

Vliv adaptace aktivovaného kalu na biodegradaci antibiotik a akumulaci genů resistance

Effect of activated sludge adaptation on biodegradation of antibiotics and accumulation of resistance genes

Ivan Karpíšek | Jitka Zachová | Dana Vejmelková | Vladimír Sýkora

INFORMACE O ČLÁNKU

DOI

10.35933/ENTECHO.2019.06.001

HISTORIE

Datum doručení: 13. 3. 2019

Datum revize: 22. 5. 2019

Datum akceptace: 4. 6. 2019

AFILACE

VŠCHT Praha

Technická 5, 166 28 Praha 6

karpisei@vscht.cz

tel.: +420220443228

KLÍČOVÁ SLOVA

antibiotika;
antibiotická resistance;
aktivovaný kal;
biologická rozložitelnost, PCCPs

KEYWORDS

antibiotics, antibiotic resistance,
activated sludge,
biodegradation, PCCPs

ABSTRAKT

Aktivovaný kal na čistírnách odpadních vod je neustále vystavován nízkým koncentracím antimikrobiálních látek a dalších léčiv. To vyvolává otázku, jak mikroorganismy k těmto látkám na čistírně odpadních vod přistupují. Zda jsou schopny se v tomto prostředí na tyto látky adaptovat, degradovat je, případně je využít jako substrát. Nebo jestli jsou tyto látky aktivovaným kalem opomíjeny.

Pro posouzení adaptace aktivovaného kalu byla využita metoda PCR pro sledování genů resistance a testy biologické rozložitelnosti. Pro testy byl využit aktivovaný kal z ČOV a kal adaptovaný v laboratorních SBR modelech při koncentracích antibiotik $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ a $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Biologická rozložitelnost byla posuzována dle normy ČSN ISO 14593. Testované látky byly sledovány pomocí skupinového stanovení celkového anorganického uhlíku. Jako testované látky byly vybrány: benzylpenicilin, ampicilin, streptomycin, erythromycin, chloramfenikol, sulfamethoxazol a trimetoprim.

Aktivovaný kal z čistírny odpadních vod neměl vyvinutou aktivitu k biodegradaci testovaných antibiotik. Je pravděpodobné, že vysoké zatížení snadno biologicky rozložitelným substrátem a krátké zdržení odpadní vody na ČOV, vede k tomu, že mikroorganismy aktivovaného kalu nejsou nuceny tyto látky aktivně využít a brání se jim pouze tvorbou obranných mechanismů pomocí genů antibiotické resistance. Nízké koncentrace antibiotik v SBR modelech vytvářely selekční tlak na mikroorganismy a podněcovaly šíření genů antibiotické resistance.

ABSTRACT

Activated sludge in wastewater treatment plants is constantly exposed to low concentrations of antimicrobials and other drugs. This raises the question of how microorganisms approach to these substances in the sewage treatment plant. Whether they can adapt, degrade, or use antibiotics as a substrate in this environment or the activated sludge neglects these substances.

To assess the adaptation of activated sludge, the PCR method for monitoring antibiotic resistance genes and biodegradability tests were used. These tests were carried out with activated sludge from WWTP and sludge adapted in laboratory SBR models at $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of chosen antibiotics. Their biodegradability was assessed according to ČSN ISO 14593. The tested substances were monitored by group determination of total inorganic carbon. The chosen substances were: benzylpenicillin, ampicillin, streptomycin, erythromycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole and trimethoprim.

Activated sludge had no developed activity for biodegradation of tested antibiotics. It is likely that the high load of readily biodegradable substrate and the short retention of the wastewater at the WWTP lead to the activated sludge not being forced to actively utilize these substances and will only prevent from them by forming defence mechanisms using antibiotic resistance genes. Low concentrations of antibiotics in SBR models produced selective pressure on microorganisms and stimulated the spread of antibiotic resistance genes.

1 Úvod

Antibiotika jsou jedny z nejdůležitějších léčivých látek v moderní medicíně. Používají se k léčení bakteriálních infekcí u lidí, zvířat i rostlin. Inhibují bakteriální metabolismus a tím potlačují bakteriální růst, nebo

bakteriální buňku přímo usmrcují, což vede ke snížení počtu těchto mikroorganismů (Kümmerer, 2009a). Jelikož mají antibiotika přímý účinek na mikroorganismy, tak mají silný potenciál k ovlivnění ekosystému. Vychýlení rovnováhy v přirozených mikrobiálních komunitách může mít významný vliv na životní prostředí (Kümmerer, 2009b).

Hlavním zdrojem residuí antibiotik v povrchových vodách jsou komunální odpadní vody. Jestliže antibiotika nejsou odstraněna na čistírnách odpadních vod, pronikají do povrchových vod a dále do životního prostředí, kde tyto ekosystémy mohou ovlivňovat. Vedle primárních látek mohou do životního prostředí vstupovat i jejich metabolity a další degradační produkty (hydrolyza, fotodegradace aj.), které stále mohou být biologicky aktivní a toxické. Rozložitelnost různých druhů antibiotik je velice rozdílná od snadno biologicky rozložitelných látek podléhající úplné mineralizace jako benzylpenicilin, až po persistentní látky jako trimetoprim (Kümmerer, 2003).

Tendenci k degradaci na ČOV se antibiotika sledovaná v této práci velice liší. Betalaktamy benzylpenicilin a ampicilin nejsou obvykle na ČOV detekovány, nejspíše z toho důvodu, že betalaktamový kruh (v závislosti na pH a struktuře daného betalaktamu) podléhá hydrolyze. Peniciliny vhodné pro perorální užití, mezi které patří i ampicilin, jsou proti hydrolyze odolnější, proto jsou stabilnější i na ČOV. Beta-laktamový kruh u těchto látek může být rozštěpen a tím inaktivován extracelulárními betalaktamázi, které jsou produkovány některými typy bakterií resistantních na betalaktamy. Dalším důvodem, proč tyto látky nemusí být detekovány na ČOV, by mohla být jejich problematická stanovitelnost pomocí hmotnostní spektroskopie (Kümmerer, 2009b). Z penicilinových antibiotik bývá občasně detekován na ČOV a v povrchových vodách amoxicilin v koncentracích řádově $10^1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Brar, 2011). Během rozkladu betalaktamů vzniká kyselina penicilínová a penicilová. Biodegradace končí úplnou mineralizací (Kümmerer, 2009b). Betalaktamy nejsou považovány za problematické polutanty, jelikož snadno podléhají biotickému i abiotickému rozkladu. Ze všech antibiotik však pokrývají více jak 70 % celkové spotřeby, proto je nelze zcela přehlížet. Jejich vliv se může projevit zejména na ČOV v souvislosti s antibiotickou resistencí.

