne EUCAST (2016).

Przy użyciu programu Statistica v. 12.5 (StatSoft) obliczono wartość średnią zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków. Przeprowadzono także ocenę korelacji pomiędzy stężeniem nanocząstek srebra a zahamowaniem wzrostu *E. coli*.

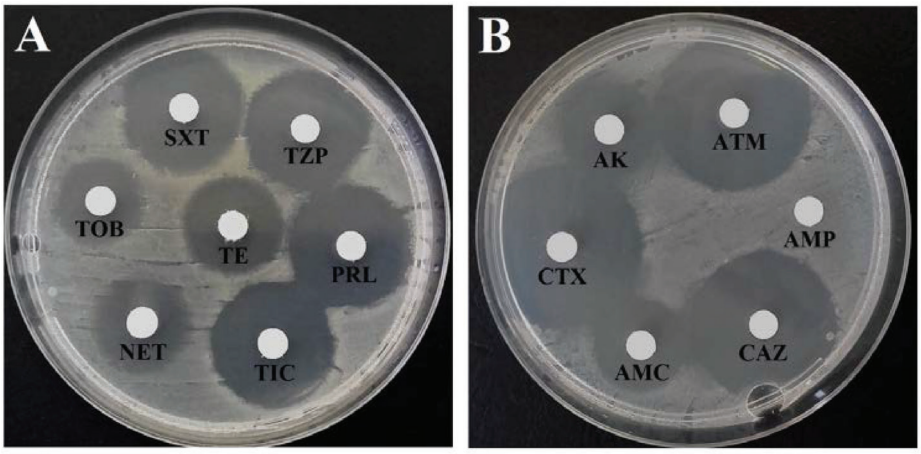


Rysunek 1. Schemat przeprowadzonych badań
Figure 1. Diagram of research methodology

WYNIKI

Ocena oporności bakterii E. coli na wybrane antybiotyki.

Analiza profilu lekooporności zgromadzonych izolatów pozwoliła na stwierdzenie, iż większość analizowanych antybiotyków ma hamujące działanie na wzrost i rozwój badanych szczepów *E. coli* (Rysunek 2, Tabela 1).



Rysunek 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* na skutek działania testowanych antybiotyków
Figure 2. Zones of growth inhibition of *E. coli* caused by the application of antibiotics analyzed

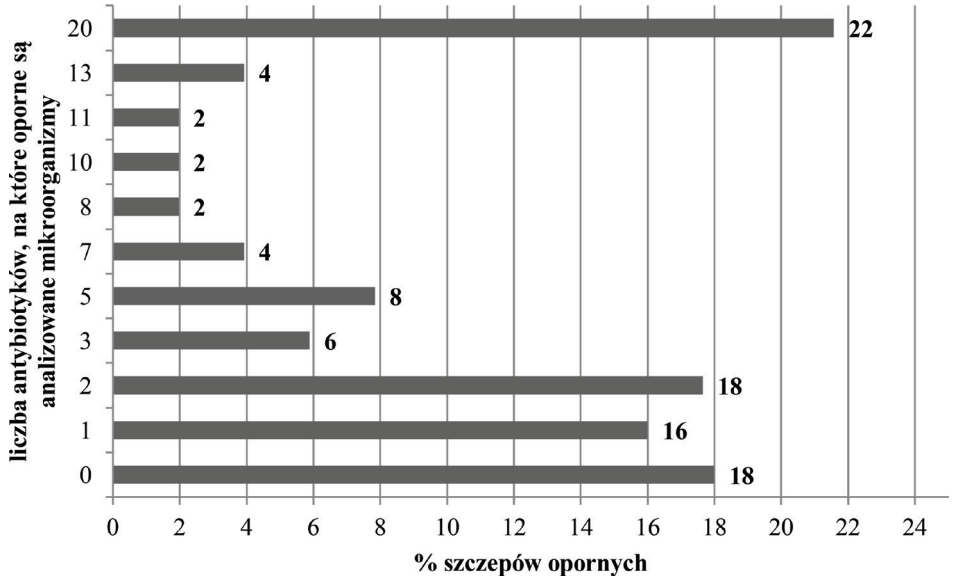
Tabela 1. Profil lekooporności bakterii *E. coli*
Table 1. Profile of drug-resistant *E. coli*

