

Monitoring of pharmaceutical residues, putrescine, and antibiotic resistance in Gram-negative bacteria in cemetery well waters

Monitoring pozostałości farmaceutycznych i putrescyny oraz oporności antybiotykowej pałeczek Gram-ujemnych w wodach studziennych lubelskich cmentarzy



DOI: 10.15199/62.2026.6.5

Well water samples collected in the vicinity of the necropolis were analyzed for the presence of Gram-negative bacilli, their antibiotic resistance, and the levels of selected chems., such as paracetamol, salicylic acid, and putrescine. Gram-negative bacilli were identified using culture and biochem. methods, and their susceptibility to antibiotics was assessed in accordance with EUCAST guidelines. The concns. of pharmaceuticals and putrescine were detd. using HPLC-MS/MS. Varied microbial. contamination and the presence of paracetamol, salicylic acid, and putrescine were detected in the water, but no significant acquired antibiotic resistance mechanisms were identified.

Keywords: cemetery, groundwater quality, microbiological contamination, Gram-negative bacteria, antibiotic susceptibility, pharmaceuticals, environmental monitoring

Próbki wód studziennych pobrane w otoczeniu nekropolii analizowano pod kątem obecności pałeczek Gram-ujemnych, ich oporności na antybiotyki oraz zawartości wybranych substancji chemicznych, takich jak paracetamol, kwas salicylowy i putrescyna. Pałeczki Gram-ujemne oznaczano metodami hodowlanymi i biochemicznymi, a ich lekowrażliwość oceniano zgodnie z wytycznymi EUCAST. Zawartość farmaceutyków i putrescyny oznaczono metodą HPLC-MS/MS. W wodach wykryto różnicowane skażenie mikrobiologiczne oraz obecność paracetamolu, kwasu salicylowego i putrescyny, jednak bez stwierdzenia istotnych nabytych mechanizmów oporności na antybiotyki.

Słowa kluczowe: cmentarz, jakość wód gruntowych, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, bakterie Gram-ujemne, wrażliwość na antybiotyki, substancje farmaceutyczne (leki), monitoring środowiskowy

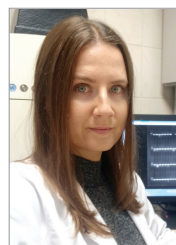
Niedobory wody na świecie pozostają poważnym problemem. Jednym ze źródeł zanieczyszczeń wód są cmentarze, które wymagają ciągłego monitoringu w celu zapobiegania zagrożeniom środowiskowym¹⁻⁴). Wody podziemne stanowią główne źródło zaopatrzenia w wodę dla małych wiejskich miejscowości oraz zurbanizowanych miast. Są one wykorzystywane w rolnictwie, do celów pitnych oraz innych potrzeb bytowych. Jakość tych wód w dużym stopniu zależy od działalności człowieka zakłócającej obieg hydrologiczny, co może prowadzić m.in. do wypłukiwania substancji odżywczych i pestycydów z pól uprawnych.

Innymi przyczynami pogorszenia jakości wód podziemnych są składowiska odpadów komunalnych i przemysłowych (w tym spożywczych), eksploatacja surowców naturalnych oraz działalność pogrzebowa. Powstałe zanieczyszczenia pogarszają parametry wody pitnej, zmniejszają jej zasoby i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego²).

Z rozkładającego się ciała ludzkiego powstaje ok. 0,5 L odcieku na 1 kg masy ciała⁴⁻⁶). Składa się on z ok. 50% wody, 15% kości oraz 35% substancji organicznej, a także zawiera pierwiastki nieorganiczne i śladowe, takie jak np. Ca, P, N oraz Na⁺. Szczątki ludzkie po pochówku ulegają



Dr Mateusz OSSOWSKI (ORCID: 0000-0003-4734-8293) w roku 2016 ukończył studia na Wydziale Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. W 2022 r. uzyskał stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo na tym samym wydziale. Jest adiunktem w Katedrze Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska tej samej uczelni. Specjalność – zoohigiena i ochrona środowiska.



Dr n. farm. Martyna KASELA (ORCID: 0000-0002-9791-2932) w roku 2016 ukończyła studia z zakresu biologii stosowanej na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie. W 2021 r. uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych na Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym tej samej uczelni. Specjalność – diagnostyka mikrobiologiczna.