Streptomycin se vzhledem k rychlému růstu antibiotické resistance již pro léčbu lidí nevyužívá. Je pouze součástí antibiotické směsi na léčbu tuberkulózy. Hojně se však využívá v zemědělství, zejména pro pěstování ovoce a pro chov ryb. Z tohoto důvodu není detekován na ČOV, ale může se sezónně vyskytovat v povrchových vodách vlivem splachu zemědělských oblastí během přívalových dešťů. Dle databáze <https://toxnet.nlm.nih.gov> je streptomycin z organismu obvykle vylučován v nezměněné formě a informace o biodegradaci nebyly nalezeny. Rozklad streptomycinu je navržen v práci (Shen et al., 2017), autor se v práci věnuje převážně abiotické degradaci. Jako jeden z možných metabolitů streptomycinu je streptidin (Granados and Meza Ruiz, 2005), ačkoli tato práce je zaměřená na klinické testy, nikoli na osud látky v životním prostředí.

Od použití chloramfenikolu se již v minulosti upustilo vzhledem k jeho nežádoucím účinkům na kostní dřeň a riziku vzniku aplastické anémie, přesto má v medicíně stále své místo jako léčivo poslední volby díky jeho širokospektrému účinku a velice dobré farmakokinetice. Na ČOV v Evropě z tohoto důvodu již obvykle detekován nebývá. Na základě čínské studie (Peng et al., 2006) je odstranění chloramfenikolu na ČOV pravděpodobně úplné. Biodegradace chloramfenikolu byla navržena v práci (Smith et al., 2007), probíhala skrze redukci nitroskupiny s finálním metabolitem iminochinonem.

Erythromycin dnes již nemá velké využití, jeho význam přetrvává převážně jako lék na léčbu akné a je součástí antibiotických mastí. Z tohoto důvodu se však do vod může dostávat přímo bez předchozí mineralizace v organismu a znečišťovat šedé nebo i rekreační vody. Ve vodním prostředí erythromycin váže další molekulu vody a obvykle se označuje jako erythromycin- H_2O . Přestože se erythromycin používá poměrně málo, stále ho v odpadních vodách nalézáme v koncentracích řádově $10^1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ a na ČOV se odstraní přibližně z 30 % (Tylová et al., 2013).

Sulfamethoxazol a trimetoprim se ve většině případů předepisují v kombinaci pod obchodním názvem cotrimoxazol na léčbu zánětu močových cest, případně horních cest dýchacích. Trimetoprim je silně persistentní látka. Na ČOV je detekován v koncentracích 10^2 – $10^3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ a v podstatě není odstraňován. V práci slovenských autorů (Birošová

et al., 2014) bylo detekováno na přítoku $99 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \pm 11 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ a na odtoku $87 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \pm 6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. V práci německých autorů (Rossmann et al., 2014) bylo stanoveno na přítoku $186 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, a na odtoku dokonce vyšší koncentrace $208 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Trimetoprim podléhá pouze menším změnám na etherových nebo amonných funkčních skupinách (Bergh et al., 1989). Sulfamethoxazol je jedno z nejčastěji detekovaných antibiotik a obecně léčí v životním prostředí. Sulfonamidy jsou ze všech antibiotik předepisovány z více jak 20 % a jsou vysoce odolné proti rozkladu (Kümmerer, 2009a; Brar, 2011). Degradace sulfonamidů je poměrně dobře probádána, pravděpodobně i z toho důvodu, že sulfamethoxazol má velice dobrou odezvu při stanovení hmotnostní spektrometrií. V práci (Tylová et al., 2013) bylo v České republice detekováno $550 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ sulfamethoxazolu na odtoku z ČOV, který byl odstraněn z cca 20 %. Sulfamethoxazol je látka, u které můžeme často pozorovat vyšší výskyt na odtoku z ČOV než na přítoku, jelikož u něj může docházet k reverzibilní oxidaci amonných skupin, které se v anoxické části mohou redukovat zpět. Během mineralizace a degradace mohou vznikat následující metabolity: N^4 -hydroxy-sulfamethoxazol, N^4 -acetyl-sulfamethoxazol, N^4 -nitro-sulfamethoxazol, desamino-sulfamethoxazol, 4-aminobenzensulfamethoxazol, anilin (García-Galán et al., 2008; Bonvin et al., 2012; Jiang et al., 2014).

Data o odstranění léčiv na konvenčních ČOV jsou poměrně nekonzistentní. Obecně se píše, že léčiva se na ČOV odstraní z 90–99,9 %, ale odstranitelnost různých typů léčiv se může pohybovat mezi 0–100 %. (Miège et al., 2009; Wanner et al., 2011). Účinnost odstranění se může lišit i na základě technologického uspořádání a technologických parametrů. Významnými parametry jsou například doba zdržení aktivovaného kalu nebo odpadní vody ad. Biodegradace některých léčiv lépe probíhá v přítomnosti nitrifikačních bakterií.

Odstranění těchto látek na ČOV může probíhat různými procesy: biodegradací, sorpcí, hydrolyzou aj. a nelze vždy jasně určit, který z těchto procesů se na odstranění látky podílel a jakého stupně degradace bylo dosaženo. Může vznikat široké spektrum stabilních metabolitů, které jsou stále biologicky aktivní a které není možné v dnešní době efektivně sledovat. Odstranění primární látky nemusí v některých případech přímo znamenat zlepšení stavu odpadní vody. Proto je důležité rozšiřovat informace o degradaci těchto polutantů za různých podmínek a různými metodami a ideálně tyto informace i přehledně evidovat. Sledování degradace pomocí selektivních a skupinových metod stanovení, může poskytnout velice užitečné informace o osudu těchto látek v životním prostředí i na ČOV.