Lp.	Antybiotyk	Skrót	Szczepy wrażliwe (S)	Szczepy średniowrażliwe (I)	Szczepy oporne (R)
1	Amikacyna	AK	38	2	11
2	Amoksycylina/ kwas klawula-nowy*	AMC	32	1	18
3	Ampicylina	AMP	23	3	25
4	Aztreonam	ATM	33	–	18
5	Cefamandol	MA	33	–	18
6	Cefepim	FEP	35	–	16
7	Cefotaksym*	CTX	34	1	16
8	Cefoksytyna	FOX	29	–	22
9	Ceftazydym*	CAZ	34	1	16
10	Cefalotyna	KF	20	8	23
11	Cefazolina	KZ	20	8	23
12	Ciprofloksacyna	CIP	34	3	14
13	Gentamicyna	CN	31	8	12
14	Netilmicyna	NET	36	2	13
15	Piperacylina	PRL	37	–	14
16	Piperacylina/ tazobaktam	TZP	39	–	12
17	Tetracyklina	TE	36	2	13
18	Tikarcylina	TIC	24	–	27
19	Tobramycyna	TOB	34	2	15
20	Trimetoprim/sul-fametoksazol	SXT	33	–	18

*antybiotyki stosowane w wykrywaniu mechanizmu ESBL

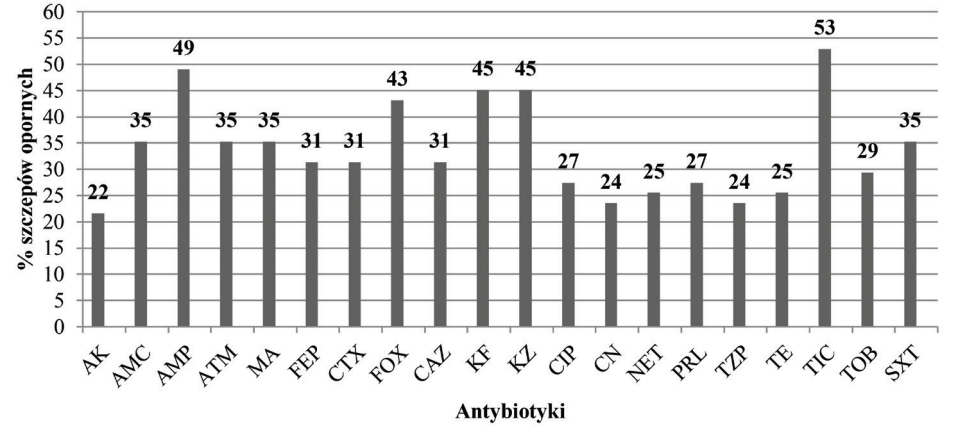
Nie zaobserwowano występowania mechanizmu oporności typu ESBL. 18% badanych szczepów *E. coli* jest wrażliwa na wszystkie analizowane antybiotyki. Duży odsetek (68%) izolatów *E. coli* wykazuje oporność na 2 i więcej antybiotyków (Rysunek 3).

Każdy z testowanych antybiotyków wykazywał skuteczność hamowania wzrostu w stosunku do co najmniej 20 szczepów bakterii (Tabela 1). Najwięcej izolatów było opornych na tikarcylinę (53%), a antybiotykiem, który hamował wzrost największej liczby izolatów była amikacyna (22%) (Rysunek 4).



Rysunek 3. Wielolekooporność *E. coli*
Figure 3. Multidrug–resistance of *E. coli*

