

Antybiotykooporność *Bacillus cereus* sensu lato izolowanych z żywności różnego pochodzenia

Monika Zambrzycka, Marek Bartoszewicz

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

WSTĘP

Bacillus cereus sensu lato to grupa kilkunastu gatunków gram-dodatnich laseczek szeroko rozpowszechnionych w środowisku naturalnym. Zdolność przetrwalnikowania sprawia, iż stanowią poważny problem w produkcji żywności, a liczne czynniki wirulencji (m.in. enterotoksyny biegunkowe) oraz psychrotolerancja umożliwiają wywoływanie różnorodnych chorób (Bartoszewicz&Czyżewska, 2017).

Zjawisko antybiotykooporności jest dobrze rozpoznane wśród najgroźniejszych patogenów, lecz *B. cereus* sensu lato, mimo iż może być rezerwuarem genów oporności jest słabo poznany pod tym względem. Środowisko pozyskiwania żywności, tak ekologicznej jak i konwencjonalnej może zawierać czynniki stymulujące akumulację genów oporności (Bartoszewicz&Czyżewska, 2021).

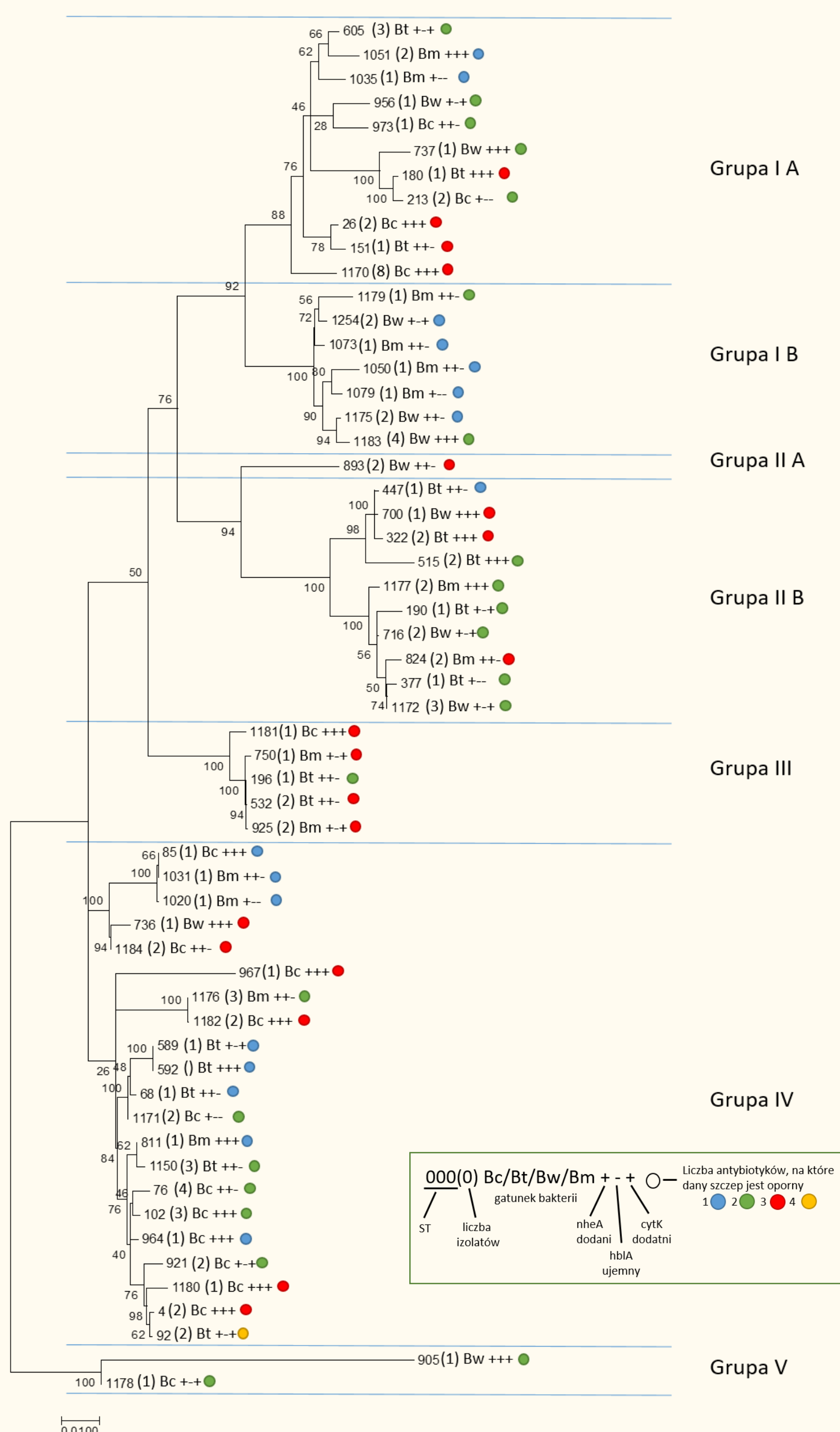
Dlatego też celem niniejszej pracy jest porównanie profili oporności na najważniejsze antybiotyki stosowane w terapii ludzi i zwierząt, a także enterotoksyczności i pokrewieństwa genetycznego wśród szczepów *B. cereus* sensu lato izolowanych mleka z gospodarstw konwencjonalnych oraz ekologicznych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły szczepy *B. cereus* sensu lato pochodzące z gospodarstw konwencjonalnych i ekologicznych z Polski Północno-Wschodniej:

◇ *B. cereus* (Bc) N=39 ◇ *B. thuringiensis* (Bt) N=20
◇ *B. mycoides* (Bm) N=20 ◇ *B. weihenstephanensis* (Bw) N=20

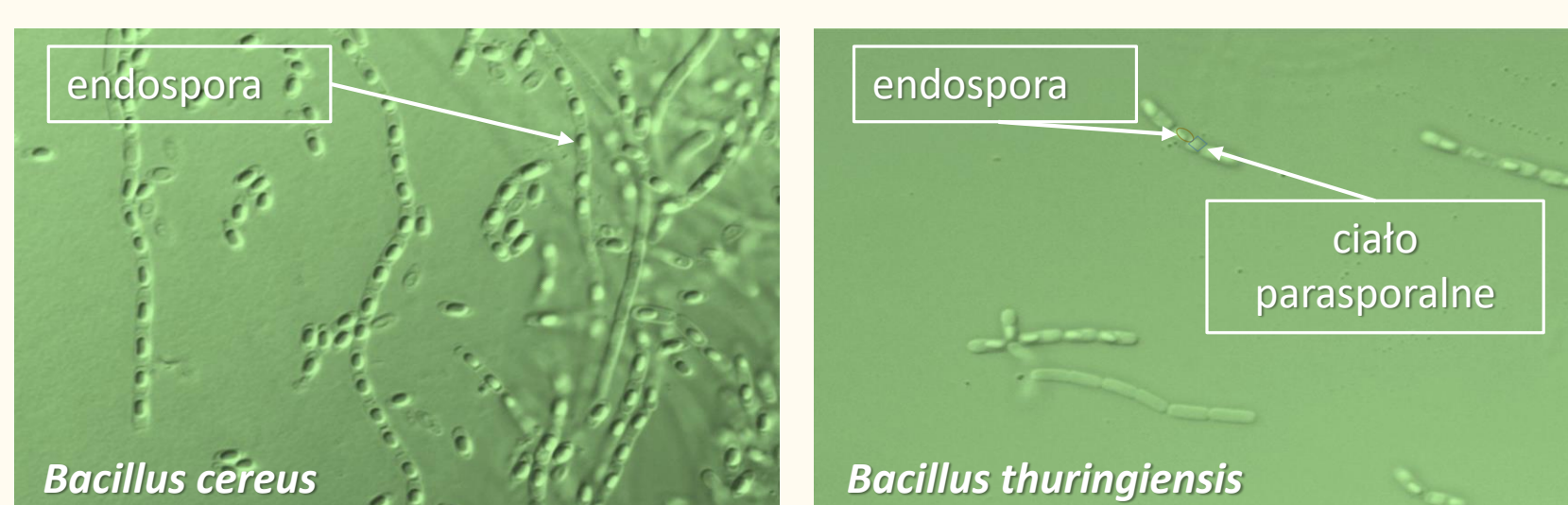
- **Izolacja i identyfikacja bakterii:** (i) wzrost na podłożu MYP/agarze z krwią, (ii) mikroskopia kontrastowo-fazowa, (iii) sekwencjonowanie genów *cspA* oraz 16S rRNA
- **Enterotoksyczność:** (i) PCR *nheA* (enterotoksyna niehemolityczna), *hblA* (hemolizyna BL), *cytK* (cytotoksyna K), (ii) testy immunochromatograficzne Duopath Cereus Toxins;
- **Analiza filogenetyczna:** MLST (Jolley *et al.*, 2018); rekonstrukcja filogenezy za pomocą MEGA 7 (metoda ML, model GTR G+I)
- **Antybiotykooporność:** (i) metoda dyfuzyjno-krążkowa wg CLSI, (ii) paski gradientowe dla penicyliny, amoksyliny z kwasem klawulanowym, meropemu, ceftriaxonu, chloramfenikolu, wankomycyny, erytromycyny, azitromycyny, klindamycyny i rifampicyny, (iii) analiza statystyczna.