Informace o biologické rozložitelnosti léčiv a dalších mikropolutantů jsou pro sledování a predikci jejich osudu v životním prostředí zcela zásadní. Hlavní faktor ovlivňující jejich stabilitu ve vodách a půdách je přítomnost a aktivita mikroorganismů se schopností rozkládat danou látku. Biodegradace může probíhat metabolickými a kometabolickými drahami. Metabolická dráha ukazuje na využití dané chemikálie jako zdroj energie, uhlíku a jiných nutrientů, zatímco kometabolismus je spojen s náhodným rozkladem vlivem enzymu nebo kofaktoru, který je vytvářen během metabolismu jiného substrátu. V některých případech opakovaná expozice těchto látek vodním a půdním mikroorganismům může posílit jejich biodegradaci aktivitu a tím urychlit nebo umožnit biologický rozklad. Dalšími faktory ovlivňujícími osud a podílejícími se na stabilitě residuí léčiv v prostředí jsou fyzikálně chemické vlastnosti farmaka a environmentální faktory (světlo, teplota, pH, roční období aj.), s nimiž se pojí důležité abiotické degradační procesy fotodegradace a hydrolyza (Barra Caracciolo et al., 2015). I když většina léčiv se z prostředí odstraní přirozenou cestou, uchovávají si pseudo-persistentní charakter, protože je do životního prostředí neustále vypouštíme (Ducey a Sapkota, 2010).

Pro charakterizaci biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí jsou dnes platné směrnice OECD 301, 302, 303 a 308 a z nich vycházející národní normy (Kümmerer, 2009a). U nás jsou pro tyto účely nejvhodnější normy ČSN EN ISO 9888 (ZW test), ČSN ISO 14593 (HS test) a ČSN ISO 10707 (BSK test). Princip těchto metod je

stejný, testovaná látka je jediným zdrojem organického uhlíku a energie pro směsnou kulturu mikroorganismů. Liší se způsobem provedení, koncentrací inokula a testované látky a analytickou koncovkou. V rámci zkoušek se vedle biodegradace testované látky sleduje i chování samotného inokula jako slepý pokus, aktivita inokula pomocí snadno rozložitelné standardní látky, inhibiční působení testované látky na mikroorganismy a případné abiotické děje. Úbytek testované látky se stanovuje pomocí následujících skupinových stanovení organických látek: $CHSK_{Cr}$ (chemická spotřeba kyslíku dichromanem draselným), TOC (celkový organický uhlík), TIC (celkový anorganický uhlík) a BSK (biochemická spotřeba kyslíku).

S výskytem antibiotik v životním prostředí se pojí jeden z největších problémů moderní společnosti, resistance patogenních mikroorganismů na antimikrobiální látky. Omezený počet známých mechanismů, jakým antibiotika účinkují, způsobuje relativně snadný vznik odolnosti (Brar, 2011). Známe dva způsoby selekce resistantních mikroorganismů, a to mutaci a plazmidovou resistenci. Při mutaci dochází ke vzniku buněk s náhodnou mutací DNA, díky níž se stávají necitlivé proti danému antibiotiku (Kümmerer, 2004). Plazmidová resistance je kódovaná v tzv. mobilních genetických elementech, které poskytují danému mikroorganismu evoluční výhodu. Buňky disponují mechanismy, které zajišťují přenos plazmidu do další generace (vertikální přenos). Zároveň je možné, aby se plazmidy šířily i z buňky do buňky, jelikož se vyskytují volně v cytoplasmě (horizontální přenos) (Snyder a Champness, 2007). Jeden plazmid může kódovat odolnost i proti více antibiotikům najednou a buňka může vlastnit i více mobilních genetických elementů zároveň, což umožňuje tvorbu multiresistentních kmenů (Kümmerer, 2004). Vliv plošného výskytu antibiotik v životním prostředí na tvorbu resistantních bakteriálních kmenů není objasněn, ale předpokládá se, že tvorbu odolnosti podporuje. Nasvědčuje tomu zvýšený výskyt resistantních mikroorganismů za odtoky z čistíren odpadních vod. Další problém spojený s výskytem antibiotik v životním prostředí je vliv na přirozeně se vyskytující mikroorganismy a ovlivnění mikrobiální diverzity a s ní spojený negativní vliv na samočisticí procesy a účinnost biologických čistíren odpadních vod (Escher et al., 2011). Villa-Costa (Vila-Costa et al., 2017) navrhuje dva mechanismy, jak se mikroorganismy mohou antibiotikům bránit: biodegradací a šířením genů antibiotické resistance. V práci byl měřen výskyt genů resistance *sul1* a *sul2* a degradace sulfonamidů. Z výsledků vychází, že za těchto podmínek se mikroorganismy brání nízkým koncentracím sulfonamidů šířením genů resistance a vyšším koncentracím sulfonamidů biodegradací antibiotika.

2 Metodika práce

V této práci byla sledována biologická rozložitelnost vybraných antibiotik neadaptovaným kalem odebraným z ČOV a kalem předem adaptovaným na testovanou látku v SBR laboratorních modelech a výsledky byly mezi sebou porovnány. Bylo sledováno následujících sedm antibiotik: benzylpenicilin, ampicilin, streptomycin, erythromycin, chloramfenikol, sulfamethoxazol a trimetoprim. Pro testy byly využity standardy pro mikrobiologické testy od firmy Sigma-Aldrich. Dále byly detekovány geny antibiotické resistance na peniciliny (kódující beta-laktamázy) a sulfonamidy (kódující dihydropteroát syntázu, která snižuje afinitu cílové struktury na daném enzymu k sulfonamidům).

Biologická rozložitelnost byla posuzována pomocí standardizovaného testu dle normy: ČSN ISO 14593 – Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvíčkách (CO_2 headspace test).