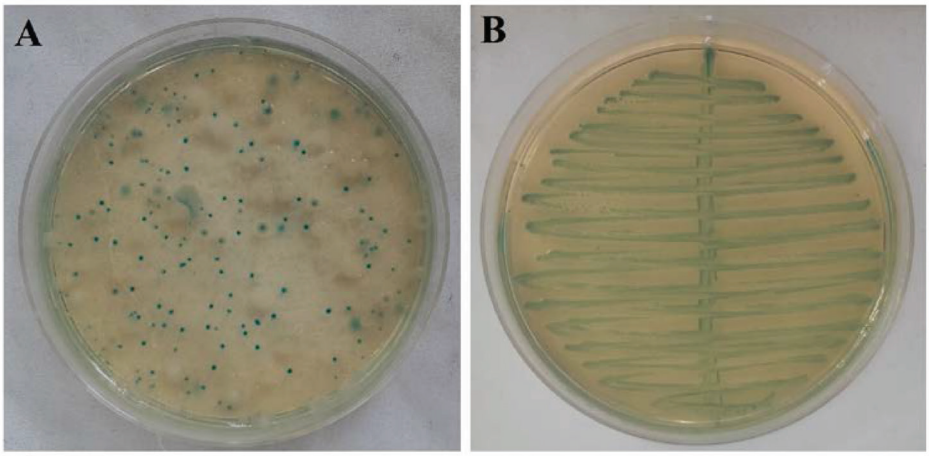
Statystyczna analiza zależności średniej strefy zahamowania wzrostu bakterii od stężenia nanocząstek potwierdziła bardzo wysoką, dodatnią korelację pomiędzy tymi dwiema wartościami (wartość współczynnika korelacji r Pearsona to 0,88) dla ($p<0,05$).



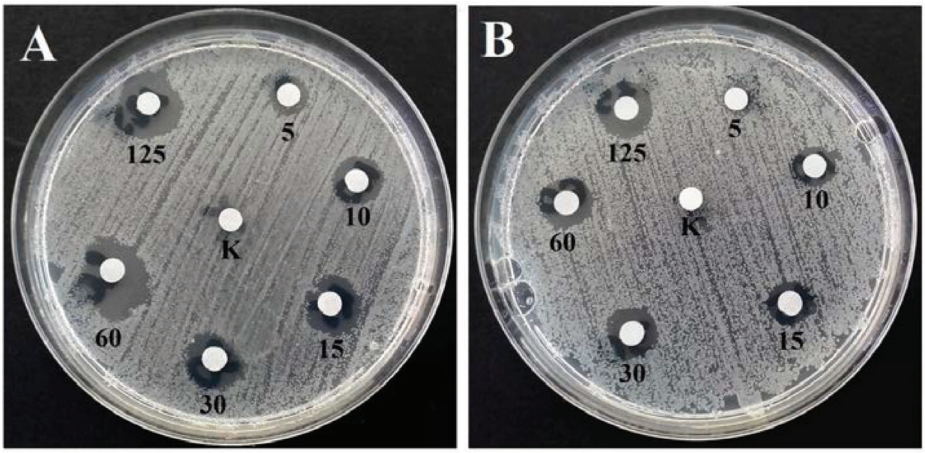
Rysunek 4. Udział opornych izolatów *E. coli* na testowane antybiotyki
Figure 4. The share of resistant isolates of *E. coli* to tested antibiotics

Wpływ toksyczności nanocząstek srebra na bakterie E. coli.

Podczas badań własnych analizowano wpływ bakteriobójczości nanocząstek srebra na bakterie *E. coli* (Rysunek 5).



Rysunek 5. Różne szczepy (A) oraz namnożona wybrana kolonia bakterii *E. coli* (B) na podłożu TBX
Figure 5. Various strains (A) and the amplified selected colonies of *E. coli* (B) on TBX agar

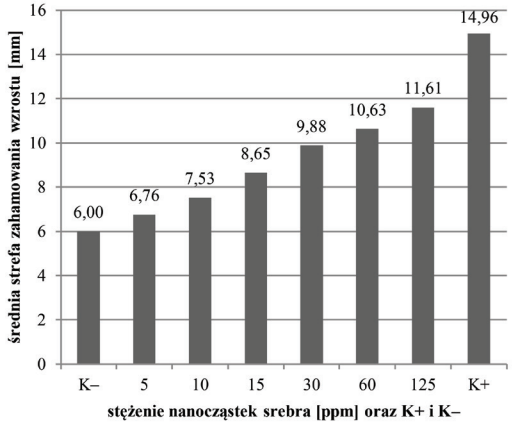


Rysunek 6. Strefy zahamowania wzrostu bakterii *E. coli* w wyniku działania nanocząstek srebra (5-125 ppm, K – kontrola negatywna)
Figure 6. Zones of growth inhibition of *E. coli* caused by the application of silver nanoparticles (5-125 ppm; K – negative control)