Rycina 1. Drzewo filogenetyczne przedstawiające pokrewieństwo genetyczne badanych szczepów *Bacillus cereus* sensu lato na podstawie porównania sekwencji siedmiu genów metabolizmu podstawowego (MLST) oraz enterotoksyczności i lekooporności.

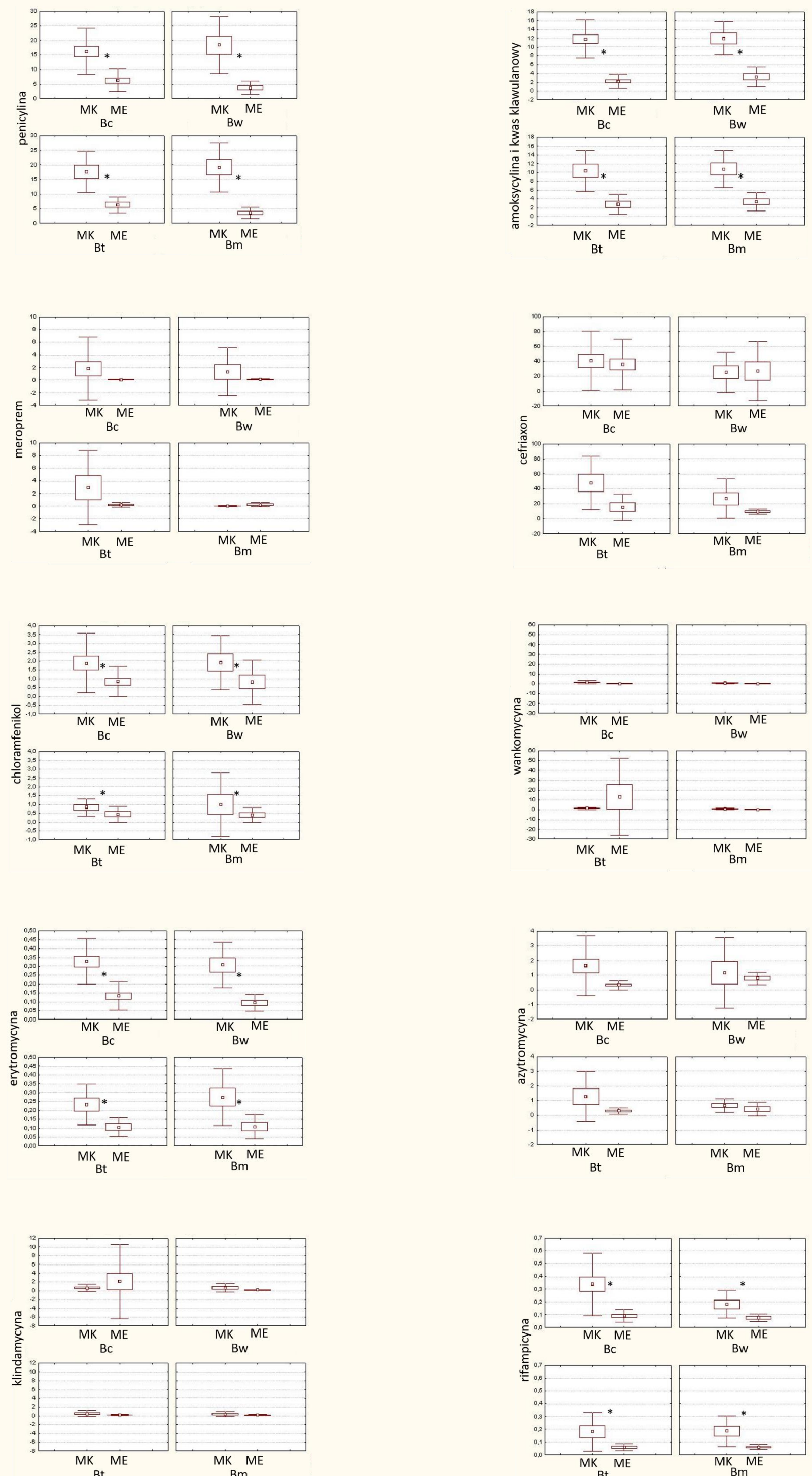
Rekonstrukcję filogenezy przeprowadzono za pomocą MEGA 7 stosując model maksymalnego podobieństwa (ML) i metodę GTR z poprawkami G+I. Analizy oparte były na genach *glp*, *gmk*, *ilv*, *pta*, *pur*, *pyc*, *tpi* (za Jolley *et al.*, 2018).

