

VPLYV ODPADOVEJ VODY NA VZNIK A ŠÍRENIE BAKTERIÁLNEJ REZISTENCIE VOČI ANTIBIOTIKÁM

KRISTÍNA LÉPEŠOVÁ^a, TOMÁŠ MACKUEAK^b
a LUCIA BIROŠOVÁ^a

^a Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Ústav potravinárstva a výživy, ^b Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Ústav chemického a environmentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava
kristina.nagyova@stuba.sk

Došlo 6.5.16, prepracované 10.10.16, prijaté 10.11.16.

Kľúčové slová: odpadové vody, čistiareň odpadových vôd, mikrobiálna rezistencia, nemocnice

Obsah

1. Úvod
2. Vplyv antimikrobiálnych látok ako mikropolutantov v odpadových vodách na vývoj rezistencie
 - 2.1. Antibiotiká v odpadových vodách
 - 2.2. Biocídy v odpadových vodách
3. Gény rezistencie a baktérie odolné voči antibiotikám v odpadových vodách
4. Vplyv nemocníc na obsah znečisťujúcich látok v odpadových vodách
 - 4.1. Nemocničné odtoky ako vektor prenosu bakteriálnej rezistencie
 - 4.2. Legislatívne riadenie spôsobu odvádzania nemocničných odpadových vôd a možnosti redukcie mikropolutantov z hľadiska prevencie vývoja a šírenia rezistencie do prostredia
5. Záver

1. Úvod

Do komunálnych odpadových vôd sa dostávajú rôzne znečisťujúce látky vrátane antibiotík, ktoré nie sú v hostiteľskom organizme úplne degradované a sú vylučované močom alebo stolicou. Ich subinhibičné koncentrácie pôsobia na prítomnú mikrobiotu selektívne, v dôsledku čoho môže dochádzať jednak k mutáciám v bakteriálnej DNA vedúcim k rezistencii voči antibiotikám, ako aj k zvýšeniu rýchlosti horizontálneho transferu génov rezistencie. K tomuto prenosu môže dochádzať vďaka prítomnosti rezistentných patogénov nesúcich mobilné genetické ele-

menty ako aj samotnej prítomnosti génov rezistencie v odpadových vodách. Horizontálnym transferom sa následne gény kódujúce rezistenciu voči jednotlivým antibiotikám môžu inkorporovať do genómu hostiteľského mikroorganizmu a vyvolať fenotyp rezistencie aj u citlivých druhov.

Najvýznamnejším zdrojom multirezistentných patogénnych baktérií, ako aj rôznych liečiv sú odpadové vody pochádzajúce z nemocníc a zdravotníckych zariadení. Nemocničné odpadové vody sú rovnako privádzané na komunálne čistiarne odpadových vôd, ale môžu byť vypúšťané do vodných zdrojov aj bez účinného predchádzajúceho čistenia. Takýmto spôsobom sa mikrobiálna rezistencia môže šíriť do prostredia, ako aj do potravinového a potravinového reťazca a ohrozovať zdravie populácie.

2. Vplyv antimikrobiálnych látok ako mikropolutantov v odpadových vodách na vývoj rezistencie

Odpadové vody sú čistené v čistiarnach odpadových vôd (ČOV), ktoré majú dôležitú úlohu pri zlepšení kvality vôd, predtým, než sa vrátia do ekosystému¹. Všeobecne platí, že do odpadových vôd sa dostávajú rôzne znečisťujúce látky vrátane povrchovo aktívnych látok, endokrinných disruptorov, farmaceutík a prípravkov osobnej starostlivosti. Najväčší dôraz sa však kladie práve na farmaceutické látky, ktorých používanie sa neustále zvyšuje po celom svete. Celý rad liečiv, ktoré sú nedostatočne odstránené počas čistenia odpadových vôd, sa vypúšťajú v odtokových vodách priamo do vodného prostredia². Pochopenie distribúcie baktérií rezistentných voči antibiotikám vo vodných zdrojoch je dôležité, pretože voda slúži ako prepojenie medzi hlavnými rezervoármi – človekom, zvieratami a pôdou, prostredníctvom ktorých sa môže mikrobiálna rezistencia šíriť³.

2.1. Antibiotiká v odpadových vodách

Spomedzi všetkých farmaceutík sa najväčšia pozornosť venuje antibiotikám². Ako náhle totiž vstupujú do ekosystému, môžu mať vplyv na vývoj štruktúry spoločenstva, čo ovplyvňuje aj fungovanie vodného ekosystému⁴. Ako príklad možno uviesť vplyv antibiotík ako erytromycínu, dihydrostreptomycínu, oxytetracyklínu a tylosínu na inhibíciu rastu fotosyntetizujúcej sinice *Synechocystis*, alebo zelenej riasy *Selenastrum capricornutum*⁵.

Celosvetová spotreba antibiotík sa odhaduje na 100 000 až 200 000 ton ročne⁶. Vzhľadom na to, že látky antimikrobiálneho charakteru nepodliehajú úplnej degra-

dácii v hostiteľskom organizme, ich pôvodné formy, metabolity aj transformačné produkty sa najčastejšie vylučujú stolicou alebo močom užívateľov, a následne sa dostávajú do ČOV^{7,8}. Vo všeobecnosti platí, že 30–90 % z podanej dávky vo vode rozpustných antibiotík sa vylučuje v exkrementoch v aktívnej forme a dostáva sa do kanalizačného systému⁷. Metabolity antibiotík môžu byť biologicky aktívne, výsledkom čoho je ich transformácia späť na pôvodnú zlúčeninu po vylúčení z organizmu. Z toho vyplýva, že vysoké percento podávaných antibiotík sa môže dostať do životného prostredia v aktívnej forme⁹.