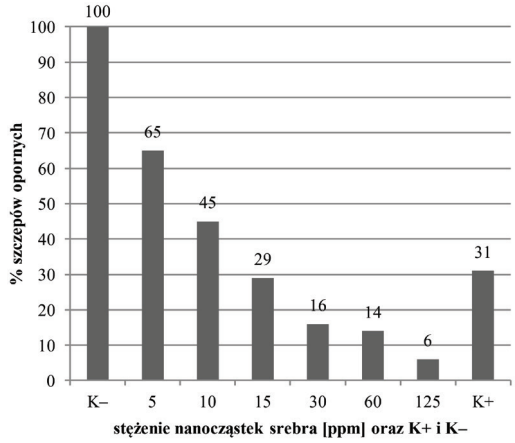
Z przedstawionych danych (Rysunek 6, Rysunek 7) wynika, że nanocząstki srebra w zastosowanych stężeniach hamują wzrost 94% testowanych izolatów *E. coli*. Można również zauważyć, że wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek zwiększa się strefa zahamowania wzrostu szczepów.

Szczepy różniły się między sobą wrażliwością na nanosrebro. Najmniejszym stężeniem, które działało bójczo na wybrane izolaty było 5 ppm. Nie udało się wyznaczyć minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) dla wszystkich izolatów, ponieważ wśród analizowanych szczepów 3 izolaty były oporne na każde stężenie nanosrebra. Analizując wrażliwość szczepów na nanosrebro z pominięciem 3 ekstremalnie opornych izolatów, wyznaczono MIC dla *E. coli* równe 60 ppm. Na podstawie badań własnych stwierdzono, że 33 szczepy były oporne na stężenie nanocząstek o wartości 5 ppm, 23 szczepy – na stężenie 10 ppm, 15 szczepów – na stężenie 15 ppm, 8 szczepów – na stężenie 30 ppm, 7 szczepów – na stężenie 60 ppm oraz 3 szczepy – na stężenie 125 ppm. Ponadto, 16 szczepów było opornych na ampicylinę (kontrola pozytywna) (Rysunek 8).

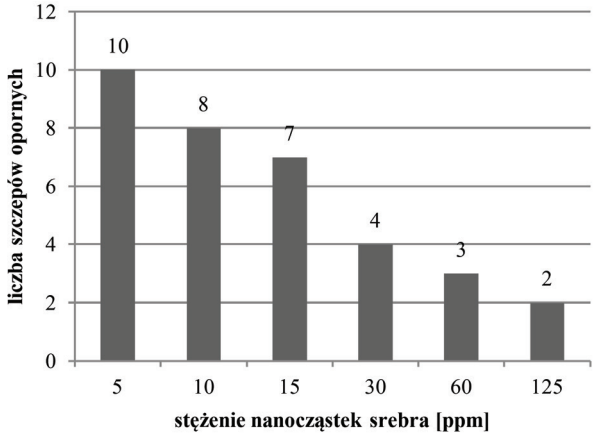
Najskuteczniejszym stężeniem nanosrebra ograniczającym wzrost drobnoustrojów jest 125 ppm. Stężenie to hamuje wzrost 94% wszystkich szczepów. Najmniej skuteczne okazało się stężenie 5 ppm, gdzie zaledwie w przypadku 35% szczepów doszło do zahamowania wzrostu. Ampicylina, będąca kontrolą pozytywną, nie hamowała wzrostu wszystkich izolatów *E. coli*, a jej działanie bakteriobójcze było skuteczne w stosunku do 69% analizowanych szczepów. Co ciekawe, 14 izolatów, które wykazywały oporność na ampicylinę, były wrażliwe na niektóre stężenia nanocząstek srebra. Spośród wszystkich szczepów 2 wykazywały oporność zarówno na ampicylinę, jak i na wszystkie stężenia nanocząstek srebra (Rysunek 9).



Rysunek 7. Wpływ określonych stężeń nanocząstek srebra na szczepy *E. coli*
Figure 7. Impact of certain concentrations of nanosilver on *E. coli* strains



Rysunek 8. Szczepy oporne na nanocząstki srebra (ppm) oraz K+ i K–
Figure 8. Strains resistant to silver nanoparticles (ppm) and K+ and K–



Rysunek 9. Szczepy oporne na określone stężenia nanosrebra w obrębie izolatów opornych na ampicylinę
Figure 9. Strains resistant to certain concentrations of nanosilver across the ampicillin resistant isolates

DYSKUSJA

Mając na uwadze rozprzestrzenianie się zjawiska lekooporności drobnoustrojów na powszechnie stosowane antybiotyki, poszukuje się innych, bardziej

skutecznych metod zwalczania patogenów. Struktury nanometryczne, m.in. nanocząstki srebra, są coraz częściej wykorzystywane w celu eliminacji drobnoustrojów z różnych powierzchni. Na temat bakteriobójczych właściwości nanosrebra w stosunku do różnych gatunków mikroorganizmów realizowanych jest wiele prac badawczych (Pal i in. 2007, Rai i in. 2009, Pantidos i Horsfall 2014, Shahrokh i in. 2014, Sheehy i in. 2015).