Widoczne jest wyraźne zróżnicowanie genetyczne szczepów, przy czym w obrębie poszczególnych grup obecne są izolaty reprezentujące odmienne gatunki i profile enterotoksyczności oraz oporności. Związane jest to prawdopodobnie z różnorodnością ekotypów w obrębie grupy oraz dużym udziałem cech kodowanych plazmidowo (Bartoszewicz&Czyżewska, 2017).



Rycina 3. *Bacillus cereus* oraz *Bacillus thuringiensis* widziane pod mikroskopem kontrastowo-fazowym (Olympus BX-61).

Cechą odróżniającą oba gatunki jest obecność krystalicznych ciał parasporalnych zawierających białka Cry o aktywności owadobójczej w komórkach *B. thuringiensis*. W przypadku wątpliwości, identyfikację tego gatunku potwierdzano za pomocą PCR skierowanego na wybrane geny *cry*.



ME – mleko ekologiczne

MK – mleko konwencjonalne

* Różnice pomiędzy gatunkami istotne statystycznie

Rycina 2. Zróżnicowanie średnich wartości MIC poszczególnych antybiotyków w obrębie badanych gatunków bakterii z grupy *B. cereus* sensu lato pomiędzy szczepami pochodzącymi z mleka konwencjonalnego i ekologicznego. Do analiz zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, $p=0,05$).

Istotne różnice widoczne są dla penicyliny, amoksyliny z kwasem klawulanowym, chloramfenikolu, erytromycyny oraz rifampicyny.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- Powszechnie występujący w mleku konwencjonalnym i ekologicznym *B. cereus* sensu lato cechuje się zdolnością do syntezy enterotoksyny hemolitycznej (100% izolatów), hemolizyny BL (55%) oraz cytotoksyny K (47%) oraz powszechną opornością na penicylinę.
- Oporność na pozostałe testowane antybiotyki jest rzadsza (amoksyliny z kwasem klawulanowym, meroprem, ceftriaxon), a na chloramfenikol, erytromycynę i rifampicynę nie została odnotowana.
- Większość szczepów z mleka konwencjonalnego toleruje zdecydowanie wyższe stężenia badanych antybiotyków od szczepów z mleka ekologicznego.
- *B. cereus* sensu lato może być traktowany jako potencjalny rezerwuariusz genów oporności na antybiotyki dla innych bakterii.

LITERATURA

- Bartoszewicz M., Czyżewska U. (2021), Comparison of the antibiotic resistance between genetically diverse and toxigenic *Bacillus cereus* sensu lato from milk, pepper and natural habitats, Journal of Applied Microbiology, JAM, DOI: 10.1111/jam.14792
- Bartoszewicz M. Czyżewska U. (2017), Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* sensu lato, Postępy Mikrobiologii, 2017, 56, 4, 440-450
- Jolley KA., Bray JE., Maidem MCJ (2018), Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.