UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

PROBLEMATIKA ANALYTICKÉ A MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY ODPADNÍCH VOD

Ing. Nikola Roulová

DISERTAČNÍ PRÁCE

2023

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.
Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17. 4. 2023

Ing. Nikola Roulová

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří byli mými rádci a inspirací po celou dobu studia. Mé upřímné poděkovaní patří právě těm, kteří měli skutečné porozumění a nedovolili mi neuspět. Hluboce děkuji mým rodičům, za jejich trpělivost, všestrannou pomoc a nikdy nekončící podporu, která mi umožnila získat cenný dar vysokoškolského vzdělání. Děkuji mým školitelkám doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. a Ing. Petře Moťkové, Ph.D. za pomoc během naší mnohaleté společné spolupráce.

ANOTACE

První část disertační práce se zabývala detekcí, výskytem a antibiotickou citlivostí patogenních bakterií *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* a *Salmonella* spp. v odpadních vodách. Podstatou druhé části disertační práce bylo zhodnotit příjem polyfluorovaných léčiv efavirenzu a kyseliny flufenamové za hydroponických podmínek různými druhy rostlin, a to řeřichou setou (*Lepidium sativum*), roketou setou (*Eruca sativa*), ředkvičkou setou (*Raphanus sativus*) a hrachem setým (*Pisum sativum*). Ve třetí části disertační práce byly hodnoceny změny akutní toxicity v průběhu heterogenní fotokatalýzy vodných roztoků chloracetanilidových herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru pomocí zkoušky inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri.*

KLÍČOVÁ SLOVA

odpadní voda, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, příjem léčiv rostlinami, polyfluorovaná léčiva, hydroponické pěstování, akutní toxicita, chloracetanilidové herbicidy, *Chlorella kessleri*

ANNOTATION

The first part of the dissertation dealt with the detection, occurrence, and antimicrobial susceptibility of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* spp. in wastewater. The essence of the second part of the dissertation was to evaluate the uptake of polyfluorinated pharmaceuticals efavirenz and flufenamic acid under hydroponic conditions by different plant species, namely cress (*Lepidium sativum*), rocket (*Eruca sativa*), radish (*Raphanus sativus*), and pea (*Pisum sativum*). In the third part of the dissertation, changes in acute toxicity during heterogeneous photocatalysis of aqueous solutions of chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and acetochlor were evaluated via a growth inhibition test using the green alga *Chlorella kessleri*.

KEYWORDS

wastewater, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, plant uptake, polyfluorinated pharmaceuticals, hydroponic cultivation, acute toxicity, chloroacetanilide herbicides, *Chlorella kessleri*

OBSAH

ÚVOD 15
1 TEORETICKÁ ČÁST 16
1.1 Centralizované čištění odpadních vod 16
1.2 Odpadní vody ze zdravotnických zařízení 16
1.3 Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení v České republice 18
1.4 Antibiotická rezistence v městských čistírnách odpadních vod a vliv odpadních vod ze zdravotnických zařízení 19
1.5 Odstranění mikropolutantů biologickým procesem čištění odpadních vod 22
1.6 Odstranění mikrobiální zátěže biologickým procesem čištění odpadních vod 24
1.6.1 Dezinfekce odpadních vod po biologickém procesu čištění 25
1.7 Vhodné přístupy a technologie k čištění odpadních vod 27
1.8 Kultivační metody v mikrobiologii vody 28
1.8.1 Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách kultivačními metodami 29
1.9 Molekulárně biologické metody v mikrobiologii vody 32
1.10 Využití přečištěných odpadních vod pro zavlažování 33
1.10.1 Studium přijmu léčiv rostlinami 36
1.10.2 Polyfluorovaná léčiva efavirenz a kyselina flufenamová 39
1.11 Odstranění herbicidů z kontaminovaných vod 40
1.11.1 Chloracetanilidové herbicidy 42
1.11.2 Hodnocení toxicity 43
1.11.3 Vybrané zkušební organismy pro biologické testy toxicity 46
2 PRAKTICKÁ ČÁST 48
2.1 Detekce, výskyt a antibiotická citlivost vybraných patogenních bakterií v odpadních vodách 48
2.1.1 Typy odpadních vod pro mikrobiologický rozbor 48
2.1.2 Vzorky odpadních vod 49
2.1.3 Odběr vzorků odpadních vod 50

2.1.4 Vyšetření citlivosti k antibiotikům diskovou difúzní metodou 50
2.1.5 *Staphylococcus aureus* 51
2.1.5.1 Experimentální část 51
2.1.5.2 Výsledková část a diskuse 54
2.1.6 *Pseudomonas aeruginosa* 61
2.1.6.1 Experimentální část 61
2.1.6.2 Výsledková část a diskuse 63
2.1.7 *Yersinia enterocolitica* 69
2.1.7.1 Experimentální část 69
2.1.7.2 Výsledková část a diskuse 73
2.1.8 *Salmonella* spp. 80
2.1.8.1 Experimentální část 80
2.1.8.2 Výsledková část a diskuse 83
2.2 Příjem polyfluorovaných léčiv efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami za hydroponických podmínek a jejich detekce v rostlinných extraktech 89
2.2.1 Experimentální část 89
2.2.1.1 Modelové rostliny a pěstební médium 89
2.2.1.2 Podmínky hydroponického pěstování rostlin 90
2.2.1.3 Expozice rostlin efavirenzem a kyselinou flufenamovou 90
2.2.1.4 Odběr a zpracování vzorků rostlin 91
2.2.1.5 Extrakce efavirenzu a kyseliny flufenamové z rostlinné matrice 92
2.2.1.6 HPLC/MS analýza efavirenzu a kyseliny flufenamové v rostlinných extraktech 92
2.2.2 Výsledková část a diskuse 93
2.2.2.1 Hydroponické experimenty 93
2.2.2.2 Vzhled rostlin po expozici efavirenzem a kyselinou flufenamovou 95
2.2.2.3 Optimalizace extrakce efavirenzu a kyseliny flufenamové z rostlinných matric 96

2.2.2.4 Příjem efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami 97

2.2.2.5 Příjem efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami v průběhu 7denního období pěstování 101

2.3 Hodnocení akutní toxicity v průběhu fotokatalytické degradace chloracetanilidových herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru 106

2.3.1 Vzorky pro hodnocení akutní toxicity 106

2.3.2 Experimentální část 107

2.3.2.1 Zkušební organismus a růstové médium 107

2.3.2.2 Zkouška inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri* 108

2.3.3 Výsledková část a diskuse 110

2.3.3.1 Modifikace zkoušky inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri* 110

2.3.3.2 Zkouška s referenční látkou dichromanem draselným 111

2.3.3.3 Změny akutní toxicity reakčních roztoků v průběhu fotokatalytické degradace alachloru, metolachloru a acetochloru 111

3 ZÁVĚR 113

4 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 116

5 SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI 136

6 PŘÍLOHY 138

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Blokové schéma základní technologické linky středních a velkých městských čistíren odpadních vod.....23
Obrázek 2 Vzhled MS agaru po roztěru zředěné neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a po roztěru zředěné odpadní vody (ředění 10^{-2}) (b) 57
Obrázek 3 Vzhled B-P agaru po roztěru zředěné neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a po roztěru zředěné odpadní vody (ředění 10^{-3}) (b) 58
Obrázek 4 Vyočkované selektivně pomnožené kultury získané z BHI bujónu s 6,5 % NaCl na B-P agaru (a) a MS agaru (b).....59
Obrázek 5 Presumptivní kolonie bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na cetrimidovém agaru po 48hodinové inkubaci (označeny červenou šipkou) po vyočkování neselektivně pomnožených kultur získaných z TSB bujónu.....65
Obrázek 6 Nárůst doprovodné mikroflóry na cetrimidovém agaru po vyočkování neselektivně pomnožené kultury získané z BHI bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (b) 66
Obrázek 7 Vyočkování alkalizovaných kultur na CIN agar čarami za pomocí kličky.....76
Obrázek 8 Falešně pozitivní kolonie na CIN agaru po vyočkování nealkalizované kultury získané z ITC bujónu (a) a nealkalizované kultury získané z PSB bujónu (b).....77
Obrázek 9 Semena řeřichy seté v den setí (a) a vyklíčená semena řeřichy seté po 72 hodinách hydroponického pěstování (b).....95
Obrázek 10 Vzhled rostlin po 7denní expozici kyselinou flufenamovou o koncentraci 3,75 mg/l v pěstebním médiu: řeřicha setá (a), roketa setá (b), ředkvička setá (c) a hrách setý (d).....96

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie *Staphylococcus aureus* v odpadních vodách.....53
Tabulka 2 Sestava antibiotických disků pro bakterii *Staphylococcus aureus*.....53
Tabulka 3 Výskyt bakterie *Staphylococcus aureus* v různých typech odpadních vod.....54
Tabulka 4 Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie *Staphylococcus aureus* na základě použitého kultivačního protokolu.....56
Tabulka 5 Antibiotická citlivost kmenů *Staphylococcus aureus* izolovaných z odpadních vod 60
Tabulka 6 Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v odpadních vodách.....62
Tabulka 7 Sestava antibiotických disků pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa*.....63
Tabulka 8 Výskyt bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v různých typech odpadních vod.....64
Tabulka 9 Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na základě použitého kultivačního protokolu.....64
Tabulka 10 Antibiotická citlivost kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z odpadních vod.....68
Tabulka 11 Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie *Yersinia enterocolitica* v odpadních vodách.....72
Tabulka 12 Sestava antibiotických disků pro bakterii *Yersinia enterocolitica* 73
Tabulka 13 Výskyt bakterie *Yersinia enterocolitica* v různých typech odpadních vod 73
Tabulka 14 Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie *Yersinia enterocolitica* na základě použitého kultivačního protokolu.....75
Tabulka 15 Antibiotická citlivost kmenů *Yersinia enterocolitica* izolovaných z odpadních vod 78
Tabulka 16 Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách.....82
Tabulka 17 Sestava antibiotických disků pro bakterie rodu *Salmonella* 83
Tabulka 18 Výskyt bakterií rodu *Salmonella* v různých typech odpadních vod.....84
Tabulka 19 Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterií rodu *Salmonella* na základě použitého kultivačního protokolu 85
Tabulka 20 Antibiotická citlivost kmenů *Salmonella* spp. izolovaných z odpadních vod 88
Tabulka 21 Systém zálivky rostlin a metodika odběru vzorků 92

Tabulka 22 Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny).....98
Tabulka 23 Molekulární struktura a vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny flufenamové a efavirenzu 99
Tabulka 24 Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 1,00 mg/l) 103
Tabulka 25 Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 3,75 mg/l) 104
Tabulka 26 Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 7,50 mg/l) 105
Tabulka 27 Složení růstového média OECD dle metodiky OECD 201 108

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Koncentrace kyseliny flufenamové v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny) 100
Graf 2 Koncentrace efavirenzu v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny) 101

SEZNAM ZKRATEK

AOPs	pokročilé oxidační procesy
BG agar	agar s briliantovou zelení
BHI bujón	mozko-srdcová infúze
B-P agar	Baird-Parker agar
BSK	biologická spotřeba kyslíku
CCALA	Sbírka kultur autotrofních organismů
CET agar	cetrimidový agar
CIN agar	agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem
CN agar	pseudomonádový agar CN
ČOV	čistírna odpadních vod
ČSN	česká státní norma
DC agar	deoxycholát citrátový agar
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC_{50}	střední účinná (efektivní) koncentrace
EHS	Evropské hospodářské společenství
EN	evropská norma
EO	ekvivalentní obyvatel
ES	Evropské společenství
ESKAPE	akronym složený z počátečních písmem rodových jmen bakterií *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
HGT	horizontální přenos genů
HIV	lidský virus imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ch.	*Chlorella*
CHKS	chemická spotřeba kyslíku
IC_{50}	střední inhibiční koncentrace
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
ITC bujón	bujón s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným
LC_{50}	střední letální koncentrace
Log K_{ow}	rozdělovací koeficient oktanol/voda

MGE	mobilní genetické elementy
MH agar	Mueller Hinton agar
MKTTn bujón	bujón podle Mullera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem
MRSA	meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*
MS agar	slaný agar s manitolem
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NNRTI	nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
NSAID	nesteroidní antirevmatika
OD	optická hustota
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
P.	*Pseudomonas*
PCR	polymerázová řetězová reakce
pKa	disociační konstanta
PPV	pufrovaná peptonová voda
PSB bujón	bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
QqQ	trojitý kvadrupól
QTOF	hybridní hmotností spektrometr kombinující kvadrupól a analyzátor doby letu
QuEChERS	akronym složený z vlastností charakterizujících metodu přípravy vzorků (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)
RNA	ribonukleová kyselina
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
RVS bujón	bujón dle Rappaporta a Vassiliadise se sójou
SPE	extrakce tuhou fází
St.	*Staphylococcus*
TOC	celkový organický uhlík
TS	technická specifikace
TSA	trypton-sójový agar
TSB bujón	trypton-sójový bujón
TSS	celkový obsah nerozpuštěných látek
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

US-EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
UV	ultrafialové záření
VBNC	životaschopné, ale nekultivovatelné
XLD agar	agar s xylózou, lyzinem a deoxycholanem
Y.	*Yersinia*

ÚVOD

Voda je podstatou života, dokud je čistá. Voda určená k lidské spotřebě, jenž byla využita k jakémukoliv účelu, a u níž člověk změnil její kvalitu, se stává vodou odpadní. Odpadní voda jakéhokoliv původu s sebou vždy nese riziko pro veřejné zdraví i životní prostředí, které je u specifických typů odpadních vod umocněno jejich silně infekční nebo toxickou povahou. Předcházet vzniku odpadů je nejúčinnějším způsobem, jak omezit jejich nepříznivé dopady na životní prostředí. Tuto praxi však nelze dost dobře aplikovat na odpadní vodu, neboť bez možnosti využít vodu k lidské spotřebě a činnostem, by bylo jen těžko dosaženo současného standardu života ve vyspělých zemích.

Ať už bude na odpadní vodu nahlíženo z jakéhokoliv úhlu, vždy bude specifický. Z mikrobiologického hlediska se jedná o složitou matrici vyznačující se značnou fekální kontaminací. Avšak patogenní bakterie, které představují zdravotní riziko pro obyvatelstvo, tvoří pouze minoritní část z celkové bakteriální populace v odpadních vodách. Vzhledem k tomu, že se patogenní bakterie v odpadní vodě nacházejí uprostřed mnohem většího množství komplexní doprovodné mikroflóry a jejich koncentrace jsou relativně nízké, je jejich detekce kultivačními metodami do značné míry obtížná. Na rozdíl od molekulárně biologických metod, které sice nabízejí rychlejší a přesnější detekci, umožnuje zisk bakteriálního izolátu kultivačními metodami jeho další charakterizaci, například stanovení citlivosti k antibiotikům. Pro životní prostředí představují odpadní vody zdroj znečišťujících látek, neboť současné konvenční technologie čištění odpadních vod založené na využití aktivovaného kalu nejsou k jejich odstranění dostatečně účinné. Použití přečištěné odpadní vody k zavlažování vede k zanesení těchto látek do půdního prostředí, kde při dlouhodobé aplikaci dochází k jejich akumulaci na úrovně, jež výrazně převyšují jejich koncentrace ve zdrojové závlahové vodě. Příjem mikropolutantů rostlinami ze závlahové vody nebo kontaminované půdy může vést k jejich vnesení do potravinového řetězce, kde představují potenciální zdravotní riziko pro spotřebitele. V tomto ohledu je problematický zejména příjem léčiv.

Pro oblast environmentálního inženýrství je velkou výzvou navrhnout pokročilé technologie čistění odpadních vod, které by zajistily nejenom účinné odstranění specifických mikropolutantů, ale současně by se vyznačovaly i nákladovou efektivností. Značný aplikační potenciál mají v tomto směru pokročilé oxidační procesy. Navržené technologie je však nezbytné hodnotit nejenom z hlediska jejich efektivnosti při odstraňování cílových mateřských sloučenin, ale vzhledem k riziku tvorby toxických degradačních produktů i z hlediska změny akutní toxicity ošetřované kontaminované vody.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Centralizované čištění odpadních vod

Centralizovaný systém sběru a čištění odpadních vod je v městských oblastech vyspělých zemích zavedeným standardem (Libralato *et al.* 2012; Tang *et al.* 2020). Výsledkem je, že městské čistírny odpadních vod přijímají nejenom splaškové vody z domácností, ale k centralizovanému čištění je zde shromažďována i odpadní voda generovaná průmyslovými oblastmi, zemědělstvím nebo zdravotnickými zařízeními. Centralizací čistícího procesu tak do městských čistíren odpadních vod vstupuje i specifické znečištění spojené s konkrétním typem odpadních vod (Manaia *et al.* 2016; Nnadozie *et al.* 2017; Le *et al.* 2018; Lorenzo *et al.* 2018). Legislativa v oblasti čištění odpadních vod v České republice vychází z principů příslušných směrnic Evropské unie. Směrnice Rady č. 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod, vydaná v roce 1991, stanovila požadavky na čištění odpadních vod u městských aglomerací s více než 2000 obyvateli (Směrnice Rady č. 91/271/EHS). V roce 2000 byla vydána Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2000/60/ES, kterou se stanovil rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Touto rámcovou směrnicí byla stanovena pravidla s cílem dosáhnout „dobrého stavu“ povrchových a podzemních vod v Evropské unii (Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2000/60/ES).

1.2 Odpadní vody ze zdravotnických zařízení

Přestože odpadní vody ze zdravotnických zařízení představují specifickou a nebezpečnou kategorii odpadu, je jejich čištění na centrálních městských čistírnách odpadních vod běžnou praxí i ve vyspělých zemích (Lorenzo *et al.* 2018; Majumder *et al.* 2021). Nevyhovující nebo zcela chybějící předčištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení přímo v místě jejich vzniku vysvětluje přítomnost kontaminantů primárně spojených s nemocničním prostředím v městských čistírnách odpadních vod, ale také v povrchových i podzemních vodách (Korzeniewska and Harnisz 2013; Orias and Perrodin 2013).

Odpadní vody ze zdravotnických zařazení jsou obecně charakterizovány vysokou biochemickou spotřebou kyslíku (BSK), chemickou spotřebou kyslíku (CHKS) a hodnotou celkového organického uhlíku (TOC). Podobně i obsah amoniakálního a organického dusíku, fosforu a celkový obsah nerozpuštěných látek (TSS) je vyšší ve srovnání s komunálními odpadními vodami (Carraro *et al.* 2016; Majumder *et al.* 2021; Parida *et al.* 2022). Odpadní vody ze zdravotnických zařízení se vyznačují přítomností specifických znečišťujících látek,

které jsou generovány terapeutickou, laboratorní, diagnostickou nebo výzkumnou činností. Jedná se o těžké kovy, dezinfekční látky, anestetika, radionuklidy nebo jodované kontrastní látky (Verlicchi *et al*. 2010; Fuentefria *et al.* 2011; Orias and Perrodin 2013; Santos *et al*. 2013; Carraro *et al*. 2016; Lutterbeck *et al.* 2020; Majumder *et al.* 2021). Důsledkem přítomnosti celé řady mikropolutantů je značná toxicita, která je 5–15krát vyšší v porovnání s komunálními odpadními vodami. Z tohoto důvodu představují odpadní vody ze zdravotnických zařazení jeden z nejvíce toxických podílů, který je vypouštěn do veřejné kanalizační sítě. Většina z přítomných mikropolutantů může být pro člověka i vodní organismy toxická i ve velmi nízkých koncentracích (μg/l až ng/l) (Tran *et al.* 2018; Ebrahimi *et al.* 2020; Khan *et al.* 2021a; Khan *et al.* 2021b). Koncentrace léčiv v odpadních vodách ze zdravotnických zařízení může být 2–150krát vyšší než koncentrace v komunálních odpadních vodách, přičemž zvýšené koncentrace jsou pozorovány zejména pro antibiotika (Carraro *et al.* 2016; Perini *et al.* 2018; Antonopoulou *et al.* 2021). Mezi další často se vyskytující třídy léčiv patří analgetika, cytostatika, β-blokátory, protizánětlivé a psychiatrické léky (Carraro *et al.* 2016; Ebrahimi *et al.* 2020).