Súčasný systém čistenia odpadových vôd nie je navrhnutý na dostatočné odstránenie antibiotík, o čom svedčí aj prítomnosť ich rezíduí v rôznych vodných prostrediach¹⁰. Hoci určitý podiel antimikrobiálnych látok sa transformuje alebo degraduje v životnom prostredí, výskyt všetkých tried antibiotík v odpadových vodách bol zaznamenaný v koncentračnom rozmedzí od ng l^{-1} po mg l^{-1} (cit.^{6,7}). Ich koncentračné hladiny v povrchových vodách boli zaznamenané na úrovni niekoľkých desiatok ng l^{-1} , čo v minulosti bolo považované za koncentrácie, ktoré nemajú negatívny dopad na životné prostredie. V súčasnosti je však známe, že aj takéto nízke koncentrácie antibiotík sú schopné nepriaznivo vplyvať na akvakultúru⁵. Prvý hlásený prípad kontaminácie povrchových vôd antibiotikami pochádza z Anglicka z roku 1980, kedy bola detegovaná aspoň jedna zlúčenina z makrolidovej, sulfónamidovej aj tetracyklínovej skupiny antibiotík v riečnej vode o koncentracii $1 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.¹⁰). Z hľadiska monitorovania situácie na Slovensku, výskumníci podrobili analýze odpadovej vody na prítoku aj odtoku z dvoch komunálnych ČOV v Bratislave. Zistili, že z 33 testovaných antibiotík dominovali na prítoku aj odtoku najmä ciprofloxacín, norfloxacín, levofloxacín, klaritromycín a azitromycín. Ostatné antibiotiká boli detegované v nižších koncentráciách. Vody na prítoku do čistiarnie testované vo februári sa vyznačovali značne vysokými koncentraciami ciprofloxacínu ($1350 \pm 150 \text{ ng l}^{-1}$; $2120 \pm 140 \text{ ng l}^{-1}$) v oboch sledovaných ČOV⁷. Iná štúdia uvádza, že vzorky odpadových vôd na odtoku z čistiarnie obsahovali tetracyklín v koncentračnom rozmedzí od 0,14 do $0,56 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.¹¹). Po orálnom podávaní sa sulfametoxazol metabolizuje v ľudskom tele tiež iba čiastočne a približne 45–70 % sa do 24 h vylúči močom. Nakoľko počas čistenia na ČOV dochádza k jeho neúplnej eliminácii, často je detegovaný aj v odtokovej vode či recipientoch v koncentráciách približne $1,9 \mu\text{g l}^{-1}$ (cit.⁶). Počas monitoringu odpadových vôd na Slovensku sa zistilo, že koncentrácie vybraných makrolidov, sulfónamidov a trimetoprimu v odtokových vodách boli podobné koncentraciám zaznamenaným vo vzorkách prítokových vôd. Tieto zistenia korelujú s výsledkami výskumnej skupiny, ktorá taktiež pozorovala slabú mieru eliminácie sulfalazínu a sulfametoxazolu na ČOV. Koncentrácie tetracyklínu v odtokových vodách pochádzajúcich zo slovenských čistiarní sa pohybovali v intervale 3–8 ng l^{-1} (cit.⁷). Monitoring odpadových vôd v Singapure poukázal na vysoké hladiny vankomycínu, ktorého koncentrácia na prítoku

ČOV bola až $43,74 \mu\text{g l}^{-1}$. Počas biologického čistenia však dochádzalo k účinnej eliminácii tohto antibiotika, o čom svedčí jeho neprítomnosť v odtokovej vode. Surová prítoková voda obsahovala aj vysoké hladiny antibiotík tetracyklínovej a β -laktámovej triedy. Koncentrácie β -laktámov sa pohybovali v rozsahu 264,8–6516 ng l^{-1} , pričom obsah β -laktámov novej generácie (meropenému) bol nižší minimálne o jeden rád než obsah 2. generácie β -laktámových antibiotík (amoxicilínu). Taktiež bola zaznamenaná vysoká miera ich eliminácie pomocou kombinovaného systému aktivovaného kalu a membránového bioreaktora v danej ČOV. V porovnaní s inými skupinami antibiotík, linkozamidy a chloramfenikol v prítokovej vode boli detegované na nižších úrovniach v koncentracii do 100 ng l^{-1} . Aj napriek nízkej hladine linkozamidov v odpadových vodách bol zaznamenaný iba nízky stupeň ich odstraňovania počas biologického čistenia. Chloramfenikol bol eliminovaný z odpadových vôd s viac ako 98% účinnosťou¹². Dôsledkom dlhej doby rozkladu niektorých liečiv (biologický polčas rozpadu tetracyklínu je 300 až 500 dní) je ich kumulácia v prostredí, ako aj v potravinovom reťazci. Ako príklad možno uviesť štúdiu, ktorá testovala obsah 32 antibiotík v 97 vzorkách rýb pochádzajúcich z Európy, Afriky a Ázie. Štúdia odhalila, že zo všetkých testovaných antibiotík bolo v 15 vzorkách prítomné aspoň jedno antibiotikum, pričom najčastejšie stanoveným liečivom boli chinolóny¹³.