Zkoušená látka byla dávkována tak, aby počáteční koncentrace celkového organického uhlíku byla $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Jako inokulum byl použit aktivovaný kal z ČOV a kal adaptovaný v laboratorních modelech. Aktivovaný kal byl dávkován tak, aby konečná koncentrace sušiny v modelu byla $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

U každého testu byly sledovány modely pro slepý pokus, kontrolu aktivity inokula na standardní látku benzoan sodný, biodegradaci testované látky a test inhibice, který obsahoval zkoumanou sloučeninu a benzoan sodný v poměru celkového organického uhlíku 1:1. U testů s adaptovaným kalem nebyl prováděn test inhibice.

Během testů bylo postupováno s následujícími odchylkami od norem. Při přípravě minerálního média byl chlorid amonný dávkován ve formě samostatného roztoku. Inkubace probíhala v reagenčních lahvíčkách o objemu 250 mL namísto 160 mL a byl zachován předepsaný poměr mezi kapalnou a plynou fází. Pro přeměnu oxidu uhličitého na uhličitany byl používán úměrně menší objem roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ místo $7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, z důvodu omezení rozpustnosti oxidu uhličitého v roztoku a tím snížení koncentrace TIC slepého stanovení (Macharová a Sýkora, 2007). Pro udržení rovnováhy mezi kapalnou a plynou fází během testu byly využity magnetické míchačky namísto laboratorních třepáček. Při výpočtu stupně biologického rozkladu v čase t byla vždy od hodnoty TIC v čase t u zkoušené látky a slepého pokusu odečtena koncentrace TIC v čase 0 kvůli korekci výpočtu na skutečnou počáteční koncentraci. Stupeň biodegradace D_T byl vypočítán dle rovnice 1 (Macharová a Sýkora, 2007).

$$D_T = \frac{(TIC_{Lt} - TIC_{L0}) - (TIC_{Bt} - TIC_{B0})}{TOC_0} \cdot 100\% \quad (1)$$

Kde TIC_{Lt} je koncentrace anorganického uhlíku v modelu s testovanou látkou v čase t , TIC_{L0} je koncentrace anorganického uhlíku v modelu s testovanou látkou v čase 0, TIC_{Bt} je koncentrace anorganického uhlíku ve slepém pokusu v čase t , TIC_{B0} je koncentrace anorganického uhlíku ve slepém pokusu v čase 0 a TOC_0 je koncentrace organického uhlíku na počátku testu.

Hodnoty TIC byly stanoveny vždy ze tří nezávislých stanovení se směrodatnou odchylkou nižší než 2%. Intervaly spolehlivosti naznačené na grafech chybovými úsečkami byly vyhodnoceny pomocí studentova rozdělení na 5% hladině významnosti ze dvou až tří opakování (dle výsledné směrodatné odchylky jednotlivých stanovení). V případě benzylpenicilinu, chloramfenikolu a sulfamethoxazolu byly intervaly spolehlivosti vypočítány ze všech hodnot získaných pro testy adaptovaných kalů, jelikož na základě výsledků byl vliv adaptace při obou podmínkách obdobný.

Adaptace aktivovaného kalu byla prováděna v laboratorních SBR modelech o objemu 1 L, s jednodenním cyklem, s denním přítokem $0,5 \text{ L}$, se zdržením aktivovaného kalu 20 dní, s denním přítokem methanolu $260 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($CHSK$) a peptonu $550 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ($CHSK$). Pro udržení stabilního pH byl dávkován fosforečnanový tlumivý roztok. Kal byl adaptován na dvou koncentračních hladinách testovaných antibiotik $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ a $500 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$.

Geny resistance na antibiotika (ARG, *Antibiotic Resistance Genes*) byly detekovány metodou PCR. Použité primery jsou shrnuty v tab. 1. DNA byla izolována pomocí kitu DNA PowerSoil (Qiagen).

Pufr, $MgCl_2$, dNTP a polymeráza byly použity od firmy Roche (FastStart Taq DNA Polymerase, dNTP pack). Přidávané BSA (Sigma-Aldrich) bylo naředěno na $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Přidávané primery měly koncentraci $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a byly syntetizovány u Sigma-Aldrich (Vejmelková et al., 2018).

Multiplex metoda byla připravena zvlášť pro ARG na betalaktamy a sulfonamidy. Do PCR směsi byla přidána výše zmíněná činidla v daných objemech: $2,5 \mu\text{L}$ pufru, $1,6 \mu\text{L}$ $MgCl_2$, $1,5 \mu\text{L}$ BSA, $0,75 \mu\text{L}$ dNTP, $0,5 \mu\text{L}$ od každého primeru a $0,3 \mu\text{L}$ polymerázy. Činidla byla přidána do vody s PCR čistotou o takovém objemu, aby konečný objem byl $24 \mu\text{L}$. K mastermixu byl přidán vždy $1 \mu\text{L}$ roztoku izolované DNA. Směs byla po promíchání vložena do termocyklu VWR Doppio a byl spuštěn příslušný program. Součástí každé PCR byla pozitivní a negativní kontrola (Vejmelková et al., 2018).

Tabulka 1: Seznam použitých primerů pro PCR (upraveno dle Vejmelková et al., 2018)

| Použitý pár primerů | F-primer a R-primer | Velikost PCR produktu [bp] | Citace |
|---------------------|--|----------------------------|-------------------------|
| <i>bla</i> -SHV | F- 5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' R- 5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3' | 747 | (MONSTEIN et al., 2007) |
| <i>bla</i> -TEM | F- 5'-TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3' R- 5'-ACGCTACCCGGCTCCAGATTTAT-3' | 445 | |
| <i>sul</i> 1 | F- 5'-CTTCGATGAGAGCCGGCGGC-3' R- 5'-GCAAGCGGAAACCCGCGCC-3' | 433 | (Blahna et al., 2006) |
| <i>sul</i> 2 | F- 5'-GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3' R- 5'-GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3' | 293 | |

Polycyklická reakce betalaktamázy byla prováděna za následujících podmínek:

- Počáteční denaturace 15 minut při 95 °C
- 30 cyklů
- Denaturace 30 sekund při 94 °C
- Hybridizace 30 s při 60 °C
- Elongace 2 minuty při 72 °C
- Finální extenze 10 minut při 72 °C (Monstein et al., 2007).

