

Antibiotikaresistenta bakterier i bevattningsvatten: förekommer de och kan deras spridning begränsas genom fotokatalytisk behandling?

BEATRIX ALSANIUS, MARIA GRUDÉN, CRISTER OLSSON

Sammanfattning

Enligt WHO (2014)¹, är antibiotikaresistens ett av de största hoten mot global folkhälsa. Den ökade förekomsten av antibiotikaresistenta bakteriestammar ett reellt hot mot antibiotikaanvändning i terapeutiskt syfte världen över. En grupp av antibiotika där en ökad resistens sprider sig globalt är bland s.k. β -laktamantibiotika. Användning av β -laktam-baserade preparat (t.ex. penicillin) är vid behandling av våra vanligaste infektionssjukdomar mycket utbredd, vilket gör denna utveckling särskilt oroande. Antibiotikaresistenta mikroorganismer är mycket vanliga i naturen. Livsmedel i ej tillagad form är en viktig väg för överföring av dessa bakterier till människor².

Föreliggande studie genomfördes i två steg. Steg 1 var en fallstudie där vi undersökte förekomsten av bakterier resistenta mot valda antibiotika (amikacin, gentamicin, kanamycin, penicillin G, ampicillin, piperacillin, trimetoprim, kalium-tellurit och ciprofloxacin) i två sydsvenska bevattningsdammar. I steg 2 undersöktes huruvida fotokatalytisk behandling av bevattningsvattnet kan begränsa förekomsten av valda antibiotikaresistenta stammar. Fotokatalytisk behandling har sedan tidigare visat effekt mot fekala föroreningar i bevattningsvattnet³. Vi konstaterade att:

- 175 av 177 isolat framtagna från dammvattnet hade förmåga att växa på ESBL-selektivt agar
- Många av dessa stammar var kliniskt resistenta
- Störst var resistensen mot penicillin G, ampicillin, amikacin, kanamycin och trimetoprim
- Resistens mot β -laktam-baserade antibiotika var mycket vanligt förekommande
- ESBL-kodande gener påvisades med PCR i 11 isolat



Figur 1. Antibiotikaresistenta bakterier är vanligt förekommande i ytvatten. Denna studie undersöktes bland annat deras förekomst i vattendammar som används för bevattning av fältgrönsaker. Dammen på bilden har inte medverkat i denna studie. (foto: B. Alsanius)

- Fotokatalys inverkar på förekomsten av de tre teststammarna och förekomsten minskades med log 3.
- Flödes hastigheten inverkar på fotokatalysens reningsgrad; testen genomfördes dock enbart vid förhållandevis låga flöden.

Studien har genomförts i samarbete med Sydgrönt ek. för. och också fått finansiellt stöd av KSLA.

Bakgrund

Skydd mot infektionssjukdomar är en förutsättning för god folkhälsa och förutsätter tillgång till effektiva medikament mot bakteriella infektioner. Ökad förekomst av antibiotikaresistenta bakterier är ett globalt hot mot användning av antibiotika i terapeutiskt syfte^{4,5}. Antibiotikaresistenta mikroorganismer har blivit allt vanligare i miljön och hittas i stor utsträckning i mark, vatten och organiska gödselmedel. Förekomsten av antibiotikaresistensgener (ARGs) i vatten har ökat globalt⁶⁻¹⁰. Livsmedel anses vara

en avgörande vektor för spridning av ARGs till människan då mikroorganismer och resistensgener vandrar mellan olika miljöer. Eftersom frukt och grönt ofta konsumeras med en levande mikrobiota råa eller efter minimal tillredning, intar dessa livsmedel en särställning vid spridning av ARGs till konsumenten. Utbrottet i Tyskland och Frankrike år 2011 med flera tusen insjuknade personer illustrerar denna risk på ett obehagligt tydligt sätt; utbrottsstammen *E. coli* O104:H4 bar på multipla resistensgener mot antibiotika, däribland resistens mot β -laktampreparat. ARGs uppkommer i miljöer med ett ökat selektionstryck mot specifika substanser med antibiotiska egenskaper. Uppkomst och spridning av resistensgener är en naturlig process som pågått lång innan antibiotikapreparat började användas av människan. Spridningen av resistensgener har ett evolutionärt syfte för de bakteriella samhällenas överlevnad och när en bakterie väl plockat upp en resistensgen behålls den¹¹. Några huvudsakliga mekanismer genom vilka bakterier är resistenta mot antibiotika

