

## Izolacija i karakterizacija multirezistentnih bakterijskih sojeva iz Kolubare i Petničkog jezera

---

*Antibiotici su među najčešće korišćenim lekovima u ljudskoj terapiji. Antibiotici kao zagađivači vodenih sredina imaju potencijal da izazovu nastajanje rezistentnih mikroorganizama u prirodnim zajednicama nepatogena, što može da dovede do prenosa rezistencije na patogene bakterije. Tokom leta 2014. godine vršeno je uzorkovanje vode Petničkog jezera i Kolubare u cilju izolacije i karakterizacije multirezistentnih bakterijskih sojeva prisutnih na ovim lokalitetima. Određen je ukupan broj bakterija u uzorku i dokazano je prisustvo koliforma kao indikatora fekalnog zagađenja, od kojih su neki iz rodova Salmonella i Shigella. Dobijene su čiste kulture morfološki različitih kolonija i testirane su na dve vrste antibiotika, penicilin/streptomycin i gentamicin, u koncentraciji 1 mg/L. Antibiotici su u ovoj koncentraciji pospešili rast bakterija u odnosu na negativnu kontrolu, zbog čega su sojevi testirani na 10 puta višu koncentraciju. Sedam morfološki različitih tipova kolonija koje su izrasle na podlogama sa višim koncentracijama antibiotika testirano je na osetljivost na još četiri antibiotika metodom antibiogram testa. Korišćeni antibiotici su ampicilin, hloramfenikol, rifampicin i tetraciklin. Rezultati antibiogram testa su pokazali da je 100% od 7 odabranih bakterijskih sojeva rezistentno na ampicilin i rifampicin, a 57% na hloramfenikol i tetraciklin. Iz tri soja izolovana je DNK i urađena je molekularna identifikacija sekvenciranjem gena za 16S rRNK.*

---

## Uvod

Mikroorganizmi su bitni činioци svih ekosistema. Široko su rasprostranjeni, veoma brojni, raznovrsni i lako se prilagođavaju životu na različitim vrstama staništa u kratkom vremenskom periodu. Zahvaljujući tim karakteristikama, često se koriste u industriji i bioinženjeringu, u medicini i farmaciji za pravljenje antibiotika, u bioremedijaciji pri čišćenju zemljišta i voda od teških metala i materija štetnih po okolinu kao što su nafta i njeni derivati, kao bioindikator i zagađenja u ekološkim i sanitarnim analizama vode, zemljišta, vazduha (Noble *et al.* 2003). Koliformne bakterije potiču iz zemljišta, vegetacije ili intestinalnog trakta toplokrvnih životinja. Ova grupa bakterija često se koristi kao indikator zagađenja vode i mogućeg prisustva patogena. Iako same primarno nisu patogeni organizmi, nalaze se u fekalnim materijama i neretko se izlučuju sa patogenima, pa tako zajedno sa njima, najčešće preko kanalizacije, dospevaju u vodene tokove.

Rezistencija predstavlja relativnu neosetljivost organizma podvrgnutog nekom tretmanu pod određenim spletom okolnosti. Mnogi organizmi su oduvek, zahvaljujući svojoj fiziološkoj ili biohemijskoj prirodi, bili neosetljivi ili rezistentni na neke od agenasa iz svog okruženja. Osetljivi organizmi mogu vremenom postati rezistentni mutacijama ili inkorporacijom genetičkih informacija koje kodiraju rezistenciju (Kümmerer 2004). Fenomen širenja rezistencije ne mora da bude jednosmeran, sa sredinskih izo-

---

*Anđelija Cvetković (1996), Beograd, Gočka 43a, učenica 3. razreda Trinaeste beogradske gimnazije*

*Ivana Jovanović (1997), Beograd, Dragice Končar 12, učenica 2. razreda Četrnaeste beogradske gimnazije*

**MENTORI:**

*dr Tanja Adnađević, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Beograd*

*Lea Mascarell Maričić, dr medicine, ISP*

lata na kliničke patogene, već može da se odvija i u suprotnom smeru zahvaljujući delovanju čoveka. Posebno je značajno kontaminiranje životne sredine rezistentnim bakterijama koje su prisutne na čoveku, ali i u njemu, a do koga dolazi, recimo, kupanjem u vodotokovima ili jezerima. Takođe, stalna akumulacija deterdženata ili dezinfekcionih sredstava doprinosi razvoju i širenju rezistentnih organizama u vodenom okruženju.