Počas biologického čistenia sa vytvárajú podmienky vhodné pre rozvoj a šírenie bakteriálnej rezistencie, ktoré sú výsledkom neustáleho kontaktu mikroorganizmov pri dostatočnom množstve živín s antibiotikami v subinhibičných koncentráciách^{14,15}. Antibiotiká v subinhibičných koncentráciách totiž pôsobia ako signálne molekuly a môžu vyvolať tzv. selekčný tlak na prítomné baktérie, v dôsledku čoho dochádza k mutáciám v bakteriálnej DNA s oveľa vyššou frekvenciou v porovnaní s letálnymi koncentraciami^{16–18}. Na druhej strane však do odpadových vôd spolu s ľudskými výkalmi pritekajú aj patogénne a potenciálne patogénne baktérie rezistentné voči antibiotikám, ktoré vďaka horizontálnemu transferu šíria svoje gény rezistencie na citlivé druhy mikroorganizmov cez plazmidy a integróny^{14,19}.

2.2. Biocídy v odpadových vodách

Nevhodné a nadmerné používanie biocídnych látok v rôznych oblastiach vrátane nemocníc, potravinárskeho priemyslu, ale najmä domácností, tiež môže viesť k zvýšeniu tolerancie voči rôznym biocídom. Keďže biocídy sa dostávajú do životného prostredia v nízkych koncentráciách, zvýši sa riziko selekcie rezistentných mikroorganizmov a súbežne sa môže u nich objaviť aj skřížená rezistencia voči antibiotikám^{20,21}.

Medzi najvýznamnejšie biocídy patrí triklozán, ktorý je súčasťou mnohých výrobkov ako sú napríklad mydlá, zubné pasty, dezodoranty, sprchovacie gély, telové krémy a ústne vody^{22,23}. V produktoch každodenného používania vrátane kozmetických výrobkov maximálna povolená kon-

centrácia triklozánu je 0,3 % podľa smernice EÚ pre kozmetické výrobky 76/768/EEC (cit.²⁴).

Vzhľadom k širokému a dlhodobému využívaniu triklozánu sa táto zlúčenina nachádza takmer všade v prostredí, vrátane povrchových a odpadových vôd, pôdy, pitnej vody, ČOV, sedimentov, ako aj materského mlieka, krvi a moču^{22,25}. Štúdie uvádzajú, že z celkového množstva triklozánu pritekajúceho v odpadových vodách na ČOV sa až 79 % eliminuje biodegradáciou a 15 % sorpciou do aktívneho kalu. Napriek tomu, že percento odbúravania triklozánu v čistiarňach je vysoké, jeho koncentrácie v prečistenej vode sú pomerne vysoké (11–98 ng l⁻¹). V rôznych štúdiách sa uvádzajú rôzne koncentračné rozpätia triklozánu (0,07–14 000 µg l⁻¹) na prítoku na ČOV, pričom koncentrácia tohto biocidu v povrchových vodách bola nameraná v koncentráciách 50–2300 ng l⁻¹ a v sedimentoch 1–35 µg l⁻¹ (cit.²⁶). V prípade 58 % vodných prúdov vyšetovaných v USA bola nameraná koncentrácia triklozánu v rozmedzí 0,14 až 2,3 µg l⁻¹ (cit.²⁷). Do odpadových vôd sa dostáva predovšetkým v moči, pričom pri koncentrácii nižšej ako 1 mg l⁻¹ vytvára externý tlak pre selekciu rezistencie voči triklozánu ako aj voči antibiotikám²². Výskyt triklozánu bol stanovený aj v poľnohospodárskych pôdach ako následok hnojenia pôdy biomasou pochádzajúcou z ČOV²³. Zistilo sa, že približne 50 ± 19 % triklozánu pritekajúceho na čistiareň s odpadovými vodami pretrváva v biomase bežných ČOV. Vzorky poľnohospodárskych pôd v Michigane, na ktoré boli predtým aplikované biosolidy, ešte po dvoch rokoch obsahovali triklozán o koncentrácii 0,16–1,02 µg kg⁻¹ (cit.²⁸).

3. Gény rezistencie a baktérie odolné voči antibiotikám v odpadových vodách

Odpadové vody predstavujú najvýznamnejšie rezervuáre baktérií rezistentných voči antibiotikám, ako aj samotných génov rezistencie⁷. Istá štúdia zistila, že až 80,5 % vzoriek stolice pochádzajúcich od zdravých probandov obsahovalo baktérie rezistentné voči antibiotikám. Po ich následnom vyizolovaní bolo 98 % z nich identifikovaných ako *Escherichia coli*. Tieto baktérie sa môžu šíriť do životného prostredia spolu so spracovávanými odpadovými vodami. Napríklad na odtoku z ČOV boli zistené rezistentné koliformné baktérie o koncentrácii 10³ KTJ ml⁻¹, z ktorých 17 % vykazovalo šesťnásobne vyššiu rezistenciu voči antibiotikám²⁹. Súčasné štúdie sú zamerané na patogénne baktérie, ale aj na potenciálne patogénne fekálne indikátorové mikroorganizmy vrátane predstaviteľov čeľade *Enterobacteriaceae*, rodu *Aeromonas* a *Acinetobacter* a tiež druhu *E. coli*, ktoré sú prítomné v odpadových vodách a majú tendenciu prijímať gény kódujúce rezistenciu voči antibiotikám od iných baktérií^{4,30}.

Vo vodnom prostredí bolo zatiaľ identifikovaných 38 génov kódujúcich rezistenciu voči tetracyklínu (*tet*) a 3 gény kódujúce odolnosť voči oxytetracyklínu (*otr*)¹⁷.