*** Adres do korespondencji:**

Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Akademicka 13, 20-950 Lublin, tel.: (81)445-69-90, e-mail: mateusz.ossowski@up.edu.pl

Table 1. ESI-MS/MS parameters and retention times for selected compounds

Tabela 1. Parametry ESI-MS/MS oraz czas retencji dla wybranych związków

Nazwa związku	Jon prekursorowy, m/z	Jony potomne, m/z	Fragmentor, V	Energia kolizji, V	Polaryzacja	Czas retencji, min
Paracetamol	152,0	109,8 65,0	60	20 30	+	1,27
Diazepam-D5	290,0	195,0 151,2	161	35 32	+	4,90
Ibuprofen	207,0	190,8 72,9	280	25 35	+	4,77
Kadaweryna	103,0	86,1 68,9	60	10 10	+	0,52
Kwas salicylowy	137,0	92,8 64,7	60	5 40	-	4,05
Putrescyna	89,0	72,0 55,1	60	5 20	-	0,52

+ pozytywna, - negatywna

różnym procesom, m.in. gnilnemu, autolizie oraz rozkładowi, który trwa zwykle 15–25 lat. W trakcie rozkładu zwłok zachodzą procesy prowadzące do powstania zanieczyszczeń gazowych i ciekłych, takich jak CO, CO₂, H₂S, CH₄, NH₄⁺, NO₃⁻ oraz amin biogennych, które przenikają następnie do gleby wokół grobu. Odpowiednia grubość warstwy ziemi przykrywającej trumnę jest istotna z punktu widzenia emisji tych substancji do środowiska¹⁾.

Abia i współpracownicy⁷⁾ przeanalizowali występowanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych w glebie w zależności od głębokości poboru próbek wokół miejsca pochówku. Odnotowali istotne różnice w składzie bakterii w zależności od głębokości. Autorzy podkreślają, że cmentarze jako źródło zanieczyszczeń mikrobiologicznych, takich jak bakterie, wirusy i pozostałości antybiotyków, w wodach podziemnych mają szczególnie duże znaczenie na terenach o płytkim poziomie wód gruntowych, co potwierdzają również inne badania^{3-6, 8)}. Obszerny przegląd literatury przeprowadzony przez Żychowskiego i Bryndalę⁴⁾ dotyczący cmentarzy jako źródeł zanieczyszczeń wód bakteriami i wirusami wskazuje, że zwłoki są rezerwuarem licznych bakterii z grupy *coli*, które nie przetrwają długo poza organizmem gospodarza. Jednak liczne gatunki laseczek tlenowych i beztlenowych, przystosowane do życia w nieprzychylnych warunkach, mogą przetrwać nawet kilka lat dzięki tworzeniu przetrwalników. Po pochówku do środowiska uwalniają się także inne substancje chemiczne, takie jak leki, płyny do balsamowania zwłok i kosmetyki⁵⁾.

Należy również wspomnieć o trumnach i sarkofagach oraz materiałach i środkach chemicznych stosowanych do ich produkcji, w tym substancjach impregnujących, farbach i lakierach. Rozkładając się, przenikają one z biegiem czasu do okolicznej gleby, a w konsekwencji do wód gruntowych i powierzchniowych^{2-4, 8)}.

Polskie prawo dotyczące cmentarzy reguluje rozporządzenie⁹⁾ i określa wymogi sanitarne dla terenów wokół nekropoli. Pierwszy paragraf opisuje ogólnie lokalizację cmentarzy, wskazując, że teren nowego cmentarza nie powinien negatywnie oddziaływać na otaczające środowisko. Wytyczne dotyczące minimalnych odległości studni lub innych źródeł wody od cmentarzy określają, że dystans ten powinien wynosić co najmniej 150 m od granicy cmentarza dla zabudowań mieszkalnych, zakładów przemysłu spożywczego, żywienia zbiorowego lub przechowujących artykuły spożywcze. Jeśli te budynki są podłączone do sieci wodociągowej, dystans ten może zostać zmniejszony do 50 m.

Biorąc pod uwagę powyższe uwarunkowania, datę powstania powyższego rozporządzenia oraz aktualne doniesienia dotyczące wpływu cmentarzy na jakość sanitarną gleby, wody i powietrza, konieczny jest stały monitoring tych elementów środowiska w otoczeniu miejsc pochówku. Z tego względu podjęto badania wód pochodzących ze studni cmentarnych celem oznaczenia zawartości farmaceutyków, toksyn i skażenia mikrobiologicznego, skupiając się na pałeczkach Gram-ujemnych, oznaczając dodatkowo ich wrażliwość na antybiotyki.