Usled svojih biohemijskih karakteristika, antibiotici se nakon korišćenja izlučuju nepromenjeni u prirodnu sredinu. Većina antibiotika se samo nepotpuno razgradi nakon konzumacije, te putem ekskreta dospeva u otpadne vode, pa preko njih u prirodne recipijente. Stoga poslednjih decenija i raste zabrinutost uticaja tako izlučenih antibiotika na okolinu, a naročito na živi svet vodenih tokova (Al-Ahmad *et al.* 1999). Ukoliko su prirodne vode (potoci, reke, jezera) opterećene fekalijama, patogene bakterije, virusi i paraziti takođe mogu biti prisutni, predstavljajući opasnost po zdravlje ljudima koji dolaze u kontakt sa vodom.

Petničko jezero i Kolubara su vodene površine koje se nalaze u blizini, odnosno u samom centru ljudskih naseobina, te njihove vode mogu biti kontaminirane koliformnim bakterijama i antibioticima iz fekalija ili đubreta. Ukoliko je u vodama ovaj otpad prisutan, one mogu postati izvor rezistencije mikroorganizama.

Broj potencijalnih patogenih bakterija povećava se u jezerima i stajaćim vodama uopšte, prilikom obilnih kiša i priliva iz tekućih voda. Poplave koje su zadesile Srbiju u proleće 2014. godine znatno su poremetile ekosisteme reka i njihove okoline. Kako su se te vode proticale i kroz naseljena mesta, verovatno je da su bile u kontaktu sa kanalizacijom i fekalijama, pa je pretpostavljeno da u vodama u vodama Kolubare i Petničkog jezera postoji povećan broj potencijalnih patogena, kao i ostalih koliformnih bakterija (Brookes *et al.* 2007).

Cilj ovog istraživanja je da se ispita prisustvo i brojnost koliformnih bakterija u vodama Petničkog jezera i reke Kolubare na delu njenog toka kroz Valjevo, i da se, u slučaju da su koliformi prisutni, izololuju multirezistentni sojevi i identifikuju do nivoa vrste.

## Materijal i metode

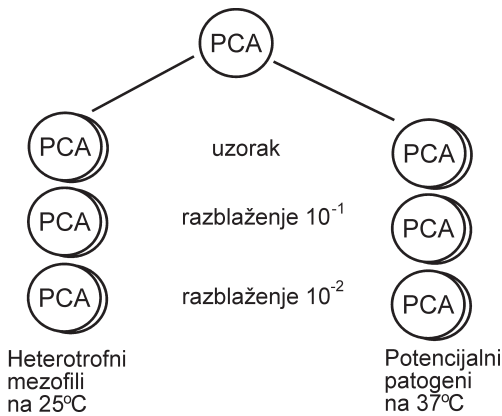
Uzorci su prikupljeni na Petničkom jezeru i delu toka Kolubare kroz Valjevo. Rađen je test sa Duramovim cevčicama za detekciju prisustva koliformnih bakterija, nakon čega su koliformi izolovani na različitim selektivnim i diferencijalnim podlogama kako bi bili bliže karakterizovani. Određen je ukupan broj potencijalnih patogena prebrojavanjem kolonija sa Plate count podloga. Broj heterotrofnih mezofila nije određen jer nije bilo dovoljno kolonija ove ekološke grupe za statističku obradu.

Osim na selektivne i diferencijalne podloge, uzorci vode bili su inokulisani i na podloge sa antibioticima: gentamicinom i penicilin/streptomycinom u koncentraciji 1 mg/L. Nakon rasta bakterija na pripremljenim podlogama sa antibioticima, izabrane su morfološki različite kolonije koje su potom prenete na podloge sa koncentracijom antibiotika 10 mg/L. Morfološki različiti sojevi porasli i na podlogama sa gentamicinom, testirani su na osetljivost na još četiri antibiotika: ampicilin, rifampicin, tetraciklin i hloramfenikol. Izolovana je DNK iz 7 sojeva rezistentnih na svih 6 antibiotika. Iz tri uzorka izolovana DNK poslata je na analizu sekvence gena 16S rRNK.