Okazuje się jednak, że nieracjonalne stosowanie nanosrebra może spowodować adaptację bakterii do wzrostu w obecności tego nanoproduktu, a w dalszej perspektywie może wywołać całkowitą oporność drobnoustrojów na ten metal. W związku z coraz bardziej powszechnym wykorzystaniem nanosrebra, zasadnym jest prowadzenie badań mających na celu optymalizację jego syntezy oraz ocenę wpływu na środowisko (Hsu i in. 2010, Samberg i in. 2011).

Bakterie *E. coli* wykazują dużą wrażliwość na nanocząstki srebra (Seil i Webster 2012, Durán i in. 2016). Natomiast ich skuteczność w stosunku do bakterii jest zróżnicowana i uzależniona od wielu czynników (Tabela 2).

Tabela 2. Charakterystyka nanocząstek srebra stosowanych do eliminacji *E. coli*
Table 2. Characteristics of silver nanoparticles used to eliminate *E. coli*

Lp.	Rozmiar (nm)	Kształt	MIC AgNPs (ppm)	Źródło
1	31	sferyczny	60	Badania własne
2	21	sferyczny	75	(Morones i in. 2005)
3	39	sferyczny	12,5	(Pal i in. 2007)
4	50	trójkątny	0,1	(Pal i in. 2007)
5	6	trójkątny	0,1	(Liu i in. 2010)
6	13	sferyczny	30	(Sheehy i in. 2015)
7	5	sferyczny	12,5	(Jaiswal 2010)
8	25	sferyczny	1,69	(Panáček i in. 2006)
9	12	sferyczny	10	(Sondi i Salopek-Sondi 2004)
10	55	sferyczny	0,25	(Paredes i in. 2014)
11	14	sferyczny	0,36	(Kim i in. 2007)

Uzyskane w badaniach własnych wyniki były porównywalne z danymi przedstawionymi przez Morones i in. (2005), którzy zastosowali niewiele mniejszy rozmiar nanostruktur, natomiast minimalne stężenie hamujące (MIC) było o 15 ppm większe. Wyniki przedstawione przez Pal i in. (2007) również można zestawić z badaniami własnymi, ale tylko pod względem doboru rozmiaru nanocząstek. W tym przypadku rozbieżność dotycząca MIC była znacznie większa.

Badania prowadzone przez Pal i in. (2007) dotyczyły oceny wpływu kształtu nanostruktur na ich właściwości antybakteryjnie. Stwierdzono, że większą toksycznością względem *E. coli* odznaczają się formy trójkątne nanostruktur pomimo dużego rozmiaru cząstek w porównaniu z formami sferycznymi. Liu i in. (2010) badali wpływ średnicy nanocząstek sferycznych na ich aktywność antybakteryjną. Wskazali, że istnieje zależność między wielkością nanosrebra, a ich stopniem bakteriobójczości. Oznacza to, że im mniejsze są średnice cząstek, tym ich powierzchnia działania jest większa, a tym samym zwiększają się właściwości bakteriobójcze.

Na podstawie zestawienia wybranych parametrów charakteryzujących nanocząstki srebra (Tabela 2), należy stwierdzić, iż istnieje bardzo duże zróżnicowane dotyczące powiązania wielkości i kształtu nanosrebra z jego właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Efektywność bakteriobójczego działania nanosrebra jest uzależniona m.in. od poziomu oporności szczepów a także może mieć związek z ich pochodzeniem, czyli miejscem izolacji bakterii. Wrażliwość izolatów na konkretne stężenia nanocząstek srebra może wynikać także z różnic w budowie komórkowej bakterii i właściwości fizykochemicznych nanosrebra. Ponadto, niektóre szczepy mogą posiadać specyficzne cechy, które uniemożliwiają ich unieszkodliwienie przez nanocząstki. Chodzi tutaj o geny oporności na srebro, które u bakterii mogą występować naturalnie lub które izolaty nabyły wskutek zbyt długiego kontaktu z tym metalem (Mazur i Klag 2004, Harnisz 2013). Na zmiany właściwości fizykochemicznych oraz różną aktywność w stosunku do bakterii *E. coli* może mieć również wpływ odmienna metoda syntezy i proces wytwarzania nanocząstek srebra (Song i Kim 2009, Durán i in. 2016, Osonga i in. 2016).