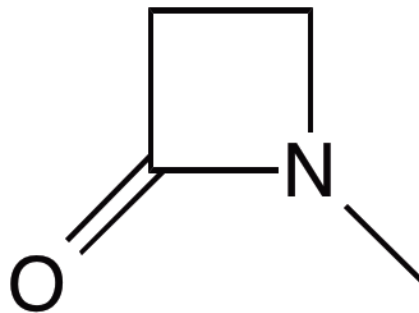
är via enzymatisk nedbrytning av preparatet, modifierade receptorer som hindrar antibiotikan från att attackera cellen eller genom aktivering av effluxpumpar som pumpar ut antibiotikan. Bakterierna uppnår dessa förmågor genom spontana mutationer eller överföring av genetiska element, s.k. plasmider eller transposoner, mellan bakterier¹¹.

Resistens mot våra mest använda antibiotikasorter uppstår och ökar i takt med ökad förskrivning till människor och djur (sjukdomsbehandlande, profylaktiskt och till djuren även i tillväxtsyfte). På senare tid har även otillräckligt renat utsläpp från fabriker inom läkemedelsindustrin ringats in som en pådrivande faktor vid resistensuppkomst. Produktionen av dessa läkemedel sker framförallt i låglöneländer som Indien och Kina och det är väl känt att de multi-resistenta stammar som uppstår här orsakar problem i form av svårbehandlade infektioner hos människor och djur^{12,13}. I det globaliserade samhället finns många potentiella vägar där sedan de resistenta bakterierna transporteras över resten av världen. Detta sker bland annat via människor som reser och genom handel med djur och varor som exempelvis färsk grönsaker och frukt¹². Dagens reningsverk är inte anpassade för att eliminera vare sig bakterier, med eventuell resistens, eller läkemedelsrester. Detta gör att bakterier som efter att ha koloniserat och så småningom passerat mag-tarmkanalen hos en människa till slut hittar vägen tillbaka till naturen vartefter spridningscykeln fortsätter¹³.

Förvärvad antibiotikaresistens kan förekomma i olika grupper av bakterier relaterade till livsmedelskedjan, nämligen:

- Patogener, såsom *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *Shigella* spp. eller *Listeria* spp. Dessa tarmsmittor har orsakat olika utbrott relaterade till grönsaker.
- Den naturliga tarmfloran hos djur och människor, t.ex. *Escherichia coli* och andra tarmbakterier inom familjen *Enterobacteriaceae* samt i olika species av släkten *Bacteroides* och *Enterococcus*.
- Den naturliga växtmikrofloran, såsom *Enterobacteriaceae* och *Pseudomonadaceae*.

Resistens mot antibiotika av β -laktampreparat (t.ex. penicillin) är särskilt oroväckande. Användning av β -laktampreparat är mycket vanlig och vården kommer under överskådlig tid vara beroende av dessa preparat för att behandla infektionssjukdomar. Samtidigt är resistensen mot dessa preparat utbredd. Resistenta stammar producerar huvudsakligen enzymer, β -laktamaser, som klyver (*hydrolyserar*) substansernas verksamma plats, β -laktamringen (se figur 2).



Figur 2. β -laktamring.

Det finns olika klasser av β -laktamaser (klass A, B, C, D)¹⁴. ESBL (extended spectrum betalactamase)-bildande bakterier hydrolyserar också tredje och fjärde generationen cefalosporiner. ESBL-producerande bakterier bär ofta också på resistens mot andra antibiotika⁹. ESBL-resistens kan spridas via plasmider vilket är särskilt oroväckande då dessa ringar av genetiskt material lätt kan överföras mellan bakterier genom s.k. horisontell gentransfer. Detta gör att spridningen av det genetiska materialet sker extra effektivt även mellan olika arter i en viss miljö¹⁵.