Biologické riziko spojené s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení je důsledkem přítomnosti velkého množství patogenních mikroorganismů (bakterie, viry, prvoci), které se do odpadní vody uvolňují stolicí a močí infikovaných pacientů (Carraro *et al.* 2016; Parida *et al.* 2022). Odpadní voda taktéž představuje jednu z cest šíření rezistentních bakterií a genů antibiotické rezistence ze zdravotnických zařízení, která jsou v důsledku intenzivního používání antimikrobiálních látek považována za primární místa vzniku antibiotické rezistence (Varela *et al*. 2014; Hocquet *et al.* 2016; Tesfaye *et al*. 2019). Bakterie sdružené pod akronym ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.) jsou spolu s bakterií *Escherichia coli* celosvětově hlavními původci vážných nozokomiálních nákaz zejména u kriticky nemocných a imunosuprimovaných pacientů. Termín ESKAPE odráží schopnost těchto bakterií „uniknout“ účinkům konvenční antibiotické terapie a vyvinout si vysokou úroveň rezistence vůči řadě antibiotik. To následně vede k vysoké úmrtnosti pacientů a představuje kritické ohrožení veřejného zdraví (Founou *et al.* 2018; Mulani *et al.* 2019; Zhen *et al.* 2019; Ma *et al.* 2020; Savin *et al.* 2020). Největším rizikem, které je spojeno s rozšiřováním těchto bakterií z nemocničního prostředí, je přenos jejich genů antibiotické rezistence na další patogenní bakterie (Asfaw *et al.* 2017). Získání genů antibiotické rezistence klinicky významnými patogenními bakteriemi může zvýšit četnost případů, kdy dojde k selhání antibiotické terapie. Následkem tohoto selhání se zvýší závažnost lidských bakteriálních

infekcí, a to zejména v případě přenosu rezistence vůči terapeuticky vysoce důležitým antibiotikům (Savin *et al.* 2020).

Celkové množství produkovaných odpadních vod a jejich vlastnosti se mezi jednotlivými zdravotnickými zařízeními mohou do značné míry lišit. Záleží na velikosti zařízení, poskytované zdravotní péči (počet a typ oddělení), počtu lůžek, počtu ambulantních a hospitalizovaných pacientů, poskytovaných službách (prádelna, stravovací zařízení, klimatizace) nebo technickém zázemí (Carraro *et al.* 2016; Lutterbeck *et al.* 2020; Khan *et al.* 2021a; Majumder *et al.* 2021; Parida *et al.* 2022).

1.3 Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení v České republice

Vzhledem k tomu, že v Evropské Unii neexistují závazné pokyny pro nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení, přijali jednotlivé členské země vlastní předpisy o nakládání a kritériích hodnocení odpadních vod ze zdravotnických zařízení (Carraro *et al.* 2016; Ebrahimi *et al.* 2020; Khan *et al.* 2019; Khan *et al.* 2021a; Khan *et al.* 2021b). V České republice specifikuje nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení před jejich vypuštěním do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu norma ČSN 75 6406. Její revize proběhla v roce 2020, a i přesto, že je v současné době platná, není závazná. Norma 75 6406 bere v úvahu základní principy nakládání s odpadními vodami a přísná omezení pro vypouštění nebezpečných a sledovaných látek ve smyslu předpisů Evropské Unie do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu. Součástí normy je také obecný popis technologií vhodných pro předčištění odpadních vod ze zdravotnických zařízení v místě jejich vzniku, a to v závislosti na přítomnosti specifických znečišťujících látek. Jsou zde také shrnuty dostupné metody dezinfekce pro odpadní vody ze zdravotnických zařízení a uvedeny jejich výhody i nevýhody. Současně jsou uvedeny fyzikálně-chemické ukazatele a jejich limitní hodnoty pro předčištěné odpadní vody ze zdravotnických zařízení, ale i mikrobiologické parametry a požadavky na ekotoxicitu (ČSN 75 6406). Voda vypouštěná ze zdravotnických zařízení musí v České republice plnit základní limity kanalizační sítě, které jsou dané kanalizačním řádem, přičemž nejvyšší přípustné znečištění je stanoveno na základě parametrů kanalizačního systému jeho vlastníkem nebo provozovatelem. Zdravotnická zařízení taktéž žádají na příslušném vodoprávním úřadu o povolení vypouštění odpadních vod do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu. Vodoprávní úřad podle charakteru zdravotnického zařízení stanoví povinnost sledovat vybrané fyzikálně-chemické případně mikrobiologické ukazatele a četnost jejich sledování v odpadní vodě.

Přímé vypouštění odpadních vod ze zdravotnických zařízení do veřejné kanalizační sítě bez předchozího předčištění a centralizované čistění na městských čistírnách odpadních vod představuje jeden z hlavních ekologických problémů, které je s tímto typem odpadních vod spojen (Khan *et al.* 2021b). Nejvhodnějším způsobem nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení je jejich efektivní čistění v místě jejich vzniku (Khan *et al.* 2019). Decentralizovaným čištěním odpadních vod je možné eliminovat rozšíření specifických kontaminantů ze zdravotnických zařízení do veřejné kanalizační sítě a dále do vodního recipientu. Předchází se tím problémům, jako je kontaminace a inhibice aktivovaného kalu nebo podpora šíření antibiotická rezistence, které vznikají v důsledku likvidace odpadních vod z těchto zařízení na centrálních městských čistírnách (Perini *et al.* 2018).

1.4 Antibiotická rezistence v městských čistírnách odpadních vod a vliv odpadních vod ze zdravotnických zařízení

Městské čistírny odpadních vod jsou uznávanými rezervoáry rezistentních bakterií a genů antibiotické rezistence. Současně představují jedno z nejvýznamnějších míst, kde se antibiotická rezistence rozšiřuje (Novo and Manaia 2010; Novo *et al.* 2013; Zhuang *et al.* 2015). Významně k tomu přispívá intenzivní vypouštění antibiotik a dalších látek s potenciálním selektivním tlakem, rezistentních bakterií a genů antibiotické rezistence do veřejné kanalizační sítě (Novo *et al.* 2013; Manaia *et al.* 2016). Městské čistírny odpadních vod pak slouží jako jejich sběrná místa (Dires *et al.* 2018). Nejvýznamnějším zdrojem rezistentních bakterií, genů antibiotické rezistence a antibiotik ve veřejné kanalizační síti jsou odpadní vody ze zdravotnických zařízení, přestože obvykle tvoří pouze minoritní část surové odpadní vody, která je do městských čistíren odpadních vod přiváděna (Lorenzo *et al.* 2018). V životním prostředí nepředstavují antibiotika pouze chemické látky s možným toxickým efektem, ale především léčiva schopná působit na bakteriální populaci selektivním tlakem (Pazda *et al.* 2019). Antibiotika jsou navíc ve střevech velmi špatně absorbována, a mezi 30 a 90 % podané terapeutické dávky je vyloučeno ve formě původní nezměněné sloučeniny (Harnisz *et al.* 2015; Carvalho and Santos 2016; Lorenzo *et al.* 2018).

Podstatou působení selektivního tlaku je eliminace doposud citlivých bakteriálních kmenů a podpora proliferace kmenů rezistentních. Rezistentní kmeny se mohou přizpůsobit selektivnímu tlaku prostředí a sloužit jako vektory pro další šíření antibiotické rezistence. Disponují totiž vlastnostmi umožňujícími nepříznivý účinek antibiotik překonat (Thompson *et al.* 2013; Moges *et al*. 2014; Varela *et al*. 2014; Hocquet *et al*. 2016; Lien *et al*. 2017;

Lorenzo *et al*. 2018; Pazda *et al*. 2019). Současně může selektivní tlak indukovat horizontální přenos genů (HGT) antibiotické rezistence na vnímavé jedince bakteriální komunity, čímž dojde k jejich rychlé adaptaci na nové podmínky (Varela *et al*. 2014; Santoro *et al.* 2015). Kromě antibiotik a jiných léčiv podporují horizontální přenos genů i dezinfekční prostředky a těžké kovy (Hunitel *et al.* 2021). Právě horizontální přenos genů je zásadním krokem pro přežití bakterie v konkurenčním nebo nepříznivém prostředí a je taktéž považován za jeden z hlavních faktorů, který ovládá šíření bakteriální rezistence (Guo *et al*. 2015; Von Wintersdorff *et al.* 2016). Horizontální přenos genů mezi bakteriemi je z velké části zprostředkováván pomocí specializovaných mobilních genetických elementů (MGE), které představují důležitý zdroj genetické rozmanitosti a přispívají k adaptaci a evoluci bakterií (Rodríguez-Beltrán *et al.* 2020). Mobilní genetické elementy představují pozoruhodné genetické prvky nezbytné pro expresi a přenos genů mezi molekulami deoxyribonukleové kyseliny (DNA) uvnitř buňky i mezi jednotlivými bakteriemi (Bondarczuk *et al.* 2016). Horizontální přenos genů dává bakteriím příležitost získat nové rezistentní vlastnosti, a to nejen od zástupců stejného rodu, ale tak i od vzdáleně příbuzných nebo zcela odlišných bakteriálních rodů (Alekshun and Levy 2007; Hutinel *et al.* 2021).

Koncentrace antibiotik v odpadní vodě je výrazně nižší ve srovnání s běžně podávanými terapeutickými dávkami, přesto jsou i takto nízké (tzv. subinhibiční) koncentrace schopné ovlivňovat citlivé bakterie, selektovat rezistentní bakterie nebo podporovat horizontální přenos genů antibiotické rezistence (Luczkiewicz *et al*. 2010; Manaia *et al*. 2018). Značný dopad mají subinhibiční koncentrace antibiotik na vznik a šíření multirezistence. Existují důkazy, že působení subinhibičních koncentrací antibiotik vede k mutagenezi v širším spektru genů kódujících antibiotickou rezistenci a efluxní pumpy, což vede k vytvoření multirezistentního kmene (Sengupta *et al*. 2013). Jako multirezistentní jsou klasifikovány bakterie, které jsou rezistentní k nejméně jednomu antibiotiku ze tří a více tříd (Krzeminski *et al.* 2019). Multirezistentní patogenní bakterie představují významnou globální hrozbu pro veřejné zdraví. Schopnost získat rezistenci vůči širokému spektru antibiotik směřuje k tomu, že infekce způsobené multirezistentními bakteriemi se stávají prakticky neléčitelnými (Nnadozie *et al.* 2017).

Druhým faktorem přispívajícím k šíření antibiotické rezistence v prostředí čistíren odpadních vod je skutečnost, že podmínky nabízené mikroorganismům během biologického procesu čištění poskytují ideální prostředí pro selekci rezistentních bakterií, horizontální přenos genů antibiotické rezistence a vznik nových rezistentních kmenů (Novo *et al.* 2013; Nnadozie *et al.* 2017; Lorenzo *et al*. 2018). Je obecně známo, že biologický proces čištění odpadních vod,

založený na aktivovaném kalu, který je široce používaný v městských čistírnách odpadních vod, nabízí potenciální prostředí pro rozvoj antibiotické rezistence (Zhuang *et al*. 2015; Manaia *et al*. 2016; Michael-Kordatou *et al*. 2018). Vysoká hustota buněk a jejich blízký kontakt v kombinaci s nadbytkem živin, vysokou koncentrací kyslíku, stabilní teplotou a pH, přítomností subinhibičních koncentrací antibiotik a dalších látek se selektivním tlakem, vytváří ideální podmínky pro snadný přenos genů resistence mezi bakteriemi, jehož důsledkem dochází k velmi rychlému šíření antibiotické rezistence (Luczkiewicz *et al*. 2010; Rizzo *et al*. 2013a; Zhang *et al*. 2015; Zhuang *et al.* 2015; Manaia *et al*. 2016; Nnadozie *et al*. 2017; Osińska *et al*. 2017; Manaia *et al*. 2018; Michael-Kordatou *et al*. 2018). V tomto prostředí s vysokou bakteriální hustotou mají mikroorganismy přístup k obrovskému množství genů antibiotické rezistence, ale také k mobilním genetickým elementům, např. plazmidům a transpozonům, prostřednictvím nichž se mohou geny antibiotické rezistence šířit bakteriální populací (Koczura *et al*. 2012; Korzeniewska and Harnisz 2013). Při čištění odpadních vod pak dochází k rozsáhlé genetické výměně, při které mohou patogenní bakterie získat zcela nové geny rezistence nebo se stát multirezistentními, pokud získají plazmid nesoucí více genů antibiotické rezistence (Santoro *et al.* 2015; Hunitel *et al.* 2021).

Schopnost bakterií přenášet geny antibiotické rezistence pomocí mobilních genetických elementů představuje stěžejní bod pro šíření antibiotické rezistence v bakteriálních komunitách (Kotlarska *et al*. 2015; Osińska *et al*. 2017). Integrony nejsou samy o sobě mobilními elementy, ale mohou být včleněny do jiných mobilních genetických elementů, jakými jsou transpozony nebo plazmidy, které umožnují horizontální přenos genů mezi bakteriemi (Koczura *et al*. 2012; Kotlarska *et al*. 2015). Prostřednictvím integronů mohou bakterie získat geny, které jim umožnují rychlé přizpůsobení měnícím se podmínkám prostředí, čímž je zajištěno jejich přežití (Osińska *et al.* 2017). Integrony jsou genetické platformy, které jsou schopny zachytit a integrovat exogenní geny antibiotické rezistence a převést je na funkční geny zajištěním jejich správné exprese (Zhang *et al.* 2019). Obsahují kolekce genů, tzv. genetické kazety a vyznačují se schopností stabilně se integrovat do oblastí jiných DNA, kam při jediné výměně současně dodávají více genů (Alekshun and Levy 2007; Osińska *et al*. 2017). Do jednoho integronu může být včleněno několik genetických kazet (Koczura *et al.* 2012; Osińska *et al*. 2017; Zhang *et al*. 2019). V integronech mohou být vytvářeny nové kombinace genů antibiotické rezistence, což přispívá ke vzniku multirezistentních kmenů (Osińska *et al*. 2017). Integrony hrají velmi důležitou roli v horizontálním přenosu genů antibiotické rezistence a ve značné míře se vyskytují v přečištěných odpadních vodách (Zhang *et al.* 2019). Ačkoliv jsou integrony široce distribuovány v gramnegativních bakteriích, u nichž se podílejí na zachycení, mobilizaci

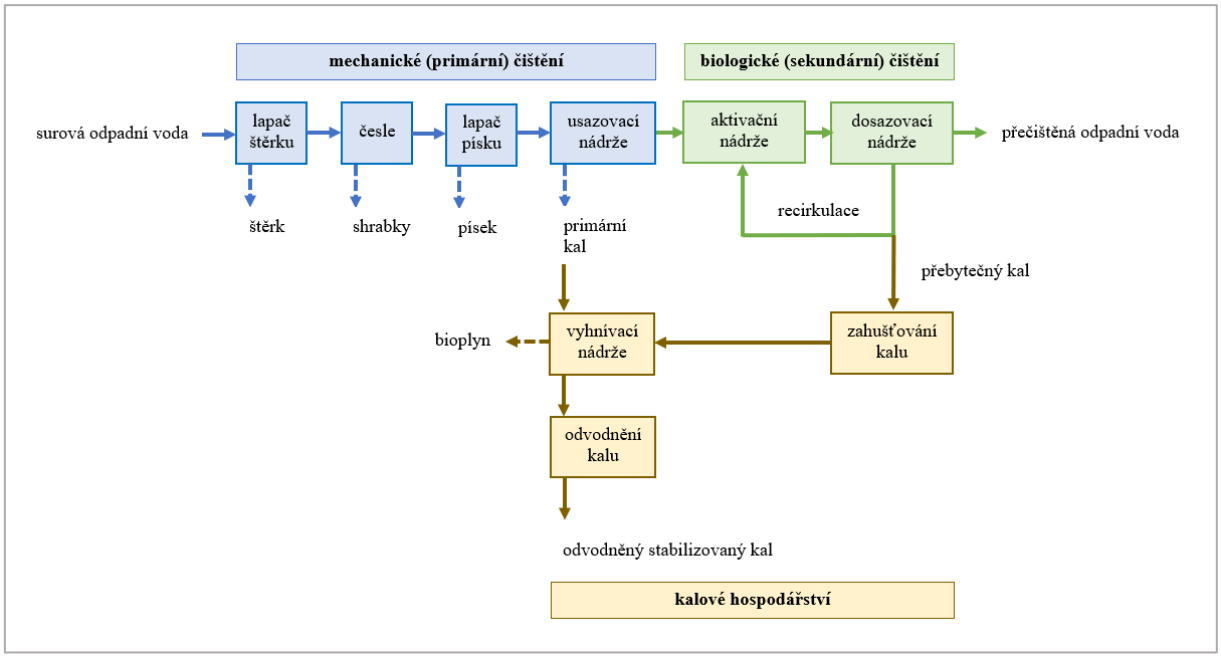
a šíření genů antibiotické rezistence, existují důkazy naznačující jejich výskyt i u grampozitivních druhů bakterií (Koczura *et al*. 2012; Kotlarska *et al.* 2015).
Celosvětově vede čištění odpadních vod bez ohledu na jeho účinnost nebo provozní podmínky, k produkci přečištěných odpadních vod s obsahem rezistentních bakterií (Novo *et al.* 2013). V důsledku toho představují přečištěné odpadní vody jednu z nejvýznamnějších cest pro šíření antibiotické rezistence do vodního prostředí (Lorenzo *et al.* 2018).