W niniejszej pracy oprócz badań dotyczących nanocząstek srebra, analizowano wpływ wybranych antybiotyków na bakterie *E. coli*. Okazało się, że największy odsetek (53%) stanowiły szczepy oporne na tikarcylinę, a najmniejszy (22%) – na amikacynę.

Threedeach i in. (2012) prowadzili badania na szczepach *E. coli* wyizolowanych z dwóch odcieków ze składowiska. Wykazali, że antybiotykami o największych zdolnościach hamowania wzrostu bakterii były meropenem (szczepy wrażliwe – 100% oraz 98,8%) i cefepim (szczepy wrażliwe – 100% oraz 97,5%), a antybiotykiem najmniej skutecznym okazała się być cefalotyna, gdzie szczepy wrażliwe stanowiły 5% i 6,3%. W badaniach własnych meropenem nie był analizowany, 69% bakterii było wrażliwych na cefepim, a 55% – na cefalotynę.

Podobne badania prowadziły Wolny-Koładka i Lenart-Boroń (2016), gdzie 44% szczepów *E. coli* wyizolowanych ze zbiornika wodnego na terenie Krakowa było wrażliwych na tikarcylinę. Jednym z antybiotyków, który wykazywał największą skuteczność w stosunku do *E. coli* była amikacyna (97% izolatów wrażliwych).

W badaniach przeprowadzonych przez Reinthaler i in. (2003) analizowano bakterie *E. coli* izolowane z trzech oczyszczalni ścieków. Stwierdzono oporność sięgającą 18% w przypadku antybiotyków takich, jak ampicylina, amoksycylina oraz piperacylina. W badaniach własnych, gdzie analizowano szczepy pochodzące z odpadów komunalnych, w stosunku do tych samych antybiotyków wykazano oporność w granicach 24-49%.

Szczepy oporne na antybiotyki można podzielić na MDR (ang. multidrug-resistance) – wielolekooporne, XDR (ang. extensively drug resistance) – o rozszerzonej oporności oraz PDR (ang. pandrug-resistance) – całkowicie oporne (Żabicka i in. 2012). W badaniach własnych udało się wykryć szczepy wielolekooporne, które były niewrażliwe na wszystkie badane antybiotyki i stanowiły 22%. Najprawdopodobniej tak wysoka oporność miała związek z pochodzeniem szczepów, które izolowano z odpadów komunalnych. Osińska i in. (2017) badając lekooporność bakterii *E. coli* pochodzących ze ścieków komunalnych, stwierdzili że 38% izolatów było opornych na wszystkie analizowane antybiotyki należące do trzech klas: tetracykliny, β-laktamy oraz fluorochinolony. Tak duży odsetek opornych szczepów *E. coli* zapewne wynika z miejsca izolacji drobnoustrojów. Składowiska odpadów i oczyszczalnie ścieków komunalnych są źródłem różnorodnych mikroorganizmów oraz stanowią rezerwuar bakteryjnych genów oporności na antybiotyki. Ponadto, bakterie tam występujące, bytują w warunkach dużej konkurencji gatunkowej i mogą uodparniać się na związki przeciwdrobnoustrojowe. Izolaty te są więc bardzo dużym zagrożeniem dla osób pracujących przy składowaniu i przetwarzaniu odpadów oraz oczyszczaniu ścieków.

