



Geny oporności na antybiotyki są częścią metagenomu hodowalnych i niehodowalnych bakterii środowiskowych

Antibiotics resistance genes are a part of metagenom of culturable and unculturable environmental bacteria

Adam Jaworski¹, Ireneusz Jurczak¹

¹ Instytut Nauk o Zdrowiu, Społeczna Akademia Nauk

¹ Institute of Health Sciences, University of Social Sciences, Poland

Streszczenie

W serii trzech artykułów przeglądowych pragniemy przedstawić najnowszą wiedzę na temat bardzo ważnego i aktualnego problemu, jakim jest narastanie oporności bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. W niniejszym artykule omawiamy coraz lepiej identyfikowane w populacjach bakterii środowiskowych źródła genów odpowiedzialnych za fizjologiczne i molekularne mechanizmy nabywania lekooporności. Koncentrujemy uwagę nie tylko na znanych szczepach i gatunkach bakterii hodowalnych, lecz także na wciąż mało poznanym świecie bakterii dotąd niehodowalnych, które w środowiskach naturalnych są producentami antybiotyków lub mogą wykorzystać antybiotyki jako źródło węgla i energii dla własnego wzrostu i rozwoju. W kolejnym artykule uwagę skoncentrujemy na szczepach i gatunkach bakterii, które w procesie ewolucyjnego rozwoju wykształciły systemy błonowych białek transportowych. Jako pompy molekularne w warunkach naturalnych są one zdolne wydajnie usuwać z komórek różne toksyczne substancje, w tym różne ksenobiotyki, metale ciężkie i antybiotyki. Przedstawiamy również dane na temat niedawno rozpoznanego zjawiska w populacjach różnych gatunków bak-

terii chorobotwórczych, to jest komórek uśpionych metabolicznie, zdolnych do przetrwania w obecności antybiotyków (*persister cells*) i niezwykle opornych nawet na wysokie stężenia tych antybiotyków, które działają wyłącznie na populacje komórek aktywnych metabolicznie i szybko się namnażających. To niezwykle groźne zjawisko jest prawdopodobnie odpowiedzialne za nawroty chorób zakaźnych wywołanych szczepami bakterii uznanymi za wrażliwe na powszechnie stosowane antybiotyki.

Omówimy także dobrze już ugruntowaną wiedzę na temat molekularnych mechanizmów transmisji genów lekooporności w populacjach bakterii środowiskowych i klinicznych, a także zawiniony przez człowieka proces selekcji szczepów opornych na antybiotyki poprzez nadmierne i nieuzasadnione względami medycznymi stosowanie antybiotyków nie tylko w ochronie zdrowia, ale także w hodowli zwierząt i w produkcji żywności.

Słowa kluczowe

geny, antybiotyki, bakterie środowiskowe

Summary

In these three articles we intend to present the latest knowledge on today's major problem, which is the bacterial resistance to antibiotics and chemotherapeutics. In this article we describe sources of genes responsible for molecular mechanisms of resistance acquisition in environmental bacterial populations. We focus not only on well-known strains and culturable bacterial species but also on a little-known spectrum of until now non-culturable bacteria, which in the natural environment produce antibiotics or can use antibiotics as a source of carbon and energy required for their growth and development. We also point out bacterial strains and species, which in the process of evolutionary development have created systems of transporters (efflux pumps), which in the natural environment are able to pump out of the cells toxic substances, including heavy metals and antibiotics. We also show data about a newly discovered persister cells found in the population of different pathogenic bacteria species, which in the presence of antibiotics do not die but enter a dormant/quiescent state and thus become highly resistant even to the high concentration of these antibiotics. This dangerous phenomenon is probably responsible for relapse of contagious diseases caused by bacterial strains, which are considered to be sensitive to commonly prescribed antibiotics. In the subsequent article we will present well-established knowledge concerning molecular mechanisms of drug resistance genes' transmission in the populations of environmental and clinical bacteria as well as the process of resistant strains selection caused by the excessive and medically unjustified use of antibiotics, not only in treatment and prevention but also in livestock raising and agriculture.