1.5 Odstranění mikropolutantů biologickým procesem čištění odpadních vod

Čistírny odpadních vod zastávají v procesu čištění odpadní vody funkci jedinečné bariéry, která má zabránit přímému vstupu znečišťujících látek z odpadních vod do životního prostředí, zejména pak do vodních recipientů (Nnadozie *et al.* 2017; Manaia *et al.* 2018; Zhou *et al.* 2019; Herraiz-Carboné *et al.* 2021). Konvenční postup čištění odpadních vod využívá kombinaci fyzikálně-chemického (primární stupeň) a biologického čištění (sekundární stupeň). Principem biologického čištění odpadních vod je metabolická aktivita komplexního společenstva mikroorganismů, tzv. aktivovaného kalu, kde interakce mezi jednotlivými druhy nebo kmeny přímo ovlivňují a určují celkovou účinnost biologického čištění odpadních vod. Značné množství informací o fungování těchto složitých mikrobiálních společenstev není ale doposud známo. Základní mechanicko-biologický systém čištění může být ještě doplněn terciálním stupněm čištění, který slouží k dočištění odpadní vody. Je cílen buď na odstranění biologicky nerozložitelných nebo obtížně odstranitelných znečišťujících látek anebo na hygienizaci odpadní vody. Jeho účelem je získání přečištěné odpadní vody vysoké kvality před jejím vypouštěním do vodního recipientu nebo před opětovným použitím (Garrido-Cardenas *et al.* 2017). Blokové schéma základní technologické linky středních a velkých městských čistíren odpadních vod je zobrazeno na Obrázku 1.
Tradičně používané a nákladově efektivní biologické čištění odpadních vod je určeno pro odstraňování snadno biologicky odbouratelných sloučenin uhlíku, dusíku a fosforu, ale nikoliv pro odstraňování organických mikropolutantů, které se nacházejí ve specifických typech odpadních vod (Han *et al.* 2020; Antonopoulou *et al.* 2021). Ostatně městské čistírny odpadních vod ani nebyly k odstraňování takových znečišťujících látek navrženy (Tran *et al.* 2018; Patel *et al.* 2019; Phoon *et al.* 2020; Parida *et al.* 2022). Mísení odpadních vod ze zdravotnických zařízeních nebo průmyslových odpadních vod s komunálními odpadními vodami vede k vytvoření komplexní matrice se zvýšenými nároky na čistící proces (Majumder *et al.* 2021). Biodegradace, adsorpce a těkání jsou hlavní mechanismy, které se v biologickém procesu

čištění odpadních vod uplatňují při odstraňování znečišťujících látek (Mir-Tutusaus *et al.* 2021). Všechny tři jsou do značné míry ovlivněny chemickými vlastnostmi odstraňovaných sloučenin (Luczkiewicz *et al.* 2010). Látky, u kterých nedochází během procesu čištění k rozložení na jednoduché sloučeniny, jsou převážně adsorbovány a dále koncentrovány v čistírenském kalu (Hu *et al.* 2018; Alenzi *et al.* 2021). Typickým příkladem mikropolutantů, které procházejí čistírnami odpadních vod prakticky bez jakéhokoliv dotčení, jsou léčiva. Adsorpce je hlavním mechanismem, který se uplatňuje při odstraňování antibiotik během biologického čistění. Přibližně 70 % antibiotik je z odpadních vod přenášeno do čistírenských kalů, čímž se stávají jedním z jejich nejvýznamnějších rezervoárů. Naproti tomu vůči mikrobiální degradaci jsou antibiotika většinou velmi odolná, zejména pak fluorochinolony, sulfonamidy a trimethoprim (Sun *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019a; Buta *et al.* 2021; Mejías *et al.* 2021).

Mnoho z mikropolutantů zaváděných do čistíren odpadních vod je schopno inhibovat biologickou aktivitu společenstva mikroorganismů v aktivovaném kalu, což má za následek další snížení účinnosti biologického procesu čištění, a to z důvodu vymírání přítomné bakteriální populace (Khan *et al.* 2020; Khan *et al.* 2021a).



Obrázek 1 *Blokové schéma základní technologické linky středních a velkých městských čistíren odpadních vod*

1.6 Odstranění mikrobiální zátěže biologickým procesem čištění odpadních vod

Při čištění odpadních vod je odstranění mikrobiálního znečištění, zejména pak patogenních bakterií, obecně věnováno málo pozornosti (Lucas *et al.* 2014; Topic-Popovic *et al.* 2015). Přispívá k tomu i skutečnost, že ve Směrnici Rady č. 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod, která definuje požadavky na přečištěné odpadní vody, nejsou uvedeny mikrobiologické ukazatele. Limitní hodnoty pro mikrobiologické ukazatele jsou ve Směrnici Rady č. 91/271/EHS specifikovány pouze v případě, že je v čistícím procesu zahrnut terciální stupeň čištění s dezinfekcí odpadní vody (Lucas *et al.* 2014; López *et al.* 2020). Z toho vyplývá, že proces čištění odpadních vod zahrnující pouze primární a sekundární stupeň čištění není přímo určen k odstraňování mikrobiální zátěže. Účinnost odstraňování mikrobiálního znečištění pak závisí na konkrétních provozních podmínkách čistírny odpadních vod a na povaze bakteriální populace přítomné v čištěné odpadní vodě. Obecně je možné mikrobiální zátěž v určitých fázích konvenčního čistícího procesu snížit, vždy zde ale zůstane část bakterií, které budou v odpadní vodě schopny přetrvat (López *et al.* 2020).

Obecně se uvádí, že primární a sekundární stupeň čištění dokáže odstranit až 99 % indikátorů fekálního znečištění. V závislosti na úrovni mikrobiálního znečištění surové odpadní vody ale nemusí být ani tato čistící účinnost dostatečná (Lucas *et al.* 2014; Topic-Popovic *et al.* 2015). Čistící proces odpadních vod taktéž není schopný efektivně odstranit rezistentní bakterie a geny antibiotické rezistence (Guo *et al.* 2015; Liang *et al.* 2021).

Jak již bylo zmíněno výše, samotné podmínky biologického čištění odpadních vod ještě přispívají k rozvoji antibiotické rezistence. Zastoupení rezistentních bakterií může být v přečištěné odpadní vodě ještě vyšší, než v surové odpadní vodě přiváděné do dané čistírny (Novo *et al.* 2013). Taktéž množství genů antibiotické rezistence detekované v přečištěných odpadních vodách výrazně přesahuje úrovně typické pro vodní ekosystémy (Zhuang *et al.* 2015). Tento jev je zřejmě opět spojen s biologickým čištěním odpadních vod, neboť se uvádí, že biologické procesy čištění vedou spíše ke zvyšování množství genů antibiotické rezistence, než k jejich odstranění (Liang *et al.* 2021; Zhu *et al.* 2021).

Kontaminace vodních recipientů přečištěnou odpadní vodou s nízkou mikrobiální kvalitou vede k riziku šíření nákaz, zvláště pokud daný vodní útvar slouží jako zdroj pitné nebo zavlažovací vody, případně je využíván k rekreačním účelům (Lucas *et al.* 2014; Collivignarelli *et al.* 2017; Gomes *et al.* 2019).

1.6.1 Dezinfekce odpadních vod po biologickém procesu čištění

Pro účinnou kontrolu mikrobiologických rizik spojených s přečištěnou odpadní vodou je nezbytné zařadit do procesu čištění odpadních vod dezinfekční krok, jenž efektivně podpoří odstranění patogenních bakterií (Huang *et al.* 2011; Lucas *et al.* 2014; Gomes *et al.* 2019).

Dezinfekce odpadní vody má především zajistit ochranu obyvatel před expozicí vodou šiřitelných patogenních bakterií. Mikrobiální inaktivace je dezinfekčním krokem, který vyvolává biochemické změny v bakteriální populaci. Povaha těchto biochemických změn závisí na bakteriální komunitě a použitém dezinfekčním prostředku (Collivignarelli *et al.* 2017). Přesto i po provedení dezinfekčního kroku stále přetrvává mikrobiální riziko, neboť hrozí reaktivace bakteriálních buněk (Bouki *et al.* 2013). Po aplikaci dezinfekčního prostředku je velká část bakterií, a to včetně rezistentních, zničena. Ostatní bakteriální buňky ale v důsledku vystavení stresovým podmínkám přecházejí do stavu vegetačního klidu, a po uvolnění stresových faktorů může dojít k jejich reaktivaci. K tomuto jevu dochází například zředěním přečištěné odpadní vody ve vodním recipientu nebo jejím dlouhodobým skladováním (Manaia *et al*. 2018).

Z mikrobiologického ani genetického hlediska není důvod předpokládat, že rezistentní bakterie lépe přežijí proces dezinfekce, v porovnání s citlivými bakteriemi. Dezinfekční krok, vhledem ke schopnosti snižovat mikrobiální zátěž přispívá i k redukci rezistentních bakterií (Manaia *et al*. 2018). Pro odstranění genů antibiotické rezistence je ale dezinfekční ošetření neúčinné (Liang *et al*. 2021).

Chlorace, ozonace a aplikace ultrafialového záření (UV) představují nejběžněji používané procesy pro dezinfekci odpadních vod (Zhuang *et al*. 2015). Použití chloru nebo oxidu chloričitého je nejpoužívanější metodou k dezinfekci přečištěných odpadních vod. Využití tohoto postupu však může vést k tvorbě mutagenních, karcinogenních nebo toxických vedlejších produktů, např. halogenovaných organických sloučenin, škodlivých pro vodní organismy i lidské zdraví (Collivignarelli *et al*. 2017; Gomes *et al.* 2019).

UV záření stále častěji zastupuje dezinfekci chlórem, neboť při jeho aplikaci nedochází ke tvorbě potencionálně nebezpečných vedlejších produktů (Rizzo *et al*. 2013b). Využití UV záření se ukazuje jako vhodný dezinfekční postup pro odpadní vody obsahující rezistentní bakterie. Inaktivace genů antibiotické rezistence většinou závisí na stupni poškození DNA, který je dán absorpcí UV záření proniklého do buňky nukleovými kyselinami (Zhu *et al.* 2021). Účinek ozonu spočívá v porušení buněčné stěny v důsledku protoplazmatické oxidace, což nakonec vyústí v lýzi buňky. K tomu může dojít buď přímo účinkem molekulárního ozonu

anebo nepřímo prostřednictvím hydroxylových radikálů, které vznikají rozkladem ozonu. Tvorbu hydroxylových radikálů lze zvýšit pomocí heterogenních katalyzátorů, ale jejich použití může být značně finančně nákladné (Gomes *et al*. 2019). Výkonost procesu při eliminaci rezistentních bakterií a genů antibiotické rezistence silně závisí na citlivosti cílové bakterie nebo genu, koncentraci ozónu a době působení (Michael-Kordatou *et al*. 2018). Podobně jako vůči účinku UV záření, jsou i k působení ozónu více tolerantní grampozitivní bakterie, ve srovnání s gramnegativními (Zhu *et al*. 2021).

Jako dezinfekční prostředek pro odpadní vody je možné využít i kyselinu peroctovou, silné oxidační činidlo se širokým antimikrobiálním účinkem. Během aplikace nedochází ke vzniku vedlejších mutagenních nebo toxických produktů. Nevýhodou je však zvýšení koncentrace organické složky přečištěné odpadní vody, vlivem hlavního rozkladného produktu, kyseliny octové. Tento jev naopak zvyšuje potenciál pro opětovný bakteriální růst (Collivignarelli *et al*. 2017).

Účinnost dezinfekčních procesů je závislá především na použité dávce dezinfekčního činidla. Konečný stupeň odstranění je ovlivněn jak strukturou bakteriálních buněk, tak i provozními podmínkami konkrétní čistírny odpadních vod (Bouki *et al*. 2013; Manaia *et al*. 2018). Dezinfekční procesy obecně účinně snižují množství rezistentních bakterií, ale pro eliminaci genů antibiotické rezistence mají velmi omezený účinek (Zhuang *et al*. 2015; Ferro *et al*. 2016; Lan *et al*. 2019). Neporušené zbytky DNA mohou přežít a kódované geny antibiotické rezistence se tak mohou přenést na bakteriální populaci ve vodních recipientech transformací nebo transdukcí (Zhuang *et al*. 2015). Přestože vysoké dávky dezinfekčních prostředků způsobí v mikrobiální komunitě závažné změny, pro inaktivaci genů antibiotické rezistence mohou být nedostatečné (Ferro *et al*. 2016; Manaia *et al*. 2018).

Aplikace jakéhokoliv dezinfekčního prostředku vede ke změnám ve složení odpadních vod, z nichž mnohé přetrvávají i po ukončení dezinfekčního procesu. Povaha a rozsah těchto změn jsou specifické pro konkrétní dezinfekční prostředek. Jedním z důsledků chemických změn může být zvýšení toxicity přečištěných odpadních vod (Collivignarelli *et al*. 2017).

1.7 Vhodné přístupy a technologie k čištění odpadních vod

Navržení přizpůsobených a specializovaných čistících technologií by mohlo podnítit decentralizované čistění specifických odpadních vod přímo v místě jejich vzniku. Konvenční biologický proces čistění odpadních vod, založený na aktivovaném kalu, vždy nemusí poskytnout uspokojivé výsledky, pokud jde o odstranění specifických kontaminantů nebo redukci vysoké mikrobiální zátěže. Stále se ale jedná o celosvětově nejběžněji aplikovanou technologii čištění a mělo by na ni být pohlíženo jako na metodu referenční, se kterou je vhodné nové čistící technologie srovnávat (Jaén-Gil *et al.* 2021). Vzhledem k různorodosti chemických, fyzikálních a biologických vlastností mikropolutantů je pro jejich efektivní odstranění nezbytné, aby navržená technologie kombinovala různé mechanismy čištění (Majumder *et al.* 2021). Biologické procesy mohou být kombinovány s dalšími technologiemi čištění, jakými jsou pokročilé oxidační procesy. Jejich zařazení jako kroku předčištění před biologickým čištěním spočívá ve zvýšení biologické rozložitelnosti kontaminantů. Naopak zařazení pokročilých oxidačních procesů jako terciálního stupně čištění, může vést ke zlepšení celkové účinnosti odstraňování kontaminujících látek a současně snížit ekonomické náklady a ekologickou stopu (Jaén-Gil *et al.* 2021; Mir-Tutusaus *et al.* 2021). Účinnost kombinovaného procesu čištění bude vždy ovlivněna vlastnostmi čištěné odpadní vody. Navíc je nutné správně vyhodnotit nejúčinnější kombinaci technologií, která zajistí celkové snížení kontaminujících látek, což zahrnuje odstranění nejenom mateřských sloučenin, ale také hlavních metabolitů a vznikajících transformačních produktů (Jaén-Gil *et al.* 2021).

S ohledem na eliminaci šíření bakteriální rezistence je pak nezbytně nutné, aby technologie byla schopna odstraňovat nebo alespoň redukovat nejenom celkové mikrobiální znečištění, ale i geny antibiotické rezistence (Zhuang *et al.* 2015; Le *et al.* 2018). Vzhledem k tomu, že geny antibiotické rezistence jsou vysokomolekulární sloučeniny (biomakromolekuly) s molekulární hmotností od desítek tisíc do milionů, mohly by být zachyceny na membránách a tím odstraněny z odpadní vody. Z tohoto důvodů je důležité zhodnotit možnou roli membránových procesů, zejména ultrafiltrace a nanofiltrace, pro eliminaci šíření genů antibiotické rezistence skrze odpadní vody do životního prostředí (Lan *et al.* 2019; Liang *et al.* 2021). Z pokročilých oxidačních procesů je to zejména Fentonova oxidace, která vykazuje vysokou účinnost v odstraňování genů antibiotické rezistence (Lan *et al.* 2019; Liang *et al.* 2021; Majumder *et al.* 2021). Fotokatalýza i Fentonova oxidace mohou současně degradovat farmaceutické sloučeniny a inaktivovat mikroorganismy. Jeví se proto jako lukrativní možnost pro nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízeních (Uyguner Demirel *et al.* 2018).

1.8 Kultivační metody v mikrobiologii vody

Kontrola mikrobiologické kvality vod je historicky spojena s kultivačními metodami. Jakost vod je rutinně kontrolována pomocí standardních metod, které jsou neustále aktualizovány, aby zajistily průkaz nebo stanovení cílových bakterií významných pro kontrolu kvality vod, ochranu veřejného zdraví a hodnocení rizik (Vaz-Moreira *et al.* 2011; Helmi *et al.* 2015). Kultivačními metodami je možné detekovat bakterie, které jsou v daném okamžiku v životaschopném stavu (Manaia *et al*. 2018). Naproti tomu bakterie, které se přechodně nebo trvale nacházejí v nekultivovatelném stavu, detekci unikají. Tento stav může být u bakterií způsoben specifickými růstovými požadavky, které ale nejsou v daném prostředí k dispozici. Dále nedostatkem živin, výskytem strukturálních poškození, které omezují nebo zpomalují dělení buněk nebo nízkou růstovou rychlostí, snižující konkurenceschopnost vůči rychle rostoucím bakteriálním druhům (Lévesque *et al.* 2011; Varela and Manaia 2013; Vaz-Moreira *et al*. 2013; Manaia *et al*. 2016). Neschopnost růstu na kultivačních půdách může u některých bakteriálních druhů představovat významné omezení jejich detekce (Varela and Manaia 2013; Helmi *et al.* 2015). Tato část bakteriální populace se nazývá životaschopná, ale nekultivovatelná (VBNC). Tyto bakterie mohou stále vykazovat aktivní metabolismus a v příznivých podmínkách se mohou potencionálně znovu začít množit. Navíc stav nekultivovatelnosti nevylučuje schopnost způsobit infekci a aktivovat mechanismy virulence (Helmi *et al*. 2015; Manaia *et al*. 2018). Až 99 % bakterií nacházejících se v životním prostředí může být životaschopných, ale nekultivovatelných (Vaz-Moreira *et al*. 2013; Helmi *et al*. 2015; Manaia *et al*. 2018; Pazda *et al*. 2019). Z tohoto důvodu mohou kultivační metody podceňovat skutečné množství bakterií přítomných ve vyšetřovaném vzorku (Helmi *et al.* 2015). V obecném měřítku je detekce bakterií kultivačními metodami velmi pracná a získání výsledků může být značně časově náročné (Rizzo *et al*. 2013a; Alhamlan *et al*. 2015; McLain *et al*. 2016). Navzdory nepopiratelným omezením však nelze význam a hodnotu kultivačních metod podceňovat (McLain *et al*. 2016). Kultivační metody jsou klíčem k charakterizaci fenotypu jednotlivých izolátů (McLain *et al*. 2016; Pazda *et al*. 2019). Umožňují nejenom studovat strukturální a fyziologické vlastnosti bakterií, ale představují i neocenitelný nástroj pro studium biologie a ekologie bakterií, neboť mnohé z fenotypových znaků jsou zásadní pro jejich pochopení (Vaz-Moreira *et al*. 2013; Manaia *et al.* 2018). Kultivační metody taktéž umožnují stanovit počet životaschopných buněk a hodnotit antibiotickou rezistenci izolátů. Fenotypová charakterizace izolátů má rozhodující význam pro určení spektra antibiotické rezistence, stanovení minimální inhibiční koncentrace nebo schopnosti podílet se na procesech

horizontálního přenosu genů (Manaia *et al*. 2018). Jednou z výhod zisku bakteriálního izolátu je možnost stanovení profilů multirezistence. Velmi cennou vlastností metod využívajících bakteriální kultivaci je schopnost detekovat expresi genů kódujících vícečetnou antibiotickou rezistenci v jednom izolátu, a nikoliv pouze prokázat přítomnost těchto genů. Izolace bakterií proto představuje nejpřímější cestu, jak v daném prostředí posoudit přítomnost multirezistentních bakterií (McLain *et al*. 2016).

Kultivační metody jsou taktéž důležité při detekci vodou přenosných patogenních bakterií. Při výskytu nákazy je izolace bakteriálního původce zásadní pro sérotypizaci a následnou epidemiologickou charakterizaci pomocí molekulárně-genetických metod (Laukkanen *et al*. 2010; Pitkänen 2013; Strakova *et al.* 2021). Při využití kultivačních metod tak může být bakteriální izolát charakterizován jak fenotypově, tak následně i genotypově (McLain *et al*. 2016).

1.8.1 Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách kultivačními metodami

Metody průkazu nebo detekce vybraných patogenních bakterií ve vodách jsou specifikovány normami. Jedná se zejména o patogenní bakterie, které mají indikátorovou hodnotu nebo o významné původce vodou šiřitelných onemocnění, jejichž detekce je důležitá z epidemiologického hlediska. Pro detekci patogenních bakterií v odpadních vodách nejsou definovány žádné specifické protokoly. Některé z norem z oblasti mikrobiologie vody však specifikují metody detekce patogenních bakterií použitelné pro všechny druhy vod. Případně je možné vycházet z principů standardizovaných metod, které jsou určeny pouze pro určité druhy vod nebo dokonce pro potravinový řetězec. V každém případě je ale nezbytné použitý kultivační protokol přizpůsobit specifickým vlastnostem odpadní vody.