Veľmi rozšírené sú aj gény *sul1*, *sul2* a *sul3* kódujúce rôzne typy dihydropteroátsyntáz (DHPS) spôsobujúce odolnosť baktérií voči sulfónamidom. Štúdie zaoberajúce sa detekciou sulfónamid-rezistentných baktérií v odpadových vodách sa zameriavajú na tieto gény, ktoré sa najčastejšie šíria prostredníctvom mobilných genetických elementov^{17,31}. V prípade génov zodpovedných za rezistenciu voči erytromycínu boli v odpadových vodách a biologických ČOV identifikované najmä ribozomálne gény *erm* (*A*, *B*, *C*, *E*, *F*, *T*, *V* a *X*), ktoré kódujú modifikáciu cieľového miesta, ďalej *mef* gény (*A*, *E* a *I*) a *msrA* gény pre efluxné pumpy ako aj *ereA/B* a *mphA* gény pre esterázové enzýmy¹⁷. Predchádzajúce štúdie taktiež uvádzajú, že *Staphylococcus aureus* rezistentný voči meticilínu (MRSA) vykazujúci multirezistenciu ako aj jeho gén *mecA* kódujúci rezistenciu voči β-laktámovým antibiotikám sú rozšírené v komunálnych ČOV, ktoré tým pádom slúžia ako rezervuáre pre ich šírenie do prostredia³². Skupina výskumníkov identifikovala okrem vyššie spomenutých génov aj gény kódujúce rezistenciu voči penicilínom a širokospektrálnym cefalosporínom (*bla_{TEM}*) a gény spojené s rezistenciou voči fluorochinolónom (*qnrS*) v nemocničných odtokoch, ako aj v prítokových a odtokových vodách z ČOV. Kvantitatívna analýza poukázala na to, že kým množstvo *ermB* a *tetW* génov sa znížilo v dôsledku čistenia odpadových vôd, koncentrácia *bla_{TEM}*, *qnrS* a *sulI* bola vyššia v odtokovej vode v porovnaní so vzorkami prítokovej vody¹⁶.

4. Vplyv nemocníc na obsah znečisťujúcich látok v odpadových vodách

Kanalizačné systémy zbierajú odpadové vody nielen z domácností, ale aj z nemocníc, psychiatrických kliník, domovov pre dôchodcov a z ďalších zdravotníckych zariadení, ktoré predstavujú významný zdroj liečiv³³.

Osobitnú kategóriu odpadových vôd predstavujú najmä nemocničné odpadové vody, ktoré sú vysoko nebezpečné z hľadiska infekčného a toxického charakteru. Okrem toho, predstavujú významný zdroj multirezistentných baktérií a antibiotík¹⁶. Komunálne ČOV nie sú špecializované na odstránenie nemocničných kontaminantov a ich odtoky zvyčajne obsahujú ešte stále vysoké hladiny aktívnych molekúl, ktoré sú vylučované do okolitého prostredia³⁴. V rozsiahlej vedeckej štúdií bol hodnotený obsah antibiotík v nemocničných a komunálnych odpadových vodách, úspešnosť ich odbúravania v ČOV a ich následná prítomnosť v riekach prijímajúcich vypustené odpadové vody. Zistilo sa, že aj napriek ich vysokej spotrebe, zlúčeniny patriace do triedy penicilínov a tetracyklínov neboli detegovateľné ani v analyzovaných vzorkách odpadových vôd, ani v riekach, pravdepodobne z dôvodu ich chemickej nestability. V nemocničných odpadoch však bola zaznamenaná veľmi vysoká koncentrácia fluorochinolónov, metronidazolu, sulfametoxazolu a trimetoprimu, zatiaľ čo hladina cefalosporínov, azytro-

mycínu a klaritromycínu bola nižšia v porovnaní s vodami pritekajúcimi na ČOV. Hoci v prípade niektorých látok antimikrobiálneho charakteru bola pozorovaná vysoká účinnosť eliminácie, približne 80 % z nich bolo detegovaných aj v riečnej vode¹⁶. V Českej republike sa taktiež vyšetrovala prítomnosť antibiotík v komunálnych odpadových vodách na prítoku a odtoku ČOV, ako aj v odpadových vodách odtokajúcich z nemocníc. Najvyššiu prevalenciu mali antibiotiká diaminopyrimidinového (trimetoprim), linkozamidového (klindamycín a linkomycín), makrolidového (azitromycín, klaritromycín a erytromycín), fluorochinolónového (ciprofloxacín, enrofloxacin, levofloxacin, norfloxacín a ofloxacín), sulfonamidového (sulfametoxazol, sulfapyridín a sulfadimidín) a tetracyklínového (chlortetracyklín, doxycyklín, oxytetracyklín a tetracyklín) charakteru³⁵.