PODSUMOWANIE

Uzyskane w badaniach własnych wyniki pozwalają na stwierdzenie, iż wśród zgromadzonych izolatów *E. coli* jest wiele szczepów lekoopornych na powszechnie stosowane antybiotyki. Dodatkowo, niniejsze dane pokazują, że odpady komunalne są miejscem bytowania mikroorganizmów wysoce opornych na leki przeciwbakteryjne, a także nanocząstki srebra. Dlatego ciągle rozwijająca się nanotechnologia jest nadzieją w walce z drobnoustrojami patogennymi, co potwierdzają badania własne. Jednak, z uwagi na to, że jest to nowa dziedzina nauki i dotychczas mało poznana, należy dołożyć wszelkich starań, aby ocenić i kontrolować ewentualny toksyczny wpływ nanocząstek na środowisko i organizmy wyższe. Powszechne stosowanie nanosrebra może z czasem przyczynić się do powstania oporności bakterii na ten metal. Być może w niedalekiej przyszłości poznamy wszystkie aspekty działania nanocząstek w stosunku do mikroorganizmów, a odkrycie bezpiecznych preparatów na bazie

nanosrebra o właściwościach bakteriobójczych, okaże się przełomowym momentem w dziedzinie medycyny.

LITERATURA

Cho K.H., Park J.E., Osaka T., Park S.G. (2005). *The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient.* Electrochim Acta 51, 956–960. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.071

Durán N., Durán M., Bispo de Jesus M., Seabra A.B., Fávaro W.J., Nakazato G. (2016). *Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity.* Nanomedicine 12: 789-799. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015. 11.016

El-Sheekh M.M., El-Kassas H.Y. (2016). *Algal production of nano-silver and gold: Their antimicrobial and cytotoxic activities: A review.* J Genet Eng Biotechnol. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.09.008

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2016). *Clinical breakpoints – bacteria (v. 6.0)*. http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/public_consultation_clinical_microbiology_infection_article.aspx.

Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M. (2015). *Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents.* Molecules 20: 8856-8874. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/molecules20058856

Gniadkowski M., Żabicka D., Hryniewicz W. (2009). *Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych.* Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów, Narodowy Instytut Leków, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej.

Guo L., Yuan W., Lu Z., Li C.M. (2013). *Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications.* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 439: 69-83. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.12.029

Harnisz M. (2013). *Total resistance of native bacteria as an indicator of changes in the water environment.* Environ Pollut 174: 85-92. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.005

Hsu S.H., Tseng H.J., Lin Y.C. (2010). *The biocompatibility and antibacterial properties of waterborne polyurethane-silver nanocomposites.* Biomaterials 31, 26: 6796-6808. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.015

Ibrahim M.E., Bilal N.E., Hamid M.E. (2012). *Increased multi-drug resistant Escherichia coli from hospitals in Khartoum state, Sudan.* Afr. Health Sci. 12, 3: 368-375. DOI: http://dx.doi.org/10.4314/ahs.v12i3.19

Jaiswal S., Duffy B., Kumar A., Stobie N., McHale P. (2010). *Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using β-cyclodextrin as a capping agent.* Int J Antimicrob Agents 36, 3: 280-283. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.05.006

Kędziora A., Sobik K. (2013). *Oporność bakterii na srebro – problem stary czy nowy?* Kosmos 62, 4: 557-570.

Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C., Kim Y., Lee Y., Jeong D.H., Cho M. (2007). *Antimicrobial effects of silver nanoparticles.* Nanomedicine 3: 95-101. DOI: http://dx.doi.org/10. 1016/j.nano.2006.12.001

Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.) (2009). *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Liu H., Dai S.A., Fu K., Hsu S. (2010). *Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane.* Int. J. Nanomedicine 5: 1017-1028. DOI: http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S14572

Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Tam P.K., Chiu J.F., Chen C.M. (2006). *Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles.* J Proteome Res. 5, 916-924. DOI:10.1021/pr0504079

Mazur E., Klag S. (2004). *Mechanizmy lekooporności bakterii.* Med Rodz 6: 278-281.

Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J. (2005). *The bactericidal effect of silver nanoparticles.* Nanotechnology 16: 2346-2353. DOI: http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/ 059

Osińska A., Korzeniewska E., Harnisz M., Niestępski S. (2017). *The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent Escherichia coli strains in the municipal wastewater system and their environmental fate.* Sci Total Environ 577: 367-375. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.203

Osonga F.J., Kariuki V.M., Yazgan I., Jimenez A., Luther D., Schulte J., Sadik O.A. (2016). *Synthesis and antibacterial characterization of sustainable nanosilver using naturally-derived macromolecules.* Sci Total Environ 563-564: 977-986. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.064

Pal S., Tak Y.K., Song J.M. (2007). *Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli.* Appl Environ Microbiol 73, 6: 1712-1720. DOI: http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02218-06