Dr n. med. i n. o zdr. Dominika PRZYGODZKA (ORCID: 0000-0001-7040-4754) w roku 2015 ukończyła studia w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Jest asystentem w Pracowni Toksykologii Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Specjalność – toksykologia sądowa.



Prof. dr hab. n. med. Grzegorz BUSZEWCZ (ORCID: 0000-0001-7637-6387) w roku 1985 ukończył studia w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Był profesorem w Pracowni Toksykologii Sądowej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Specjalność – toksykologia sądowa. Zmarł 4 grudnia 2023 r.

Table 2. Gram-negative bacteria isolated from cemetery-site water and the degree of water-sample contamination by coli form bacteria

Tabela 2. Zidentyfikowane pałeczki Gram-ujemne wyizolowane z wody z cmentarzy oraz stopień zanieczyszczenia próbek wody bakteriami z grupy coli

Lokalizacja cmentarza	Ogólna liczba bakterii z grupy coli, jtk/100 mL	Zidentyfikowane gatunki bakterii
Dys	10500	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Motycz	3712	NZ
Zemborzyce Podleśne	2890	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Citrobacter youngae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp.
Krężnica Jara	41	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ewingella americana</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> 1
Wojciechów	2	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Proteus mirabilis</i>
Końskowola	36	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , NZ
Czerniejów	7	<i>Citrobacter</i> sp., NZ
Jabłonna	1	<i>Hafnia alvei</i> 1
Lublin, ul. Lipowa	440	<i>Klebsiella pneumoaniae</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i>
Lublin, ul. Unicka	1	NZ

NZ – niezidentyfikowane

Część doświadczalna

Materiał badawczy

Próbki wody do badań mikrobiologicznych, analizy zawartości farmaceutyków i putrescyny pobierano 2-krotnie ze studni na 10 wytypowanych cmentarzach położonych w woj. lubelskim. Próbki do badań mikrobiologicznych pobierano zgodnie z normą¹⁰⁾ (z uwzględnieniem normy¹¹⁾). Wykorzystano do tego celu sterylne plastikowe pojemniki, które następnie przewożono do laboratorium w warunkach chłodniczych (2–8°C, czas transportu < 4 h) i niezwłocznie poddano analizom.

Metodyka badań

Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych pałeczek Gram-ujemnych

Skażenie mikrobiologiczne oceniano hodowlą na agarze Endo LES (BTL sp. z o.o., Łódź, Polska) w temp. 37°C, przez 24–48 h, oznaczając pałeczki Gram-ujemne standardową metodą barwienia Grama. Pałeczki Gram-ujemne izolowano z podłoża Endo LES uzyskanych metodą posiewu powierzchniowego oraz filtracji membranowej badanych próbek wód ze studni cmentarnych, zgodnie z normami^{12,13)}. Z każdego punktu pomiarowego izolowano kolonie bakteryjne o odmiennej morfologii wzrostu. Identyfikację prowadzono, określając zdolność drobnoustrojów do fermentacji laktozy na podłożu MacConkeya (BTL sp. z o.o., Łódź, Polska), przeprowadzono test służący do wykrywania enzymu oksydazy cytochromowej (BioMerieux, Marcył'Etoile,

France) oraz wykorzystując testy biochemiczne API 20E (BioMerieux, Marcył'Etoile, France). Interpretację wyników testów API 20E przeprowadzono za pomocą apiwebTM (BioMerieux, Marcył'Etoile, France). W przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników identyfikacji dla pałeczek niefermentujących drobnoustroje posiewano na wybiórcze podłoże Pseudo CN do izolacji pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*. W przypadku wszystkich drobnoustrojów, dla których identyfikacja gatunkowa była niewystarczająca, określano ich przynależność do rodzaju. Pozostałe pałeczki Gram-ujemne, dla których nie uzyskano wiarygodnych wyników identyfikacji, oznaczono jako NZ (niezidentyfikowane).

Oznaczanie wrażliwości na antybiotyki

Ze wszystkich gatunków pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych z wód ze studni cmentarnych badanie wrażliwości na antybiotyki przeprowadzono wśród rodzajów lub gatunków o znaczeniu klinicznym w kontekście wywoływania zakażeń. Zarówno stosowane procedury oznaczania wrażliwości na antybiotyki, jak i interpretację uzyskanych wyników wykonano na podstawie aktualnych wytycznych Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 10.0¹⁴⁾).