**Uzorkovanje vode.** Uzorkovanje vode izvršeno je standardnom procedurom uz poštovanje pravila sterilnog rada. Uzorci su uzeti sa dve tačke na Petničkom jezeru i sa dva mesta na delu toka Kolubare kroz Valjevo: u najužem centru grada i uzvodno, na ulazu reke u centar.

**Podloge.** Pravljene su selektivne i diferencijalne podloge za izolaciju koliforma, i to Endo Agar, Eosin methylene blue agar (EMB), Xylose lysine deoxycholate agar (XLD), kao i Pseudomonas selective agar (PSA). Endo i EMB agar su selektivne i diferencijalne podloge koje pokazuju prisustvo vrste *Escherichia coli* kao predstavnika koliforma. Na EMB agaru njene kolonije su metalno zelenog sjaja, a na ENDO agaru su crne boje. Na XLD agaru kolonije žute boje prikazuju moguće rodove *Salmonella* i *Shigella*, a roze boja kolonija je indikator prisustva vrste *Escherichia coli*. PSA je selektivna podloga za vrstu *Pseudomonas aeruginosa*. Na svaku podlogu zasejavano je po 0.1 mL uzorka vode sa oba lokaliteta u dva ponavljanja.

**Test za utvrđivanje prisustva koliformnih bakterija.** U sterilne epruvete sa Duramovim cevčicama sipano je po 5 mL laktoznog bujona i 2 mL uzorka. Epruvete sa uzorcima ostavljene su na inkubaciji 24 h na 36°C. Nakon 24 h zabeležena je pojava gasa, usled fermentacije laktoze, što ukazuje na pozitivan rezultat testa. Ako dođe do izdvajanja gasa tek nakon 48 h, test je sumnjiv



Slika 1. Metoda određivanja heterotrofnih mezofila i potencijalnih patogena

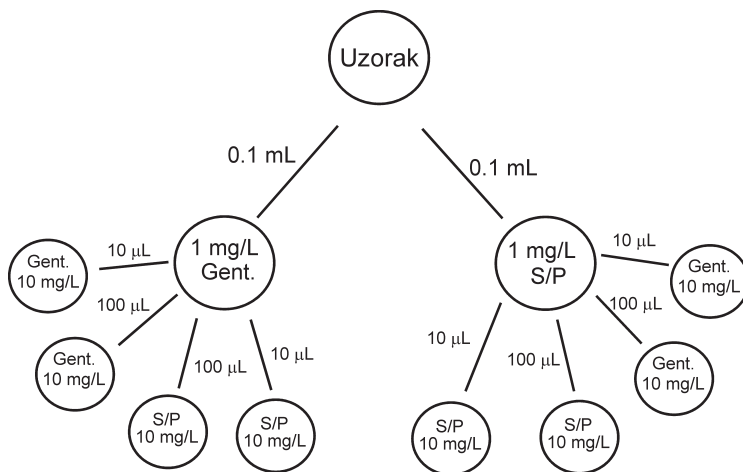
Figure 1. A method for determining the number of heterotrophic mesophilic bacteria and potential pathogens

i potrebno je raditi potvrđne testove, a ako nema izdvajanja gasa ni nakon 48 h, test je negativan.

Pripremljena je i podloga za određivanje ukupnog broja bakterija – Plate Count Agar (PCA). Određen je ukupan broj heterotrofnih mezofila inkubacijom na 25°C 72 h i potencijalnih patogena inkubacijom 37°C 24 h (slika 1). Na podloge PCA inokulisano je u duplikatu po 0.1 mL samog uzorka, kao i 0.1 mL razblaženja uzorka  $10^{-1}$  i  $10^{-2}$  za obe temperature.