Nemocničné odpadové vody sú zložitá zmes, ktoré sa často vypúšťajú priamo do vodných zdrojov alebo komunálnej kanalizačnej siete bez účinného predchádzajúceho čistenia³⁶. Skupina vedcov vo svojom prieskume poukázala na 4 až 150× vyššie koncentrácie znečisťujúcich látok v nemocničných odpadových vodách v porovnaní s komunálnymi odpadovými vodami³⁴. Nielen prítomné antibiotiká, ale aj metabolity rôznych cytostatík, psychoaktívnych látok, antidepresív, analgetík alebo liekov používaných na srdcovo-cievne ochorenia môžu viesť k zvýšeniu mutačnej frekvencie a rozvoju mechanizmov rezistencie u mikroorganizmov^{34,36,37}. V týchto odpadových vodách sa môžu nachádzať aj účinné látky vo vyšších koncentráciách, nakoľko lieky sa občas po expirácii tiež priamo kanalizujú³⁷. Tramadol a karbamazepín (lieky používané proti bolesti) ako aj metabolit nikotínu kotinín sú často prítomné v odpadových vodách. Ich koncentrácie boli monitorované v odpadových vodách a zistila sa vysoká prevalencia oboch liečiv. Preukázalo sa, že hladiny tramadolu boli stanovené medzi 413–850 ng l⁻¹, kým koncentrácie kotinínu sa pohybovali v rozmedzí 2270–3950 ng l⁻¹ (cit.^{37,38}). Následne sa testoval vplyv rôznych koncentrácií spomenutých látok prítomných v odpadových vodách ako aj v moči pacientov na vývoj mutácií vedúcich k rezistencii voči ciprofloxacínu u *Salmonella* Typhimurium. Zvýšenie frekvencie mutácií bolo zaznamenané najmä po pôsobení subinhibičných koncentrácií testovaných látok. Okrem čistých substancií bol detegovaný aj samotný príspevok odpadových vôd z nemocníc k rezistencii voči ciprofloxacínu u tohto modelového kmeňa, pričom bol zaznamenaný 1,22–1,69 násobný nárast rezistentného indexu³⁹. V meste Rouen vo Francúzsku bol taktiež analyzovaný odtok z nemocnice a následne porovnávaný s prítokom a odtokom na čistiareň. Najviac koncentrovanými zlúčeninami spomedzi 20 analyzovaných liečiv boli tramadol, venlafaxín, citalopram, kodeín a oxazepam. Koncentrácie týchto liečiv sa v nemocničnom odtoku pohybovali v rozsahu 0,1–2,4 µg l⁻¹ (cit.⁵).

4.1. Nemocničné odtoky ako vektor prenosu bakteriálnej rezistencie

Mikroorganizmy izolované z nemocničného prostredia sú bohaté na rôzne gény rezistencie a v prípade, že sa dostanú do kanalizácie, môžu tieto gény prenášať ďalej na iné bakteriálne druhy⁵. Selektívny tlak antimikrobiálnych látok je v nemocniciach veľmi vysoký, nakoľko 20 až 30 % hospitalizovaných pacientov v Európe dostane počas svojej hospitalizácie antibiotickú liečbu. Okrem toho sa však patogénne mikroorganizmy šíria v nemocničnom prostredí aj prostredníctvom zdravotníckeho personálu. Rezistentné baktérie opúšťajú zdravotnícke zariadenia jednak vďaka už kolonizovaným pacientom, ale aj vďaka kanalizačnému systému. Medzi najdôležitejšie multirezistentné baktérie pochádzajúce z nemocničného prostredia patria predovšetkým *E. coli* produkujúce široké spektrum β-laktamázy (ESBL), enterokoky rezistentné voči vankomycínu (VRE) a *Pseudomonas aeruginosa*. V rokoch 2002 až 2013 sa vo francúzskych nemocniciach zvýšil výskyt ESBL-produkujúcich *E. coli* medzi všetkými enterobaktériami z 19 až na 59 %. Celkový počet *E. coli* v komunálnych aj nemocničných odpadových vodách sa pohybuje medzi 10⁵–10⁶ KTJ ml⁻¹ (cit.⁴⁰). Vo všeobecnosti, síce prevalencia celkových *E. coli* je vyššia v komunálnych odpadových vodách z hľadiska vyššej miery riadenia odpadových vôd v nemocničnom prostredí (vysoká spotreba vody, cca 700 l), podiel ESBL producentov je však oveľa vyšší práve v odpadových vodách pochádzajúcich z nemocníc (3,8–39 %)^{40,41}. *P. aeruginosa* patrí medzi ubikvitárne mikroorganizmy, ktoré sú zodpovedné aj za veľký počet nozokomiálnych infekcií. Nakoľko sa vyznačujú prirodzenou rezistenciou voči mnohým skupinám antibiotík, ľahko si dokážu vybudovať odolnosť aj voči ostatným triedam látok antibiotického charakteru^{42,43}. Na rozdiel od *E. coli*, *P. aeruginosa* nie je súčasťou komenzálnej mikrobioty ľudí, tým pádom jeho frekvencia prenosu medzi hospitalizovanými pacientmi je relatívne nízka. Aj napriek tomu je však prevalencia multirezistentných kmeňov *P. aeruginosa* oveľa vyššia v nemocničných odpadových vodách v porovnaní s komunálnymi odpadovými vodami. Napríklad kmene rezistentné voči ciprofloxacínu, ako aj VIM metalo-β-laktamázy produkujúce izoláty, boli pozorované v odpadových vodách opúšťajúcich nemocničné lokality. Koncentrácie enterokokov sú porovnateľné v komunálnych aj nemocničných odpadových vodách, výskyt VRE je však vyšší v odpadových vodách pochádzajúcich z nemocníc. Kmeň s vysokým epidemiologickým rizikom CC17 *Enterococcus faecium*, ktorý sa spája s nemocničnými VRE epidémiami na celom svete, je tiež nadmerne zastúpený v nemocničných odpadoch⁴⁰.