Dla pałeczek z rodzaju *Klebsiella* wykrywano zdolność do wytwarzania β -laktamaz o rozszerzonym spektrum działania typu ESBL (*extended-spectrum β -lactamases*), związków o najważniejszym znaczeniu dla oporności tej grupy drobnoustrojów na antybiotyki β -laktamowe. Oznaczenia przeprowadzono, wykorzystując metodę 2 krążków DDST



Dr hab. inż. Łukasz WLAZŁO, prof. UP (ORCID: 0000-0002-1086-182X), w roku 2008 ukończył studia w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie. Jest profesorem uczelni w Katedrze Higieny Zwierząt i Środowiska. Specjalność – zoohigiena, ochrona środowiska.



Prof. dr hab. Bożena NOWAKOWICZ-DĘBEK (ORCID: 0000-0003-2510-1062) w roku 1995 ukończyła studia na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie. Jest profesorem w Katedrze Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska tej uczelni. Specjalność – zoohigiena, ochrona środowiska.

Table 3. Mean concentrations of selected drugs and putrescine in water samples from selected wells in cemeteries in the Lublin region, ng/mL

Tabela 3. Średnia koncentracja wybranych leków oraz putrescyny w próbkach wody z wybranych studni na lubelskich cmentarzach, ng/mL

Punkt pomiarowy	Lokalizacja cmentarza	Paracetamol	Kwas salicylowy	Putrescyna
1	Dys	0	2,836	0
2	Motycz	0,784	4,325	2,685
3	Zemborzyce Podleśne	0	4,708	1,48
4	Krężnica Jara	0	10,442	0
5	Wojciechów	0	7,361	0
6	Końskowola	0	0	0
7	Czerniejów	0,813	3,745	0
8	Jabłonna	0	3,011	1,441
9	Lublin, ul. Lipowa	0	5,341	1,432
10	Lublin, ul. Unicka	0	5,211	0
Średnia arytmetyczna		0,160	4,698	0,704

(double disc synergy test) i stosując krążki z cefotaksymem (30 µg), ceftazydimem (30 µg) oraz amoksycyliną z kwasem klawulanowym (20/10 µg). Szczepy klasyfikowano jako ESBL (+), gdy widoczne było powiększenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążków z cefalosporynami, od strony krążka z amoksycyliną z kwasem klawulanowym. Dodatkowo, metodą krążkowo-dyfuzyjną, badano wrażliwość na następujące antybiotyki: ampicylinę (10 µg), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (20/10 µg), cefuroksym (30 µg), gentamycynę (10 µg), ciprofloksacynę (5 µg), lewofloksacynę (5 µg) oraz trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg).

W przypadku pałeczek z rodzajów *Enterobacter* i *Citrobacter* zdolność do wytwarzania β-laktamaz o roz-

szerzonym spektrum działania typu ESBL badano jak dla *Klebsiella* spp., ale dodatkowo układano krążek z cefepimem (30 µg) celem wykrycia derepresji AmpC. Dodatkowo, metodą krążkowo-dyfuzyjną, badano wrażliwość na takie antybiotyki, jak: gentamycyna (10 µg), ciprofloksacyna (5 µg), lewofloksacyna (5 µg) oraz trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg).

Dla pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących z rodzaju *Pseudomonas* wykrywano 2 mechanizmy oporności na antybiotyki: MBL warunkujący oporność na karbapenemy w związku ze zdolnością do produkcji metalo-β-laktamaz oraz KPC warunkujący oporność na antybiotyki β-laktamowe, wynikający z produkcji karbapenemazy klasy A. Test w kierunku MBL wykonywano z zastosowaniem krążków zawierających inhibitor EDTA, ceftazydim (30 µg) oraz imipenem (10 µg), natomiast test w kierunku KPC z wykorzystaniem meropenemu (10 µg) oraz meropenemu nasyconego kwasem boronowym.

Zawartość farmaceutyków i toksyn

Analizy farmaceutyków (paracetamol, kwas salicylowy) i putrescyny prowadzono metodą HPLC-MS/MS. Wykorzystano w tym celu wysokosprawny chromatograf cieczowy (HPLC 1260 Agilent Technologies, Germany), który wyposażony był w kolumnę chromatograficzną Poroshell 120 EC-C18 column 3,0 × 50 mm; 2,7 µm (Agilent Technologies, USA). Dodatkowo badania prowadzono za pomocą spektrometru mas typu potrójny kwadrupol (QqQ 6460, Agilent Technologies, USA; rodzaj jonizacji ESI positive).