**Testiranje rezistencije na antibiotike.** Pripremljene su PCA podloge sa antibioticima: jedna grupa sa gentamicinom, a druga sa rastvorom penicilin/streptomycin (s/p). Koncentracija antibiotika u podlogama bila je 1 mg/L. Po 0.1 mL uzoraka vode je zasejavano u duplikatu na dve vrste podloga sa antibioticima, a zatim inkubirano na 37°C. Nakon inkubacije, ustanovljeno je da raste više od 300 bakterijskih kolonija po podlozi sa antibiotikom, tako da nije bilo moguće odrediti broj ćelija po mililitru zato što se javlja statistička greška prilikom obrade rezultata. Kolonije na podlogama PCA bez antibiotika je bilo moguće prebrojati.

Određeni su različiti morfološki tipovi kolonija koji su potom preneti u sterilni LB medijum. Izolacija čistih kultura za svaki od izdvojenih tipova kolonija vršena je metodom iscrpljivanja (šarane ploče). Od čistih kultura napravljene su



Slika 2.

Postupak rada sa antibiotiskim podlogama. Sa svake od podloga koje su sadržale antibiotike (1 mg/L) su uzete morfološki različite kolonije i u dozama 10 µL i 100 µL su zasejavane na antibiotičke podloge koncentracije 10 mg/L.

Figure 2.

A method for testing on antibiotic PCA plates. From each plate which kept antibiotics (1 mg/L) morphologically different colonies were taken and inoculated, in volumes 10 µL and 100 µL, on new antibiotic plates (10 mg/L). Uzorak – a sample from the locality.

prekonočne kulture u LB medijumu, koje su zatim razblažene hiljadu puta.

Ponovo su pripremljene PCA podloge sa koncentracijom gentamicina i penicilin/streptomocina 10 mg/L. Detaljna metoda zasejavanja bakterija na podloge sa antibioticima prikazana je na slici 2.

**Izolacija i karakterizacija bakterijske DNK.** Sojevi koji su se pokazali rezistentnim na svih 6 antibiotika su odabrani za potpunu ekstrakciju DNK i identifikaciju sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Korišćen je metod ekstrakcije ključanjem TE pufera (Yang *et al.* 2008). Iz prekonočne kulture uzeto je 2 mL bakterijske suspenzije i sipano u sterilnu tubu. Centrifugirano je 7 minuta na 9000 rpm. Odliven je supernatant, a na dnu je ostao talog od ćelija bakterija. U tubu sa talogom dodato je 200 µL TE pufera. Rastvor je vorteksovan dok se tečnost nije homogenizovala, tj. zamutila. Dodato je 100 µL SDS (2%). Bakterijski zid je rasturan sistemom zamrzavanja i odmrzavanja. Uzorci su ostavljeni da se greju u vodi na 100°C. Nakon toga su stavljeni u ultrazvučno kupatilo na 10 s, a zatim ubačeni u hladnu vodu na 10 s što je proces koji se ponovio tri puta. Posle zamrzavanja, uzorci su opet stavljeni da se greju na 100°C, a onda su hlađeni u hladnoj vodi na 4°C. Ukoliko je rastvor i dalje bio zamućen, ciklus zamrzavanja-odmrzavanja je ponovljen dok se ne razbistri. Bistri rastvori su pokazatelj da se bakterijski zid raspao. Dodati je izopropil sa natrijum acetatom i centrifugirano je 15 minuta na 10 000g. Odliveno je 100 µL supernatanta bez DNK. Tuba je ostavljena otvorena da bi rastvor ispario, a DNK ostala.

Izolovana DNK iz tri uzorka je poslata na analizu sekvence gena 16S rRNK (Macrogen

Inc. Netherlands). Sekvence korišćenih prajmera su 27F: 5'GTT TGA TCC TGG CTC AG 3' i 1492R: 5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3'.