Key words

genes, antibiotics, environmental bacteria

Wprowadzenie

W artykule przeglądowym opublikowanym w roku 2014 w czasopiśmie „Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej” szczegółowo opisaliśmy aktualne dane na temat zarówno źródeł antybiotyków w różnych środowiskach naturalnych, jak i molekularnych mechanizmów związanych z ich aktywnością biologiczną oraz skutkami biologicznymi w postaci indukowania i selekcji szczepów bakterii opornych na antybiotyki [1]. W niniejszym artykule pragniemy przedstawić czytelnikom, kolejne trzy artykuły dotyczące antybiotyków i lekooporności bakterii. W tym numerze prezentujemy aktualną światową wiedzę na temat: obecności i rozpowszechnienia genów oporności na antybiotyki w populacjach hodowlanych i niehodowlanych bakterii środowiskowych, w następnym numerze przedstawimy dane na temat genetycznych i molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za horyzontalny transfer tych genów i ich rozprzestrzenianie się w środowiskach naturalnych, w kolejnym zaś podejmiemy dyskusję na temat niedawno sformułowanej niezwykle ciekawej, aczkolwiek kontrowersyjnej hipotezy, która sugeruje możliwość generowania przez antybiotyki w komórkach bakterii reaktywnych form tlenu, które byłyby, zgodnie z tą hipotezą, odpowiedzialne za cytotoksyczną i bakteriobójczą aktywność wielu różnych antybiotyków.

Odkrycie i wprowadzenie w pierwszej połowie ubiegłego wieku do terapii chorób infekcyjnych człowieka antybiotyków było jednym z największych osiągnięć medycyny, które umożliwiło opracowanie sposobów ratowania życia i ochrony zdrowia milionów ludzi na całym świecie. Z drugiej strony w czasie 75 lat – wraz z rosnącą i masową produkcją oraz powszechnym stosowaniem antybiotyków w medycynie, hodowli i w rolnictwie – stopniowo narastał problem oporności bakterii na antybiotyki. Ocenia się bowiem, że roczna światowa produkcja antybiotyków wynosi 100–200 tys. ton, a w latach 1940–2010 wyprodukowano w skali świata ponad 1 mln ton [2,3]. Zjawisko lekooporności, odkryte po raz pierwszy w połowie lat 30. ubiegłego wieku dla sulfonamidów, a w drugiej połowie lat 40. dla penicyliny i streptomycyny, stało się obecnie globalnym problemem epidemiologicznym i ogromnym zagrożeniem. Obserwowany w ostatniej dekadzie wzrost częstości pojawiania się wielolekoopornych szczepów klinicznych (*multidrug-resistant*, MDR), a także szczepów ekstremalnie opornych na wszystkie dostępne

antybiotyki (*extreme drug resistant*), dramatycznie ogranicza skuteczną antybiotykoterapię wielu groźnych chorób infekcyjnych [2, 4, 5, 6, 7, 8]. Opublikowane w 2013 r. dane dla krajów Unii Europejskiej dowodzą, że infekcje wielolekoopornymi bakteriami są przyczyną ponad 25 tys. zgonów rocznie, a 3/4 wszystkich zgonów związanych jest z infekcjami bakteriami Gram-ujemnymi, w tym głównie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. W cytowanym raporcie koszty leczenia bakteryjnych, infekcyjnych chorób człowieka w USA szacuje się na kwotę 21–34 miliardów dolarów [9]. Istnieje dzisiaj uzasadnione przekonanie, że groźne zjawisko pojawiania się i gwałtownego narastania lekooporności w świecie bakterii chorobotwórczych jest przykładem niezwykle szybkiej biologicznej ewolucji bakterii, wzmaganej w dużym stopniu przez różnorodną działalność człowieka [10, 11]. Do lat 70. ubiegłego wieku wśród mikrobiologów i lekarzy istniało przekonanie, że szybkie narastanie zjawiska oporności bakterii na antybiotyki jest mało prawdopodobne, bowiem częstotliwość mutacji w kierunku nabywania tej oporności jest znikoma [12]. Jednak w roku 2000 w raporcie WHO jednoznacznie stwierdzono, że ogłoszenie zwycięstwa w walce z bakteryjnymi chorobami człowieka dzięki powszechnemu zastosowaniu antybiotyków okazało się jednak zbyt optymistyczne i przedwczesne [13]. Pomimo ogromnego postępu badań poznawczych, jaki dokonał się w ostatnich 20–25 latach w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej bakterii chorobotwórczych i środowiskowych, w tym szczególnie w takich obszarach jak genomika i metagenomika, proteomika, inżynieria genetyczna, wciąż nie mamy wystarczającej wiedzy na temat różnych czynników środowiskowych, a także na temat złożoności wielu mechanizmów komórkowych i molekularnych, które są bezpośrednio lub pośrednio związane ze zjawiskiem oporności bakterii na antybiotyki naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne, w tym także na antybiotyki najnowszej generacji. Wciąż nie mamy pełnej wiedzy na temat dróg i mechanizmów transmisji genów lekooporności w różnych niszach i populacjach bakterii chorobotwórczych i środowiskowych. Nie wiemy dokładnie, co czyni określone gatunki szczególnie podatnymi na nabywanie genów lekooporności, a jakie bariery ograniczają transmisję takich genów u innych gatunków. Nie ma także pełnej odpowiedzi na pytania, jakie czynniki środowiskowe i molekularne mechanizmy decydują o tym, że określone geny lekoopor-