Polycyklická reakce *sul*1 a *sul*2 byla prováděna za následujících podmínek:

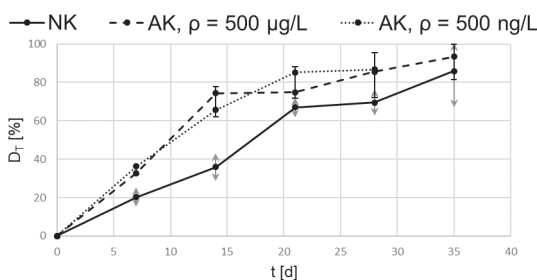
- Počáteční denaturace 5 minut při 94 °C
- 30 cyklů
- Denaturace 40 sekund při 94 °C
- Hybridizace 40 s při 55 °C
- Elongace 1 minuta při 72 °C
- Finální extenze 7 minut při 72 °C (Blahna et al., 2006).

3 Výsledky a diskuse

Průběhy biologické rozložitelnosti testovaných antibiotik jsou shrnuty na obrázcích 1–6. V grafu je mezi sebou vždy porovnán rozklad látky vlivem neadaptovaného a adaptovaného inokula. U trimetoprimu nebyl sledován žádný viditelný biologický rozklad. Žádná z testovaných látek neměla inhibiční vliv a ověření aktivity inokula byla vždy pozitivní. Zkouška biodegradace má dle normy ČSN ISO 14593 trvat 28 dní, z toho důvodu budou myšleny stupně biodegradace po 28 dnech testu, jestliže nebude specifikován jiný čas.

Benzylpenicilin se neadaptovaným kalem rozložil ze 70 % a adaptovanými kaly z 85 %. Biologický rozklad v obou případech započal hned na počátku testu, ale v případě adaptovaného inokula byla degradace rychlejší (14 dní), oproti neadaptovanému inokulu (21 dní). Maximální stupeň biodegradace byl v obou případech při ukončení testu po 35 dnech kolem 90 % (Obr. 1).

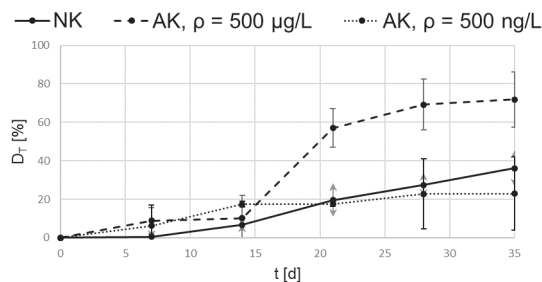
Benzylpenicilin



Obr. 1: Průběh biologického rozkladu benzylpenicilinu adaptovaným a neadaptovaným kalem

Ampicilin, přestože se od benzylpenicilinu liší pouze amino skupinou, byl proti degradaci mnohem odolnější. Pozitivní vliv adaptace se projevil pouze u kalu, který byl adaptován při koncentraci ampicilinu 500 µg · L⁻¹, kdy se rozložil ze 70 %. V ostatních případech byl stupeň degradace kolem 25 %. U testů s adaptovaným kalem můžeme vidět již na počátku testu malý rozklad pravděpodobně způsobený sekundárním rozkladem. Oproti tomu neadaptovaný kal projevoval prvních 7 dní lagovou fází a teprve poté započala pomalá degradace (Obr. 2).

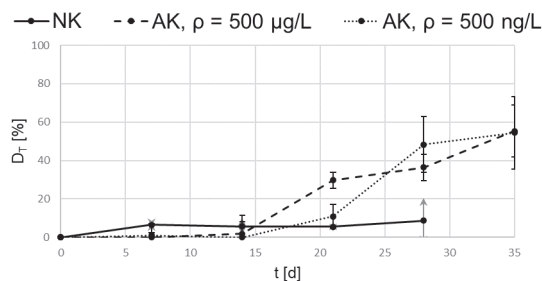
Ampicilin



Obr. 2: Průběh biologického rozkladu ampicilinu adaptovaným a neadaptovaným kalem

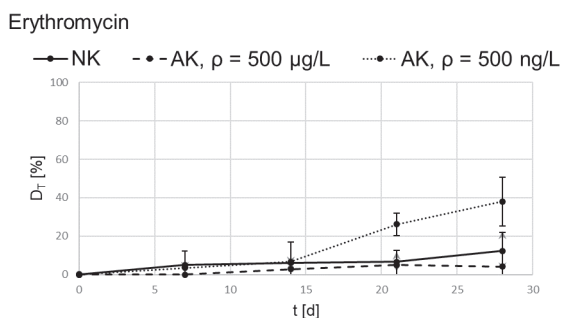
Streptomycin se vlivem neadaptovaného inokula významně nerozkládal, na počátku testu došlo k degradaci přibližně 10 % látky, která byla dále stabilní. Adaptace na obou hladinách koncentrací měla u streptomycinu podobný vliv. Byla zde pozorována čtrnáctidenní lagová fáze, a pak pomalý biologický rozklad, který dosáhl ke konci testu stupeň rozkladu 30–60 % (Obr. 3).

Streptomycin



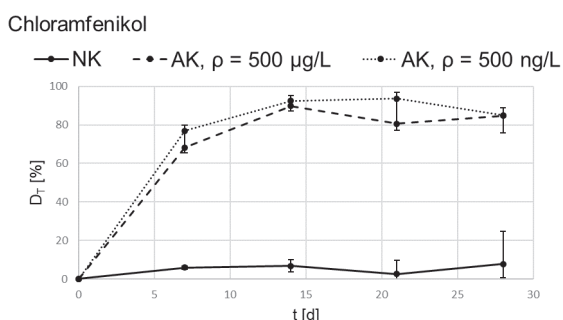
Obr. 3: Průběh biologického rozkladu streptomycinu adaptovaným a neadaptovaným kalem

Erythromycin byl lépe rozložitelný kalem adaptovaným na nižší koncentraci antibiotika, kdy se rozložil téměř ze 40 % po čtrnáctidenní lagové fázi. V ostatních případech byl pozorován pouze minimální nebo žádný rozklad (Obr. 4).