Hygienisk kvalitet av bevattningsvatten har diskuterats i Sverige under ett antal år¹⁶⁻¹⁹. Kvaliteten varierar och generellt sett håller borr-, regn- resp. kommunalt vatten högsta standard. Ytvattenkällor respektive behandlat eller obehandlat avloppsvatten är ur ett mikrobiologiskt perspektiv mer variabla i avseende på hygienkvalitet. Deras mikrobiologiska status påverkas bland annat av ytavrinning, förekomsten av strandbetande djur, bebyggelse nära strandkanten utan fungerande avloppsrening, servicefunktioner kopplade till vattenreservoaren, men också av väderlek¹⁶. Förekomsten och mängden av bakterier påverkas också av stamledningsnätet från bevattningskällan till -rampen^{17,20}. Förekomsten av bakterier som kännetecknar fekala föroreningar

kan kort- och långsiktigt ligga högt respektive mycket högt över kriterier för tjänligt dricksvatten. Bevattningsvattnets hygieniska status kan förbättras genom olika åtgärder, t. ex. långsamfiltrering och fotokatalys^{3,16}. Mot bakgrund av ovanstående resonemang var målet med föreliggande fallstudie att undersöka om antibiotikaresistenta bakterier förekommer i vattenkällor som används för bevattning av frilandsgroänsaker i Sverige och om deras förekomst kan påverkas genom fotokatalys.

Hypoteser

- Antibiotikaresistenta bakterier förekommer i bevattningsvattenreservoarer
- Fotokatalys reducerar förekomsten av ESBL i bevattningsvatten
- Vattnets flödehastighet under behandlingen har avgörande betydelse

Genomförande

Vattenprover (2 x 0,5 L) samlades från två bevattningsdammar och transporterades i kylväska till laboratoriet. Vattenproverna odlades upp på fem semi-selektiva bakteriella näringsmedier (Luria-Bertani agar (Sigma-Aldrich: L2879), mEnterococcus agar (Neogen: 7544), Rainbow agar (Biolog: 80102), 0,1 x Tryptic Soy Agar (Neogen: 7100), VRBD (Merck: 1102750500)) enligt producentens anvisningar. Totalt togs 177 bakterieisolat fram.

Dessa renodlades och överfördes till kryokulturer innan frysning vid -80 °C. De renodlade bakterierna karakteriserades biokemiskt med hjälp av Biolog GENIII panel enligt producentens anvisningar genom jämförelse mot Omnilog-biblioteket. Deras förmåga att växa till på ESBL-selektivt agar testades på Brilliance ESBL agar (Oxoid: PO5302).

Ett antal isolat valdes ut för att bedöma individuella resistensmönster med hjälp av Etest (Biomeriëux). Dessa var isolat som var säkrast identifierade med Omnilog GENIII-systemet (Biolog) samt som är kända för att bära resistenser. De antibiotika som testades var amikacin (Biomeriëux: 501350), ampicillin + sulbactam (Biomeriëux: 501858), ciprofloxacin (Biomeriëux: 508650), imipenem (Biomeriëux: 513650), kanamycin (Biomeriëux: 523650), levofloxacin (Biomeriëux: 527450), meropenem (Biomeriëux: 513850), moxifloxacin (Biomeriëux: 529050), piperacillin + tazo-

bactam (Biomeriëux: 521555), ticeracillin + clauvulanat (Biomeriëux: 522650), trimetoprim (Biomeriëux: 523658). Inför inokuleringsstillfället tillsattes 50 µl från respektive kryrorör till 5 ml Müller-Hinton-buljong (Merck: 105435). Detta fick växa över natt i 35 °C på skakbord. Därefter inokulerades 200 µl på Müller-Hinton-plattor (Merck: 105435). Till sist inokulerades plattorna över natt i 35 °C. Därefter avlästes graden av resistens på varje platta enligt tillverkarens anvisningar.

