

## \_ Lagos ornamentais como reservatórios de microrganismos resistentes a antimicrobianos

### Ornamental lakes as potential reservoirs for microorganisms resistant to antimicrobial agents

João Rodrigues<sup>1</sup>, Rui Matias<sup>1</sup>, Luísa Jordão<sup>2</sup>

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

Os espaços verdes nas grandes cidades têm ganho uma importância crescente para a qualidade de vida e saúde da população. Os lagos e fontes ornamentais presentes nestes espaços são muito atrativos, mas podem esconder alguns perigos.

Neste estudo foi avaliada mensalmente durante um ano a flora bacteriana (planctónica e organizada em biofilmes) presente num lago ornamental de um parque urbano situado em Lisboa (Portugal).

Foram identificadas bactérias pertencentes a 14 Géneros diferentes, mas apenas as *Aeromonas* spp. foram identificadas em todas as colheitas na água e/ou biofilmes sendo consideradas residentes. A suscetibilidade aos antibióticos e à cloração foram avaliadas para esta população residente. Os resultados obtidos permitiram identificar um grupo de bactérias residentes que não são alvo de pesquisa dedicada de acordo com a legislação em vigor em Portugal. O nível de eficácia da cloração na eliminação de biofilmes destes microrganismos sugere a necessidade de monitorização e/ou uso de métodos de desinfeção mais eficazes.

#### \_Abstract

Urban parks and other green spaces in large cities have gained increasing importance for the quality of life and health of inhabitants. The lakes and ornamental fountains present in these spaces are very attractive, but can hide some dangers.

In this study, the bacterial flora (planktonic and organized in biofilms) present in an ornamental lake in an urban park located in Lisbon (Portugal) was evaluated monthly for a year.

Bacteria from 14 different Genus were identified, but only *Aeromonas* spp. were identified in all water collections and/or biofilms being considered as residents. Susceptibility to antibiotics and chlorination were assessed for this resident population.

The obtained results allowed the identification of a resident bacterial group that are not target of dedicated research in accordance with the legislation in force in Portugal. The level of effectiveness of chlorination in eradicating biofilms of these microorganisms suggests the need for monitoring and/or use of more effective disinfection methods.

#### \_Introdução

A vida nas grandes cidades e respetivas áreas metropolitanas tem tanto de conveniente como de problemático e estressante. Uma forma de combater estes fatores negativos, que tem ganho crescente popularidade, é usufruir do tempo livre nos parques das cidades, praticando desportos ao ar livre ou simplesmente interagindo com a natureza. Nos últimos tempos tem-se assistido a uma revitalização das áreas verdes nestes aglomerados urbanos com a recuperação de jardins e parques. Estas áreas são benéficas para a saúde pública e a preservação ambiental. Entre os contributos positivos para a saúde pública destaca-se a prática de atividade física com impacto na condição psicológica e interações sociais (1).

Na maioria dos parques existem lagos artificiais, fontes ornamentais ou outros cursos de água. A água é essencial à vida e promove o bem-estar geral. No entanto, pode servir de reservatório para agentes infecciosos e químicos tóxicos constituindo uma ameaça para a saúde humana. Por exemplo, as fontes decorativas têm sido relacionadas com surtos da doença do Legionário (2). Nas águas ornamentais habitam frequentemente animais como aves e peixes ornamentais que podem introduzir agentes microbianos potencialmente patogénicos para o Homem como por exemplo as *Aeromonas* spp. (3). As *Aeromonas* spp., ubíquas em diversas massas de água, embora sejam maioritariamente associadas a infeções em peixes, podem provocar infeções no Homem que variam entre desarranjos gastrointestinais, infeções do globo ocular e septicémia que pode ser fatal (4,5).

A existência de multirresistência a antimicrobianos em *Aeromonas spp.* isoladas de peixes e água está descrita (6-8). O crescente uso de antibióticos na saúde humana, animal e vegetal associado à capacidade de formação de biofilmes pelos microrganismos (9) tem contribuído para a diminuição da sua eficácia representando um grave problema de saúde pública.