## Rezultati i diskusija

**Prisustvo koliformnih bakterija.** Uočena je pojava gasa u Duramovim cevčicama u svim testiranim uzorcima, i iz jezera i iz toka reke Kolubare. To ukazuje na moguće prisustvo koliforma, ali potvrdni testovi nisu rađeni. Prisustvo koliformnih bakterija je bilo očekivano zbog blizine ljudskih naseobina i prateće fekalne kontaminacije jezera i Kolubare. Istraživanje je rađeno leti, pa se pretpostavlja veća brojnost koliforma u vodi, a samim tim i veća mogućnost njihove detekcije (Ash *et al.* 2002). Za letnje periode karakteristične su temperature iznad 35°C, što odgovara prirodnom okruženju koliformnih bakterija koje inače rastu na 37°C.

**Ukupan broj bakterija, heterotrofnih mezofila i potencijalnih patogena.** Na PCA podlogama koje su inkubirane na 25°C za određivanje heterotrofnih mezofila nije bilo dovoljno bakterijskih kolonija za utvrđivanje broja ćelija u uzorku. Potrebno je da najmanje 30, a najviše 300 kolonija izraste na Petrijevoj šolji da bi rezultat mogao adekvatno da se obradi u analizama (Knežević-Vukčević i Simić 1997). Prebrojane su kolonije na podlogama za utvrđivanje prisustva potencijalnih patogena i rezultati su predstavljeni u tabeli 1.

**Diferencijacija.** Na diferencijalnim podlogama primećene su očekivane razlike u rastu i bojenju određenih sojeva kao i bojenju agrausled reakcije produkata njihovog metabolizma i podloge. Kod svih uzoraka uočene su metalno

Tabela 1. Broje potencijalnih patogena

Uzorak	Broj ćelija po mililitru			
	Jezero 1	Jezero 2	Kolubara 1	Kolubara 2
PCA uzorak	1230 ±22	1060 ±30	*	*
PCA 10 <sup>-1</sup>	/	/	9650 ±37	7600
PCA 10 <sup>-2</sup>	/	/	/	/

\* – postoji previše kolonija izraslih na Petri šoljama, / – nema dovoljno izraslih kolonija na Petri šoljama. Podaci su dati u obliku: srednja vrednost ± standardna devijacija.

zelene kolonije na EMB agaru što ukazuje na prisustvo *E. coli*, kao i kolonije žute boje na XLD podlozi koje potvrđuju prisustvo te vrste. Pronađene su i roze kolonije na XLD podlozi koje ukazuju na prisustvo bakterija iz rodova *Salmonella* i *Shigella*, ali potvrdni testovi nisu rađeni. Iako im to nije prirodno stanište, prisustvo rodova *Escherichia*, *Salmonella* i *Shigella* je očekivano i pokazuje skorašnju kontaminaciju fekalijama Petničkog jezera i Kolubare.

**Testiranje rezistencije.** Na podlogama sa antibioticima koncentracije 1 mg/L poraslo je više bakterijskih kolonija nego na PCA bez penicilin/streptomocina ili gentamicina. Pretpostavljeno je da premala koncentracija antibiotika

može da pospeši rast bakterija (Atanasković 2009). Da bi se bliže karakterizovale bakterije rezistentne na ovu koncentraciju antibiotika, određene su morfološki različite kolonije sa tih podloga. Ukupno su izabrane 22 morfološki različite kolonije (tabela 2) koje su porasle na podlogama sa antibioticima koncentracije 1 mg/L, i prenete na LB medijum.

Morfološki različite kolonije koje su ponovo pokazale rast na podlozi sa gentamicinom i penicilin/streptomycinom koncentracije 10 mg/L su testirane i na dejstvo još četiri antibiotika metodom antibiograma. Od prethodno izolovanog 21 soja, 7 sojeva je imalo najviše kolonija na većoj koncentraciji antibiotika. Broj kolonija je

Tabela 2. Rast bakterija na PCA podlogama veće koncentracije

Kolonija		Podloga			
		Gentamicin		Penicilin/streptimicin	
		10 µL	100 µL	10 µL	100 µL
Penicilin/streptomycin	A1	+	+	-	+
	A2	-	+	-	-
	A3	+	+	-	-
	B1	+	+	+	-
	B2	+	+	-	-
	D1	+	+	x	+
	D2	+	+	-	-
	D3	+	+	+	+
	D4	+	+	+	+
Gentamicin	A1	+	+	-	+
	A2	-	+	-	-
	A3	+	+	-	-
	C1	+	+	-	+
	C2	+	+	+	-
	C3	+	+	-	-
	C4	+	+	+	-
	D1	+	+	-	-
	D2	+	+	-	-
	D3	+	-	+	-
	D4	+	x	-	-
	D5	+	+	+	+
D6	+	+	-	-	