Panáček A., Kvítek L., Prucek R., Kolář M., Večeřová R., Pizúrová N., Sharma V.K., Nevěčná T., Zbořil R. (2006). *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity.* J. Phys. Chem. B 110, 16248-16253. DOI: http://dx.doi.org/10.1021/jp063826h

Pantidos N., Horsfall L.E. (2014). *Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants*. J Nanomed Nanotechnol 5:233. DOI: http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000233

Paredes D., Ortiz C., Torres R. (2014). *Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against Escherichia coli O157:H7 and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Int. J. Nanomedicine 9: 1717-1729. DOI: http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S57156

Rai M., Yadav A., Gade A. (2009). *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnol. Adv. 27: 76-83. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002

Reinthaler F.F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckenbauer G., Mascher F., Marth E. (2003). *Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge.* Water Res 37: 1685-1690. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/ S0043-1354(02)00569-9

Russell A.D., Hugo W.B. (1994). *Antimicrobial activity and action of silver.* Progr. Med. Chem. 31, 351–370.

Samberg M.E., Orndorff P.E., Monteiro-Riviere N.A. (2011). *Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, Surface conditions and synthesis methods*. Nanotoxicology 5, 2: 244-253. DOI: http://dx.doi.org/ 10. 3109/ 17435390.2010.525669

Seil J.T., Webster T.J. (2012). *Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature.* Int. J. Nanomedicine 7: 2767-2781. DOI: http://dx.doi. org/10.2147/IJN.S24805

Shahrokh S., Hosseinkhani B., Emtiazi G. (2014). *The Impact of Silver Nanoparticles on Bacterial Aerobic Nitrate Reduction Process.* J Bioproces Biotechniq 4: 3. DOI: http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000152

Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S. (2007). *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* Nanomed-Nanotechnol. 3, 168-171. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2007.02.001

Sheehy K., Casey A., Murphy A., Chambers G. (2015). *Antimicrobial properties of nano-silver: A cautionary approach to ionic interference.* J Colloid Interface Sci 443, 56-64. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/ j.jcis.2014.11.074

Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004). *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria.* J Colloid Interface Sci 275: 177-182. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/ j.jcis.2004.02.012

Song J.Y., Kim B.S. (2009). *Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts.* Bioprocess Biosyst Eng 32: 79-84. DOI: http://dx.doi.org/ 10.1007/s00449-008-0224-6

Threedeach S., Chiemchaisri W., Watanabe T., Chiemchaisri C., Honda R., Yamamoto K. (2012). *Antibiotic resistance of Escherichia coli in leachates from municipal solid waste landfills: Comparison between semi-aerobic and anaerobic operations.* Bioresource Technol 113: 253-258. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/ j.biortech.2012.01.086

Tolaymat T.M., El Badawy A.M., Genaidy A., Scheckel K.G., Luxton T.P., Suidan M. (2010). *An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers.* Sci Total Environ 408: 999-1006. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.003

Wolny-Koładka K., Lenart-Boroń A. (2016). *Phenotypic and molecular assessment of drug resistance profile and genetic diversity of waterborne Escherichia coli.* Water Air Soil Pollut 227:146. DOI: http://dx.doi.org/ 10.1007/s11270-016-2833-z

Wolny-Koładka K., Malinowski M., Sikora A., Szymonik K., Pelczar G., Wawrzyniak-Turek K. (2016). *Effect of the intensive aerobic biostabilization phase on selected microbiological and physicochemical parameters of wastes.* Infrastruktura i ekologia terenów wiejskich/Infrastructure and ecology of rural areas 4, 1: 1099–1115. DOI: http://dx.medra.org/10.14597/infraeco.2016.4.1.080

Żabicka D., Literacka E., Bojarska K. (2012). *MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki.* Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków 3.

Autor do korespondencji: Dr inż. Katarzyna Wolny-Koładka
Inż. Agnieszka Sikora
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków
tel.: 12 662 40 96
e-mail: katarzyna.wolny@urk.edu.pl

Dr inż. Dagmara Malina
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
Politechnika Krakowska
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
tel.: 12 628 20 93
e-mail: dagmaramalina@chemia.pk.edu.pl

Wpłynęło: 4.09.2017
Akceptowano do druku: 20.12.2017