Přestože se odpadní vody vyznačují vysokou fekální kontaminací, od vzorků stolice se z hlediska bakteriálního složení značně odlišují. Vzorky stolice obvykle obsahují velké množství životaschopných buněk patogenních bakterií. Dominantní postavení cílové patogenní bakterie, spolu s velkou populací fyziologicky aktivních buněk, usnadňuje detekci. Proto je pro izolaci patogenních bakterií ze stolice postačující metoda přímého vyočkování na pevná média (Pitkänen 2013; Petsios *et al.* 2016).

Naproti tomu v odpadních vodách tvoří patogenní bakterie pouze minoritní část z celkové bakteriální populace a jejich koncentrace jsou tak relativně nízké, neboť se nacházejí uprostřed mnohem většího množství komplexní doprovodné mikroflóry (Hsu *et al*. 2011; Varela and Manaia 2013; Petsios *et al.* 2016). Ve srovnání s ostatními bakteriálními skupinami jsou

tak patogenní bakterie přítomny ve výrazné menšině (Hsu *et al.* 2011; Varela and Manaia 2013). Kromě toho je přítomná populace patogenních bakteriích většinou fyziologicky málo aktivní a značná část buněk může být i strukturálně poškozena nebo mít potíže s adaptací na podmínky *in vitro* (Lévesque *et al*. 2011). Z těchto důvodů není přímá izolace patogenních bakterií na pevných půdách pro vzorky odpadních vod dostatečně účinná. Vzorky odpadních vod typicky vyžadují pomnožení v tekutém médiu před vyočkováním na pevná média, aby bylo dosaženo zvýšení množství cílových patogenních bakterií. K tomu lze přispět i zkoncentrováním vzorku odpadní vody (Khan *et al.* 2013; Pitkänen 2013; Petsios *et al.* 2016; Liu *et al.* 2018).

Membránová filtrace je nejběžnější používanou metodou pro zkoncentrování buněk v mikrobiologii vody a je součástí řady standardizovaných metod. Jedná se o jednoduchý a relativně rychlý přístup, jenž se snadno přizpůsobí jakémukoliv objemu vody (El Boujnouni *et al*. 2022). Výhody membránové filtrace lze však uplatnit pouze pro vzorky nezakalených vod. Proces membránové filtrace odpadních vod je v praxi značně komplikovaný, neboť přítomné plovoucí nebo sedimentující nečistoty, zejména u surových odpadních vod, způsobují ucpávaní pórů membrány (Strakova *et al.* 2021; El Boujnouni *et al.* 2022). Mnohdy je k záchytu velmi nízkých počtů cílových patogenních bakterií zapotřebí zkoncentrovat značné objemy odpadní vody, což je ale z důvodu vysokého stupně znečištění velmi obtížné (Pitkänen 2013). Využití membránové filtrace pro vzorky odpadních vod vyžaduje odstranění mechanických nečistot. K tomu lze využít předřazené filtrační kroky za použití membrán s dostatečnou velikostí pórů, tak aby byly prostupné pro bakteriální buňky. Stále zde ale existuje riziko, že tímto postupem budou zachyceny i cílové patogenní bakterie. Navíc vícestupňové uspořádaní filtrace zvyšuje pracnost celého procesu zkoncentrování vzorku (Lévesque *et al.* 2011). Alternativním přístupem pro zkoncentrování odpadní vody je centrifugace (Pitkänen 2013). Jednoduchost centrifugačního protokolu je však omezena malým objemem zpracovaného vzorku odpadní vody (El Boujnouni *et al.* 2022).

Pomnožení odpadní vody v tekutém médiu před vyočkováním na pevné půdy umožňuje navýšit počty cílových patogenních bakterií na detekovatelné úrovně (Hsu *et al.* 2011; Pitkänen 2013). Použití neselektivního média usnadňuje obnovení a následný růst stresovaných nebo poškozených buněk cílových patogenních bakterií, ale rovněž vede k pomnožení doprovodné mikroflóry (Liu *et al.* 2018; Sullivan *et al.* 2020). Ve vzorcích odpadních vod vyznačujících se vysokou mikrobiální zátěží však může růst a metabolismus doprovodné mikroflóry pomnožení patogenních bakterií potlačit. Převažující necílová bakteriální populace spotřebovává během procesu pomnožení enormní množství živin, čímž je inhibován růst cílových patogenních bakterií. Pravděpodobnost tohoto jevu ještě zvyšuje zkoncentrování vzorku odpadní vody, čímž

se kromě počtu cílových bakterií zvýší i množství doprovodné mikroflóry (Abulreesh *et al.* 2005; Pitkänen 2013).

Snížení počtu konkurenčních bakterií lze dosáhnout působením vhodného selektivního tlaku. Ten může být aplikován buď přímo během primárního pomnožení, nebo být do metody detekce včleněn jako samostatný krok následující po primárním neselektivním pomnožení (Daquigan *et al.* 2016). Selektivitu pomnožovacího kroku lze ovlivňovat prostřednictvím kultivačních podmínek (teplotou a časem), ale taktéž přídavkem antibiotik nebo dalších látek se selektivním tlakem, např. chloridem sodným (Pitkänen 2013, Kim *et al.* 2016).

Zařazení pomnožení v tekutém médiu do metody detekce patogenních bakterií z odpadních vod je klíčové pro jejich úspěšnou izolaci, a proto je zcela nezbytné správně nastavit podmínky pomnožení. V úvahu je potřeba brát počet a selektivitu pomnožovacích kroků, objem zpracovávaného vzorku odpadní vody, objem tekutého pomnožovacího média, jejich vzájemný poměr, zkoncentrování buněk nebo dobu a teplotu kultivace. Každý z těchto paramentů může hrát důležitou roli (Lévesque *et al.* 2011; Kim *et al.* 2016).

Ačkoliv pro silně kontaminované matrice odpadních vod může být pomnožení v neselektivním médiu až kontraproduktivní, jeho předřazení před krok selektivního pomnožení zvyšuje pravděpodobnost detekce poškozených patogenních bakterií, neboť tyto bakterie nemusí přežít stresové podmínky vyvolané přímou kultivací v selektivním médiu (Davies *et al.* 2000; Lévesque *et al.* 2011; Vaz-Moreira *et al.* 2011; Daquigan *et al.* 2016). Naproti tomu vynechání kroku neselektivního pomnožení snižuje riziko přemnožení doprovodné mikroflóry a následné inhibice cílové patogenní bakterie a zkracuje dobu potřebnou k získání negativních výsledků (Margot *et al.* 2013).

Optimální pevné médium se vyznačuje vysokou úrovní citlivosti a specifity pro cílovou patogenní bakterii (Carrique-Mas *et al*. 2009). Tradiční selektivně-diagnostická média odlišují cílové bakterie od ostatních bakteriálních druhů na základě vizualizace jednoduchých biochemických vlastností, jako je produkce sulfanu nebo fermentace cukrů. Tato média se ale mohou vyznačovat poměrně špatnou specifitou, neboť na nich nelze vizuálně rozlišit cílové bakterie od bakteriálních druhů se stejnými nebo podobnými biochemickými vlastnostmi (Cassar and Cuschieri 2003; Hyeon *et al.* 2012; Tan *et al.* 2014). Tyto falešně pozitivní kolonie, které vzhledem odpovídají cílovým patogenním bakteriím, vytvářejí zbytečnou pracovní zátěž a také zvyšují náklady spojené s konfirmačními testy (Carrique-Mas *et al*. 2009; Kuijpers *et al*. 2018). Jednou z možností, jak překonat tento problém, je použití chromogenních médií, které mají vysokou specifitu. Tato média obsahují chromogenní substrát specifický pro určitý enzym, jehož působením dochází k barevné změně substrátu (Cassar and Cuschieri 2003).

Chromogenní média tak umožnují specifičtější vizuální identifikaci presumptivních kolonií cílových bakterií, čímž se snižují počty falešně pozitivních kolonií vybraných pro konfirmační testy. Tímto též dochází k usnadnění a urychlení detekce (Carrique-Mas *et al*. 2009; Lee *et al.* 2015). Přesto je ale vhodné předpokládané barevné reakce cílových bakterií, ale také nejčastěji se vyskytujících druhů doprovodné mikroflóry, ověřit pomocí kontrolních kmenů (Kuijpers *et al.* 2018).

Primárním cílem kultivační detekce je zisk bakteriálního izolátu. Současně je pak pozornost soustředěna na dosažení co nejrychlejší detekce a identifikace, snížení pracnosti a celkových nákladů kultivace. Mnohdy je tyto dva aspekty velice těžké propojit. Kultivační protokol kombinující pomnožení v jednom selektivním pomnožovacím médiu s následnou izolací na chromogenním médiu proces detekce zjednoduší, zkrátí i zlevní. Výsledkem ale může být i nepřijatelně vysoký počet falešně negativních výsledků. Naproti tomu použití několika tekutých pomnožovacích nebo pevných médií povede ke zvýšení míry detekce cílové patogenní bakterie a snížení rizika falešně negativních výsledků, ale současně se tím zvýší i náklady a pracovní zátěž.

1.9 Molekulárně biologické metody v mikrobiologii vody

Molekulárně biologické metody využívají při detekci specifickou nukleotidovou sekvenci cílové bakterie. Umožňují rychlou identifikaci cílové bakterie bez nutnosti získání čisté kultury a vyznačují se vysokou přesností a specifitou (Lee *et al.* 2015). Mezi základní a současně i nejpoužívanější postupy molekulární detekce patří polymerázová řetězová reakce (PCR) a kvantitativní PCR (nejčastěji označovaná jako qPCR nebo real-time PCR) (Pazda *et al.* 2019). Proces extrakce DNA ze vzorku a zejména kvalita izolované DNA jsou klíčové pro následnou detekci cílové nukleotidové sekvence. Vzorky odpadních vod představují komplexní matrici, která obsahuje značné množství organických a anorganických látek, z nichž mnohé působí inhibičně a znesnadňují detekci cílových bakteriálních druhů nebo genů. Snížení citlivosti detekce může způsobit podhodnocení počtu cílů nebo vést k falešně negativním výsledkům. Typickým příkladem PCR inhibitorů, které se nacházejí v odpadních vodách, jsou huminové látky a detergenty (Pazda *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2021). Molekulární metody jsou obecně považovány za vysoce citlivé a schopné detekovat velmi nízké počty cílových bakterií. Přesto ale molekulární detekce velmi nízkých počtů patogenních bakterií ve vzorcích vod vyžaduje zařazení pomnožovacího kroku v tekutém médiu, za účelem zvýšení počtu cílových buněk (Lee *et al.* 2015). Tento přístup nejenom že prodlužuje dobu detekce, ale v případě odpadních vod

vede i k pomnožení už tak vysokých úrovní doprovodné mikroflóry, což komplikuje následné kroky molekulární detekce. V případě qPCR může vynechání kroku pomnožení vést ke zlepšení přesnosti kvantifikace, ale i tento přístup má své nevýhody. Do reakční směsi může být přidáno pouze velmi malé množství templátu (předlohy DNA). Čistota a podíl cílové DNA v celkovém množství DNA obsažené ve vzorku, může ovlivnit přesnost výsledků. Dalším problémem PCR metod je neschopnost odlišit DNA z živých a mrtvých buněk. Způsob, jak toto překonat, je detekovat přítomnost ribonukleové kyseliny (RNA). Tento přístup je ale značně pracný a může vést k falešně negativním výsledkům v důsledku degradace RNA (Liu *et al.* 2018). Na druhou stranu molekulární metody umožnují detekovat bakterie, jejichž kultivace je za laboratorních podmínek velmi obtížná a taktéž zajišťují rychlou detekci u bakteriálních druhů, které se množí velmi pomalu (Pazda *et al.* 2019).

Přestože molekulární metody představují nástroj pro kvantifikaci bakterií, který je přesný, rychlý a zajišťuje specifickou detekci, nejsou součástí standardních metod. V této oblasti zcela převládá použití tradičních kultivačních metod (Zhamg *et al.* 2021). V současné době existuje pouze jedna mezinárodní norma v oblasti kvality vod, ve které je primárně využita molekulární detekce. Jedná se o normu ISO/TS 12869:2019, která specifikuje metodu detekce a kvantifikace *Legionella* spp. a *Legionella pneumophila* ve vodách, a to metodou qPCR. Metoda může být použita pro všechny typy vod, pokud povaha nebo obsah suspendovaných látek anebo doprovodné mikroflóry neovlivňuje stanovení (ISO/TS 12869:2019). Norma ISO/TS 12869:2019 však nebyla v České republice přijata a metoda qPCR se k detekci ani kvantifikaci legionel nepoužívá.

1.10 Využití přečištěných odpadních vod pro zavlažování

Využití přečištěných odpadních vod pro zavlažovaní je zdánlivě elegantním a praktickým řešením nedostatku vody (Gatica and Cytryn 2013). Zejména v polosuchých nebo suchých oblastech světa umožňuje tento přístup zmírňovat vyčerpání sladkovodních zdrojů vody pro zavlažování a zachovává je pro lidskou potřebu. Zavlažování přečištěnou odpadní vodou je důležité pro zachování potravinové bezpečnosti v oblastech, kde jsou zdroje sladké vody omezené, neboť umožnuje rozšířit zemědělskou činnost (Paudel *et al.* 2018; Marano *et al.* 2019; Kampouris *et al.* 2021). Očekává se, že význam přečištěné odpadní vody jako zdroje pro zavlažování vzroste i v dalších oblastech světa, a to s ohledem na zvyšující se nedostatek vody vlivem změny klimatu (Marano *et al.* 2019; Kampouris *et al.* 2021).

Zavlažování přečištěnými odpadními vodami má i agronomické výhody, neboť zvyšuje organickou hmotu v půdě a také koncentrace živin potřebných pro růst rostlin, jako je dusík, fosfor, železo, mangan, draslík, vápník nebo hořčík. Vysoká nutriční hodnota přečištěné odpadní vody může zlepšit růst rostlin, omezit aplikaci chemických hnojiv a zvýšit produkci na špatně úrodných půdách (Gatica and Cytryn 2013; Paudel *et al.* 2018).

Navzdory zřejmým výhodám jsou ale se zavlažováním přečištěnou odpadní vodou spojeny i obavy, týkající se důsledků pro lidské zdraví a životní prostředí (Gatica and Cytryn 2013; Kampouris *et al.* 2021). Využití přečištěné odpadní vody k zavlažování zemědělských plodin vyvolává otázky týkající se biologické bezpečnosti této praxe, zejména s ohledem na riziko kontaminace plodin patogenními mikroorganismy. Ke kontaminaci dochází nejčastěji přímým kontaktem plodin se zavlažovací vodou, která obsahuje patogenní organismy schopné adheze na jejich povrch. Alternativně však také může dojít k přijmu (tzv. internalizaci) patogenních organismů skrze kořenový systém rostlin z půdy (Marano *et al.* 2019). Zdravotní riziko pro spotřebitele z hlediska fekálně-orálního přenosu představuje zejména konzumace neomytých syrových plodin, např. salátů nebo jahod (Marano *et al.* 2019; Obayomi *et al.* 2019). Patogenní mikroorganismy se však mohou ze zavlažovací vody šířit i ovzduším, do kterého se dostávají během jakékoliv mechanické operace, zejména pak při použití automatických zavlažovacích systémů. Bioaerosol pak může být prostředkem k přenosu patogenních bakterií nebo virů, přičemž jeho vlivu nejsou vystaveni jenom zemědělští pracovníci, ale i obyvatelé v okolí zavlažovaných ploch (Korzeniewska and Harnisz 2013; Korzeniewska *et al.* 2013). Zavlažování přečištěnou odpadní vodou taktéž dochází ke kontinuálnímu uvolňování rezistentních bakterií a genů antibiotické rezistence do půdního prostředí. Prostřednicím horizontálního přenosu mohou geny antibiotické rezistence získávat půdní bakterie, ze kterých se mohou následně rozšiřovat na další patogenní bakterie (Kampouris *et al.* 2021).

Použití přečištěné odpadní vody k zavlažování taktéž vede k zavádění mikropolutantů do půdního prostředí (Kampouris *et al.* 2021). Dlouhodobá aplikace pak přispívá k nahromadění znečišťujících látek v půdě na úrovně, jenž výrazně převyšují jejich koncentrace ve zdrojové závlahové vodě (Wu *et al.* 2015). Kontaminací půdy může dojít k ovlivnění základních funkcí půdního ekosystému, nezbytných pro jeho správné fungování. Biochemické změny uhlíku a dusíku v půdě ovlivňují dostupnost živin pro rostliny. Fyzikálně-chemické změny, jako je snížení pH nebo zvýšení salinity a hydrofobicity půdy, mohou mít škodlivé účinky na její kvalitu. Aplikace přečištěné odpadní vody na půdu může také vést k strukturálním a funkčním změnám v půdních bakteriálních společenstvech. Dalším environmentálním dopadem je kontaminace vodních ekosystémů, prostřednictvím vyplavování znečišťujících látek z půdy do

podzemních nebo povrchových vod (Wu *et al.* 2015; Hammad *et al.* 2018; Jauregi *et al.* 2021; Santana *et al.* 2021; Aydın *et al.* 2022).

Zřejmě největší obavy však vzbuzuje příjem znečišťujících látek rostlinami, jež mohou být vnášeny do potravinového řetězce a představovat potenciální zdravotní riziko pro spotřebitele. V tomto ohledu je problematický zejména příjem léčiv (Wu *et al.* 2015; Ben Mordechay *et al.* 2018; Madikizela *et al.* 2018). Rostliny mohou kořenovým systémem přijímat léčiva jak z vody, kterou jsou zavlažovány, tak i z kontaminované půdy (Barreales-Suárez *et al.* 2018; Madikizela *et al.* 2018). V půdním prostředí jsou léčiva vystavena řadě procesů, které ovlivňují jejich koncentrace dostupné pro příjem rostlinami. Sorpce a transformace léčiv může vést k vytvoření produktů s výrazně sníženou biologickou dostupností. Na druhou stranu rozpuštěné a reverzibilně sorbované frakce léčiv jsou v půdě dostupné pro rostliny i půdní mikroorganismy (Wu *et al.* 2015; Ben Mordechay *et al.* 2018).

Po příjmu kořenovým systémem mohou být léčiva přemístěna do různých částí rostlin, zatímco některá zůstavují v kořenech, jiné jsou transportovány až do semen, listů a plodů, a to především v závislosti na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech (Madikizela *et al.* 2018). V rostlinných tkáních následně léčiva podléhají metabolizaci a transformaci (Emhofer *et al*. 2017; Ben Mordechay *et al*. 2018; Klampfl 2019). Toxicita vznikajících metabolitů pak může překročit toxicitu mateřské sloučeniny. Na druhou stranu velká část metabolitů může být v rostlinách přeměněna zpět na mateřskou sloučeninu, což je skutečnost, která pravděpodobně podporuje lékovou rezistenci (Klampfl 2019). Hladiny léčiv se tak v zemědělských produktech pohybují hluboko pod terapeutickou dávkou, na koncentračních úrovních μg/kg (Chuang *et al.* 2019). Přesto ale nejsou účinky dlouhodobé konzumace nízkých koncentrací léčiv skrze potraviny zcela jasné (Madikizela *et al.* 2018).