V odpadových vodách z nemocníc bolo tiež detegované veľké množstvo génov rezistencie ako napríklad *vanA*, *ampC* a iné, ktoré dokazujú výmenu génov kódujúcich rezistenciu medzi predstaviteľmi rodu *Pseudomonas* a *E. coli*⁴⁴. Porovnávané boli vzorky prítokových, odtokových a nemocničných odtokových vôd z hľadiska prítomnosti štyroch génov kódujúcich rezistenciu voči antibioti-

kám (*intI1*, *vanA*, *bla_{TEM}* a *marA*). Celkovo najväčšie množstvo génov (bakteriálnej DNA) bolo zaznamenané v odtokovej vode pochádzajúcej z nemocníc, ale aj vo vode na prítoku ČOV. Odtoková voda obsahovala zhruba o jeden logaritmický rád nižší obsah genetického materiálu, čo svedčí o čiastočnej eliminácii baktérií počas procesu čistenia. Zo všetkých štyroch génových ukazovateľov bol *intI1* prítomný v najhojnejšom počte vo všetkých typoch odpadových vôd. Táto skutočnosť naznačuje, že gén *intI1*, ktorého produkt je nevyhnutný pre inzerciu génov do variabilnej oblasti integrónu, môže byť značne stabilný v odpadových vodách. V porovnaní s vodou pritekajúcou na čistiareň bol v nemocničnej odtokovej vode zaznamenaný významný nárast v prevalencii génu *marA*, ktorý kóduje transkripčný regulátor patriaci do chromozomálneho *mar* regulónu *E. coli* aj ďalších predstaviteľov *Enterobacteriaceae*. Tento typ regulónu sa spája s rezistenciou voči viacerým antibiotikám, dezinfekčným prostriedkom, organickým rozpúšťadlám, oxidačnému stresu a má dôležitú úlohu pri prežívaní v stresových podmienkach. Nemocničná odtoková voda je tiež významným zdrojom génov *bla_{TEM}* a *vanA*, pričom k ich výraznému odstráneniu nedochádza ani po čistení v ČOV. Prítomnosť týchto génov korelovala jednak so stanovenými koncentraciami tetracyklínu a sulfametoxazolu v nemocničnom odtoku, ako aj s výskytom heterotrofných a koliformných baktérií. Prekvapujúcim faktom bola skutočnosť, že *bla_{TEM}* nebol v korelácii s množstvom amoxicilín-rezistentných kmeňov koliformných baktérií, čo naznačuje, že pravdepodobne nie je najbežnejším génom rezistencie u tejto populácie baktérií. Z toho vyplýva, že iné *bla* gény ako napríklad *bla_{CTX-M}* by boli oveľa účinnejšími indikátormi prevalence rezistentných koliformných baktérií⁴⁴.

4.2. Legislatívne riadenie spôsobu odvádzania nemocničných odpadových vôd a možnosti redukcie mikropolutantov z hľadiska prevencie vývoja a šírenia rezistencie do prostredia

Celková produkcia nemocničných odpadových vôd závisí od viacerých faktorov vrátane počtu hospitalizovaných a ambulantných pacientov, počtu lôžok, počtu a typov oddelení, veľkosti objektu, počtu a typov služieb rovnako ako aj od veku zariadenia a nárokov na údržbu, či od ročného obdobia. V Európe existuje približne 2,6 nemocníc na každých 100 000 obyvateľov s priemerným počtom nemocničných lôžok 530, ktoré produkujú až 265 m³/deň odpadových vôd. V Európskej únii (EÚ) neexistuje jednotná smernica, ktorá by určila spôsob odvádzania týchto nemocničných odtokov. Avšak smernica č. 91/271/EEC z 21. mája 1991 o čistení komunálnych odpadových vôd sa považuje za smerodajnú pri regulácii vypúšťania nemocničných odpadových vôd považovaných za priemyselnú odpadovú vodu. V prípade, že sa nemocničné zariadenie považuje na základe právnych predpisov štátu za priemyselné resp. za zariadenie produkujúce aj odpadovú vodu inú než komunálnu ako v Španielsku alebo vo Francúzsku, vyžaduje sa znalosť

špecifických parametrov odpadovej vody pre povolenie jej vypúšťania do komunálnej ČOV. Špecifické parametre sledované v odpadových vodách zahŕňajú napríklad pH hodnotu, teplotu, chemickú spotrebu kyslíka, biochemickú spotrebu kyslíka, obsah celkových nerozpustných látok, adsorbovateľných organických halogénov, celkového a voľného chlóru, detergentov, dezinfekčných prostriedkov, tukov, olejov, síranov, kyanidov, organofosfátov, celkového dusíka, ťažkých kovov, zriedka aj mikrobiologických indikátorov (celkové a fekálne koliformné baktérie, *E. coli*) a toxicitu. Najčastejšie sa vyžaduje aj predchádzajúce čistenie odpadovej vody takéhoto typu. Na rozdiel od toho, v krajinách kde nemocničné odpadové vody sú považované za komunálne, ako napríklad v Nemecku, ani povolenie, ani sledovanie špecifických vlastností nie sú potrebné. V ostatných prípadoch, ak charakter odpadových vôd pochádzajúcich z nemocničných zariadení je v súlade so špecifickými parametrami určenými príslušnou čistiarnou, odpadová voda sa môže považovať za komunálnu, a vypúšťa sa do ČOV bez akéhokoľvek predbežného spracovania. Pri prekročení limitov indikátorových parametrov však odpadová voda musí byť prečistená pred vypúšťaním do ČOV (napríklad v Taliansku). Okrem toho, smernica č. 2008/98/EC o nakladaní s nebezpečnými odpadmi, ako aj zoznam nebezpečných odpadov podľa Európskeho rozhodnutia č. 2000/532/CEE uvádzajú, že niektoré kvapalné odpady pochádzajúce z nemocníc (farmaceutické výrobky, lieky, rezíduá rozpúšťadiel, mydlá, nehalogénované organické látky, atď.) nesmú byť vypúšťané do splaškovej kanalizácie priamo, ale treba ich čistiť a likvidovať samostatne. Všetky členské štáty EÚ by však mali mať vlastnú legislatívu a kritériá pre hodnotenie kvality ako aj riadenie odpadových vôd pochádzajúcich z nemocníc⁴¹. Spôsob odvádzania a čistenia odpadových vôd zo zdravotníckych zariadení v Českej republike upravuje technická norma ČSN 75 6406 platná od roku 1996 (cit.⁴⁵). V Slovenskej republike existuje vyhláška č. 553/2007 Z.z. Ministerstva zdravotníctva SR platná od roku 2007, ktorá stanovuje, že odpadové vody zo zdravotníckych zariadení sa vypúšťajú do verejnej kanalizácie. V prípade, že nezodpovedajú podmienkam podľa kanalizačného poriadku, musia sa prečistiť v samostatných zariadeniach⁴⁶.