Przygotowanie próbek

Pobrano 5 mL próbki i zateżono do objętości 1 mL (za pomocą wyparki rotacyjnej RapidVap®N2/48). Dodano 10 µL deuterowanego standardu wewnętrznego (IS), czyli Diazepam-D5 D3 w stężeniu 10 µg/mL w MeOH. Materiał z dodatkiem IS wymieszano, dodano 0,5 mL buforu węglanowego (węglan amonu) o pH = 9, ponownie wymieszano i dodano 1,2 mL octanu etylu. Ekstrakcję za pomocą wytrząsarki (amplituda ruchów posuwisto-zwrotnych wynosiła 8 mm) prowadzono przez 10 min przy prędkości wytrząsania równej 280 rpm. Fazę organiczną oddzielano przez 2 min przez wirowanie z prędkością 14 000 rpm. Następnie supernatant (octan etylu) o objętości 0,95 mL przeniesiono do fiolki Eppendorf (2 mL). Odparowano do sucha w strumieniu N₂ w temp. 45°C

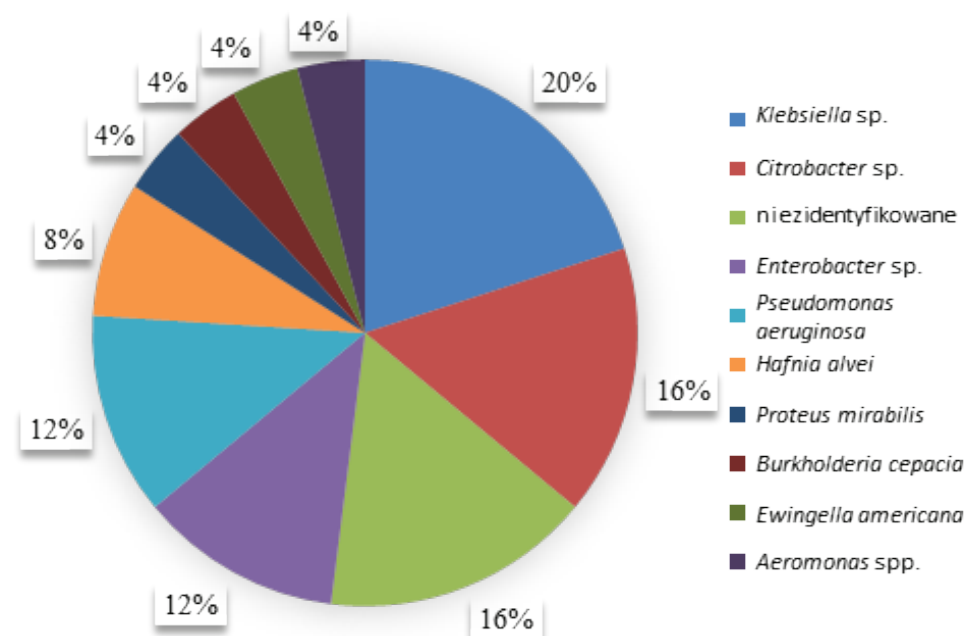


Figure. Distribution of the individual genera and species of Gram-negative rods isolated from water

Rysunek. Udział poszczególnych rodzajów i gatunków pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych z wody

(za pomocą wyparki rotacyjnej RapidVap[®]N₂/48). Suchą pozostałość rozpuszczono w 50 µL MeOH i odwirowano przez 2 min (przy 14000 rpm). Ekstrakty przenoszono do insertów i analizowano za pomocą systemu HPLC-QQQ-MS/MS.

Metody analityczne

Badane substancje rozdzielano w termostatowanej (40°C) kolumnie Poroshell 120 EC-C18 column 3,0 × 50 mm; 2,7 µm. Jako fazę ruchomą zastosowano wodę z kwasem mrówkowym (0,1%) (A) oraz acetonitryl (B). Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,5 mL/min i przebiegała wg gradientu: 0–4 min 5–95% B, 4–6 min 95% B. Każdorazowo do analizatora nastrzykiwano 10 µL próbki.

W spektrometrze mas zastosowano jonizację typu elektrosprej (ESI). Analizę jakościową oraz ilościową przeprowadzano na podstawie monitoringu wybranych reakcji (MRM). Parametry ESI-MS/MS oraz czas retencji dla wybranych związków przedstawiono w tabeli 1.

Wyniki badań

Zidentyfikowane gatunki pałeczek Gram-ujemnych

W badaniach zaobserwowano duże różnice w liczbie gatunków wyizolowanych z poszczególnych punktów pomiarowych: z jednego punktu izolowano 1–6 różnych gatunków pałeczek Gram-ujemnych.