No ambiente, os microrganismos persistem preferencialmente em biofilmes definidos como comunidades microbianas bem estruturadas constituídas por microrganismos e pela matriz extracelular por eles secretada (10). A presença de biofilmes nos sistemas de abastecimento de água pode contribuir para diminuir a eficácia dos procedimentos de desinfecção, como a cloragem (11). O uso generalizado deste processo de desinfecção contribuiu para a seleção de bactérias resistentes ao cloro, por mecanismos ainda não elucidados na totalidade (12,13), podendo representar um problema para a saúde pública (14).

## \_Objetivos

Este trabalho tem como objetivos: i) caracterizar a população bacteriana presente num lago ornamental localizado num parque urbano de Lisboa e ii) avaliar a suscetibilidade dos isolados do único grupo bacteriano residente (*Aeromonas spp.*) a agentes antimicrobianos.

## \_Metodologia

### Amostragem

As amostras foram recolhidas num lago ornamental da região de Lisboa (Portugal) entre março de 2016 e fevereiro de 2017 com uma periodicidade mensal. A recolha foi efetuada num frasco estéril (100 mL) ou com zaragatoas estéreis numa área de 10 cm<sup>2</sup> para análise da água ou do biofilme, respetivamente (15). O acondicionamento e transporte da amostra foi efetuado como descrito anteriormente. A temperatura da água, pH e concentração de cloro foram determinadas no local como descrito anteriormente (16).

### Caracterização microbiológica das amostras

As amostras de água e biofilmes foram processadas como descrito anteriormente (15). Duma forma resumida, 10 mL de água foram filtrados através duma membrana com poro de 0,45 µm. Os filtros foram transferidos para meio Drigalski e Muller Hinton (MH) agar e incubados a 30°C ou 37°C durante 24 horas. Os biofilmes foram dispersos em 10 mL de PBS e processados da mesma forma. As bactérias presentes nos meios de cultura foram identificadas por métodos bioquímicos ou por espectrometria de massa usando o VITEK2 ou o Vitek-MS Legacy, respetivamente.

### Caracterização da população de *Aeromonas spp.* (identificação e perfil de resistência a antibióticos)

Os isolados de *Aeromonas spp.* foram cultivados durante 18h a 37°C em MH agar. O ADN foi extraído destas culturas frescas usando o Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de isolados de *Aeromonas* em nível de espécie foi confirmada por sequenciação de 16S rRNA como descrito anteriormente (16).

A atividade antimicrobiana foi testada utilizando o método de difusão em disco conforme descrito pela EUCAST. Resumidamente, uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 McFarland foi inoculada em MH agar e testada com os seguintes antibióticos (Oxoid): ceftazidima (CAZ 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), levofloxacina (LEV 5 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (STX 25 µg), cefoxitina (FOX 30 µg), imipenem (IMP 10 µg), meropenem (MEM 10 µg) e gentamicina (CN 30 µg). Após incubação a 35 ± 1° C durante 18h ± 2h procedeu-se à leitura dos halos de inibição. Os resultados foram interpretados de acordo com as diretrizes do EUCAST para *Aeromonas spp.* (CAZ, CIP, LEV e STX) quando disponíveis (17) e de acordo com Skwor e colegas para *Enterobacteriaceae* (FOX, IMP, MEM e CN) (8).

### Avaliação da produção de biofilmes por *Aeromonas* spp.

O ensaio foi realizado conforme descrito antes por Nascimento e colegas (16). A produção de biofilme foi avaliada pelo método de coloração com cristal violeta após 24h de incubação; sendo as bactérias classificadas quanto à sua capacidade de formar biofilme de acordo com o critério estabelecido por Stepanovic (18) que define as seguintes categorias: fortes (SBP), moderados (MBP), fracos (WBP) produtores de biofilmes e não produtores de biofilmes (NBP).

### Avaliação do efeito da cloragem em biofilmes de *Aeromonas* spp.

Os isolados de *A. veronii* classificados como SBP foram selecionados para este ensaio tendo sido usados biofilmes com 24h. Os biofilmes foram lavados de forma a remover as bactérias planctónicas e incubados durante 3h à temperatura ambiente com agitação com água (Controlo) ou mistura de cloragem. Esta mistura foi preparada adicionando NaOCl 14% à água de nascente, acidificada até pH 3, tendo o cloro livre sido doseado por fotometria usando o *kit* Lovibond® *Water Testing*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume da solução de NaOCl foi ajustado de forma a obter uma concentração de cloro livre de aproximadamente 10 mg/L. Decorridas 3h, foi adicionada uma solução de amónia a 24% até se obter um pH neutro. A viabilidade do biofilme foi avaliada através do ensaio de MTT como descrito por Nascimento e colegas (16).