ności podlegają transmisji z dużą częstotliwością, inne zaś ze znacznie mniejszą, dlatego jedne z nich podlegają transmisji łącznie, a inne oddzielnie. Wciąż brak jednoznacznych wyników dotyczących ekologicznej roli producentów antybiotyków oraz produkowanych przez nich różnych substancji antybiotycznych. Co więcej, narasta wiedza dowodząca, że antybiotyki w środowiskach naturalnych nie są wyłącznie bronią w walce z konkurentami, lecz mogą spełniać także inne ważne funkcje jako cząsteczki sygnałowe lub egzogenne źródła węgla i energii [14]. W 2008 r. światowa organizacja Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA) [www.apua.org] zwróciła uwagę mikrobiologów oraz różnych specjalistów także na inne ważne aspekty związane z problemem oporności bakterii na antybiotyki, takie jak: rola komensali oraz niechorobotwórczych bakterii środowiskowych, w tym rola bakterii dotąd niehodowlanych, w pojawianiu się i rozprzestrzenianiu determinant lekooporności, znaczenie w tych procesach szczepów i gatunków bakterii związanych z produkcją i dystrybucją żywności, hodowlą zwierząt, rolnictwem, dystrybucją wody pitnej, a także gospodarką ściekami komunalnymi, przemysłowymi i rolniczymi. Wskazuje się na pilną potrzebę podejmowania w tym zakresie szerokich, interdyscyplinarnych badań ekologicznych nakierowanych na poszukiwanie źródeł i ustalenia natury genów lekooporności wśród komensali oraz bakterii zasiedlających różne nisze i środowiska naturalne, ze szczególnym zwróceniem uwagi na producentów antybiotyków jako jednego z ważnych źródeł genów lekooporności oraz na rolę biologiczną produkowanych przez nie substancji antybiotycznych. Przesłanie tego raportu nabiera szczególnego znaczenia w świetle nowych, ważnych wyników publikowanych na ten temat w ostatnich kilku latach [14, 15, 16, 17, 18, 19]. W cytowanych pracach opisuje się biologiczne i ekologiczne skutki związane z obecnością i aktywnością w środowiskach naturalnych antybiotyków nawet w bardzo małych, subinhibicyjnych stężeniach (*subinhibitory concentrations*, SI).

Populacje bakterii środowiskowych naturalnym rezerwuarem genów oporności na antybiotyki

W latach 90. ubiegłego wieku organizacja APUA rozpoczęła w ramach projektu „Reservoirs of Antibiotics Resistance” (ROAR) gromadzenie danych na temat zidentyfikowanych i scharakteryzowanych genów lekooporności w dwóch grupach bakterii, to jest komensali oraz środowi-

skowych bakterii niechorobotwórczych. Dane pochodzące z 260 krajów całego świata i ze 100 prac oraz artykułów opublikowanych w latach 1960–2008 w 260 specjalistycznych czasopismach naukowych pozwoliły w 2009 r. umieścić w tej bazie danych ponad 300 różnych genów lekooporności i 144 geny chorobotwórczości zidentyfikowanych w 66 rodzajach bakterii [20]. Analiza bazy ROAR wskazuje, że komensale i niechorobotwórcze bakterie środowiskowe są drugim obok producentów antybiotyków ogromnym, aczkolwiek wciąż mało poznanym rezerwuarem genów lekooporności. Rodzą się więc ważne pytania: jak wiele różnych determinant lekooporności krąży w świecie hodowlanych i niehodowlanych bakterii, jakie jest ich pochodzenie, jaką funkcję biologiczną spełniają te geny w środowiskach naturalnych.