Akumulace léčiv v zemědělských produktech je klíčovým faktorem při hodnocení rizik pro lidské zdraví. Bioakumulační faktor je definován jako poměr koncentrace léčiva v rostlině a okolním prostředí. Pohyb léčiv v rostlině je vyjadřován pomocí translokačního faktoru, který vyjadřuje poměr koncentrace léčiva v nadzemní části rostliny a kořenech (Chuang *et al*. 2019). Léčiva, které se nacházejí v půdním prostředí, ovlivňují i samotné rostliny. Přítomnost léčiv v rostlinných tkáních má vliv na metabolismus rostlin. Změny vyvolané v hladinách rostlinných hormonů vedou k negativním dopadům na zdraví rostlin. Řada léčiv taktéž vůči rostlinám vykazuje toxický účinek (Kalaji and Rastogi 2017; Chuang *et al*. 2019). Růst rostlin je ovlivněn skrze antimikrobiální účinek léčiv na půdní mikroorganismy, kterým dochází k narušením symbiotických interakcí mezi rostlinami a mikroorganismy (Kalaji and Rastogi 2017). Přítomnost antibiotik v půdní prostředí má vliv na množství půdních mikroorganismů a tím i na

mineralizaci uhlíku, koloběh dusíku, celkovou mikrobiální a enzymovou aktivitu. Současně antibiotika také ovlivňují funkční, strukturální a genetickou rozmanitost půdních mikroorganismů (Cycoń *et al.* 2019). Eliminace půdních bakterií má za následek nedostatek potravy pro prvoky a další půdní mikroorganismy, což může vést k pomalé degradaci organických látek, a tedy nedostatku živin v půdě (Kalaji and Rastogi 2017).

Schopnost rostlin přijímat znečišťující látky může být i výhodou, kterou lze využít ke snížení zatížení povrchových nebo odpadních vod těmito látkami (Madikizela *et al.* 2018). Fytoremediace je termín shrnující technologické postupy, které využívají tzv. hyperakumulační rostliny a jejich rhizosférický mikrobiom k imobilizaci, stabilizaci a degradaci mikropolutantů ve vodě, půdě a ovzduší. Jako hyperakumulační jsou klasifikovány rostliny, které jsou schopné přijímat a akumulovat značné množství znečišťujících látek z kontaminované vody nebo půdy, a to bez známek toxického působení (Nedjimi 2021). Rhizosféra označuje tenkou zónu obklopující kořeny rostlin s četným výskytem mikroorganismů a bezobratlých organismů. V rhizosféře dochází ke složitým interakcím mezi kořeny rostlin a půdním mikrobiomem. Jedná se o dynamický systém s variacemi během růstu rostlin, i vlivem působení abiotických faktorů, jakým je např. působení mikropolutantů, pro jejichž případný příjem rostlinou je rhizosféra klíčová.

Fytoremediační technologie jsou alternativou pro sekundární stupeň čištění odpadních vod, použitelnou zejména při decentralizovaném čištění (Li *et al*. 2020). Kořenové čistírny odpadních vod přestavují umělé mokřady, využívající přirozené biologické procesy zapojené do přeměny a odstraňování znečišťujících látek, ale za kontrolovaných podmínek (Vymazal 2022).

1.10.1 Studium přijmu léčiv rostlinami

Ke studiu příjmu a metabolizace léčiv rostlinami jsou používány především dva, do značné míry odlišné, přístupy. První přístup je založen na *in vitro* experimentech s buněčnými kulturami, které jsou inkubovány společně s léčivy, zatímco druhý přístup vystavuje účinkům léčiv celou rostlinu (Klampfl 2019). V případě využití celých rostlin je nejběžnějším přístupem hydroponické pěstování, kdy jsou rostliny vystaveny účinkům vodných roztoků jednoho nebo více léčiv, které slouží jako závlahová voda. Pokud rostliny vyrůstají v půdě, mohou být léčiva dodávána buď prostřednictvím závlahové vody, nebo mohou být součástí půdního substrátu (Wu *et al.* 2015; Madikizela *et al.* 2018; Klampfl 2019).

Experimenty využívající buněčné kultury představují rychlý a přímý přístup k objasnění reakcí probíhajících při metabolizaci léčiv v rostlinách (Klampfl 2019). Naopak hydroponické experimenty lze použít k rychlému screeningu a identifikaci léčiv s vysokým potenciálem pro příjem rostlinami. Předpovídat na základě výsledků získaných při hydroponických experimentech příjem daného léčiva rostlinami v reálných podmínkách, ale nemusí být zcela přesné. Vzhledem ke složitým procesům, kterými jsou léčiva v půdě ovlivněna, může být jejich příjem rostlinami z uměle kontaminované závlahové vody a půdy značně odlišný (Wu *et al.* 2015). Hydroponické experimenty se vyznačují jednoduchým provedením a nízkou pracovní zátěží. Hydroponické podmínky pěstování taktéž snižují riziko bakteriální kontaminace, neboť rostliny lze ošetřit dezinfekčním přípravkem a závlahová média je možné sterilizovat. Tyto podmínky umožnují minimalizovat nebo dokonce zcela eliminovat ovlivnění experimentů bakteriální činností.

Použití půdy namísto hydroponických podmínek výrazně zvyšuje nároky na provedení experimentů, neboť je nutné brát v potaz řadu faktorů (Klampfl 2019). Sorpce léčiv na půdní částice vede jednak k poklesu koncentrace léčiv pro příjem rostlinami a současně snižuje jejich biologickou dostupnost. Některá léčiva se mohou za hydroponických podmínek v rostlinách značně akumulovat, zatímco z půdy je jejich příjem minimální (Wu *et al*. 2015). Bakteriální kontaminace vnesená do pěstebního systému půdním substrátem může mít za následek degradaci nebo metabolizaci mateřské sloučeniny ještě před samotným příjmem rostlinou (Klampfl 2019). Příjem léčiva taktéž závisí na druhu použitého substrátu. Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy, jako je obsah organického uhlíku, mají schopnost ovlivnit příjem léčiv rostlinami (Carter *et al*. 2018; Madikizela *et al*. 2018). Navíc zabezpečení homogenní koncentrace léčiva je v půdním substrátu, ve srovnání s vodným roztokem, obtížnější. V obou případech je ale nutné brát v úvahu možnost, že ke vzniku transformačních produktů cílových léčiv může docházet již v závlahové vodě nebo půdním substrátu, ze kterých je následně přijímají rostliny. Z tohoto důvodu je nezbytné analyzovat i samotná pěstební média (Klampfl 2019).

Podstatou experimentů s celými rostlinami je jejich vystavení známé koncentraci léčiv po určené časové období. Po sklizení rostlin následuje stanovení cílových sloučenin v rostlinných tkáních (Madikizela *et al*. 2018). Analýza může být zaměřena na kvantifikaci povětšinou stopových koncentrací původního léčiva v nezměněné formě nebo identifikaci metabolitů vznikajících v rostlině (Emhofer *et al*. 2018). Při studiu mateřské sloučeniny, někdy společně s jedním nebo dvěma hlavními metabolity, se rostliny ošetřují pouze stopovými koncentracemi léčiv, tedy takovými, které jsou očekávané ve skutečných přečištěných odpadních vodách

(nízké μg/l nebo méně). Avšak pro detekci a identifikaci nových metabolitů se rostliny pěstují v přítomnosti podstatně vyšších koncentrací léčiv, především z důvodu usnadnění identifikace a detekce domnělých metabolitů (Emhofer *et al*. 2017; Emhofer *et al*. 2019). Ovšem vystavení rostlin nadměrným koncentracím léčiv může mít i značný toxický efekt, vedoucí k ovlivnění přirozených biologických procesů a poškození rostlin (Klampfl 2019).

Analýza léčiv v rostlinných matricích často vyžaduje zdlouhavé extrakční postupy následované čistícím krokem, který slouží k odstranění interferujících látek extrahovaných společně s cílovými analyty (Emhofer *et al*. 2017; Barreales-Suárez *et al*. 2018; Carvalho *et al*. 2018). Pokud nejsou vzorky rostlin zpracovány ihned po sklizni, uchovávají se ve zmrazeném stavu. Před extrakcí cílových sloučenin je rostlinný materiál buď přímo homogenizován, nejčastěji nasekáním na drobné kousky nožem, rozmělněním pomocí třecí misky s tloučkem nebo lyofilizován s následným mechanickým rozmělněním na jemný prášek (Carvalho *et al*. 2018; Klampfl 2019). Mezi obvykle používané extrakční postupy patří ultrazvuková extrakce a zrychlená extrakce rozpouštědlem. Dále je možné využít mikrovlnou extrakci nebo tlakovou kapalinovou extrakci (Barreales-Suárez *et al*. 2018; Carvalho *et al*. 2018). Nezávisle na použitém extrakčním kroku je nezbytné primární extrakty před vlastní instrumentální analýzou přečistit. Z rostlinných matric jsou s cílovými analyty extrahovány i lipidy a pigmenty, které mohou způsobit značné ovlivnění hmotnostní detekce, neboť mohou výrazně zvýšit nebo naopak potlačit signál iontů (Carvalho *et al*. 2018).

Nejběžnější technikou pro přečištění a zkoncentrování rostlinných extraktů je extrakce tuhou fází (SPE). Využití SPE kroku ale může mít za následek významné prodloužení doby zpracování vzorku před analýzou. Navíc existuje potenciální riziko, že namísto zkoncentrování léčiv přítomných pouze ve stopových množství, dojde k jejich ztrátě zadržením na SPE kolonkách. Některá léčiva je naopak velmi obtížné zkoncentrovat, a to z důvodu velmi omezené interakce s náplní SPE kolon (Barreales-Suárez *et al*. 2018; Klampfl 2019). Jako alternativu k jednoduché extrakci rozpouštědlem je možné využít metodu přípravy vzorku QuEChERS, která umožní vynechat krok SPE, při současném zachování velmi dobrých detekčních limitů jak pro mateřské sloučeniny, tak i metabolity (Klampfl 2019).

Pro analýzu rostlinných extraktů je primárně využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s hmotnostní (MS) nebo tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS) (Emhofer *et al*. 2017; Emhofer *et al*. 2018). Toto spojení je výhodné zejména kvůli vysoké citlivosti a selektivitě, ale také vzhledem k velmi složitému charakteru analyzované matrice (Paíga *et al*. 2017). Pokud jsou cílovými analyty původní mateřské sloučeniny, které jsou v rostlinné matrici většinou přítomny pouze ve stopových koncentracích, je nejběžnější

volbou systém HPLC/MS s trojitým kvadrupólem (QqQ). V případě, že je studie zaměřena na identifikaci nových metabolitů vznikajících až po příjmu mateřské sloučeniny rostlinou, je nezbytné využít hmotnostní analyzátor s vysokou rozlišovací schopností. Tu zajišťuje například hybridní spektrometr kombinující kvadrupól a analyzátor doby letu (QTOF) nebo Orbitrap (Emhofer *et al*. 2017; Emhofer *et al*. 2018). Pro analýzu léčiv v biologických matricích může být také výhodné využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Přínosem je rychlejší analýza, vyšší citlivost a zlepšení rozlišení dané úzkými píky oproti konvenční HPLC. Nižší spotřeba rozpouštědel pak snižuje i náklady na provoz (Paíga *et al*. 2017; Rathod *et al*. 2019).

1.10.2 Polyfluorovaná léčiva efavirenz a kyselina flufenamová

Efavirenz ($C_{14}H_9ClF_3NO_2$) patří do skupiny antiretrovirových léčiv. Jedná se o nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy (NNRTI) používaný při léčbě viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) (Cavalcante *et al.* 2017). Antirentovirová aktivita efavirenzu spočívá v přímé vazbě na enzym reverzní transkriptázu, čímž dochází k inhibici replikace viru (Gaida *et al.* 2015). Efavirenz se vyznačuje vynikající účinností a je klíčovou složkou kombinované léčby HIV infekcí. Má dlouhý poločas rozpadu, pohybující se v rozmezí 40 až 55 hodin, a je metabolizován převážně v játrech (Gaida *et al.* 2015; Cavalcante *et al.* 2017). Navzdory své vysoké účinnosti je jeho použití často spojeno s významnými neuropsychiatrickými vedlejšími účinky, a to především v prvních týdnech terapie. Hlášena byla deprese, úzkost, poruchy spánku a koncentrace, agresivní chování, noční můry, halucinace, paranoia, psychózy a bludy (Gatch *et al.* 2013; Cavalcante *et al.* 2017). Mechanismy těchto vedlejších účinků a jeho celková toxicita zůstávají doposud nepochopeny (Cavalcante *et al.* 2017).

Kyselina flufenamová ($C_{14}H_{10}F_3NO_2$) patří do skupiny nesteroidních antirevmatik (NSAID). Vyznačuje se analgetickými, protizánětlivými a antipyretickými vlastnostmi (Malinovskaja-Gomez *et al.* 2016). Navzdory nižší účinnosti v porovnání s ostatními nesteroidními protizánětlivými léčivy našla kyselina flufenamová uplatnění při odstraňování bolesti a zánětu spojeného s muskuloskeletálními poruchami a revmatickými onemocněními. Vzhledem ke značné individuální variabilitě v absorpci kyseliny flufenamové bylo perorální podávání léčiva přerušeno a v současné době dochází výhradně k lokálnímu podání (Guinamard *et al.* 2013; Malinovskaja-Gomez *et al.* 2016). Podobně jako ostatní nesteroidní antirevmatika je užívání kyseliny flufenamové spojeno s vedlejšími účinky jako jsou gastrointestinální poruchy

a poškození ledvin, které jsou ale u tohoto léčiva částečně potlačeny díky lokální aplikaci (Guinamard *et al.* 2013).

1.11 Odstranění herbicidů z kontaminovaných vod

Již více než století se ke zvýšení produktivity zemědělství a výnosů kvalitních plodin používají herbicidy, přičemž jejich spotřeba neustále roste (Huang *et al.* 2020; Machado and Soares 2021; Wang *et al.* 2021). Výhody plynoucí z jejich použití jsou však doprovázeny negativními účinky na lidské zdraví a životní prostředí (Thiam and Salazar 2019). Rozsáhlá aplikace herbicidů má za následek jejich uvolňování do životního prostředí a kontaminaci půdního prostředí, ale i vodních ekosystémů, do kterých pronikají v důsledku povrchového odtoku (Huang *et al.* 2020; Machado and Soares 2021; Wang *et al.* 2021). Herbicidy jsou hlavními produkty agrochemického průmyslu, které se nacházejí v odpadních vodách. V důsledku jejich vysoké toxicity i při relativně nízkých koncentracích a nízké biologické rozložitelnosti není biologický proces čištění odpadních vod, založený na aktivitě mikroorganismů, dostatečný pro jejich odstranění (Gar Alalm *et al.* 2015a; Gar Alalm *et al.* 2015b). Aby bylo možné herbicidy z kontaminovaných vod efektivně odstranit, je nezbytné použít nové technologie, které se budou vyznačovat jak dostatečnou účinností, tak i nákladovou efektivností (Thiam and Salazar 2019). Značný aplikační potenciál mají v tomto směru pokročilé oxidační procesy (AOPs) (Cuerda-Correa *et al.* 2020).

Pokročilé oxidační procesy využívají silná oxidační činidla, generovaná specifickými reakcemi ve vodných roztocích, k degradaci organických látek na jednoduché a netoxické molekuly (Gar Alalm *et al.* 2015a; Gar Alalm *et al*. 2015b; Kanakaraju *et al.* 2018; Thiam and Salazar 2019; Wang and Zhuan 2020). Představují technologii šetrnou k životnímu prostředí, neboť nepřenáší znečišťující látky z jedné fáze do druhé tak, jako je tomu při využití chemických procesů srážení nebo adsorpce. Neprodukují ani obrovské množství nebezpečného kalu, jako při biologických procesech čištění odpadních vod (Cheng *et al.* 2016).

Nejvyšší pozornosti se dostává hydroxylovým radikálům ($OH^{\cdot}$), které představují jednu z nejdůležitějších reaktivních forem kyslíku. Hydroxylové radikály se vyznačují neselektivní povahou, vysokou reaktivitou a silnými oxidačními schopnostmi. S hodnotou redoxního potenciálu 2,8 V je hydroxylový radikál, po atomu fluoru (redoxní potenciál 3,05 V), druhým nejsilnějším známým oxidačním činidlem. Ve vodném prostředí je schopný napadnout téměř všechny organické i organokovové znečišťující látky. V tomto procesu hydroxylový radikál iniciuje sérii oxidačních reakcí, které v ideálním případě vedou k jejich úplné mineralizaci na

oxid uhličitý, vodu a anorganické ionty (Cheng *et al.* 2016; Kanakaraju *et al*. 2018; Cuerda-Correa *et al.* 2020).

Pokročilé oxidační procesy se klasifikují na základě způsobu, jakým je generováno oxidační činidlo (Cuerda-Correa *et al.* 2020; Wang and Zhuan 2020). Mezi pokročilými oxidačními procesy představuje heterogenní fotokatalýza jednu z nejslibnějších technologií pro dekontaminaci vod znečištěných vysoce stabilními a perzistentními organickými sloučeninami (Lee *et al.* 2017; Isari *et al.* 2018). Při tomto procesu se využívají polovodičové fotokatalyzátory a UV záření jako zdroj energie (λ <400 nm) (Gar Alalm *et al.* 2015b). Absorpce světla vhodným polovodičem má za následek generování elektronů (e^-) s vysokou redukční schopností ve vodivém pásmu a vznik otvorů (h^+) s vysokou oxidační schopností ve valenčním pásmu. Excitované elektory mohou redukovat molekulární kyslík za vzniku superoxidového radikálu. Zatímco otvory ve valenčním pásmu migrují na povrch fotokatalyzátoru, kde oxidují vodu za vzniku hydroxylového radikálu, čímž vzniká primární oxidant pro fotokatalytickou oxidaci organických látek (Mbiri *et al*. 2018; Wang and Zhuan 2020). Jako fotokatalyzátory je možné použít oxidy kovů (TiO_2, ZnO_2), sulfidy kovů (CdS, ZnS), polovodiče z drahých kovů (Ag_3O_4) nebo nekovové polovodiče (grafitický nitrid uhlíku) (Wang and Zhuan 2020).

Ze všech použitelných polovodičů poutá největší pozornost oxid titaničitý (TiO_2), vzhledem k jeho vysoké fotokatalytické aktivitě a značné tepelné a chemické stabilitě. Navíc je oxid titaničitý netoxický, relativně levný a lze jej snadno recyklovat v průmyslovém měřítku (Isari *et al.* 2018; Mbiri *et al.* 2018; Jamshidi *et al.* 2019; Wang and Zhuan 2020; Hu *et al.* 2021). Oxid titaničitý se v přírodě vyskytuje ve třech polymorfních krystalických modifikacích – anatasu, rutilu a brookitu, přičemž anatas vykazuje nejvyšší fotokatalytickou aktivitu. Z tohoto důvodu se jako fotokatalyzátor nejčastěji používá buď čistý anatasový prášek nebo jeho směs s rutilem, která se ale vyznačuje vysokým podílem anatasu (70–80 %) (Lee *et al.* 2017; Mahmoud *et al.* 2017).

Využití oxidu titaničitého jako fotokatalyzátoru má však určitá omezení, přičemž jedním z nich je relativně nízká kvantová účinnost čistého oxidu titaničitého. Navíc rekombinace elektronových děr výrazně snižuje jeho fotokatalytickou aktivitu (Mbiri *et al*. 2018). Oxid titaničitý může absorbovat pouze záření o vlnových délkách do 398 nm, a proto je aktivní pouze pod UV zářením. Vzhledem k tomu, že blízké UV záření tvoří pouze 5 % slunečního světla, není čistý oxid titaničitý pod slunečním osvětlením aktivní. Jako světelný zdroj je nezbytné využívat umělé UV lampy, které ale při praktické aplikaci vykazují značnou spotřebu energie. Pro umožnění aktivity oxidu titaničitého pod viditelným zářením byla navržena řada strategií.