Fotokatalysens verkningsgrad (*efficiens*) testades med en testanordning som bestod av två ihopkopplade 100-L-vattentankar. Tank 1 fungerade som blandningstank och tank 2 som uppsamlingstank. En pump och en fotokatalytisk enhet (Wallenius OW Water, Model M300, effekt 15W, max flöde 40 l/min) kopplades mellan de två tankarna. Två stammar av *Escherichia coli*, *E. coli* CV601 som är resistent mot kanamycin och rifampicin samt *E. coli* stam 151 som är resistent mot ticeracillin användes som testorganismer. Färska kulturer odlades upp över natt, cellerna tvättades i steril 0.85% NaCl och koncentrationen justerades spektrofotometriskt till 10⁸ CFU/ml. Efficienstestet genomfördes i växthus, där NaCl tillsattes till 100 l avjoniserat vatten för att nå en koncentration på 0.085%. Därefter inokulerades 10 ml bakteriestammarna och vattnet blandades noggrant. Fem minuter efter inokulering, togs det första provet. Därefter pumpades med en flödes hastighet på 10.5 l/min genom den fotokatalytiska enheten. Den andra provtagningen genomfördes då allt vatten hade pumpats över till tank 2. Proverna transporterades direkt till laboratoriet och analyserades på Tryptic Soya Agar (TSA) som var antingen försedd med kanamycin och rifampicin eller ticeracillin. Bakgrundsfloran analyserades på TSA utan tillsatt antibiotikum. Efter avslutat experiment steriliserades allt försöksmaterial inkl. vattnet som användes i försöket. Våra forskningsfrågor var:

1. Förekommer bakterier med antibiotikaresistens i vattenreservoarer som används för bevattning?
2. Överlever sådana bakterier fotokatalytisk behandling?
3. Inverkar flödes hastigheten genom den fotokatalytiska kammaren på överlevnad av testorganismerna?

Resultat

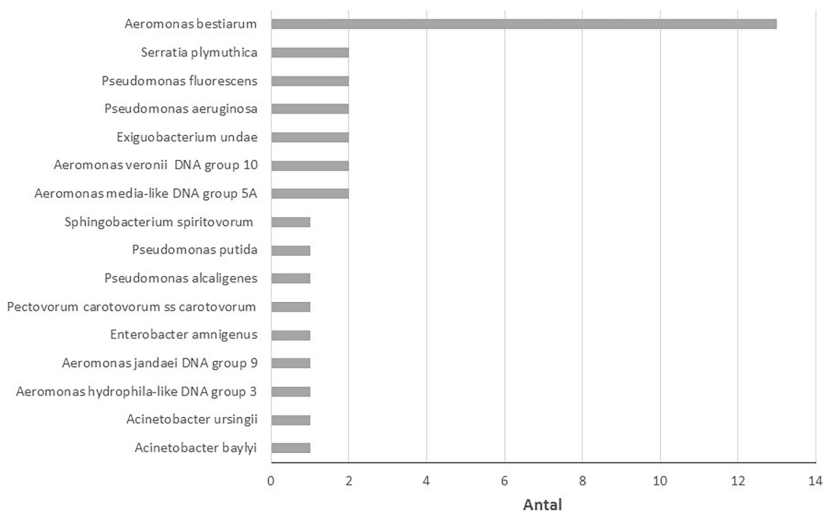
Av de 177 isolat som inokulerades på ESBL-agar, uppvisade 175 stycken tillväxt (figur 3). Resultaten av de Etest som utfördes visade att många isolat var kliniskt resistent mot ett flertal β-laktampreparat (tabell 1). Av de isolat som testades molekylärt med PCR var 11 stycken bärare av plasmidburna ESBL-kodande gener.

Vid den låga flödes hastigheten som testades var verkningsgraden av fotokatalysen hög; den skilde sig dock mellan de två bakteriestammarna. För *E. coli* stam CV601 som var resistent mot både rifampicin och kanamycin låg effiensen på 99.9% medan

dem varierade mellan 95.2% och 99.6 % för den ticeracillin resistent *E. coli* stammen 151. För den sistnämnda sjönk verkningsgraden med ökande flödes hastighet.

Diskussion

Många tidigare studier har visat hur sjukdomsframkallande intestinala bakterier, som exempelvis *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Listeria* spp. och *Salmonella* spp., från djurbesättningar, når människor via konsumtion av ej tillagad frukt och grönsaker. Det är även känt att en betydande del av bakterierna i sin tur når grönsakerna via bevattningsvatten och organisk gödselmedel.