Głębsze poznanie roli biologicznej genów oporności na antybiotyki w naturalnych populacjach bakterii, w tym szczególnie wśród producentów antybiotyków, a także komensali i niechorobotwórczych bakterii środowiskowych jest niezwykle ważnym wyzwaniem na drodze do lepszego zrozumienia zjawiska pojawiania się i rozprzestrzeniania oporności na antybiotyki wśród bakterii chorobotwórczych. W ostatnich latach narasta wiedza na temat znanych oraz nowo odkrywanych genów lekooporności preegzystujących u producentów antybiotyków oraz w populacjach innych bakterii środowiskowych, które następnie na drodze selekcji i horyzontalnego transferu szeroko rozprzestrzeniły się wśród bakterii patogennych. W pracy opublikowanej w roku 2009 opisano zaledwie kilka przykładów z dużej liczby genów i mechanizmów oporności na antybiotyki, zidentyfikowanych i scharakteryzowanych w ostatnich latach u bakterii środowiskowych takich jak: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* [15]. Wśród zidentyfikowanych u tych bakterii molekularnych mechanizmów oporności na antybiotyki opisano między innymi takie procesy jak: acetylacja i fosforylacja antybiotyków aminoglikozydowych, acetylacja chloramfenikolu, metylacja złożonego kompleksu 50S RNA odpowiedzialnego za oporność na makrolidy oraz metylacja 16S RNA warunkująca oporność na antybiotyki aminoglikozydowe, aktywność transporterów błonowych (*efflux pumps*) w oporności na tetracykliny i chloramfenikol, hydroliza antybiotyków β -laktamowych, protekcja białkami QnrA, QnrB i QnrC i białka topoizomerazy II przed bójkowym działaniem antybiotyków fluorochinonowych.

Geny i mechanizmy oporności na antybiotyki, preegzystujące w świecie bakterii środowiskowych, spełniają również inne ważne funkcje fizjologiczne. U producentów antybiotyków systemy te chronią komórkę przed toksycznym działaniem własnych produktów [21]. Szeroko rozpowszechnione, mało specyficzne systemy transporterów błonowych są zaangażowane w różnorodne procesy detoksyfikacji, wirulencję, transdukcję sygnałów [22, 23], zaś enzymy biodegradacji, modyfikacji antybiotyków, mające często charakter enzymów wielofunkcyjnych, są zaangażowane w biodegradację różnych ksenoantybiotyków, a także wykorzystanie dostępnych w środowisku antybiotyków jako źródeł węgla i energii [14]. Dla przykładu udowodniono, że hodowalne bakterie glebowe, zdolne do wykorzystania penicyliny jako jedynego źródła węgla i energii, obejmujące szczepy *Pseudomonans fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Streptomyces sp.* oraz inne niezidentyfikowane gatunki, szczepy *Flavobacterium sp.* wykorzystują chloramfenikol, zaś wiele gatunków *Proteobacteria* ma zdolność wykorzystania jako składników pokarmowych różnych antybiotyków [14, 24]. Należy jednak dodać, że geny oporności na antybiotyki mają często u pierwotnych gospodarzy charakter genów kryptycznych, jednak po ich wbudowaniu do mobilnych platform genetycznych, a następnie transferze do nowych gospodarzy mogą podlegać wydajnej ekspresji [16, 18, 25, 26, 27].

Genomika i metagenomika stworzyła w ostatnich latach nowe możliwości dla badań całych populacji hodowalnych i niehodowalnych bakterii zasiedlających różne środowiska naturalne. Coraz lepsze i tańsze techniki konstrukcji genomowych i metagenomowych bibliotek DNA bakterii stworzyły również szansę na identyfikację oraz szczegółową analizę rezerwuarów genów lekooporności w całych populacjach bakterii zasiedlających różne środowiska naturalne. Wyniki publikowane na ten temat bardzo rozszerzają naszą wiedzę na temat pochodzenia genów oporności na antybiotyki, ich zróżnicowania genetycznego, ewolucji, spełnianych funkcji biologicznych oraz dróg i mechanizmów horyzontalnej transmisji w danym środowisku. Okazało się, że w przyrodzie istnieją ogromne rezerwuary genów oporności na antybiotyki, zwanych w języku angielskim *antibiotic resistomes*, a łącznie z genami i elementami odpowiedzialnymi za ich horyzontalny transfer zwanymi *antibiotic extendend resistome*, które egzystują i krążą wśród bakterii zasiedlających gleby, wody, przewody pokarmowe ludzi i zwierząt