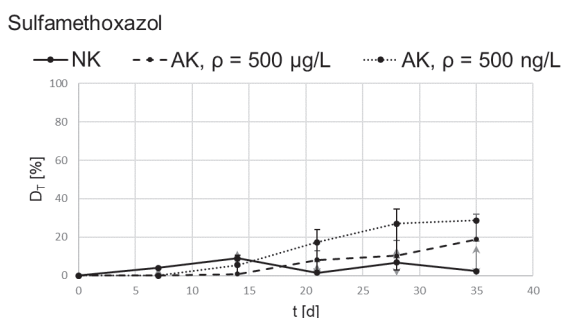
Obr. 4: Průběh biologického rozkladu erythromycinu adaptovaným a neadaptovaným kalem

Chloramfenikol neadaptovaným kalem rozložitelný nebyl. Adaptace inokula měla na biodegradaci silný vliv, biodegradace započala hned na začátku testu a bylo dosaženo rozkladu 80–90 % (Obr. 5).



Obr. 5: Průběh biologického rozkladu chloramfenikolu adaptovaným a neadaptovaným kalem

Sulfamethoxazol se na počátku testu s neadaptovaným inokulem rozložil z 5 % a dále se již nerozkládal. Oproti tomu při degradaci adaptovaným inokulem vzrostl maximální stupeň rozkladu na 20–30 % a i v tomto případě nižší koncentrace antibiotika při adaptaci byla účinnější (Obr. 6).



Obr. 6: Průběh biologického rozkladu sulfamethoxazolu adaptovaným a neadaptovaným kalem

V tabulce 2 jsou shrnuty nálezy genů resistance v modelech adaptace s koncentrací antibiotika 500 µg · L⁻¹ a srovnány s neadaptovaným kalem (inokulem). Gen *bla*_{TEM} nebyl detekován ani v inokulu ani v žádném z modelů adaptace, oproti tomu gen *sul2* byl objeven ve všech modelech. Nevymizel ani v modelu, kam nebylo dávkováno žádné antibiotikum. Na základě toho můžeme usuzovat, jak je tento typ resistance v životním prostředí běžný a stabilní. Resistance na betalaktamázy *bla*_{SHV} překvapivě nebyla objevena v modelech adaptovaných na betalaktamy, ale byla pozitivní v modelech adaptovaných na erythromycin a trimetoprim. Stejně tak gen *sul1* nebyl selektován vlivem sulfamethoxazolu, ale šířil se spolu s odolností na trimetoprim, který

se používá v kombinaci se sulfamethoxazolem, a dokonce i spolu s resistencí na testované peniciliny a streptomycin. Tento vliv je pravděpodobně způsoben přenosem genu resistance na plasmidu, který kóduje resistenci na tato antibiotika. Proč byl gen *sul1* selektován v modelech adaptovaných na peniciliny, přestože nebyly detekovány *bla*_{TEM} ani *bla*_{SHV}, mohlo být způsobeno například přenosem s geny, které kódují efluxní pumpy, nebo jiné geny kódující resistenci na betalaktamy, které nebyly sledovány.

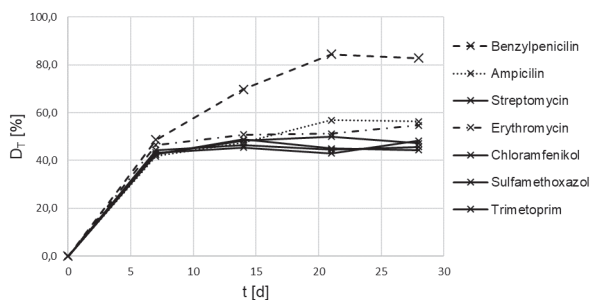
Tabulka 2: Nálezy ARG v SBR modelech adaptace při koncentrací antibiotik 500 ng · L⁻¹

| Léčivo v modelu adaptace | Gen resistance | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>sul1</i> | <i>sul2</i> |
| Inokulum (NEAD) | - | + | + | + |
| Kontrola (bez antibiotika) | - | - | - | + |
| Benzylpenicilin | - | - | + | + |
| Ampicilin | - | - | + | + |
| Streptomycin | - | - | + | + |
| Erythromycin | - | + | - | + |
| Chloramfenikol | - | - | - | + |
| Sulfamethoxazol | - | - | - | + |
| Trimetoprim | - | + | + | + |

Ve všech testech se projevil aspoň malý pozitivní vliv adaptace aktivovaného kalu na obou koncentračních hladinách na biodegradaci testovaných antibiotik. Ve většině případů nebyl rozdíl, jestliže byl aktivovaný kal adaptován na 500 ng · L⁻¹ nebo 500 µg · L⁻¹, ale v několika případech se aktivovaný kal přizpůsobil testovanému antibiotiku lépe při nižších koncentracích v SBR modelu adaptace. Přestože bude nutné doplnit výsledky i o další geny resistance a o sledování ARG v modelech adaptovaných na nižší koncentrace antibiotik, tak z dosavadních testů je evidentní, že nízké koncentrace antibiotik podporují šíření genů resistance, a to i na jiná antibiotika než ta, kterým jsou mikroorganismy vystaveny.