### \_Resultados e discussão

Este estudo começou com a identificação da população bacterianas e de algumas características físico químicas da água de um lago ornamental de um parque localizado em Lisboa. Os resultados dos parâmetros físico-químicos são apresentados na **tabela 1**. A temperatura da água variou entre os 14°C e os 29°C de acordo com as estações do ano. Um pH ligeiramente alcalino foi constante ao longo do estudo assim como uma baixa concentração de cloro que em sete dos doze meses do estudo foi inferior ao limite de deteção do método (0,05 mg/L).

Tabela 1: Características físico-químicas da água.

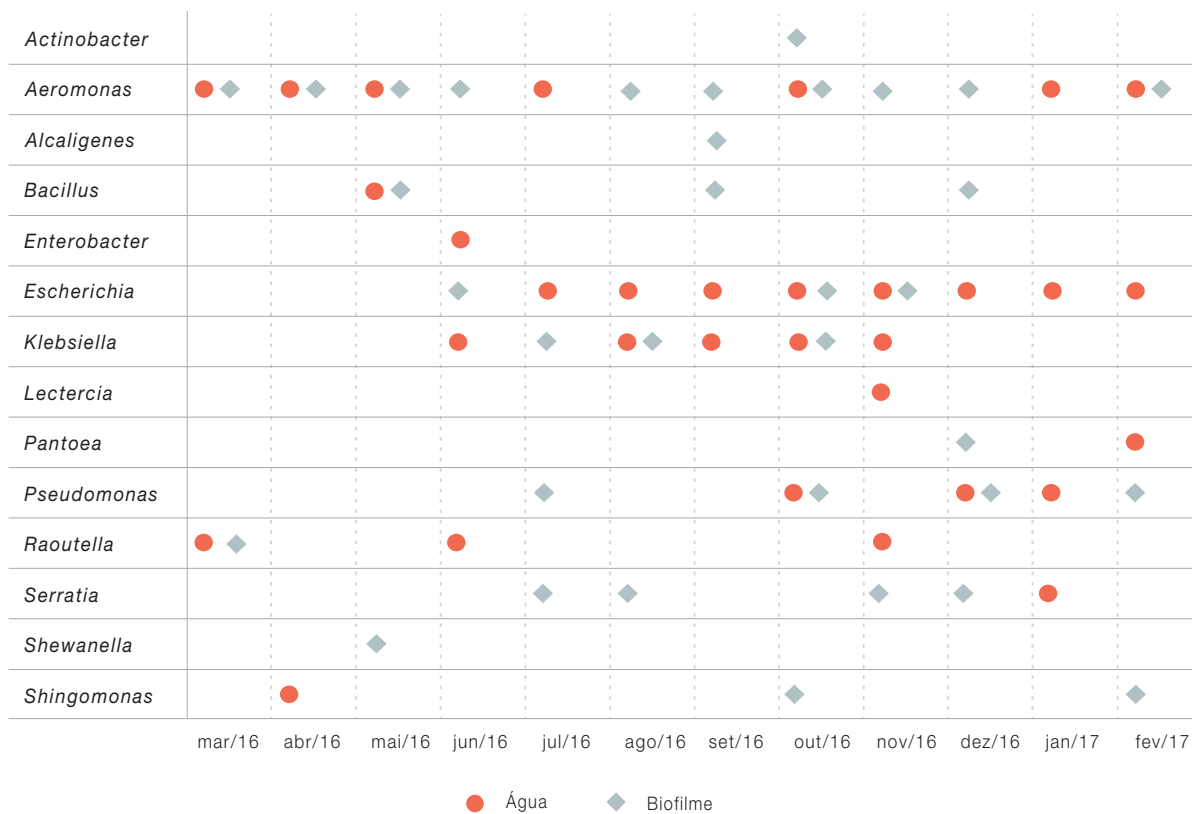
Colheita	Temperatura (°C)	pH	Cloro (mg/L)
março 2016	14,7	7,93	0,16
abril 2016	17,2	8,18	0,10
maio 2016	19,9	8,95	0,05
junho 2016	25,0	8,02	---
julho 2016	27,0	8,50	---
agosto 2016	29,0	7,53	---
setembro 2016	19,6	7,60	---
outubro 2016	20,0	8,05	---
novembro 2016	17,0	8,01	---
dezembro 2016	17,0	8,05	---
janeiro 2017	17,0	8,14	0,16
fevereiro 2017	14,0	7,91	0,10