Jednou z nich je modifikace povrchu organickými molekulami nebo nanočásticemi, použít lze také dopování kovy nebo přechodnými kovy (Isari *et al.* 2018; Cuerda-Correa *et al.* 2020).
Při fotokatalytické oxidaci hraje zásadní roli i množství použitého fotokatalyzátoru. Pokud se zvýší obsah fotokatalyzátoru, zvýší se i množství reakčních míst, což vede ke zlepšení účinnosti oxidace a mineralizace cílových znečišťujících látek. Faktem ale zůstává, že nadměrné množství fotokatalyzátoru blokuje pronikání fotonů, neboť dochází ke stínění, odrazu a rozptylu světla na pevných částicích, což způsobuje ztrátu světelné energie (Wang and Zhuan 2020).

1.11.1 Chloracetanilidové herbicidy

Vysoká míra využití chloracetanilidových herbicidů v posledních několika letech značně zvýšila pozornost věnovanou jejich potenciálním škodlivým účinkům na lidské zdraví a životní prostředí (Huang *et al*. 2020). Systémové a selektivní chloracetanilidové herbicidy se celosvětově používají k regulaci širokolistých plevelů a jednoletých trav při pěstování kukuřice, sóji, čiroku, cukrové řepy, slunečnice nebo bavlny (Souissi *et al.* 2013; Chen *et al.* 2017; Mohanty and Jena 2019). Mezi nejčastěji používané chloracetanilidové herbicidy patří alachlor, metolachlor a acetochlor (Orge *et al.* 2017).
Alachlor (2-chloro-(2′,6′-dietyl-N-(metoxymetyl) acetanilid) v cílových rostlinách přerušuje produkci bílkovin a syntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Vzhledem ke své rozpustnosti ve vodě (242 mg/l) a nízké sorpci na půdních částicích, může alachlor pronikat do povrchových, podzemních a pitných vod. Alachlor je ve vodním prostředí perzistentní, velmi špatně biologicky rozložitelná sloučenina. Svou vysokou toxicitou negativně ovlivňuje činnost aktivovaného kalu, což neumožnuje využít proces bioremediace k jeho odstranění. Taktéž fyzikálně-chemické procesy, jako peroxidace manganistanem, koagulace nebo chlorace nezajišťují jeho odstranění z vodního prostředí. Přítomnost alachloru ve vodních zdrojích je obzvláště znepokojivá, vzhledem k jeho možným účinkům na lidské zdraví a toxickým účinkům na vodní faunu. Hlavní příčinou jeho toxických vlastností je přítomnost atomů chlóru. Alachlor je lipofilní sloučenina, která je v živých organismech metabolizována jen velmi omezeně. Expozice alachloru vede k jeho akumulaci a přetrvávání v tukových tkáních (Jamshidi *et al*. 2019; Lou *et al*. 2020). Metolachlor (2-chloro-N-(2-etyl-6-metylfenyl)-N-[(1S)-2-metoxy-1-metyletyl] acetamid) představuje jeden z celosvětově nejpoužívanějších herbicidů, přičemž jeho podíl v celkové globální spotřebě činí 4,2 % (Chang *et al.* 2020; Machado and Soares 2020). Metolachlor je absorbován kořeny a výhonky rostlin

a ovlivňováním enzymů blokuje syntézu chlorofylu, bílkovin, mastných kyselin, isoprenoidů a flavonoidů. Po naklíčení je růst plevelů zablokován narušením buněčného dělení, prostřednictvím inhibice enzymu elongázy, což vede k zastavení tvorby mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (Machado and Soares 2020; Machado and Soares 2021). Metolachlor je podobně jako alachlor velmi špatně biologicky rozložitelný a perzistentní v půdě. Poločas rozpadu v půdním prostředí je více než 200 dní. Ve srovnání s jinými chloracetanilidovými herbicidy má vyšší rozpustnost ve vodě (530 mg/l). Z těchto důvodů má metolachlor vysoký potenciál kontaminovat podzemní a povrchové vody (Chang *et al*. 2020; Machado and Soares 2019; Machado and Soares 2020; Machado and Soares 2021). To potvrzuje jeho četná detekce v těchto vodních zdrojích v zemědělských oblastech, kdy jeho koncentrace může dosáhnout až 100 μg/l (Machado and Soares 2019). Metolachlor je méně toxický ve srovnání s alachlorem, přesto má škodlivý účinek na lidské jaterní buňky (Chang *et al*. 2020). Acetochlor [2-chloro-N-(etoxymetyl)-N-(2-etyl-6-metylfenyl) acetamid] je preemergentně i postemergentně aplikovaný axiálně chirální herbicid (Liu *et al*. 2020; Wang *et al*. 2019b). Blokuje tvorbu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, prostřednictvím inhibice enzymu elongázy a cyklizačních enzymů geranylgeranylpyrofosfátu (Huang *et al*. 2020). Vysoký potenciál acetochloru kontaminovat vodu a půdu vychází z jeho nízké sorpce na půdní částice, rozpustnosti ve vodě (233 mg/l) a vysoké perzistenci v prostředí (Liu *et al*. 2020).

1.11.2 Hodnocení toxicity

Přestože herbicidy byly navrženy tak, aby byly toxické pouze pro určitý druh organismů, v dnešní době existují nepopiratelné důkazy, že nepůsobí specificky pouze na svůj primární cíl. V důsledku toho herbicidy představují vážné riziko i pro necílové organismy a jejich přítomnost v půdě nebo ve vodách je doprovázena řadou nežádoucích účinků (Machado and Soares 2020). Ve vodních ekosystémech se účinek herbicidů rozšiřuje zejména na fytosynteticky aktivní organismy, vzhledem k jejich podobnosti s rostlinami. Právě fotosyntetizující organismy ale nejčastěji představují primární producenty a první úroveň potravinového řetězce, která poskytuje počáteční živiny a energii celému vodnímu ekosystému. Jakékoliv ovlivnění primárních producentů má důsledky pro vyšší trofické úrovně a následně ovlivní i celý potravinový řetězec (Machado and Soares 2020, Machado and Soares 2021).

Významnou vlastností pokročilých oxidačních procesů je jejich schopnost detoxikovat čištěnou vodu prostřednictvím rozkladu vysoce toxických organických sloučenin na méně toxické nebo dokonce netoxické produkty (Babu *et al*. 2019). Ošetření vody pokročilými oxidačními procesy

tak zpravidla způsobí ztrátu biologické aktivity znečišťujících látek a jejich inaktivaci, aniž by byla generována jakákoliv toxicita (Sharma *et al*. 2018). V některých případech ale může oxidace mateřské sloučeniny vést ke vzniku toxických transformačních nebo degradačních produktů. Podobně i při neúplné oxidaci znečišťujících látek dochází k vytvoření toxických meziproduktů. Schopnost pokročilých oxidačních procesů strukturálně změnit organické sloučeniny může potenciálně přispět k novému znečištění ošetřované vody vzniklými produkty, často toxičtějšími než původní mateřská sloučenina (Sharma *et al*. 2018; Babu *et al*. 2019). Vzhledem k riziku tvorby toxických sloučenin se v různých fázích ošetření kontaminovaných vod pokročilými oxidačními procesy provádí testování akutní toxicity, které napomáhá posoudit vhodnost navržených postupů (Babu *et al*. 2019).

V případě, že testovaný vzorek obsahuje složitou směs látek s potenciálním toxickým účinkem, není možné jeho nebezpečnost hodnotit pomocí chemické analýzy, založené na identifikaci jednotlivých kontaminantů. Jednak není možné identifikovat každou přítomnou chemickou látku, neboť mohou být přítomny ve stopových koncentracích, navíc značná část těchto látek nemusí být detekovatelná vůbec. Chemická analýza taktéž neodhaluje složité interakce mezi jednotlivými znečišťujícími látkami a neposkytuje informace o jejich biologické dostupnosti. Navíc kontaminanty s nejvyšší zjištěnou koncentrací nemusí být nutně ty s nejvyšším biologickým dopadem na živé organismy (Blanco *et al*. 2018).

Biologické testy toxicity používají k hodnocení toxického účinku chemických látek živé organismy (Ghosh *et al*. 2017). Po vystavení zkušebních organismů různým koncentracím potencionálně toxické látky se sledují a kvantifikují fyziologické nebo behaviorální změny vyvolané účinkem dané sloučeniny na živý organismus. Hlavním cílem je zjistit, zda látka vykazuje toxický účinek a jaká je hraniční koncentrace umožňující přežití použitého zkušebního organismu (Ghosh *et al*. 2017; Abbas *et al*. 2018). Změny v biologické odpovědi, které souvisí s expozicí nebo toxickými účinky chemických látek, lze objektivně měřit a vyhodnocovat pomocí biomarkerů (Ghosh *et al*. 2017). Protože interakce xenobiotik s živými organismy zpočátku probíhá na molekulární a buněčné úrovni, jsou reakce na těchto úrovních považovány za první projev toxicity. Měření vhodných biomarkerů na molekulární nebo buněčné úrovni slouží jako vhodný nástroj pro včasnou a citlivou detekci biologických účinků vyplývajících z expozice danou látkou (Ghosh *et al*. 2017; Blanco *et al*. 2018). Výsledná reakce zkušebního organismu je při biologickém testu toxicity způsobena kombinovaným účinkem směsi všech biologicky dostupných známých i neznámých sloučenin a jejich přítomných metabolitů. Tímto se překonává omezení vyplývající z chemické analýzy, která je limitována počtem cílových sloučenin (Babu *et al*. 2019; De Baat *at al*. 2019).

Použití jediného biologického testu toxicity odráží citlivost pouze jednoho zkušebního organismu a může vést k podcenění toxicity dané znečišťující látky pro ekosystém. Aby bylo možné porovnat výpovědní hodnoty jednotlivých testů toxicity u použitých zkušebních organismů a správně vyhodnotit možný toxický efekt, provádí se testování látek na souboru biologických testů, označovaných jako baterie testů. Baterie biologických testů toxicity využívají rozdílného charakteru zkušebních organismů, které pocházejí z různých částí ekosystému, čímž umožňují komplexní posouzení toxicity napříč různými trofickými úrovněmi (Ghosh *et al*. 2017).

Biologické testy toxicity mohou být prováděny buď *in vitro* za použití buněčných kultur, nebo *in vivo*. Testy *in vitro* se primárně využívají k hodnocení specifických mechanismů působení kontaminantů přítomných ve vzorku, kdy je na buněčných kulturách zkoumána cytotoxicita nebo genotoxicita chemických látek. Mohou být také použity k odhadu biologické dostupnosti kontaminantů životního prostředí (Ghosh *et al.* 2017). Vzhledem ke klíčové roli jater v metabolismu xenobiotik, se při testech *in vitro* často využívají rybí hepatocyty a jaterní buněčné linie ryb (Blanco *et al.* 2018).

Testy *in vivo* poskytují ucelenější reakci organismu. Jsou prováděny jak s využitím prokaryotických, tak eukaryotických buněk, a to včetně mnohobuněčných organismů. Mezi běžně používané zkušební organismy patří bakterie (*Vibrio fischeri*), zelené řasy (*Pseudokirchneriella subcapitata, Desmodesmus subspicatus, Chlorella vulgaris, Chlorella kessleri),* rostliny a jejich semena (oves setý, hořčice bílá), korýši (hronatka velká) nebo ryby (živorodka duhová, danio pruhovaný, pstruh duhový) (Abbas *et al.* 2018; Babu *et al*. 2019). Ačkoli využití zvířecích modelů umožnuje komplexní zhodnocení toxických účinků testovaných látek, jejich použití je spojeno se zvýšenými provozními náklady a časovou náročností, vhledem k dlouhé době růstu (Abbas *et al*. 2018).

Běžně používaným ukazatelem toxicity je střední účinná (efektivní) koncentrace EC_{50}, která představuje koncentraci zkoušené látky ovlivňující 50 % testované populace. Pokud je důsledkem toxického účinku smrt zkušebních organismů, jedná se o tzv. střední letální koncentraci LC_{50}. V případě, že toxický účinek inhibuje růst, jde o tzv. střední inhibiční koncentraci IC_{50} (Ghosh *et al.* 2017).

1.11.3 Vybrané zkušební organismy pro biologické testy toxicity

Zelené mikrořasy jsou jednobuněčné eukaryotické organismy schopné fotosyntézy, které se vyskytují ve sladkých, slaných a brakických vodách (Afify *et al.* 2018). Vzhledem k tomu, že jsou řasy široce rozšířené ve vodním prostředí a tvoří zde základ většiny potravních řetězců, představují ideální organismy pro testování toxicity. Jakákoliv změna ve společenstvu řas bude mít obrovský dopad na celý vodní ekosystém – tj. jakýkoliv účinek testované sloučeniny na řasy bude mít účinek i na vyšší trofické úrovně (Afify *et al.* 2018; Machado and Soares 2019; Machado and Soares 2020).

Pseudokirchneriella subcapitata (známá také jako *Raphidocelis subcapitata* nebo dříve jako *Selenastrum capricornutum*) je mikrořasa běžně přítomná ve sladkých vodách. Lze ji snadno kultivovat v laboratorních podmínkách a vykazuje vysokou citlivost vůči široké škále mikropolutantů. Vzhledem ke svým vlastnostem a environmentálnímu významu je *Pseudokirchneriella subcapitata* doporučována mezinárodními organizacemi, například Organizací pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) nebo Agenturou pro ochranu životního prostředí (US-EPA), jako primární zástupce zelených řas pro hodnocení toxicity chemických látek (Machado and Soares 2019; Machado and Soares 2020; Machado and Soares 2021).

Druhy z rodu *Chlorella* patří k nejrozšířenějším zástupcům jednobuněčných zelených mikrořas a jsou součástí fytoplanktonu ve sladkovodních i mořských ekosystémech (Chaufan *et al.* 2006; Spoljaric *et al.* 2011). Zástupci rodu *Chlorella*, zejména *Chlorella vulgaris* a *Chlorella kessleri*, jsou často využíváni při testech toxicity, neboť dokáží velmi rychle reagovat na toxický účinek a vykazují vysokou citlivost vůči xenobiotiků, především pak vůči herbicidům. Výhodný je i jejich krátký životní cyklus a snadná kultivace za laboratorních podmínek (Chaufan *et al.* 2006; Doicheva *et al.* 2009; Kaeoboon *et al.* 2021).

Koncovým bodem toxicity je při testech na zelených řasách nejčastěji inhibice růstu, vyjádřená jako rozdíl mezi koncentrací buněk na konci testu a počáteční koncentrací buněk (Machado and Soares 2019). Taktéž fotosyntetické pigmenty (chlorofyl a karotenoidy), mohou poskytnout přehled o inhibici řasového růstu. Stanovení obsahu chlorofylu na základě jeho fluorescence může být taktéž použito jako koncový bod toxicity (Abdelhaleem *et al.* 2020).

Hodnoty EC_{50} získané pro jednu látku při testech toxicity na jednom druhu zelené řasy se mohou značně lišit. Variace ve výsledcích mohou být spojeny s konkrétními podmínkami testu, zejména s počáteční koncentrací buněk, kultivačními podmínkami, dobou expozice testované látky a použitým koncovým bodem (Machado and Soares 2019). Kromě toho se liší i citlivost

jednotlivých druhů řas vůči jedné látce. Tento jev může být důsledkem rozdílného makromolekulárního složení buněk (konkrétně typu a obsahu lipidů a složení buněčné stěny), ale také odlišnými intracelulárními cíli, na které určitá látka působí, popřípadě rozdíly v aktivaci obranných mechanismů (Machado and Soares 2020).

Okřehkové (*Lemnaceae*) jsou podobně jako řasy klíčovou složkou sladkovodních ekosystémů, ve kterých jsou primárními producenty. Z těchto důvodů jsou OECD doporučeni jako organismy vhodné pro testování toxicity chemických látek (Fekete-Kertész *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016). Okřehek (*Lemna* spp.) je celosvětově rozšířená vyšší rostlina plavoucí na vodní hladině (Fekete-Kertész *et al.* 2015; Hampel *et al.* 2018). Pro testy toxicity jsou používány zejména dva druhy, a to Okřehek menší (*Lemna minor*) a Okřehek hrbatý (*Lemna gibba*) (Fekete-Kertész *et al.* 2015). Vhledem ke své malé velikosti a jednoduché struktuře, která zahrnuje pouze kořeny a listy se s okřehkem velmi snadno manipuluje. Pro rychlý růst, vegetativní rozmnožování, snadnou kultivaci za laboratorních podmínek a citlivost k řadě chemických látek je okřehek ideálním organismem pro testování toxicity (Fekete-Kertész *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016; Hampel *et al.* 2018). Doba, za kterou dojde k zdvojnásobení počtu listů, se pohybuje mezi 0,35–2,8 dny.

Koncovým bodem toxicity je při testech na okřehku, podobně jako u zelených řas, inhibice růstu, kterou je možno vyjádřit pomocí rozdílu měřeného paramentu na konci a na začátku zkoušky. Nejčastěji měřenými paramenty jsou počet listů, celková plocha porostlá listy a čerstvá nebo suchá hmotnost biomasy (Fekete-Kertész *et al.* 2015). Nejcitlivějším koncovým bodem pro hodnocení toxických účinků látek na okřehek je však stanovení obsahu chlorofylu (Markovic *et al.* 2021).

Okřehek reaguje odlišně na různé chemické látky, což je odrazen rozdílných fyzikálně-chemických vlastností testovaných sloučenin, stupněm jejich translokace v rostlině, metabolické degradace a přítomnosti nebo naopak nepřítomnosti molekulárních cílových míst (Tagun and Boxall 2018).

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Detekce, výskyt a antibiotická citlivost vybraných patogenních bakterií v odpadních vodách

První část této disertační práce byla zaměřena na detekci, výskyt a antibiotickou citlivost patogenních bakterií *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Yersinia enterocolitica* a *Salmonella* spp. v odpadních vodách. Hlavním cílem této části disertační práce bylo stanovit optimální kultivační protokoly pro izolaci cílových patogenních bakterií z odpadních vod. Podstatou bylo porovnání různých kultivačních protokolů, které byly buď nově navrženy nebo vznikly úpravami standardizovaných metod. V obou případech byl kladen důraz na zohlednění specifických vlastností odpadních vod, tak aby byly navržené kultivační protokoly co nejlépe přizpůsobené této komplexní matrici. Z tohoto důvodu byly používány pouze přirozeně kontaminované vzorky odpadních vod. Pro mikrobiologické rozbory byly zvoleny čtyři odlišné typy odpadních vod, a to městská surová a biologicky čištěná odpadní voda, dále surová nemocniční infekční odpadní voda a surová nemocniční odpadní voda. U získaných izolátů byla vyšetřena citlivost k antibiotikům standardní diskovou difúzní metodou dle metodologie Evropské komise pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST). Vzhledem ke dvouletému vzorkovacímu období, byly získány podrobné údaje o výskytu a antibiotické citlivosti patogenních bakterií *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Yersinia enterocolitica,* a *Salmonella* spp. na jednotlivých odběrových místech.