[8, 17, 26]. Nowe, interesujące wyniki dotyczą identyfikacji i charakterystyki puli genów oporności na antybiotyki w populacjach hodowlanych i niehodowlanych bakterii glebowych, w tym promieniowców [14, 17, 28] oraz w populacjach bakterii bytujących w ślinie i kale zdrowych ludzi [29]. Opublikowane w 2006 r. wyniki badań 480 szczepów z rodzaju *Streptomyces*, wyizolowanych z próbek gleb pochodzących z miast, farm rolniczych, lasów, dowiodły, że wszystkie szczepy bez wyjątku nosiły determinanty oporności na antybiotyki [17]. W badaniach zastosowano 21 różnych antybiotyków naturalnych, półsyntetycznych i syntetycznych. Mechanizm działania tych antybiotyków obejmował wszystkie znane tarcze molekularne i mechanizmy; były wśród nich zarówno antybiotyki stosowane w praktyce medycznej od wielu lat, jak i wprowadzone do terapii medycznej niedawno. Około 60% badanych szczepów było opornych średnio na 6–8 badanych antybiotyków użytych w stężeniach nawet 20 mg/litr, a 2 szczepy nawet na 15 z nich. Wszystkie szczepy okazały się odporne na trimetoprym i daptomycynę, 18% szczepów inaktywowało synercid (dalfoprystyna plus chinoprystyna), antybiotyk syntetyczny zalecany od roku 1999 do leczenia bakteriemii, dla 10% izolatów ujawniono oporność na rifampicynę, 27% szczepów było opornych na erytromycynę, wprowadzoną do praktyki medycznej w 1952 r., a 17% na telitromycynę, antybiotyk półsyntetyczny dopuszczony w 2004 r. do terapii infekcji opornych na antybiotyki makrolidowe. Co więcej, zidentyfikowano nowe, nieznanne dotąd mechanizmy oporności na niektóre antybiotyki. W wypadku dapomycyny, telitromycyny i rifampicyny były to mechanizmy enzymatycznej inaktywacji, zaś w wypadku antybiotyków fluorochinolonowych oporność była związana z akumulacją nieznanych dotąd mutacji punktowych w N-terminalnym regionie genu *gyrA*. Nowe światło na drobnoustroje glebowe jako ogromny rezerwuar genów oporności na antybiotyki rzuciły wyniki badań opublikowane kilka lat temu w czasopiśmie „Science” [14], z których wynika jednoznacznie, że bakterie glebowe zdolne do wykorzystania antybiotyków jako źródła węgla i energii są równocześnie ekstremalnie odporne na wszystkie klasy stosowanych obecnie antybiotyków. Łącznie wyhodowano 75 szczepów bakterii z 11 próbek gleb, korzystając z ich zdolności do wzrostu na podłożach, w których jedynym źródłem węgla i energii było 18 różnych antybiotyków użytych w różnych kombinacjach. Sześć z tych antybio-

tyków, w tym penicylina, karbenicylina, ciprofloksacyna, lewofloksacy-na oraz kwas nalidyksowy pozwoliły na selekcję z 9–11 analizowanych próbek gleb różnych szczepów bakterii na badane antybiotyki. Na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej podjednostki 16S RNA skonstruowano drzewo filogenetyczne tych szczepów, wyróżniając wśród nich następujące gromady: *Proteobacteria* (87 %), *Actinobacteria* (7%), *Bacteroides* (6%). Wśród 11 reprezentowanych rzędów wyhodowanych szczepów dominujące okazały się: *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Enterobacteriales*, a następnie *Actinomycetales*, *Rhizobiales* i *Sphingobacteriales*. Więcej niż połowa zidentyfikowanych szczepów należała do rzędów *Burkholderiales* i *Pseudomonadales*, a więc do rzędów bakterii charakteryzujących się dużymi genomami (6–10 mln par zasad) oraz uzdolnieniami do degradacji ksenobiotyków. Jednak najważniejsze i zaskakujące wyniki komentowanej pracy dotyczą oporności wyhodowanych szczepów na różne klasy antybiotyków naturalnych i syntetycznych. Okazało się że, wszystkie szczepy były odporne na średnio 17 badanych antybiotyków użytych w stężeniach 20 mg/litr, a na 14 z 18 badanych antybiotyków oporność była 50 razy wyższa. Ponadto wykazano, że jeżeli określony szczep miał zdolność wykorzystania jako jedynego źródła węgla i energii określonego antybiotyku, to równocześnie był ekstremalnie odporny na wszystkie inne antybiotyki tej samej klasy. Skoro wśród zidentyfikowanych gromad i rzędów znajdują się także szczepy bakterii patogennych, np. *Burkholderia cepacia complex* i *Serratia marcescens*, to prawdopodobna staje się dyskutowana w omawianej pracy sugestia, że horyzontalny transfer genów lekooporności od gatunków niechorobotwórczych do spokrewnionych gatunków chorobotwórczych jest łatwiejszy z racji tych samych wykorzystywanych kodonów, podobnych promotorów genów oraz motywów sekwencji regulatorowych w procesach transkrypcji i translacji. Nowe ważne informacje o obecności w populacji niehodowlanych bakterii glebowych genów oporności na antybiotyki płyną także z analizy skonstruowanych metagenomowych bibliotek DNA. Na tej drodze udało się bezpośrednio zidentyfikować między innymi nieznane dotąd geny oporności na tetracykliny (transportery błonowe) oraz na antybiotyki aminoglikozydowe (mechanizmy fosforylacji i acetylacji), których sekwencje nukleotydowe okazały się odmienne od sekwencji dotychczas znanych genów [27].