(---) valor inferior a 0,05 mg/L

No lago ornamental estudado foram identificados nas amostras de água e biofilmes bactérias pertencentes a 14 Géneros distintos (**gráfico 1**). A ocorrência das diferentes bactérias foi distinta existindo bactérias isoladas exclusivamente na água (*Enterobacter cloacae* complex e *Lectercia adecarboxylata*) ou no biofilme (*Actinobacter lwofii*, *Alcaligenes faecalis* spp. *faecalis* e *Shewanella putrefaciens*); contudo, a maioria das bactérias foram isoladas da água e/ou biofilme (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoutella*, *Serratia* e *Shingomonas*) simultaneamente ou em colheitas distintas. Neste grupo destacamos *Serratia* (*S. fonticola*, *S. marcescens* e *S. plymuthica*) e *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. oryzihabitans* e *P. putida*) isoladas em cinco colheitas; *Klebsiella* (*K. oxytoca* e *K. pneumoniae*) isoladas em seis colheitas; *Escherichia* (*E. fergusonii* e *E. coli*) isoladas em nove colheitas e *Aeromonas* (*A. hydrophyla/caviae*, *A. sobria* e *A. veronii*) isoladas em todas as colheitas e como tal consideradas residentes. A presença de *E. coli* (indicador de contaminação fecal) e bactérias associadas a infeções no Homem como por exemplo *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. alerta para a necessidade de monitorizar as águas ornamentais (19,20).

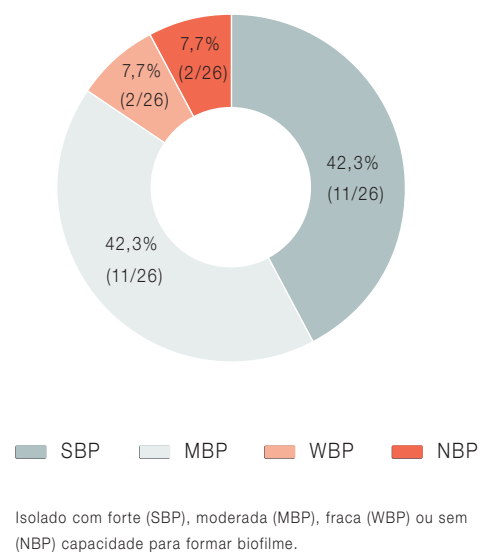
artigos breves\_ n. 7

Gráfico 1: Caracterização da população bacteriana de um lago ornamental durante o período de um ano.



No caso da população residente de *Aeromonas* spp., constituída por 26 isolados, foi realizado um estudo mais detalhado. A capacidade de formar biofilme foi avaliada tendo os isolados sido classificados em: não formadores de biofilme (NBP), formadores de biofilme fracos (WBP) moderados (MBP) e fortes (SBP). A maioria dos isolados demonstrou ser um forte formador de biofilme (SBP- 42,3%) ou moderado formador de biofilme (MBP- 42,3%), com apenas 7,7% dos isolados a ser classificados como WBP e os restantes 7,7% como NBP (gráfico 2). Uma vez que a formação de biofilmes é considerada um mecanismo de virulência que confere aos microrganismos a capacidade de resistirem a fatores de stress, estudamos com mais detalhe os isolados classificados como SBP.

Gráfico 2: Classificação dos diferentes isolados de *A. veronii* quanto à capacidade de formarem biofilmes.