Łącznie z wody pobranej z 10 cmentarzy wyizolowano 25 szczepów pałeczek Gram-ujemnych. Wyniki identyfikacji oraz stopień zanieczyszczenia próbek wody bakteriami z grupy *coli* przedstawiono w tabeli 2, a udział poszczególnych rodzajów i gatunków pałeczek na rysunku. Najczęściej izolowano pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Klebsiella* (16%), wśród których 80% (4/5) zidentyfikowano jako *Klebsiella pneumoniae*. Wśród pozostałych często izolowanych stwierdzono obecność rodzajów *Citrobacter* (16%), *Enterobacter* (12%) oraz gatunku *Pseudomonas aeruginosa* (12%). Pomimo że nie wyizolowano gatunku *Escherichia coli*, gatunki należące do rodzajów *Klebsiella*, *Citrobacter* i *Enterobacter* także klasyfikowane są w tzw. grupie *coli* typu fekalnego, więc ich obecność może świadczyć o zanieczyszczeniu badanej wody odchodami. Najwyższy poziom zanieczyszczenia bakteriami z grupy *coli* stwierdzono w próbkach wody pobranych z cmentarzy w Dysie, Motyczu oraz Zemborzycach Podleśnych, natomiast najniższy w Jabłonnej, Lublinie przy ul. Unickiej oraz w Wojciechowie. Liczba bakterii z grupy *coli* mieściła się w zakresie 1–10 500 jtk/100 mL, co wskazuje na znaczne zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi lokalizacjami.

Dekompozycja szczątków ludzkich i zwierzęcych wiąże się z uwolnieniem do środowiska licznych mikroorganizmów, w tym bakterii z grupy *coli*: *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz

Salmonella spp.⁴⁾. Większość pałeczek Gram-ujemnych występuje powszechnie w środowisku (gleba, woda), stanowiąc element mikrobioty przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt^{4,6,15)}. Drobnoustroje te mogą jednak powodować zakażenia oportunistyczne i są często izolowane ze środowiska szpitalnego. Szczepy kliniczne pałeczek Gram-ujemnych często cechują się nabytymi mechanizmami oporności na antybiotyki, co pociąga za sobą trudniejszą terapię i gorsze rokowania w przypadku zakażeń. Dlatego rekomenduje się oznaczanie wrażliwości na antybiotyki pałeczek Gram-ujemnych wyizolowanych ze środowiska w celu odróżnienia szczepów środowiskowych (wrażliwych) od klinicznych¹⁵⁾. Duża różnorodność gatunkowa lub wysokie stężenie tych drobnoustrojów może wskazywać na wtórne zanieczyszczenie wody lub eutrofizację sprzyjającą namnażaniu mikroorganizmów, w tym patogenów¹⁶⁾.

Wyniki oznaczania lekowrażliwości

W przypadku wszystkich testowanych szczepów z rzędu *Enterobacterales* (*Enterobacter* spp., *Citrobacters* spp., *Klebsiella* spp.) nie stwierdzono zdolności do wytwarzania beta-laktamaz o rozszerzonym spektrum działania typu ESBL. Nie stwierdzono także oporności na fluorochinolony, trimetoprim-sulfametoksazol, gentamycynę i karbapenemy. Tylko jeden izolat *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoanie* I charakteryzował się opornością na cefalosporynę II generacji (cefuroksym) oraz 1 izolat *Klebsiella pneumoniae* był oporny na amoksycylinę z kwasem klawulanowym. Oba izolaty pochodziły z tego samego punktu pomiarowego (punkt 4, Krężnica Jara). Nie stwierdzono obecności mechanizmów oporności na antybiotyki typu MBL i KPC u pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*. Mimo że nie stwierdzono obecności nabytych mechanizmów oporności na antybiotyki u wyizolowanych szczepów pałeczek Gram-ujemnych, należy podkreślić, że część z nich (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) charakteryzuje się wysoką opornością naturalną na wiele stosowanych antybiotyków. Badania Abia i współpr.⁷⁾ wskazują, że woda z terenów cmentarnych może stanowić rezerwuar patogennej, wielolekoopornej MDR (*multi-drug resistant*) *E. coli* odpornej na wiele klas antybiotyków i posiadającej geny wirulencji. Tezę tę zdają się potwierdzać również badania Brennana i współpr.⁸⁾. Autorzy przeanalizowali próbki wody z cmentarzy i stwierdzili, że są one źródłem bakterii (w tym z grupy *coli*, m.in.: *E. coli* czy enterokoków), posiadających zarówno geny patogenności (produkcja różnych toksyn), jak i geny oporności na antybiotyki.