Další podnět, který vychází z těchto experimentů je, že aktivovaný kal z čistírny odpadních vod, přestože je neustále exponován antibiotikům a dalším léčivům, nebyl na rozklad těchto látek adaptován, nebo jeho aktivita byla k rozkladu těchto látek mnohem nižší, než tomu bylo v případě kalu adaptovaného v SBR modelech na koncentrace odpovídající výskytu na čistírnách odpadních vod (cca 10² až 10³ ng · L⁻¹). Adaptace aktivovaného kalu na rozklad těchto látek se může lišit v závislosti na dané ČOV, použité technologii, ročním období apod., přesto bylo toto pozorování nečekané. Jeden z důvodů by mohl být, že při kontinuálním procesu, který je běžný na ČOV, má aktivovaný kal v podstatě celou dobu přístup k organickým živinám. V případě SBR modelu s jednodenním cyklem dojde k rychlému vyčerpání živin, a poté následuje několikahodinová fáze, kdy jsou mikroorganismy závislé pouze na svých zásobách a na organických látkách, které jsou hůře rozložitelné. V tento okamžik se pravděpodobně začnou rozvíjet i mechanismy k biodegradaci těchto látek. Tuto myšlenku podporují i výsledky z testů inhibice, které jsou znázorněny na obrázku 7. Na obrázku jsou graficky odděleny pouze křivky, které překročily stupeň biodegradace 50 % a pro lepší přehlednost nebyly vloženy chybové úsečky.

Během testů inhibice se biologicky významněji rozkládal pouze benzylpenicilin. U všech ostatních látek byl sledován celkový rozklad organického uhlíku v rozmezí 40–60 %. Jelikož je do testů dávkován vedle testované látky ještě benzoan sodný v poměru 1:1 (TOC), prvotní rozklad 50 % přísluší biodegradaci benzoanu sodného a lagová fáze pro testovanou látku se posunula do doby, kdy mikroorganismy vyčerpají vlastní zásoby živin.



Obr. 7: Průběhy zkoušek inhibice testovaných látek na neadaptovaný kal

Výsledky testů biologické rozložitelnosti lze s účinností odstranění těchto látek na ČOV porovnávat pouze částečně a ve vhodném kontextu. Podmínky na čistírnách odpadních vod jsou hodně odlišné. Koncentrace aktivovaného kalu na ČOV je 1000krát vyšší a vyšší je i koncentrace organických látek. V aktivční nádrži jsou mnohem agresivnější enzymatické podmínky, vzhledem k většímu celkovému povrchu vloček aktivovaného kalu hraje důležitější roli i sorpce, a dále svoji roli má i fotodegradace, které bylo během testů zcela zabráněno. Na druhou stranu doba zdržení odpadní vody na ČOV je velice krátká pro efektivní biologický rozklad persistentních polutantů. Testy biodegradace dobře slouží k predikci osudu těchto látek dále v povrchových vodách, ale cílí na význam biotického působení na degradaci a snaží se potlačit abiotické vlivy.

Na základě výše zmíněných výsledků můžeme usuzovat, že na ČOV nedochází k přímé metabolizaci těchto mikropolutantů, ale mikroorganismy je přehlížejí, jelikož mají dostatek snadno rozložitelného substrátu a na tyto antibiotika se adaptují pouze šířením ARG, díky kterým se stávají odolné proti jejich negativním vlivům. Tyto mechanismy bakteriální resistance mohou způsobovat i primární rozklad antibiotik, resp. přeměnu funkčních skupin, která potlačí jejich účinek na mikroorganismy, ale v odpadní vodě pak zůstává metabolit, který stále může mít toxické účinky na životní prostředí a člověka. Bakterie se však vlivu antibiotik brání častěji pasivně tím způsobem, že pozmění cílovou strukturu na enzymu, kde se antibiotikum váže, nebo pomocí efluxních pump apod. Jestliže dochází k biodegradaci těchto látek na ČOV, tak pravděpodobně převážně kometabolizací s jiným substrátem, nebo v případě, že ČOV má velmi nízké zatížení organickým uhlíkem. Odstranění těchto látek na ČOV tedy připadá nejspíše převážně na abiotické procesy a velká část těchto mikropolutantů pravděpodobně může procházet do povrchových vod odtokem z ČOV, buď jako primární látka, nebo jako její metabolit.

ČOV jsou již delší dobu považovány za tzv. hotspots genů resistance a tyto výsledky podporují závěry, že nízké koncentrace antibiotik na ČOV vytváří selekční tlak na mikroorganismy v aktivovaném kalu a šíření ARG. V případě, že mikroorganismy nebyly antibiotikům vystaveny (kontrolní SBR model), výskyt genů resistance se v prostředí snížil pod hladinu detekce. Pouze gen *sul2* byl natolik stabilní, že se v modelu udržel a bylo možné ho detekovat.

4 Závěr

Z testovaných antibiotik byl neadaptovaným kalem biologicky rozložitelný pouze benzylpenicilin. Ve všech případech měla adaptace aktivovaného kalu v SBR modelech pozitivní vliv na biodegradaci testovaných látek. Vlivem adaptovaného inokula se rozkládal i ampicilin (70 %), streptomycin (50 %), erythromycin (30 %), chloramfenikol (85 %) a sulfamethoxazol (25 %). Trimetoprim rozkladu nepodléhal. Adaptace probíhala mírně efektivněji při koncentracích antibiotika $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ než při $500 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$. Na základě klasifikace biologické rozložitelnosti můžeme podle těchto testů jako biologicky rozložitelný v životním prostředí označit pouze penicilin, dále za potenciálně biologicky rozložitelný ampicilin a chloramfenikol, jelikož se rozložily působením

adaptovaného kalu aspoň z 60 %, za biologicky nerozložitelné trimetoprim, sulfamethoxazol, streptomycin, erythromycin. Přesto lze očekávat, že všechny tyto látky, s výjimkou trimetoprimu, se v životním prostředí postupně degradují v součinnosti s abiotickou degradací. Trimetoprim je natolik stabilní, že lze očekávat jeho akumulaci v životním prostředí.

Přestože i koncentrace v řádech $10^2 \cdot \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ mohou umožnit mikroorganismům se na rozklad některých z těchto látek adaptovat, aktivovaný kal z čistírny odpadních vod neměl ve většině případů vyvinutou aktivitu k biodegradaci testovaných mikropolutantů. Mikroorganismy na ČOV se na antibiotika adaptovaly spíše šířením obranných mechanismů skrze geny antibiotické resistance, což můžeme vidět na pozitivních nálezech genů resistance v inokulu. Na základě porovnání testů biologického rozkladu s testy inhibice a s nálezy genů resistance, lze usuzovat, že na ČOV nejsou tyto látky pravděpodobně odstraňovány přímou metabolizací, ale na odstranění se podílí spíše abiotické procesy, nebo jsou odstraňovány kometabolizací s jinou organickou látkou. Pozitivní nálezy genů resistance v laboratorních SBR modelech potvrzují, že nízké koncentrace antibiotik kolem několika $100 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ podněcují selekci genů resistance a spolu s geny resistance na dané antibiotikum se mohou šířit i geny resistance na jiné látky.