Vedci poukazujú na to, že priamym čistením nemocničných odpadových vôd by dochádzalo k redukcii zaťaženia životného prostredia farmaceutikami. Rozvoj nových technológií na ČOV, ako aj čistenie nemocničných odpadov priamo v nemocniciach sú dvomi hlavnými možnými riešeniami tohto problému³⁴. Pred ich vtokom na komunálnu čistiareň je potrebná chlorácia celého prietoku nemocničného odpadu, inokedy len v prípade infekčných oddelení⁴⁷. V niektorých európskych krajinách ako napríklad vo Francúzsku už boli skonštruované aj ČOV špecializované na čistenie nemocničných odpadových vôd, aby nedochádzalo k ich miešaniu s komunálnym odpadom³⁴.

Keďže sa preukázalo, že klasické čistenie zahrňuje mechanické a biologické procesy v prípade odpadových vôd pochádzajúcich z nemocníc nie je dostatočne účinné,

výskumníci neustále venujú pozornosť možnostiam využitia nových degradačných postupov. Ako príklad takýchto postupov možno uviesť využitie membránových reaktorov, Fentónovej reakcie, ozonizácie, ultrazvuku, heterogénnej katalýzy, vodných rastlín a adsorpcie na aktívne uhlie. Biomembránové reaktory schopné eliminovať aj zložitejšie organické molekuly pomocou aktivovaného kalu sú pomerne často využívané. Z hľadiska vývoja rezistencie sú však nevýhodné, nakoľko pri dlhodobom kontakte mikropolutantov s kalom sa zvýši riziko vzniku rezistentných baktérií. Súčasný pokrok v oblasti vývoja nových technológií ponúka pri degradácii mikropolutantov v odpadových vodách aj využitie bórom dopovaných diamantových elektród. Ich výhoda spočíva v produkcii radikálových foriem kyslíka (hydroxylový radikál, singletový kyslík) pri dezinfekcii odpadových vôd⁵.

5. Záver

Ako dôležitý problém súčasnej doby sa javí nedostačujúca eliminácia mikropolutantov v odpadových vodách počas ich čistenia, o čom svedčí hlavne zvýšená prevalencia rezistentných baktérií či reziduí antibiotík vo vodných recipientoch a v prostredí. Odpadové vody pochádzajúce z nemocníc a zdravotníckych zariadení, ktoré okrem antibiotík obsahujú aj metabolity rôznych cytostatík, analgetík, psychoaktívnych látok a antidepresív môžu výrazne zvýšiť frekvenciu mutácií ako mieru rozvoja mechanizmov rezistencie u mikroorganizmov. Komunálne ČOV však nie sú špecializované na odstránenie kontaminantov takéhoto typu, z čoho vyplýva, že ich odtoky obsahujú vysoké hladiny aktívnych molekúl, ktoré sa následne vypúšťajú do ekosystému.

Prítomnosť liečiv i rezistentných baktérií v komunálnych a nemocničných odpadových vodách sa považuje za hlavný faktor prispievajúci k potenciovaniu diseminácie mikrobiálnej rezistencie do prostredia. Aby sa minimalizovalo zaťaženie odtokových vôd znečisťujúcimi látkami a patogénnymi mikroorganizmami, je potrebná implementácia dodatočných opatrení s cieľom zlepšenia ochrany životného prostredia.