Wyniki zawartości farmaceutyków i putrescyny

Zawartość farmaceutyków w wodach podziemnych jest od wielu lat przedmiotem dyskusji wielu ośrodków naukowych. Dlatego badaniami objęto jedne z najczęściej stosowanych leków oraz związki, które mogą powstawać w procesie rozkładu zwłok i przedostawać się do środowiska. Wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Przy zastosowanej metodzie analitycznej paracetamol wykryto w wodzie studziennej dwóch cmentarzy, oznaczonych jako 2 (0,784 ng/mL) i 7 (0,813 ng/mL). Obecności kwasu salicylowego nie potwierdzono w studni nr 6 (Końskowola). Koncentracja tego związku w próbkach wody wahała się w granicach 2,836 ng/mL (punkt 1, Dys) do 10,442 ng/mL (punkt 4, Krężnica Jara). Na cmentarzach komunalnych oznaczonych nr. 9 i 10 (odpowiednio Lublin, ul. Lipowa i ul. Unicka) wielkości te były porównywalne i wynosiły 5,341 ng/mL oraz 5,211 ng/mL.

W wyniku dekompozycji ciała ludzkiego obserwuje się nasiloną aktywność mikrobiologiczną w glebie otaczającej grób. Proces ten prowadzi do uwolnienia toksycznych związków organicznych, czyli putrescyny (1,4-butanodiamina) i kadaweryny (1,5-pentanodiamina)⁴⁾. Putrescyna należy do grupy amin biogennych i powstaje w wyniku dekompozycji białek przy udziale bakterii beztlenowych. Jej obecność potwierdzono w 4 studniach (2, 3, 8, 9), przy czym największe stężenie (2,685 ng/mL) wystąpiło w próbkach ze studni nr 2 z Motycza. Dalsze badania powinny objąć inne poliaminy, takie jak spermidyna i spermina, których prekursorem jest putrescyna. Poliaminy te są istotnym czynnikiem wzrostu wielu mikroorganizmów, takich jak *E. coli* (indukcja produkcji białek i kwasów nukleinowych, przyspieszanie wzrostu)^{17, 18)}, *Haemophilus influenzae*¹⁹⁾ i *Aspergillus nidulans*²⁰⁾. W prowadzonych analizach zastosowane metody badawcze nie pozwoliły na uzyskanie pozytywnych wyników dla kadaweryny oraz ibuprofenu w próbkach wody w granicach oznaczalności metody (LOQ = 1 ng/mL). Trwają prace doskonalące stosowane metodyki badawcze.

Adsorpcja związków farmaceutycznych i ich metabolitów zależy od ich właściwości. Związki o właściwościach liofilowych są lepiej adsorbowane na osadach i mikroorganizmach niż hydrofilowe, zaś związki o charakterze kwasowym (ibuprofen, ketoprofen) praktycznie nie są adsorbowane i pozostają w fazie wodnej. Mniejsze stężenia farmaceutyków w wodach Lubelszczyzny korelują z regionalnymi różnicami w konsumpcji leków – wydatki NFZ *per capita* były tu o 19–21% mniejsze niż np. w woj. pomorskim i zachodniopomorskim²¹⁾. W innych krajach Unii Europejskiej w próbkach wody z cmentarzy oznaczono acetaminofen, kwas salicylowy, ibuprofen, ketoprofen, nimesulid, karbamazepinę, fluoksetynę i sertralinę²²⁾. Największe stężenia uzyskano dla kwasu salicylowego (w zakresie 33,7–71,0 ng/L); wielkości te były istotnie większe niż uzyskane w badaniach własnych.

Podsumowanie i wnioski

Początkowe wyniki wskazują na wpływ cmentarzy na pogorszenie jakości wód gruntowych w analizowanym obszarze, co potwierdza ich rolę jako źródła lokalnego

zanieczyszczenia chemicznego i mikrobiologicznego. Wykrycie oporności na antybiotyki podkreśla konieczność dalszych badań nad pochodzeniem, migracją i trwałością tych mechanizmów w środowisku wodnym, z uwzględnieniem czynników biogeochemicznych. W kontekście stref chronionych ujęć wody pitnej niezbędne jest oszacowanie skali tego zagrożenia. Ograniczony zakres istniejących danych wskazuje na potrzebę badań na większą skalę, stanowiących podstawę do reform w zarządzaniu cmentarzami i strategii minimalizacji ryzyka dla zasobów wodnych.