Kolonije rastu (+), kolonije ne rastu (-), ne postoji petrijevka za taj uzorak (x)

Tabela 3. Testiranje sojeva rezistentnih na gentamicin i penicilin/streptomycin na još 4 antibiotika

	Ampicilin	Tetraciklin	Hloramfenikol	Rifampicin
S/P B2	0 (R)	23.5 mm (I)	15.5 mm (R)	15.5 mm (R)
G D5	16 mm (R)	20 mm (R)	25 mm (I)	8.5 mm (R)
G A3	0 (R)	21.5 mm (R)	31 mm (S)	19.5 mm (R)
S/P A1	0 (R)	24.5 mm (S)	30 mm (S)	13.5 mm (R)
S/P D1	0 (R)	23 mm (I)	4 mm (R)	10 mm (R)
S/P D3	4.5 mm (R)	11.5 mm (R)	18.5 mm (R)	12 mm (R)
S/P D4	0 (R)	15.5 mm (R)	5 mm (R)	8.5 mm (R)

R – soj je rezistentan na antibiotik, I – soj je prelazan, S – soj je senzitiv na antibiotik

bio najveći kod sojeva S/P B2, GA3, S/P D1, S/P A1, S/P D4, S/P D3, GD5. Testirani antibiotici su ampicilin, rifampicin, hloramfenikol i tetraciklin. Svih 7 sojeva rezistentno je na ampicilin i rifampicin, 4 na hloramfenikol i 4 na tetraciklin. Dva soja su osetljiva na hloramfenikol, a jedan je intermedierno osetljiv, dok su na tetraciklin prelazno osetljiva 4 bakterijska soja. Srednje vrednosti dva ponavljanja antibiogram testa za svaki soj su prikazane u tabeli 3.

## Zaključak

U vodama Kolubare i Petničkog jezera je utvrđeno prisustvo koliformnih bakterija kao indikatora fekalnog zagađenja. Broj potencijalnih patogena u jezeru je u opsegu od 1000 do 5000 ćelija/mL, i to na donjoj granici, što znači da je prisutan blag stepen mikrobiološkog zagađenja. Broj potencijalnih patogena u Kolubari je u opsegu od 5000 do 10 000 ćelija/mL što znači da je stepen mikrobiološkog zagađenja u ovoj reci visok. Voda je uzorkovana u kratkom vremenskom periodu posle velikih poplava 2014. godine čime se objašnjava velika kontaminacija ovih voda, kao i činjenicom da Kolubara protiče kroz grad.

I u Kolubari i u Petničkom jezeru postoje bakterijski sojevi koliforma rezistentni na minimum 6 antibiotika. Najmanje 7 sojeva je rezistentno na gentamicin, penicilin/streptomycin, ampicilin i rifampicin. Najmanje 4 soja od testiranih 7 su rezistentna na još 2 antibiotika: hloramfenikol i tetraciklin. Rezistentni sojevi su većinom iz Kolubare.

Rezistencija sojeva na ampicilin je bila i očekivana zbog česte upotrebe tog antibiotika. Međutim, prema prethodnim istraživanjima, bakterije koje su rezistentne na ampicilin su obično one gram-negativne koje ne fermentišu laktozu (Torres *et al.* 2002), na primer vrste iz rodova *Salmonella* i *Shigella*. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da postoji mogućnost identifikacije bakterija koje su rezistentne na ampicilin, a fermentišu laktozu, kao na primer *Escherichia coli*. S druge strane, visok nivo rezistencije sojeva na tetraciklin je u skladu s prethodnim istraživanjima gde je dokazano da *Escherichia coli* nosi takozvani tet(Y) gen rezistencije (Chopra *et al.* 2001). Isto važi i za hloramfenikol, na koji su rezistentni potencijalni patogeni mikroorganizmi koji žive blizu ljudskih naselja, obično u vodenim sredinama (Dang *et al.* 2008). Svi sojevi (100%) su pokazali rezistenciju na rifampicin, što nije bilo očekivano. Rezistencija na ovaj antibiotik se razvija usled genskih mutacija koje vode do promena u strukturi RNK polimeraze (Wehrli 1983), a pronađeno je mnogo enzima sa različitom osetljivošću na rifampicin, tako da rasprostranjenost rezistencije na rifampicin nije sveobuhvatni fenomen.