5 Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018)

6 Literatura

- Barra Caracciolo, A.; Topp, E.; Grenni, P., 2015. *Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 106, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
- Bergh, J. J.; Breytenbach, J. C.; Wessels, P. L., 1989. *Degradation of trimethoprim.* Journal of Pharmaceutical Sciences 78(4), 348–350. <https://doi.org/10.1002/jps.2600780418>
- Birošová, L.; Mackulák, T.; Bodík, I.; Ryba, J.; Škubák, J.; Grabic, R., 2014. *Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia.* Science of The Total Environment 490, 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.030>
- Blahna, M. T.; Zalewski, C. A.; Reuer, J.; Kahlmeter, G.; Foxman, B.; Marrs, C. F., 2006. *The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic Escherichia coli in Europe and Canada.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57(4), 666–672. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl020>
- Bonvin, F.; Omlin, J.; Rutler, R.; Schweizer, W. B.; Alaimo, P. J.; Strathmann, T. J.; McNeill, K.; Kohn, T., 2012. *Direct photolysis of human metabolites of the antibiotic sulfamethoxazole: evidence for abiotic back-transformation.* Environmental science & technology 47(13), 6746–6755. <https://doi.org/10.1021/es303777k>
- Brar, S. K., 2011. *Hazardous Materials: Types, Risks, and Control.* Nova Science Publishers.
- Ducey, S. B.; Sapkota, A., 2010. *Presence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment – A Concern for Human Health?* 1048, 345–365. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1048.ch017>
- Escher, B. I.; Baumgartner, R.; Koller, M.; Treyer, K.; Lienert, J.; McArdell, C. S., 2011. *Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater.* Water research 45(1), 75–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.019>
- García-Galán, M. J.; Silvia Díaz-Cruz, M.; Barceló, D., 2008. *Identification and determination of metabolites and degradation products of*

- sulfonamide antibiotics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 27(11), 1008–1022. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.001>
- Granados, O.; Meza Ruiz, G., 2005. *Streptidine, a metabolic derivative produced after administration of streptomycin in vivo, is vestibulotoxic in rats*. Histology and histopathology. <https://doi.org/10.14670/HH-20.357>
- Jiang, B.; Li, A.; Cui, D.; Cai, R.; Ma, F.; Wang, Y., 2014. *Biodegradation and metabolic pathway of sulfamethoxazole by Pseudomonas psychrophila HA-4, a newly isolated cold-adapted sulfamethoxazole-degrading bacterium*. Applied microbiology and biotechnology 98(10), 4671–4681. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5488-3>
- Kümmerer, K., 2003. *Significance of antibiotics in the environment*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52, 3. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>
- Kümmerer, K., 2004. *Resistance in the environment*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54(2), 311–320. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh325>
- Kümmerer, K., 2009a. *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I*. Chemosphere 75(4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Kümmerer, K., 2009b. *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II*. Chemosphere 75(4), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>
- Macharová, H.; Sýkora, V., 2007. *Ověření metody CO₂ headspace pro hodnocení úplné biologické rozložitelnosti*. Seminář o tenzidoch a detergentoch, Bojnice (SK).
- Miège, C.; Choubert, J. M.; Ribeiro, L.; Eusèbe, M.; Coquery, M., 2009. *Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results*. Environmental Pollution 157(5), 1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>
- Monstein, H.-J.; Östholm-Balkhed, Å.; Nilsson, M. V.; Nilsson, M.; Dornbusch, K.; Nilsson, L. E., 2007. *Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae*. APMIS 115(12), 1400–1408. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.00722.x>
- Peng, X.; Wang, Z.; Kuang, W.; Tan, J.; Li, K., 2006. *A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China*. Science of The Total Environment 371(1), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.07.001>
- Rossmann, J.; Schubert, S.; Gurke, R.; Oertel, R.; Kirch, W., 2014. *Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS*. Journal of Chromatography B 969, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.008>
- Shen, Y.; Zhao, W.; Zhang, C.; Shan, Y.; Shi, J., 2017. *Degradation of streptomycin in aquatic environment: kinetics, pathway, and antibacterial activity analysis*. Environ. Sci. Pollut. Res. 24(16), 14337–14345. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8978-5>
- Smith, A. L.; Erwin, A. L.; Kline, T.; Unrath, W. C.; Nelson, K.; Weber, A.; Howald, W. N., 2007. *Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in Haemophilus influenzae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 51(8), 2820–2829.
- Snyder, L.; Champness, W., 2007. *Molecular Genetics of Bacteria*. ASM Press.
- Tylová, T.; Flieger, M.; Olšovská, J., 2013. *Determination of antibiotics in influents and effluents of wastewater-treatment-plants in the Czech Republic – development and application of the SPE and a UH-PLC-ToFMS method*. Analytical Methods 5(8), 2110–2118. <https://doi.org/10.1039/C3AY00048F>
- Vejmelková, D.; Časarová, K.; Proksová, E.; Říhová Ambrožová, J., 2018. *Detekce genů resistance na antibiotika na čistírně odpadních vod: Testování metodiky*. Vodárenská biologie 2018, Praha, 6.–7. 2. 2018.
- Vila-Costa, M.; Gioia, R.; Aceña, J.; Pérez, S.; Casamayor, E. O.; Dachs, J., 2017. *Degradation of sulfonamides as a microbial resistance mechanism*. Water research 115, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.007>
- Wanner, F.; Vana, M.; Fuksa, J. K.; Matousova, L., 2011. *Removal of selected pharmaceuticals during wastewater treatment in wastewater treatment plants*. Vodní Hospodářství 61(9), 361–363.