Pracą finansowaną przez Wojewódzki Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej z siedzibą w Lublinie w ramach zadania „Ocena zanieczyszczenia wody studziennej na terenie cmentarzy Lubelszczyzny” Nr 39/2020/D/IN.

Otrzymano: 30-04-2026

Zrecenzowano: 08-05-2026

Zaakceptowano: 19-05-2026

Opublikowano: 18-06-2026

LITERATURA

- [1] S.J. Kandoli, H. Alidadi, A.A. Najafpoor, M. Mehrabpour, A. Hosseinzadeh, F. Momeni, *Desalin. Water Treat.* 2019, **168**, 235.
- [2] I.M. Ezenwa, M. Omoigberale, R. Abulu, E. Biose, B. Okpara, O. Uyi, *PLoS One* 2023, **18**, nr 12, e0292008.
- [3] S. Fiedler, J. Breuer, C.M. Pusch, S. Holley, J. Wahl, J. Ingwersen, M. Graw, *Sci. Total Environ.* 2012, **419**, 90.
- [4] J. Żychowski, T. Bryndal, *J. Water, Health* 2015, **13**, nr 2, 285.
- [5] J. Kowalczyk, Ł. Wlazło, L. Tymczyna, M. Ossowski, B. Nowakowicz-Dębek, *Przem. Chem.* 2020, **99**, nr 12, 66.
- [6] E.S. Ranti, M.Y. Khairani, T. Rahayu, *Quagga: J. Pendidikan Biol.* 2024, **16**, nr 2, 118.
- [7] A.L.K. Abia, A. Alisoltani, E. Ubomba-Jaswa, M.A. Dippenaar, *Sci. Total Environ.* 2019, **655**, 831.
- [8] A.K. Brennan, C.E. Givens, J.G. Prokopec, C.J. Hoard, Preliminary investigation of groundwater quality near a Michigan cemetery, 2016–17, *US Geol. Surv. Rep.* 2018-5120.
- [9] Rozporządzenie Ministra Gospodarki Komunalnej z dnia 25 sierpnia 1959 r. w sprawie określenia, jakie tereny pod względem sanitarnym są odpowiednie na cmentarze, *Dz.U.* 1959, nr 52, poz. 315.
- [10] PN-EN ISO 5667-3:2024-10, *Jakość wody. Pobieranie próbek. Cz. 3. Utrwalanie i postępowanie z próbkami wody.*
- [11] PN-EN ISO 19458:2007, *Jakość wody. Pobieranie próbek do analiz mikrobiologicznych.*
- [12] PN-EN ISO 8199:2019-01, *Jakość wody. Ogólne wymagania i wytyczne dotyczące badania mikroorganizmów metodą hodowli, w tym obliczanie i wyrażanie wyników.*
- [13] PN-EN ISO 9308-1:2014-12+A1:2017-04, *Oznaczanie ilościowe Escherichia coli i bakterii grupy coli. Metoda filtracji membranowej do badania wód o małej ilości mikroflory towarzyszącej.*
- [14] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 10.0, korld.nil.gov.pl, dostęp 30.04.2026 r.
- [15] P. Zalas-Więceć, A. Michalska, A. Polak, M. Orczykowska-Kotyła, Ł. Pojnar, M. Zajac i in., *Forum Zakażeń* 2022, **13**, 147.
- [16] M. Kępa, R.D. Wojtyczka, D. Idzik, M. Mrówka, K. Jasiak, J. Pacha, *Ann. Acad. Med. Siles.* 2012, **66**, nr 1, 7.
- [17] K. Igarashi, K. Kashiwagi, *J. Biol. Chem.* 2018, **293**, nr 48, 18702.
- [18] M.K. Chattopadhyay, C.N. Keembiyehetty, W. Chen, H. Tabor, *J. Biol. Chem.* 2015, **290**, nr 29, 17809.
- [19] J. Hosmer, M. Nasreen, R. Dhouib, A.T. Essilfie, H.J. Schirra, A. Henningham i in., *PLoS Pathog.* 2022, **18**, nr 1, e1010209.
- [20] M. Winther, L. Stevens, *FEBS Lett.* 1978, **85**, 229.
- [21] Główny Urząd Statystyczny, Sprzedaż leków na receptę w 2024 r., <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/zdrowie/zdrowie/sprzedaz-lekow-na-recepte-w-2024-r-,29,3.html>, dostęp 30.04.2026 r.
- [22] P. Paiga, C. Delerue-Matos, *Sci. Total Environ.* 2016, **569**, 16.