Figur 3. De isolat med högst likhet med GENIII-biblioteket och med förmåga att växa på ESBL-agar. X-axeln indikerar förekommande antal av respektive isolat.

Tabell 1. Exempel på resistensmönster hos olika bakteriestammar isolerade från de undersökta dammarna. Trots samma arttillhörighet kan stammarna uppvisa olika känslighet. De resistenser som hittades är indikerade med färg motsvarande grad av resistens; röd - klinisk resistens, orange - medelresistens, grön - viss resistens men känslig mot antibiotika vid behandlande dos.

Art:	Trimetoprim + Sulfamethoxazole	Ampicillin + Sulbactam	Piperacillin + Tazobactam	Ticeracillin + Clavulanic acid	Amikacin	Gentamicin	Kanamycin	Ampicillin	Piperacillin	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Moxifloxacin	Imipenem	Meropenem	Trimetoprim
<i>Aeromonas bestiarum</i>								•						•	•
<i>Enterobacter amnigenus</i>				•			•		•				•		•
<i>Enterobacter amnigenus</i>			•	•											
<i>Myroides odoratus</i>	•		•	•			•		•				•		•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		•		•				•							•
<i>Raoultella terrigena</i>		•	•					•							
<i>Raoultella terrigena</i>		•	•												
<i>Sphingobacterium spiritovorum</i>			•	•											

Att så många av isolaten i studien uppvisade förmåga att växa på ESBL-medium talar för att bevattningsvattnet utgör en viktig del i kartläggningen av hur eventuella antibiotikaresistenta stammar skulle kunna spridas till frilandsgroänsaker under svenska förhållanden. Som nämnts ovan finns möjlighet att resistens mot vissa antibiotika kan finnas naturligt hos vissa stammar, i andra former än på en plasmid. Vissa stammar testades positivt även molekylärt för den plasmidburna typen av ESBL-resistens. Det är svårt att i litteraturen hitta stöd för att någon av de aktuella stammarna skulle vara naturliga bärare av resistensgener mot det breda spektrum av β -laktam-antibiotika som fanns i det selektiva medium som användes. Enligt EUCAST expert rules²¹ tyder svagare resistenser på mekanismer som efflux-pumpar och modifierade receptorer. Då många Etest visar att en stor del av isolaten är kliniskt resistenta mot en rad preparat talar detta för att resistensen hos dessa isolat är plasmidburna. För att få ett exakt svar på den genetiska mekanismen bakom resistensen krävs sekvensering av det genetiska materialet då lokala varianter av olika resistenser kan förekomma. Vidare kan det konstateras att då denna del av studien bygger på provtagning vid ett tillfälle hade det varit intressant att undersöka fler dammar vid upprepade tillfällen för att få en tydligare kartläggning av utbredningsmönster bland antibiotikaresistenta stammar.

Som förväntat gav den fotokatalytiska behandlingen en reduktion av halten testade mikroorganismer i bevattningsvattnet, men reningsgraden sjönk med ökande flödes hastighet för vissa testorganism. Experimentet genomfördes med koncentrationer av *E. coli* som förekommer under kommersiella betingelser; däremot var vattenflöden som är alltför långsamma i förhållande till vad som krävs under kommersiella betingelser. För att kunna öka flödet med avseende på önskad reduktion av förekomsten av mängden antibiotikaresistenta mikroorganismer i

vattnet krävs att effekten av fotokatalytiska enheter och möjligen också antalet enheter, ökas jämfört med det antal som användes i studien. Slutsatsen blir följaktligen att fotokatalytisk behandling har en önskad effekt vad gäller reduktion av antibiotikaresistenta mikroorganismer förutsatt att antalet fotokatalytiska enheter ökas.