artigos breves\_ n. 7

Inicialmente, utilizamos a sequenciação parcial do 16S rRNA para confirmar a identificação por Vitek-MS: *A. sobria* (H<sub>2</sub>O/16/32; H<sub>2</sub>O/16/47; H<sub>2</sub>O/16/54; Biof/16/49; Biof/16/50 e Biof/16/53), *A. hydrophila/ caviae* (H<sub>2</sub>O/16/51) e *A. veronii* (H<sub>2</sub>O/16/52 e Biof/16/48). Os resultados obtidos pelos dois métodos foram concordantes apenas para dois dos nove isolados uma vez que por sequenciação parcial do 16S RNA todos os isolados foram classificados como *A. veronii*. Este resultado pode ser explicado pelo fato de *A. veronii* e *A. sobria* serem geneticamente muito próximas sendo difíceis de diferenciar e por o Vitek-MS estar desenhado para identificação de microrganismos com interesse clínico e não ambientais. Uma vez que o método de sequenciação parcial apresenta uma maior especificidade resolvemos adotar a classificação por ele gerada, embora estejamos cientes que não está isento de erro. Uma vez que para identificação fazemos uma comparação com as seqüências depositadas em bases de dados públicas identificadas de acordo com a classificação vigente de *Aeromonas* spp., que variou ao longo do tempo, tal pode condicionar o resultado final (5).

De seguida avaliamos a suscetibilidades dos diferentes isolados a um painel constituído por oito antibióticos: duas cefalosporinas (ceftazidima- CAZ10, cefoxitina- FOX30), dois carbapenemos (imipenem-IMP10 e meropenem-MEM10), duas fluorquinolonas (ciprofloxacina- CIP5 e levofloxacina- LEV 5), um aminoglicosido (CN30) e sulfometoxazol (STX25). Todos os isolados de *A. veronii* apresentam resistência a um ou mais antibióticos (tabela 2): três isolados (H<sub>2</sub>O/16/47; H<sub>2</sub>O/16/52 e Biof/16/50) são resistentes a um antibiótico (CN30); quatro isolados são resistentes a dois antibióticos sendo que um é resistente a CAZ e LEV (H<sub>2</sub>O/16/32) e os restantes três a IMP10 e CN30 (H<sub>2</sub>O/16/51; H<sub>2</sub>O/16/54; Biof/16/53); dois isolados (Biof/16/48 e Biof/16/49) são resistentes a três antibióticos (IMP10, MEM10 e CN30) sendo considerados multirresistentes (MDR). Embora a amostra seja pequena, não permitindo por isso retirar ilações, todos os isolados MDR têm origem em biofilmes que estão associados à emergência de estirpes microbianas resistentes aos antimicrobianos. O cálculo do índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR<sub>index</sub>) apresentado na tabela 3 revelou que as *A. veronii* têm origem numa fonte de contaminação de risco elevado (8). A existência de uma considerável resistência a antibióticos de reserva como os carbapenemos (IMP10 e MEM10) é simultaneamente surpreendente e preocupante (21).

tipla aos antibióticos (MAR<sub>index</sub>) apresentado na tabela 3 revelou que as *A. veronii* têm origem numa fonte de contaminação de risco elevado (8). A existência de uma considerável resistência a antibióticos de reserva como os carbapenemos (IMP10 e MEM10) é simultaneamente surpreendente e preocupante (21).

Tabela 2: Avaliação da suscetibilidade dos isolados de *A. veronii* aos antibióticos.

ID	CAZ10	CIP5	LEV5	STX25	FOX30	IMP10	MEM10	CN30
H <sub>2</sub> O/16/32	R	--	R	S	S	S	S	S
H <sub>2</sub> O/16/47	S	S	S	S	S	S	S	R
H <sub>2</sub> O/16/51	S	S	S	S	S	R	--	R
H <sub>2</sub> O/16/52	S	S	S	S	S	--	--	R
H <sub>2</sub> O/16/54	S	S	S	S	S	R	--	R
Biof/16/48	--	S	S	S	S	R	R	R
Biof/16/49	S	S	S	S	S	R	R	R
Biof/16/50	S	S	S	S	S	S	--	R
Biof/16/53	S	S	S	S	S	R	--	R

(R) resistente, (S) sensível e (--) sensível, com exposição aumentada, (CAZ 10) ceftazidima 10 µg, (CIP 5) ciprofloxacina 5 µg, (LEV 5) levofloxacina 5 µg, (STX 25) sulfametoxazole 25 µg, (FOX 30) cefoxitina 30 µg, (IMP10) imipenem 10 µg, (MEM10) meropenem 10 µg, (CN30) gentamicina 30 µg.

Tabela 3: Perfil de resistência da população de *A. veronii*.