W pracy opublikowanej w roku 2009, również w „Science”, przedstawiono nie mniej ważne wyniki na temat puli i zróżnicowania genów oporności na antybiotyki w populacjach zarówno hodowlanych, jak i niehodowlanych bakterii zasiedlających przewód pokarmowy zdrowych ludzi [28]. Autorzy wyizolowali DNA z populacji bakterii obecnych w ślinie i kale dwóch zdrowych ludzi, którzy nie stosowali żadnych antybiotyków ani w celach terapeutycznych, ani profilaktycznych w okresie ponad jednego roku. Skonstruowaną metagenomową bibliotekę fragmentów DNA o wielkości 9,3 mld par zasad, sklonowaną w *E. coli*, poddano analizie funkcjonalnej, selekcionując w ten sposób klonny oporne na wszystkie z 13 użytych antybiotyków: aminoglikozydowych, β -laktamowych, tetracyklin i amfenikoli. Analiza sekwencji nukleotydowej DNA wyselekcjonowanych 95 klonów pozwoliła na zidentyfikowanie zarówno znane, jak i nieznanne dotąd geny oporności na badane antybiotyki, a w konsekwencji umożliwiła sformułowanie wielu bardzo ważnych wniosków. Dla około 22% zidentyfikowanych genów wykazano bardzo wysoką homologię (powyżej 90%) ze znanymi genami, w większości wcześniej zidentyfikowanymi wśród niechorobotwórczych komensali, np. *Bifidobacterium longum* oraz oportunistycznych komensali *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis*. Filogenetyczna analiza zsekwencjonowanych genów przy użyciu bazy danych PhyloPytia wskazuje, że gospodarzami tych genów są szczepy z gromad *Bacteroides* i *Firmicutes*, stanowiące dominującą florę przewodu pokarmowego człowieka [29]. Co niezwykle ciekawe, homologia zdecydowanej większości analizowanych w omawianej pracy genów na poziomie ich sekwencji nukleotydowej nie przekraczała 67% w stosunku do zidentyfikowanych dotąd genów wśród gatunków bakterii patogennych. Nie ma dzisiaj wątpliwości, że w populacjach komensali i patogenów stanowiących mikrobiom człowieka zachodzi horyzontalny transfer genów lekooporności noszonych przez mobilne elementy genetyczne plazmidy, transpozony, integrony i plazmidy, co rzuca nowe światło na zagrożenia płynące z selekcji i horyzontalnej transmisji genów oporności na antybiotyki krążących w populacjach bakterii środowiskowych [30].