Litteratur

- (1) WHO *Antibimicrobial resistance: Global report on surveillance*; WHO: Geneva, 2014.
- (2) Reuland, E. A.; al Naemi, N.; Raadsen, S. A.; Savelkoul, P. H. M.; Kluytmans, J. A. J. W.; Vandembroucke, C. M. J. E. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2014**, *33*, 1843.
- (3) Alsanius, B. W.; Alam, M.; Larsson, C.; Rosberg, A. K.; Ahrné, S.; Molin, G.; Jensén, P. *Acta Horticulturae* **2011**, *922*, 61.
- (4) Kemper, N. *Ecological Indicators* **2008**, *8*, 1.
- (5) WHO In *Second WHO Expert Meeting* WHO: Copenhagen, 2007, p 41.
- (6) Dolejska, M.; Biersosova, B.; Kohoutova, L.; Literak, I.; Cizek, A. *Journal of Applied Microbiology* **2009**, *107* 1941.
- (7) Sapkota, A. R.; Curriero, F. C.; Gibson, K. E.; Schwab, K. J. *Environmental Health Perspectives* **2007**, *115*, 1040.
- (8) Schallenberg, M.; Armstrong, A. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **2004**, *38*, 19.
- (9) Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B.; Obst, U. *FEMS Microbiology Ecology* **2006**, *43*, 325.
- (10) Watkinson, A. J.; Micalizzi, G. R.; Bates, J. R.; Costanzo, S. D. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, 2224.
- (11) Walsh, C. *Antibiotics: actions, origins and resistance.*; ASM Press: Washington, D.C. , 2003.
- (12) Finley, R. L.; Collignon, P.; Larsson, J.; McEwen, S. A.; Li, X.-Z.; Gaze, W. H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D. W.; Topp, E. *Clinical Infectious Diseases* **2013**, *2013*:57, 704.
- (13) Kwak, Y.-K.; Colque, P.; Byfors, S.; Giske, C. G.; Möllby, R.; Kühn, I. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2014**, *45*, 25.
- (14) Wax, R. G.; Lewis, K.; Salyers, A. A.; Taber, H. *Bacterial resistance to antimicrobials*; 2nd ed.; CRC: Boca Raton, FL, 2008.
- (15) Cha, J.; Lakshmi, P.; Kotra, D.; Mobas-hery, S. In *Bacterial resistance to antimicrobials*; Wax, R. G., Ed.; CRC Press: Boca, FL, USA, 2008.
- (16) Alsanius, B. W. *Hygien och bevattning*; Swedish University of Agricultural Sciences: Alnarp, 2014; Vol. 2014:10.
- (17) Alsanius, B. W.; Alam, M.; Larsson, C.; Sylla, J.; Rosberg, A. K.; Olsson, C.; Morgen, L.; Ahrné, S.; Molin, G.; Jensén, P. *submitted* **2016**.
- (18) Alsanius, B. W.; Kristensen, L.; Gustafsson, P. *LITJ-fakultetens faktablad* **2010**, *2010*:17, 1.
- (19) Alsanius, B. W. *Mikrobiologiska faror i grönsakskedjan under primärproduktion*; SLU: Alnarp, 2014; Vol. 2014:12.
- (20) Pachevsky, Y.; Morrow, J.; Guber, A.; Shelton, D.; Rowland, R.; Davies, G. *Letters in Applied Microbiology* **2011**, *54*, 217.
- (21) Leclercq, R.; Canto'n, R.; Brown, D. F. J.; Giske, C. G.; Heisig, P.; MacGowan, A. P.; Mouton, J. W.; Nordmann, P.; Rodloff, A. C.; Rossolini, G.; Soussy, C.-J.; Steinbakk, M.; Winstanley, T. G.; Kahlmeter, G. *Clinical Microbiology and Infection* **2013**, *19*, 141.

- Faktabladet är utarbetat inom LITJ-fakultetens Institutionen för Biosystem och Teknologi, Enhet Hortikulturell Mikrobiologi (www.microhort.se).

- Projektet är finansierat av Partnerskap Alnarp; projekt 607/12/FoG i samarbete med Sydgrönt ek. för. samt KSLA.

- Projektansvarig/författare: Beatrix Alsanius; email: beatrix.alsanius@slu.se; Enhet för Hortikulturell Mikrobiologi, Box 103, 230 53 Alnarp

- Övrig publicering inom projektet: Grudén, Maria. 2013. Antibiotic resistance associated with bacteria in irrigation water, masterarbete vid LITJ-fakulteten, SLU Alnarp.

- epsilon.slu.se