LITERATÚRA

- Morera S., Corominas L., Poch M., Aldaya M. M., Comas J.: *J. Clean. Prod.* 112, 4741 (2016).
- Sharma V. K., Johnson N., Cizmas L., McDonald T. J., Kim H.: *Chemosphere* 150, 702 (2015).
- Maal-Bared R., Bartlett K. H., Bowie W. R., Hall E. R.: *Sci. Total Environ.* 443, 315 (2013).
- Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E.: *Ecotox. Environ. Safe* 91, 1 (2013).
- Mackuľák T., Bodík I., Bírošová L.: *Drogy a liečivá ako mikropolutanty*. Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave, 2016.
- Collado N., Buttiglieri G., Marti E., Ferrando-Climent L., Rodriguez-Mozaz S., Barceló D., Comas J., Rodriguez-Roda I.: *Chemosphere* 93, 99 (2013).
- Bírošová L., Mackuľák T., Bodík I., Ryba J., Škubák J., Grabic R.: *Sci. Total Environ.* 490, 440 (2014).
- Chen C., Li J., Chen P., Ding R., Zhang P., Li X.: *Environ. Pollut.* 193, 94 (2014).
- Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A.: *Chemosphere* 65, 725 (2006).
- Mutyar P. K., Mittal A. K.: *Environ. Monit. Assess.* 186, 541 (2014).
- Kim S., Jensen J. N., Aga D. S., Weber A. S.: *Chemosphere* 66, 1643 (2007).
- Tran N. H., Chen H., Reinhard M., Mao F., Gin K. Y.-H.: *Water Res.* 104, 461 (2016).
- Fedorova G., Nebesky V., Randak T., Grabic R.: *Chem. Pap.* 68, 29 (2014).
- Makowska N., Koczura R., Mokracka J.: *Chemosphere* 144, 1665 (2016).
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M. C., Michael I., Fatta-Cassinis D.: *Sci. Total Environ.* 447, 345 (2013).
- Rodriguez-Mozaz S., Chamorro S., Marti E., Huerta B., Gros M., Sàncnes-Melsió A., Borrego C. M., Barceló D., Balcázar J. L.: *Water Res.* 69, 234 (2015).
- Aydiñ S., Ince B., Ince O.: *Water Res.* 83, 337 (2015).
- Akiyama T., Savin M. C.: *Sci. Total Environ.* 408, 6192 (2010).
- Baquero F., Martínez J.-L., Cantón R.: *Curr. Opin. Biotech.* 19, 260 (2008).
- Kalkanci A., Elli M., Fouad A. A., Yesilyurt E., Khalil I. J.: *J. Mycol. Med.* 25, 280 (2015).
- Lerma L. L., Benomar N., Muñoz M. C. C., Gálvez A., Abriouel H.: *Food Microbiol.* 51, 33 (2015).
- Carey D. E., McNamara P.: *Front. Microbiol.* 5, 1 (2015).
- Kim Y.-M., Murugesan K., Schmidt S., Bokare V., Jeon J.-R., Kim E.-J., Chang Y.-S.: *Bioresour. Technol.* 102, 2206 (2011).
- Pintado-Herrera M. G., González-Mazo E., Lara-Martín P. A.: *Chemosphere* 95, 478 (2014).
- Lee D. G., Chu K.-H.: *Chemosphere* 93, 1904 (2013).
- Baková A.: *Bakalárska práca*. Slovenská technická univerzita, Bratislava 2015.
- Lee D. G., Zhao F., Rezenom Y. H., Russell D. H., Chu K.-H.: *Water Res.* 46, 4226 (2012).
- Scientific Committee on Consumer Safety: Opinion on triclosan. Antimicrobial resistance, SCCP/1251/09 (EU 2010).
- Reinthal F. F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckebauer G., Mascher F., Marth E.: *Water Res.* 37, 1685 (2003).
- Zhang S., Han B., Gu J., Wang C., Wang P., Ma Y., Cao J., He Z.: *Chemosphere* 135, 138 (2015).
- Ou D., Chen B., Bai R., Song P., Lin H.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 12104 (2015).
- Wan M. T., Chou C. C.: *Water Res.* 64, 288 (2014).
- Mackuľák T., Nagyová K., Faberová M., Grabic R., Koba O., Gál M., Bírošová L.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 492 (2015).

34. Chonova T., Keck F., Labanowski J., Montuelle B., Rimet F., Bouchez A.: *Sci. Total Environ.* 542, 965 (2016).
35. Carvalho I. T., Santos L.: *Environ. Int.* 94, 736 (2016).
36. Somensi C. A., Souza A. L. F., Simionatto E. L., Gaspareto P., Millet M., Radetski C. M.: *J. Environ. Manage.* 162, 74 (2015).
37. Mackuľak T., Mosný M., Škubák J., Grabic R., Birošová L.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 969 (2015).
38. Mackuľak T., Birošová L., Grabic R., Škubák J., Bodík I.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 14000 (2015).
39. Holík B.: *Bakalárska práca*. Slovenská technická univerzita, Bratislava 2015.
40. Hocquet D., Muller A., Bertrand X.: *J. Hosp. Infect.* 93, 395 (2016).
41. Carraro E., Bonetta S., Bertino C., Lorenzi E., Bonetta S., Gilli G.: *J. Environ. Manage.* 168, 185 (2016).
42. Fuentesfria D. B., Ferreira A. E., Corção G.: *J. Environ. Manage.* 92, 250 (2011).
43. Deredjian A., Colinon C., Brothier E., Favre-Bonté S., Cournoyer B., Nazaret S.: *Res. Microbiol.* 162, 689 (2011).
44. Narciso-Da-Rocha C., Varela A. R., Schwartz T., Nunes O. C., Manaia C. M.: *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 309 (2014).
45. ČSN 75 6406: *Odvádění a čišťení odpadních vod ze zdravotnických zařízení*. Duben 1996.
46. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky: *Vyhľadška o požiadavkách na prevádzku zdravotníckych*

zariadení z hľadiska ochrany zdravia, 553/2007 Z.z. (Ministerstvo zdravotníctva SR 2007).

47. Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D.: *J. Hydrol.* 389, 416 (2010).

K. Lépesová^a, T. Mackuľak^b, and L. Birošová^a
^a*Department of Nutrition and Food Quality Assessment,*
^b*Department of Environmental Engineering, Institute of Chemical and Environmental Engineering, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava):* **Effect of Wastewater Pollution on the Development and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria**

Positive correlation between the high antibiotic consumption and the development of antibiotic resistance was confirmed throughout the world. The most important reservoirs of resistant bacteria and resistance genes are municipal and hospital wastewaters inflowing to the wastewater treatment plants (WWTPs). On the other hand, antibiotics get into wastewater in human urine and their subinhibitory concentrations generate a selective pressure on microorganisms in wastewater; thus, mutations leading to antibiotic resistance may occur. Nowadays, the prevalence and persistence of antibiotic resistance in bacterial pathogens have become an emerging threat to public health.