Mamy niezaprzeczalne dowody na to, że geny oporności na antybiotyki były obecne w genomach różnych gatunków bakterii, w tym u gatunków niebędących producentami antybiotyków. Dla przykładu około 30 szczepów bakterii zliofilizowanych w 1946 i przechowywanych w ko-

lekcjach okazało się opornymi w zróżnicowanym stopniu na 8 różnych antybiotyków. Innym znanym przykładem jest kolekcja Murraya, w której znajdują się 433 szczepy z rodzaju *Enterobacteriaceae*, zgromadzone w latach 1917–1952, wśród których 24% jest zdolnych do koniugacyjnego transferu plazmidów, a 11 z nich jest opornych na ampicylinę i tetracyklinę [31]. Porównawcze analizy kolekcji szczepów bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*, zgromadzonych przed i w czasie „ery antybiotyków” dowodzą, że naturalne determinanty oporności na antybiotyki bez wątplenia były obecne od milionów lat w populacjach bakterii, jednakże narastająca, silna selekcja oraz obserwowane rozsiewanie się szczepów opornych są w znacznej mierze rezultatem ogromnej produkcji oraz masowego użycia antybiotyków oraz kontaminacji z tymi związkami różnych środowisk naturalnych.

W zakończeniu tego rozdziału warto wskazać także na rolę innych czynników, w tym środowiskowych, oraz zwierząt w rozsiewaniu w różnych środowiskach szczepów noszących geny oporności na antybiotyki. Nie ulega wątpliwości, że siły fizyczne kreowane przez wiatry, burze piaskowe oraz przez ciekły i prądy wodne mogą przenosić mikroorganizmy środowiskowe z genami oporności na antybiotyki na duże, nawet międzykontynentalne odległości [24, 32, 33, 34, 35]. Dzikie i domowe zwierzęta żyjące w zurbanizowanych, gęsto zasiedlonych regionach świata są zarówno rezerwuarami genów oporności, selekcionowanych obecnością antybiotyków obecnych w tych środowiskach w wyniku ciągłych kontaminacji, jak i wektorami w rozsiewaniu szczepów lekoopornych. Dla przykładu 90% szczepów bakteryjnych izolowanych od myszy i norników w zurbanizowanych regionach Anglii było opornych na antybiotyki β -laktamowe, podczas gdy praktycznie żadnych determinant oporności nie wykryto w kolekcjach bakterii izolowanych od łosi, jeleni oraz nornic żyjących w słabo zasiedlonych regionach Finlandii [23]. Niemalą rolę w przenoszeniu szczepów lekoopornych na dalekie, międzykontynentalne odległości spełniają ptaki wędrownie. Donoszono, że około 8% szczepów *E. coli* izolowanych od ptaków żerujących na Arktyce było opornych na od 1 do 17 antybiotyków, w tym na antybiotyki stosowane powszechnie w terapii klinicznej. Ptaki te albo zostały zainfekowane lekoopornymi szczepami bezpośrednio w środowiskach, w których poprzednio przebywały, albo nabyły je od innych gatunków przybyłych na Arktykę [34]. Domowe zwierzęta takie jak koty i psy są

również rezerwuarem szczepów lekoopornych wyselekcjonowanych w czasie ich leczenia antybiotykami lub też niekiedy nabytymi od ludzi [35].

Podsumowanie

Od połowy lat 80. ubiegłego wieku bardzo szybko narasta wiedza na temat świata mikroorganizmów prokariotycznych, żyjących w różnorodnych środowiskach naszej planety, które do niedawna jako niehodowlalne na standardowych podłożach wzrostowych umykały uwadze badaczy. Zastosowanie nowych technik mikroskopowych i molekularnych – takich jak barwienie *in situ*, metoda hybrydyzacji DNA-DNA, technika identyfikacji hodowlalnych i niehodowlalnych mikroorganizmów wykorzystująca sekwencje nukleotydowe podjednostek 5S oraz 16S RNA – pozwoliło ustalić, że wody czyste i zanieczyszczone oraz różne gleby są zasiedlone przez 10–100-krotnie większą liczbę komórek mikroorganizmów od tych, które udaje się uzyskać w hodowlach na podłożach wzrostowych [36, 37]. Dla przykładu dowiedziono, że 62 % bakterii kolonizujących przewód pokarmowy zdrowego człowieka nie było wcześniej znanych, a 80% z nich należy do grupy bakterii dotąd niehodowlanych [38, 39]. Szacuje się, że liczba genów populacji wszystkich mikroorganizmów kolonizujących ciało człowieka (bakterii, drożdży, grzybów, wirusów, bakteriofagów) jest około 100 razy większa od liczby jego własnych genów, których liczbę obecnie ocenia się na 23 tys. funkcjonalnych genów. Zatem całkowitą informację genetyczną człowieka stanowi jego własny genom jądrowy i genom mitochondrialny [40, 41, 42]. W ostatnich latach w wielu ośrodkach naukowych świata prowadzi się wielokierunkowe badania poznawcze i aplikacyjne przynoszące często zaskakujące wyniki, które w literaturze światowej są dyskutowane w różnych aspektach zdrowia ludzkiego, predyspozycji do chorób, odporności immunologicznej, czynników chorobotwórczości, pewnej i szybkiej identyfikacji wirusowych i bakteryjnych chorób człowieka, w tym identyfikacji znanych i nieznanych genów oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki oraz mobilnych elementów genetycznych odpowiedzialnych za ich horyzontalny transfer i pojawianie się szczepów opornych w populacjach zarówno bakterii środowiskowych, jak i chorobotwórczych bakterii klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Zabłotni A, Jaworski A. Źródła antybiotyków w środowiskach naturalnych i ich rola biologiczna. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2014; 68: 1040-1049.
2. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 119-146.
3. Anderson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(4): 260-271.
4. Høiby N. Ecological antibiotic policy. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46 (1): 59-62.
5. Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(9): 1179-1181.
6. Woodsford N., Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect* 2009; 59 (1): 4-16.
7. Lew W., Pai M., Oxlade O., Martin D., Menzies D. Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2008; 149 (2): 123-134.
8. Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009; 1: 20-25.
9. Morel CM., Moosialos E. Stoking the antibiotic pipeline. *BMJ* 2010; 340.
10. Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* 2003; 37(9): 1201-1209.
11. Couce A., Blazquez J. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33(3): 531-538.

12. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 1994; 264(5157): 375-382.
13. Ploy MC, Lambert T, Gassama A, Denis F. The role of integrons in dissemination of antibiotic resistance. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000; 58(4): 439-444.
14. Dantas G, Sommer MO, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 2008; 320(5872): 100-103.
15. Cantón R. Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 (1): 20-25.
16. Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008; 321(5887): 365-367.
17. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 2006; 311(5759): 374-377.
18. Cattoir V, Ould-Hocine ZF, Legrand P. Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 2001 to 2007 in a French university hospital. *Pathol Biol (Paris)*. 2008; 56(7-8): 407-411.
19. Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB. Commensals: Unappreciated Reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 2009; 4: 231-235.
20. Fajardo A, Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11(2): 161-167.
21. Lubelski J, Konings WN, Driessen AJ. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71(3): 463-476.
22. Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2): 382-402.

23. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(4): 251-259.
24. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(5): 466-475.
25. Wright GD. Biochemistry. A new target for antibiotic development. *Science*. 2007; 315(5817): 1373-1374.
26. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; 6(10): 629-640.
27. Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 525-552.
28. Sommer MO, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 2009; 325(5944): 1128-1131.
29. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308(5728): 1635-1638.
30. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 2004; 12(9): 412-416.
31. Hughes VM, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature* 1983; 302(5910): 725-726.
32. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19(3): 260-265.
33. Kellogg CA, Griffin DW. Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol Evol* 2006; 21: 638-644.

34. Sjölund M, Bonnedahl J, Hernandez J, Bengtsson S, Cederbrant G, Pinhassi J, Kahlmeter G. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(1): 70-72.
35. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(2): 321-332.
36. Torsvik V, Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 2002; 5: 240-245.
37. Jaworski A, Dobrowolska A, Stączek P. Metagenomika: genomika populacji mikroorganizmów środowiskowych [w:] Na pograniczu chemii i biologii, T.XIV, Wyd. Naukowe UAM, 2006, 153-174.
38. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359.
39. Thies FL, König W, König B. Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *J Med Microbiol* 2007; 56: 755-761.
40. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human microbiome project. *Nature* 2007; 308: 804-810.
41. Jaworski A, Dębska J, Stączek P. Metagenomika populacji wirusów i bakteriofagów środowiskowych. [w:] Na pograniczu chemii i biologii. T. XXIV. Wyd. Naukowe UAM, 2010, 11-13.
42. Jaworski A, Dobrowolska A, Stączek P. Metagenomika: Genomika populacji mikroorganizmów środowiskowych. [w]. Na pograniczu chemii i biologii. T. XIV. Wyd. Naukowe UAM, 2006, 153-174.

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. dr hab. n. biol. Adam Jaworski

Instytut Nauk o Zdrowiu

Społeczna Akademia Nauk

ul. Gdańska 121, 90-519 Łódź

email: adam@biol.uni.lodz.pl

CC-BY-SA 3.0 PL