Kromě toho byla v této části disertační práce provedena rozšířená studie se zaměřením na výskyt, charakterizaci a antibiotickou citlivost izolátů *Yersinia enterocolitica* v různých typech odpadních vod, neboť tyto data jsou celosvětově velmi omezená. V další studii byla hodnocena antibiotická citlivost izolátů *Pseudomonas aeruginosa* v nemocničních odpadních vodách, a to zejména za účelem zjištění výskytu multirezistentních kmenů.

2.1.1 Typy odpadních vod pro mikrobiologický rozbor

Městskými odpadními vodami se dle Směrnice Rady č. 91/271/EHS rozumí splašky nebo směs splašků, průmyslových odpadních vod nebo dešťových vod. Splašky jsou odpadní vody ze sídel a služeb, které vznikají převážně jako produkt lidského metabolismu a činností v domácnosti. Průmyslovými odpadními vodami se rozumí jakékoli odpadní vody vypouštěné z objektů používaných pro jakoukoli obchodní nebo průmyslovou činnost, které jsou jiné povahy než splašky a dešťové vody (Směrnice Rady č. 91/271/EHS).

Infekční odpadní vody jsou dle normy ČSN 75 6406 definovány jako odpadní vody obsahující biologické činitele nebo geneticky modifikované organismy takového druhu a v takovém množství, že vyžadují zvláštní opatření před vypouštěním do kanalizace pro veřejnou potřebu. Mohou, ale nemusí obsahovat i rizikové chemické látky. Jedná se například o odpadní vody z infekčních odděleních, patologie, chirurgie nebo mikrobiologie (ČSN 75 6406).
Odpadní vody ze zdravotnických zařízeních neobsahující rizikové koncentrace znečištění jsou dle normy ČSN 75 6406 definovány jako odpadní vody, v nichž koncentrace rizikových chemických látek anebo biologických činitelů nepřekračuje limitní hodnoty pro vypouštění do kanalizace pro veřejnou potřebu. Rizikové chemické látky jsou látky nebo skupina látek, které jsou nebo mohou být toxické, perzistentní a náchylné k bioakumulaci, nebo mohou vykazovat antimikrobiální aktivitu (ČSN 75 6406).

2.1.2 Vzorky odpadních vod

Surová a přečištěná městská odpadní voda byla odebírána z čistírny odpadních vod s projektovou kapacitou 45000 ekvivalentech obyvatel (EO). Na čistírnu je připojeno přibližně 32000 obyvatel, což odpovídá 40000 EO. Sekundární stupeň čištění zahrnuje biologické čištění s dosazováním. Celkové množství čištěných odpadních vod za rok dosahuje 2500 tisíc m^3, přičemž nejvyšším podílem je zastoupena splašková odpadní voda (1100 tisíc m^3/rok).
Vzorky surových městských odpadních vod byly odebírány v česlovně za jemnými česlemi, které v této městské čistírně odpadních vod představují první stupeň mechanického předčištění odpadní vody. Biologicky přečištěná městská odpadní voda byla odebírána za dosazovacími nádržemi před výpustí do vodního recipientu.
Nemocniční odpadní voda byla odebírána v nemocnici s kapacitou 1300 lůžek. V areálu nemocnice se nachází interní čistírna odpadních vod se sekundárním biologickým stupněm čištění, na který navazuje terciální dezinfekční stupeň v podobě chlorační stanice. Interní čistírna slouží k decentralizovanému předčištění infekčních odpadních vod před jejich vypuštěním do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu. Do interní čistírny je sváděna odpadní voda z infekčního oddělení, patologie a centrálních nemocničních laboratoří. Odpadní voda pocházející z ostatních oddělení nemocnice a technického zázemí je přímo vypouštěna do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu a čištěna na centrální městské čistírně. Jedná se tedy o odpadní vodu, která neobsahuje rizikové koncentrace znečištění. Tuto odpadní vodu lze označit také jako „hybridní“, neboť je tvořena jak splaškovými a průmyslovými odpadními

vodami (záchody, stravovací zařízení, prádelna), tak i odpadní vodou z lůžkových oddělení, ambulancí nebo operačních sálů.

Infekční nemocniční odpadní voda byla odebírána v českovně interní nemocniční čistírny odpadních vod, za hrubými česlemi, které v této čistírně představují první stupeň mechanického předčištění odpadní vody. Nemocniční odpadní voda neobsahující rizikové koncentrace znečištění byla odebírána v centrální revizní šachtě nemocniční kanalizační sítě před výstupem do kanalizační sítě pro veřejnou potřebu.

2.1.3 Odběr vzorků odpadních vod

Vzorkování odpadních vod probíhalo od června 2020 do května 2022. Celkem bylo odebráno 56 vzorků odpadních vod, což odpovídalo 14 vzorkům na každém odběrovém místě. Vzorky byly odebírány během všech ročních období, aby byly pokryty celoroční povětrností podmínky. Časový interval mezi odběry vzorků se pohyboval mezi čtyřmi až šesti týdny. Byly odebírány bodové vzorky o objemu 500 ml. Vzorkování na každém odběrovém místě probíhalo vždy v pondělí. Na městské čistírně odpadních vod byly vzorky odebírány v 7 hodin ráno, v nemocnici v 8 hodin ráno. Den i čas odběru byl dodržován po celou dobu vzorkování na všech odběrových místech. Na městské čistírně odpadních vod byl odběr vzorků prováděn sterilními plastovými odběrovými nádobami (kádinky) na teleskopické tyči. V nemocnici byly vzorky odpadních vod odebírány pomocí sterilních nerezových odběrných nádob na zirkochromovém řetězu. Ihned po odběru byla u vzorků odpadních vod změřena orientační hodnota pH pomocí indikátorových pH papírků (Fisher Scientific). Vzorky odpadních vod byly do laboratoře transportovány ve sterilních lahvích z borosilikátového skla s plastovým šroubovacím uzávěrem. Lahve s odebranými vzorky byly umístěny v polystyrenových termoboxech, aby se zabránilo změnám teploty odpadní vody během transportu. Vzorky odpadních vod byly zpracovány do dvou hodin od odběru.

2.1.4 Vyšetření citlivosti k antibiotikům diskovou difúzní metodou

Vyšetření citlivosti k antibiotikům u kmenů izolovaných z odpadních vod bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody dle standardní metodiky EUCAST (EUCAST 2023a). Pro testování byl použit Mueller Hinton agar (MH agar) (HiMedia, M173) a komerčně dostupné antibiotické disky (OXOID). Inkubace byla prováděna při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 18 ± 2 °C. Zóny inhibice byly interpretovány dle aktuálních tabulek breakpointů EUCAST (EUCAST 2020, 2021, 2022). Výsledky testování citlivosti k antibiotikům byly klasifikovány do kategorií

C, I a R dle doporučení EUCAST. V kategorii testování citlivosti C je bakteriální kmen definován jako citlivý, při standardním dávkovacím režimu. V kategorii testování citlivosti I je bakteriální kmen definován jako citlivý, při zvýšené expozici. V kategorii testování citlivosti R, je bakteriální kmen definován jako rezistentní (EUCAST 2019). Pokud byla u bakteriálního kmene zjištěna rezistence vůči alespoň jednomu antibiotiku ze tří a více různých tříd, byl kmen klasifikován jako multirezistentní. Ke sledování kvality vyšetření citlivosti k antibiotikům byly použity kontrolní kmeny *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

2.1.5 *Staphylococcus aureus*

2.1.5.1 Experimentální část

Pro průkaz bakterie *Staphylococcus (St.) aureus* v odpadních vodách byly využity dvě kultivační metody, které se lišily použitím pomnožovacího kroku před vyočkováním na pevná média. Zatímco jedna metoda pomnožení vzorků odpadních vod v tekutém médiu zahrnovala, druhá metoda využívala přímý roztěr odpadní vody na pevná média. Celkem byla použita tři tekutá pomnožovací média, která se lišila selektivitou a složením. V obou metodách pak byla použita dvě pevná média. V závislosti na použitém tekutém pomnožovacím médiu nebo pevném médiu byly metody dále rozděleny do jednotlivých protokolů. S ohledem na všechny možné kombinace byl každý vzorek odpadní vody za účelem průkazu bakterie *St. aureus* paralelně vyšetřován pomocí osmi kultivačních protokolů. Schéma kultivačních protokolů použitých pro izolaci bakterie *St. aureus* z odpadních vod je uvedeno v Tabulce 1. Izolace byla provedena následovně:

Metoda s pomnožením odpadní vody: 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml mozko-srdcové infuze (BHI bujón) (HiMedia, M210) s obsahem 6,5 % NaCl (přídavek 30 g NaCl na 500 ml BHI bujónu). Paralelně bylo dalších 10 ml odpadní vody naočkováno do 90 ml BHI bujónu. Dalších 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml trypton-sójového bujónu (TSB bujón) (HiMedia, M011). Naočkované bujóny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin. Pomnožené kultury z BHI bujónu s 6,5 % NaCl byly křížovým roztěrem vyočkovány na povrch dvou ploten Baird-Parker agaru (B-P agar) (HiMedia, M043 s přídavkem FD046) a na povrch dvou ploten slaného agaru s manitolem (MS agar) (HiMedia, M118). Pomnožené kultury z BHI bujónu a TSB bujónu byly zředěny desítkovým ředěním pomocí sterilního fyziologického roztoku (0,9 %) na požadované ředění. Pro surové městské odpadní vody, infekční nemocniční odpadní vody a nemocniční odpadní vody bylo použito

ředění na plotnách 10^{-3}, 10^{-4} a 10^{-5}. Pro přečištění městské odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-2} a 10^{-3}. 100 µl příslušného ředění pomnožené kultury bylo pipetou přeneseno na povrch dvou ploten B-P agaru a dvou ploten MS agaru. Inokulum bylo po povrchu agarových ploten rozetřeno pomocí L-hokejky. Všechny naočkované plotny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin.

Metoda přímého roztěru L-hokejkou: Vzorky odpadních vod byly zředěny desítkovým ředěním pomocí sterilního fyziologického roztoku (0,9 %). Pro surové městské odpadní vody, infekční nemocniční odpadní vody a nemocniční odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} a 10^{-4}. Pro přečištění městské odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-1} a 10^{-2}. 100 µl odpadní vody nebo příslušného ředění bylo pipetou přeneseno na povrch dvou ploten B-P agaru a dvou ploten MS agaru. Inokulum bylo po povrchu agarových ploten rozetřeno pomocí L-hokejky. Naočkované plotny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Po inkubaci byly na dně misek označeny polohy všech zjištěných presumptivních kolonií a plotny byly následně reinkubovány dalších 24 ± 3 hodin při 36 ± 1 °C.

Z každé pozitivní plotny B-P agaru a MS agaru bylo vybráno tři až pět presumptivních kolonií bakterie *St. aureus* pro biochemické potvrzení. Na B-P agaru byly za presumptivní považovány černé nebo šedé, lesklé, vypouklé kolonie obklopené zónou projasnění. Na MS agaru byly za presumptivní považovány žlutě zbarvené kolonie obklopené žlutou zónou. Vybrané presumptivní kolonie byly inkubovány na krevním agaru (HiMedia, M834 se 7 % sterilní defibrinované beraní krve) při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Předběžná identifikace byla provedena na základě průkazu enzymů cytochromoxidázy, katalázy a hyaluronidázy. Oxidázový test byl proveden za pomocí komerčních oxidázových disků (HiMedia, DD018). Katalázový test byl proveden s využitím 3% peroxidu vodíku. Průkaz hyaluronidázy byl proveden pomocí dekapsulačního testu na krevním agaru za použití detekčního kmene *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC 35195). U kmenů s pozitivním katalázovým a dekapsulačním testem a negativním oxidázovým testem byla provedena konečná identifikace pomocí soupravy STAPHYtest 16 (Erba Lachema, MLT00012).

Z každého pozitivního vzorku odpadní vody byly vybrány dva až tři potvrzené kmeny *St. aureus* k vyšetření antibiotické citlivosti. Pro bakterie *St. aureus* byla vybrána sestava šesti antibiotik zahrnující cefoxitin, ciprofloxacin, gentamicin, klindamycin, erythromycin a trimetoprim-sulfametoxazol. Sestava antibiotických disků pro bakterii *St. aureus* je uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 1 *Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie Staphylococcus aureus v odpadních vodách*

Kultivační metoda/protokol	Pomnožení v tekutém médiu	Vyočkování	Pevné médium
Metoda s pomnožením odpadní vody			
BHI 6,5 % NaCl/ B-P agar (A)	90 ml BHI bujónu s 6,5 % NaCl + 10 ml odpadní vody 36 ± 1 °C, 21–24 hodin	křížový roztěr	B-P agar
BHI 6,5 % NaCl/ MS agar (B)			MS agar
BHI/B-P agar (C)	90 ml BHI bujónu + 10 ml odpadní vody 36 ± 1 °C, 21–24 hodin	roztěr 100 µl příslušných ředění pomnožené kultury	B-P agar
BHI/MS agar (D)			MS agar
TSB/B-P agar (E)	90 ml TSB bujónu + 10 ml odpadní vody 36 ± 1 °C, 21–24 hodin	roztěr 100 µl příslušných ředění pomnožené kultury	B-P agar
TSB/MS agar (F)			MS agar
Metoda přímého roztěru L-hokejkou			
roztěr/B-P agar (G)	---	roztěr 100 µl odpadní vody a dalších ředění	B-P agar
roztěr/MS agar (H)			MS agar

BHI bujón – mozko-srdcová infúze; TSB bujón – trypton-sójový bujón; B-P agar – Baird-Parker agar; MS agar – slaný agar s manitolem

Tabulka 2 *Sestava antibiotických disků pro bakterii Staphylococcus aureus*

Sestava antibiotických disků pro bakterii *Staphylococus aureus*					
Cefoxitin	Ciprofloxacin	Gentamicin	Klindamycin	Erythromycin	Trimetoprim-sulfametoxazol
30 µg	5 µg	10 µg	2 µg	15 µg	1,25-23,75 µg

2.1.5.2 Výsledková část a diskuse

Bakterie *St. aureus* byla prokázána alespoň jedním z použitých kultivačních protokolů v 70,8 % (34/48) vyšetřovaných vzorků odpadních vod. Podíl pozitivních vzorků se mezi jednotlivými typy odpadních vod do značné míry lišil a pohyboval se v rozmezí od 50 % do 100 % (Tabulka 3). Vysoká míra výskytu bakterie *St. aureus* v surových i přečištěných městských odpadních vodách je v souladu s dalšími studiemi provedenými ve Spojených státech amerických, Španělsku a Polsku (Rosenberg Goldstein *et al.* 2012; Gómez *et al.* 2016; Amirsoleimani *et al.* 2019; Zieliński *et al.* 2020). Naproti tomu ve studii provedené v Tunisku byla bakterie *St. aureus* detekována jen ve 20 % vzorků městských odpadních vod (Ben Said *et al.* 2017).

Vysoký podíl pozitivních vzorků přečištěných městských odpadních vod naznačuje, že aktivovaný kal není dostatečně účinnou metodou pro odstranění bakterie *St. aureus* z odpadních vod (Zieliński *et al.* 2020). To podporuje i studie Rosenberg Goldstein *et al.* (2012), ve které nebyla bakterie *St. aureus* izolována ze vzorků odpadních vod, které byly čištěny za použití jiných technologií než aktivovaného kalu.

Běžný výskyt bakterie *St. aureus* v surových nemocničních odpadních vodách taktéž není překvapující, a lze ho dát do přímé souvislosti s vazbou bakterie *St. aureus* na nemocniční prostředí. Ta nabízí snadný a kontinuální zdroj kontaminace pro nemocniční kanalizační systém (Thompson *et al.* 2013; Girijan and Pillai 2021).

Tabulka 3 *Výskyt bakterie Staphylococcus aureus v různých typech odpadních vod*

Typ vzorku odpadní vody	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních vzorků
Surová městská OV	12	12 (100 %)
Přečištěná městská OV	12	9 (75,0 %)
Infekční nemocniční OV	12	6 (50,0 %)
Nemocniční OV	12	7 (58,3 %)
Celkem	48	34 (70,8 %)

OV – odpadní voda

Kultivační protokoly A (BHI 6,5 % NaCl/B-P agar) a B (BHI 6,5 % NaCl/MS agar) poskytly nejvyšší míru detekce bakterie *St. aureus* v odpadních vodách a byly schopny detekovat téměř všechny pozitivní vzorky (Tabulka 4). Nadřazenost těchto kultivačních protokolů, odrážející se ve vysokém počtu detekovaných pozitivních vzorků, lze přičíst značnému selektivnímu tlaku pomnožovacího kroku. Ten zvýhodnil růst halotolerantní bakterie *St. aureus* a současně potlačil růst většiny doprovodné mikroflóry, což umožnilo vyočkovat neředěné pomnožené kultury na pevná média křížovým roztěrem. Překvapivě je však použití BHI bujónu se zvýšeným obsahem soli pro detekci bakterií *St. aureus* z odpadních vod velmi málo rozšířené, a omezené jen na jednotky studií (Gómez *et al.* 2016).

Vzhledem k předpokladu, že by vysoce selektivní pomnožení v BHI bujónu s 6,5 % NaCl nemuselo zajistit vhodné podmínky pro obnovení poškozených buněk bakterie *St. aureus,* byly pro detekci využity i kultivační protokoly zahrnující neselektivní pomnožení. Na základě získaných výsledků je však patrné, že neselektivní pomnožení nepředstavuje vhodný přístup pro izolaci bakterie *St. aureus* z odpadních vod. Protokoly s neselektivním pomnožením odpadní vody (C až F) poskytly ve srovnání s kultivačními protokoly se selektivním pomnožením (A a B) výrazně méně pozitivních vzorků. Tyto výsledky naznačují, že izoláty *St. aureus* pocházející z odpadních vod se vyznačují značnou odolností, neboť jsou schopné přežít a množit se ve vysoce selektivním prostředí. Při přímém srovnání obou použitých neselektivních pomnožovacích médií bylo lepších výsledků dosaženo za použití BHI bujónu (protokoly C a D), ve srovnání s TSB bujónem (protokoly E a F) (Tabulka 4). Přesto je to ale právě TSB bujón, jehož použití lze při detekci *St. aureus* v odpadních vodách zaznamenat i v dalších studiích (Boopathy 2017; Oladipo *et al.* 2019).

Současné pomnožení doprovodné mikroflóry během neselektivního pomnožení vyžadovalo zředění pomnožených kultur a jejich roztěr na pevná média, tak aby byla zvýšena pravděpodobnost výskytu presumptivních kolonií bakterie *St. aureus*. Podobný přístup byl využit i ve studii Zieliński *et al.* (2020), ve které byly desítkovým ředěním zředěny kultury získané po pomnožení v bujónu podle Giolittiho a Cantoniho před roztěrem na B-P agar.