Bactéria (Nº de isolados)	% (Nº) de isolados resistentes ao antibiotico <sup>a</sup>					MAR <sub>index</sub> <sup>b</sup>
	CAZ10	LEV5	IMP10	MEM10	CN30	
<i>A. veronii</i> (n=9)	11,1% (1)	11,1% (1)	55,6% (5)	22,2% (2)	88,9% (8)	0,250

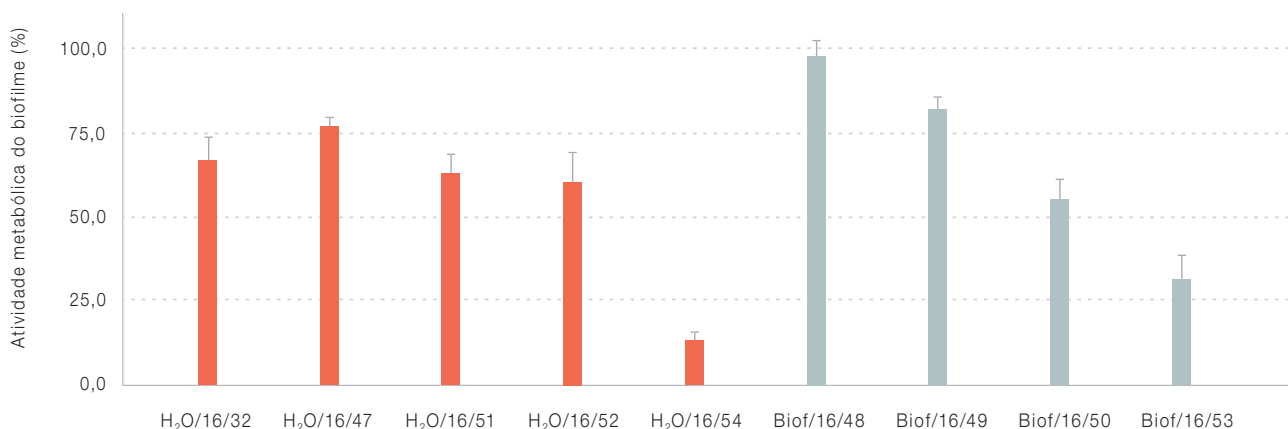
<sup>a</sup> Na tabela foram incluídos os antibióticos para os quais foi observada resistência: CAZ10: ceftazidima, 10 µg, FOX30: cefoxitina, 30 µg; IMP10: imipenem, 10µg; CN30: gentamicina, 30 µg.

<sup>b</sup> MARindex índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR).

A existência de reservatórios ambientais de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem em espaços bastante frequentados pela população pode constituir um risco. Este risco será ainda mais considerável se estes microrganismos forem resistentes a diversos antibióticos como neste caso. Uma vez que a cloragem é o método mais frequentemente utilizado no tratamento de água resolvemos testar a sua eficácia na eliminação destes microrganismos quando organizados em biofilmes. Como se pode observar na gráfico 3, apenas dois dos nove isolados apresentam uma redução superior a 50 % da sua atividade metabólica quando expostos durante 3 horas a este tratamento. Estes resultados suportam o papel de proteção a agressões externas

desempenhado pelos biofilmes, uma vez que as formas planctónicas das mesmas bactérias foram erradicadas quando submetidas às mesmas condições ou mesmo às concentrações residuais de cloro permitidas na água para consumo humano distribuída pela rede de abastecimento. A tolerância de *Aeromonas* spp. ao cloro foi descrita por outros autores (22,23) pelo que os resultados aqui apresentados relativamente à tolerância dos biofilmes demonstram a necessidade de evitar a formação dos mesmos nos sistemas de abastecimento de água, a fim de garantir a segurança da água. A elucidação dos mecanismos a tolerância ao cloro pode ser benéfica para o desenvolvimento de alternativas para os procedimentos de desinfecção da água.

Gráfico 3: Avaliação do efeito da cloragem na viabilidade do biofilme.



## Conclusão

Este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento relativamente ao ecossistema estudado.

A caracterização da flora microbiana permitiu identificar a presença de bactérias potencialmente patogénicas para o Homem que não são alvo de pesquisa dedicada de acordo com a legislação em vigor em Portugal.

Este trabalho mostra que é importante estudar o efeito dos processos de desinfecção de águas nas populações bacterianas.