## Literatura

Al-Ahmad A., Daschner D. F., Kümmerer K., 1999. Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**: 158.

Ash J. R., Mauck B., Morgan M. 2002. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infectious Diseases*, **8**: 7.

Atanasković I. 2009. Ispitivanje uticaja bakterije *Escherichia coli* na process biosinteze hlorofila a i b kod klica pšenice (*Triticum vulgare* L.). *Petličk sveske*, **67**: 189.

Baquero F., Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán C. J., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Martínez L. M. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front in Microbiology*, **2**: 22.

Benear L., Jessoe K. K., Olmstead M. S. 2009. Sampling Out: Regulatory Avoidance and the Total Coliform Rule. *Environmental Science And Technology*, **43** (14): 576.

Brookes W. B., Chambliss K. C., Stanley K. J., Ramirez A., Banks E. K., Johnson D. R., Lewis J. R. 2007. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**: 464.

Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**: 232.

Dang H., Ren Y., Song L., Sun S., An L. 2008. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**: 209.

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji I: praktikum i laboratorijski dnevnik*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Kümmerer K. 2004, Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**: 311.

Noble T. R, Moore F. D., Leecaster K. M., McGee C. D., Weisberg B. S. 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response

for ocean recreational water quality testing. *Water research*, **37**: 1637.

Torres C., Ruiz-Larrea F., Sáenz Y., Zarazaga M., Briñas L. 2002.  $\beta$ -Lactamases in Ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherap*, **46**: 3156.

Veal D. 1998. Microbial indicators of river health – Workshop 1997. Land and Water Resources Research and Development Corporation.

Wehrli W. 1983. Rifampin: Mechanisms of action and resistance. *Clinical Infectious Diseases*, **5**: 407.

Yang J-L., Wang M-S., Cheng A-C., Pan K-C., Li C-F., Deng S-X. 2008. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World Journal of Gastroenterology*, **18**: 2872.

---

*Anđelija Cvetković and Ivana Jovanović*

## Isolation and Characterization of Multiresistant Bacteria from Kolubara River and Petnica Lake

Antibiotics are among the most common drugs used for human therapy. Antibiotics, as water contaminants, have the potential to cause the occurrence of resistant microorganisms within non-pathogens, which could possibly lead to resistance gene transfer to pathogenic bacteria. During the summer of 2014 the water of Kolubara river and Petnica lake was sampled. The purpose of this research was the isolation and characterization of multiresistant bacteria from Kolubara and Petnica lake. The total number of bacteria in the sample is determined and the presence of coliforms, as fecal contamination indicators, is proven. Some of the bacteria belong to *Salmonella* and *Shigella* genuses. Pure cultures of morphologically different colonies were tested on two different types of antibiotics: streptomycin/penicillin stock and gentamicin.

The concentration of the used antibiotics was 1 mg/L. In this concentration, the antibiotics had the opposite effect from the expected one: the growth of bacteria was bigger than in the negative controls. Accordingly, bacterial strains were tested again, on a 10 times higher concentration of streptomycin/penicillin. The resistance of seven morphologically different colony types which grew on plates with a higher antibiotic concentration was again tested on four more antibiotics by a method called the Antibigram test. The antibiotics used were ampicillin, chloramphenicol, rifampicin and tetracycline. The results of the Antibigram test show that 100% of the 7 selected bacterial strains are resistant to ampicillin and rifampicin, but 57% to chloramphenicol and tetracycline. DNA was isolated from three strains and three types were identified by sequencing the 16S rRNA gene. 