## Referências bibliográficas:

- (1) Hunter RF, Christian H, Veitch J, et al. The impact of interventions to promote physical activity in urban green space: a systematic review and recommendations for future research. *Soc Sci Med*. 2015 Jan;124:246-56. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2014.11.051>. Epub 2014 Nov 26.
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2013. Stockholm: ECDC, 2015. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-europe-2013>
- (3) Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, et al. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. *PLoS One*. 2012;7(9):e39971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039971>
- (4) Pessoa RBG, de Oliveira WF, Correia MTDS, et al. *Aeromonas* and Human Health Disorders: Clinical Approaches. *Front Microbiol*. 2022 May 31;13:868890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868890>

artigos breves\_ n. 7

- (5) Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan;23(1):35-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- (6) Conte D, Palmeiro JK, Bavaroski AA, et al. Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2021 Jul;131(1):169-81. <https://doi.org/10.1111/jam.14965>
- (7) Ninhin DT, Le DV, Van KV, et al. Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in Freshwater Aquaculture. *Antibiotics (Basel).* 2021 May 4;10(5):532. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>
- (8) Skwor T, Stringer S, Haggerty J, et al. Prevalence of Potentially Pathogenic Antibiotic-Resistant *Aeromonas* spp. in Treated Urban Wastewater Effluents versus Recipient Riverine Populations: a 3-Year Comparative Study. *Appl Environ Microbiol.* 2020 Jan 21;86(3):e02053-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02053-19>
- (9) Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut.* 2009 Nov;157(11):2893-902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.05119>
- (10) Ansari MI, Schiwon K, Malik A, et al. Biofilm formation by environmental bacteria. In: Malik A, Grohmann E (eds). *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development.* Springer: Rotterdam, NL, 2012. pp. 341-77.
- (11) Koizumi Y, Ichijo T, Uchii K, et al. Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system revealed by high throughput sequencing. *J Microorg Control.* 2023;28(1):27-34. [https://doi.org/10.4265/jmc.28.1\\_27](https://doi.org/10.4265/jmc.28.1_27)
- (12) Luo LW, Wu YH, Chen GQ, et al. Chlorine-resistant bacteria (CRB) in the reverse osmosis system for wastewater reclamation: Isolation, identification and membrane fouling mechanisms. *Water Res.* 2022 Feb 1;209:117966. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117966>. Epub 2021 Dec 15.
- (13) Cho M, Kim J, Kim JY, et al. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Res.* 2010 Jun;44(11):3410-8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- (14) Lu YW, Liang XX, Wang CY, et al. Synergistic nanowire-assisted electroporation and chlorination for inactivation of chlorine-resistant bacteria in drinking water systems via inducing cell pores for chlorine permeation. *Water Res.* 2023 Feb 1;229:119399. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119399>. Epub 2022 Nov 20.
- (15) Sousa M, Morgado P, Rodrigues J, et al. Caracterização da população bacteriana em barragens na bacia hidrográfica do Sado. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2019;8(Supl 11):44-48. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7144>
- (16) Nascimento M, Rodrigues J, Matias R, et al. *Aeromonas* spp. in Freshwater Bodies: Antimicrobial Resistance and Biofilm Assembly. *Antibiotics (Basel).* 2024 Feb 8;13(2):166. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020166>
- (17) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 12.0. 2022. [Online]. (consult. 2022.01.31). [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)
- (18) Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007 Aug;115(8):891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- (19) Heijnen L, de Vries HJ, van Pelt G, et al. Qualitative detection of *E. coli* in distributed drinking water using real-time reverse transcription PCR targeting 16S rRNA: Validation and practical experiences. *Water Res.* 2024 Aug 1;259:121843. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121843>
- (20) LeChevallier MW, Prosser T, Stevens M. Opportunistic Pathogens in Drinking Water Distribution Systems-A Review. *Microorganisms.* 2024 Apr 30;12(5):916. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050916>
- (21) World Health Organization. AWaRe Classification of Antibiotics for Evaluation and Monitoring of Use. 2023. [Online]. (consult. 2024.01.12). <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.04>
- (22) Scoaris Dde O, Colacite J, Nakamura CV, et al. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Jan-Feb;93(1-2):111-22. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9185-z>
- (23) Wadström T, Ljungh A. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food- and waterborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 1991 Apr;12(4):303-11. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90144-e](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90144-e)