Tabulka 4 *Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie Staphylococcus aureus na základě použitého kultivačního protokolu*

Kultivační metoda/protokol	Surová městská OV (n=12)	Přečištěná městská OV (n=9)	Infekční nemocniční OV (n=6)	Nemocniční OV (n=7)	Celkový počet pozitivních vzorků (n=34)
Metoda s pomnožením odpadní vody					
BHI 6,5 % NaCl/ B-P agar (A)	12 (100 %)	9 (100 %)	6 (100 %)	6 (85,7 %)	33 (97,1 %)
BHI 6,5 % NaCl/ MS agar (B)	12 (100 %)	8 (88,9 %)	4 (66,7 %)	5 (71,4 %)	29 (85,3 %)
BHI/B-P agar (C)	8 (66,7 %)	0 (0 %)	2 (33,3 %)	0 (0 %)	10 (29,4 %)
BHI/MS agar (D)	8 (66,7 %)	0 (0 %)	2 (33,3 %)	2 (28,6 %)	12 (35,3 %)
TSB/B-P agar (E)	0 (0 %)	6 (66,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	6 (17,6 %)
TSB/MS agar (F)	0 (0 %)	6 (66,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	6 (17,6 %)
Metoda přímého roztěru L-hokejkou					
roztěr/B-P agar (G)	3 (25,0 %)	2 (22,2 %)	0 (0 %)	2 (28,6 %)	7 (20,6 %)
roztěr/MS agar (H)	1 (8,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (14,3 %)	2 (5,9 %)

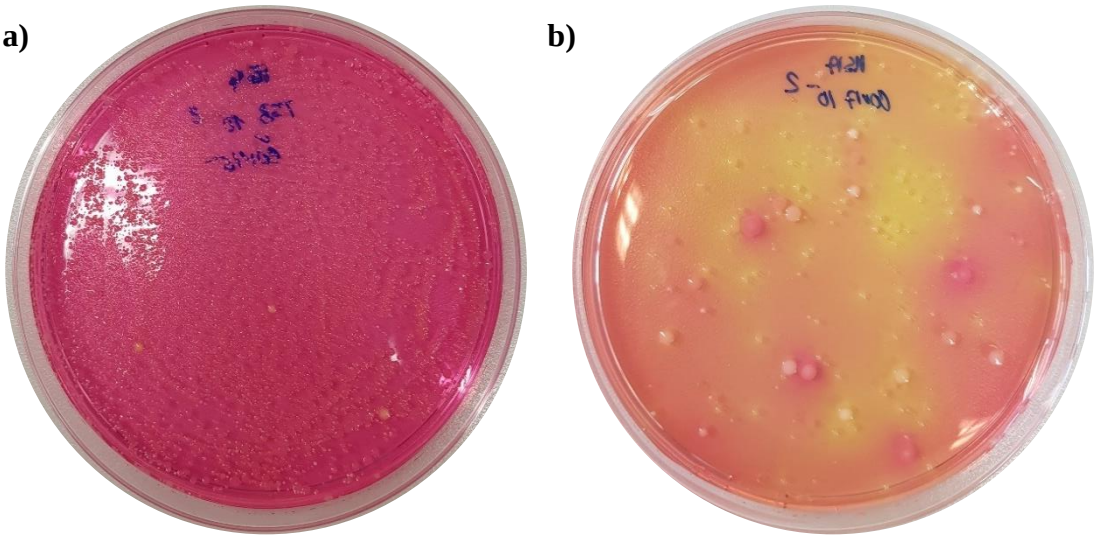
OV – odpadní voda; BHI bujón – mozko-srdcová infúze; TSB bujón – trypton-sójový bujón; B-P agar – Baird-Parker agar; MS agar – slaný agar s manitolem

Kultivační protokoly s přímým roztěrem odpadní vody na pevná média (G a H) poskytly v této práci nejnižší míru detekce bakterie *St. aureus* v odpadních vodách a ve srovnání s kultivačními protokoly s pomnožovacím krokem (A až F) byly méně účinné. Přímé vyočkování nebo přímý roztěr odpadní vody a příslušných ředění na pevné médium je ale nejběžnějším přístupem pro izolaci *St. aureus* z odpadních vod, přičemž ve studiích převládá použití MS agaru jako pevného média (Adekanmbi and Falodun 2015; Mohd Zulkeflle *et al.* 2019; Akya *et al.* 2020; Rahman *et al.* 2021; Zagui *et al.* 2022). Oblíbenost těchto kultivačních protokolů může souviset s jejich

velmi jednoduchým provedením a relativně krátkou dobou potřebnou pro získání výsledků. V této práci bylo ale obvykle nezbytné inkubovat B-P agar i MS agar při přímém roztěru odpadní vody 48 hodin. Tím byla vyrovnána časová náročnost protokolů s pomnožovacím krokem, kde vyočkování pomnožených kultur vyžadovalo pouze 24hodinovou inkubaci agarových ploten. Metoda roztěru L-hokejkou umožnuje nejenom zisk izolátů, ale také stanovení počtu bakterií *St. aureus* ve vzorku odpadní vody, čehož je ve studiích taktéž využíváno (Boopathy 2017; Akya *et al.* 2020; Kozajda and Ježak 2020).

Roztěr na B-P agar je podstatou standardní metody pro stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků (tj. *St. aureus* a další druhy) v potravinách a krmivech, která je specifikovaná normou ČSN EN ISO 6888-1. Tato metoda je využívána i pro stanovení počtu bakterií *St. aureus* ve vzorcích vod z umělých koupališť, pro které je vyhláškou č. 238/2011 Sb. *St. aureus* určen jako mikrobiologický ukazatel jakosti. Pro potřeby této vyhlášky je však normovaná metoda upravena a namísto roztěru vzorku se používá technika membránové filtrace 100 ml vody (Vyhláška č. 238/2011 Sb.).

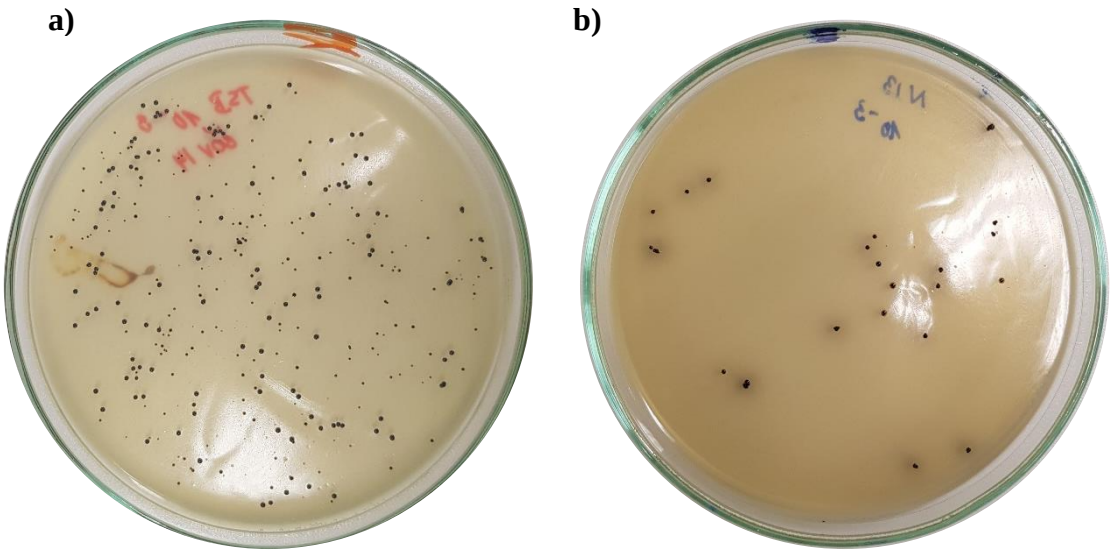
Přestože je MS agar vzhledem k vysoké koncentraci soli (7,5 %) značně selektivním médiem, jeho vhodnost pro vzorky odpadních vod není zcela jednoznačná. Vysoká koncentrace doprovodné mikroflóry ve vzorku může na médiu způsobit až souvislý nárůst, za který jsou zodpovědné zejména halotolerantní druhy bakterií, např. zástupci rodu *Bacillus* (Davis *et al.* 2006). Tento jev byl pozorován i v této práci, ale výhradně po vyočkování neselektivně pomnožených kultur. Při přímém roztěru odpadní vody a příslušných ředění byla doprovodná mikroflóra částečně potlačena (Obrázek 2).



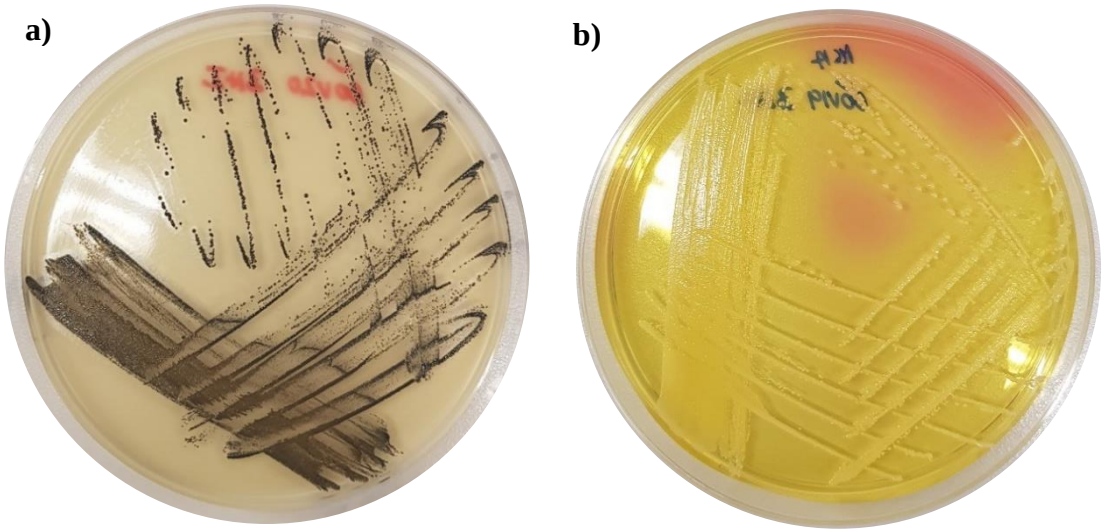
Obrázek 2 *Vzhled MS agaru po roztěru zředěné neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a po roztěru zředěné odpadní vody (ředění 10^{-2}) (b)*

Po vyočkování selektivně pomnožených kultur byla na MS agaru pozorována pouze přítomnost žlutých presumptivních kolonií *St. aureus.* Ve všech případech byla ale morfologie presumptivních kolonií *St. aureus* na MS agaru nejednoznačná a charakter růstu se lišil zejména v oblasti velikosti, průřezu a konzistence. Pro konečnou identifikaci presumptivních kolonií proto bylo nezbytné jejich přeočkování na B-P agar. Podobně i ve studii Vivehananthan and Luphzhy (2021) bylo pro identifikaci presumptivních kolonií z MS agaru použito jejich přeočkování na B-P agar. Tento přístup ale vede jednak k prodloužení doby nezbytné pro identifikaci bakterií *St. aureus* a současně ke zvýšení pracnosti a nákladnosti celého procesu. K překonání těchto problémů se nabízí přímé využití B-P agaru. Na druhou stranu pro vzorky s nízkou mikrobiální zátěží přestavuje MS agar vynikající pevné médium zajišťující snadnou identifikaci bakterií *St. aureus* (Davis *et al.* 2006).

Na rozdíl od MS agaru poskytoval B-P agar velmi snadno vizuálně identifikovatelné presumptivní kolonie *St. aureus*, a to zejména na základě přítomnosti zóny projasnění kolem kolonií. Ačkoliv i na B-P agaru docházelo k růstu doprovodné mikroflóry, byla do značné míry potlačena, a to i při vyočkování neselektivně pomnožených kultur (Obrázek 3). Typická byla přítomnost hnědavě zbarvených kolonií, ve kterých vyrůstaly bakterie rodu *Proteus.* Podobně jako u MS agaru byly na B-P agaru po vyočkování selektivně pomnožených kultur velmi často přítomny pouze presumptivní kolonie (Obrázek 4).



Obrázek 3 *Vzhled B-P agaru po roztěru zředěné neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a po roztěru zředěné odpadní vody (ředění 10^{-3}) (b)*



Obrázek 4 *Vyočkované selektivně pomnožené kultury získané z BHI bujónu s 6,5 % NaCl na B-P agaru (a) a MS agaru (b)*

Zatímco u kultivačních protokolů s totožným pomnožovacím krokem byla míra izolace bakterie *St. aureus* z obou použitých pevných médií srovnatelná, u protokolů s přímým roztěrem L-hokejkou byla patrná nadřazenost B-P agaru z hlediska počtu detekovaných pozitivních vzorků. Tento jev lze přičíst složení B-P agaru, neboť je obohacen glycinem a pyruvátem sodným, jejichž úkolem je chránit poškozené buňky a usnadnit jejich obnovu. Z tohoto důvodu je možné B-P agar použít k izolaci a stanovení počtu poškozených buněk *St. aureus* i bez použití neselektivního pomnožovacího kroku (da Silva *et al.* 2000). Naproti tomu přímé počítání presumptivních kolonií na MS agaru za účelem stanovení počtu bakterií *St. aureus* ve vzorcích odpadních vod může být velice nepřesné (Davis *et al.* 2006).

Pro vyšetření citlivosti k antibiotikům bylo vybráno 76 kmenů *St. aureus* izolovaných z odpadních vod. U 89,5 % izolátů (68/76) byla zjištěna citlivost ke všem testovaným antibiotikům. Na základě zjištěné rezistence k cefoxitinu byly detekovány tři meticilin-rezistentní *St. aureus* (MRSA) (3,9 %, 3/76) (Tabulka 5). Dva MRSA izoláty byly zachyceny v přečištěných městských odpadních vodách, zatímco jeden MRSA izolát pocházel ze vzorku nemocniční odpadní vody. Nízký záchyt MRSA kmenů v městské odpadní vodě zjištěný v této práci je v rozporu s předchozími studiemi, které prokázaly běžnou přítomnost MRSA kmenů v surových i přečištěných městských odpadních vodách ve Švédsku nebo Spojených státech amerických (Börjesson *et al.* 2010; Rosenberg Goldstein *et al.* 2012; Boopathy 2017). Na druhou stranu nulová detekce MRSA kmenů byla zaznamenána na dvou městských čistírnách odpadních vod v Tunisku (Ben Said *et al.* 2017). Nízký výskyt MRSA kmenů

v městských odpadních vodách může být odrazem velmi nízkého výskytu nebo absence MRSA kmenů ve zdravé populaci v dané oblasti.

Vzhledem k tomu, že MRSA kmeny jsou jedny z hlavních původců nozokomiálních nákaz, které se vzhledem k obtížné léčitelnosti vyznačují vysokou úmrtností pacientů, jejich šíření z nemocničního prostředí je globální hrozbou pro veřejné zdraví (Börjesson *et al.* 2010). Předchozí studie uvedly přítomnost MRSA kmenů v nemocničních odpadních vodách v Austrálii, Íránu nebo Nigérii. Nemocniční MRSA kmeny se vyznačovaly vysokou mírou rezistence k dalších testovaným antibiotikům a vysoké procento z nich bylo klasifikováno jako multirezistentní (Thompson *et al.* 2013; Oladipo *et al.* 2019; Akya *et al.* 2020). Multirezistentní profil je u MRSA kmenů velmi častý, kromě rezistence ke všem β-laktamovým antibiotikům je běžná i rezistence k fluorochinolonům, makrolidům, aminoglykosidům, tetracyklinům a linkosamidům (Algammal *et al.* 2020). Multirezistentní profil byl u nemocničního MRSA kmene zaznamenán i v této práci, neboť jako jediný MRSA izolát vykazoval rezistenci k dalším testovaným antibiotikům. Konkrétně k ciprofloxacinu, klindamycinu a erythromycinu. Jak uvedl ve své studii Thompson *et al.* (2013), počet MRSA kmenů v nemocničních odpadních vodách může být do značné míry ovlivněn velikostí nemocnice, která určuje počet a skladbu léčených pacientů. Taktéž čas odběru vzorků může mít vliv na míru izolace MRSA kmenů, neboť činnosti přispívající k jejich uvolnění do kanalizačního systému, jako je sprchování pacientů, jsou prováděny spíše v průběhu dopoledne než brzy ráno.

Tabulka 5 *Antibiotická citlivost kmenů Staphylococcus aureus izolovaných z odpadních vod*

Antibiotikum (obsah disku)	**Počet kmenů *Staphylococcus aureus* (n=76)**		
	S	**I**	**R**
Cefoxitin (30 μg)	73 (96,1 %)	0 (0 %)	3 (3,9 %)
Ciprofloxacin (5 μg)	0 (0 %)	74 (97,4 %)	2 (2,6 %)
Gentamicin (10 μg)	72 (94,7 %)	0 (0 %)	4 (5,3 %)
Klindamycin (2 μg)	75 (98,7 %)	0 (0 %)	1 (1,3 %)
Erythromycin (15 μg)	74 (97,4 %)	0 (0 %)	2 (2,6 %)
Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75μg)	76 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

S – citlivý, standardní dávkovací režim; I – citlivý, zvýšená expozice; R – rezistentní

2.1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.6.1 Experimentální část

Pro průkaz bakterie *Pseudomonas (P.) aeruginosa* v odpadních vodách byly využity dvě kultivační metody, lišící se zařazením pomnožovacího kroku před vyočkováním na pevné médium. Zatímco jedna metoda pomnožení vzorků odpadních vod v tekutém médiu zahrnovala, druhá metoda využívala přímý roztěr odpadní vody na pevné médium. Celkem byla použita dvě neselektivní tekutá pomnožovací média a jedno pevné médium. S ohledem na všechny možné kombinace byl každý vzorek odpadní vody za účelem průkazu bakterie *P. aeruginosa* paralelně vyšetřován pomocí tří kultivačních protokolů. Schéma kultivačních protokolů použitých pro izolaci bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod je uvedeno v Tabulce 6. Izolace byla provedena následovně:

Metoda s pomnožením odpadní vody: 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml BHI bujónu. Dalších 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml TSB bujónu. Naočkované bujóny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin. Pomnožené kultury byly zředěny desítkovým ředěním pomocí sterilního fyziologického roztoku (0,9 %) na požadované ředění. Pro surové městské odpadní vody, infekční nemocniční odpadní vody a nemocniční odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-3}, 10^{-4} a 10^{-5}. Pro přečištění městské odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-2} a 10^{-3}. 100 µl příslušného ředění pomnožené kultury bylo pipetou přeneseno na povrch dvou ploten cetrimidového agaru (CET agar) (HiMedia, M024 s přídavkem glycerolu). Inokulum bylo po povrchu agarových ploten rozetřeno pomocí L-hokejky. Naočkované plotny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Po inkubaci byly na dně misek označeny polohy všech zjištěných presumptivních kolonií a plotny byly následně reinkubovány dalších 24 ± 3 hodin při 36 ± 1 °C.

Metoda přímého roztěru L-hokejkou: Vzorky odpadních vod byly zředěny desítkovým ředěním pomocí sterilního fyziologického roztoku (0,9 %). Pro surové městské odpadní vody, infekční nemocniční odpadní vody a nemocniční odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} a 10^{-4}. Pro přečištění městské odpadní vody bylo použito ředění na plotnách 10^{-1} a 10^{-2}. 100 µl odpadní vody nebo příslušného ředění bylo pipetou přeneseno na povrch dvou ploten CET agaru. Inokulum bylo po povrchu agarových ploten rozetřeno pomocí L-hokejky. Naočkované plotny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Po inkubaci byly na dně misek označeny polohy všech zjištěných presumptivních kolonií a plotny byly následně reinkubovány dalších 24 ± 3 hodin při 36 ± 1 °C.

Z každé pozitivní plotny CET agaru bylo vybráno tři až pět presumptivních kolonií bakterie *P. aeruginosa* pro biochemické potvrzení. Za presumptivní byly na CET agaru považovány kolonie s modrozeleným, zeleným, žlutozeleným nebo žlutým zbarvením. Vybrané presumptivní kolonie byly inkubovány na krevním agaru (HiMedia, M834 se 7 % sterilní defibrinované beraní krve) při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Předběžná identifikace byla provedena na základě průkazu enzymů cytochromoxidázy a katalázy. Oxidázový test byl proveden za pomocí komerčních oxidázových disků (HiMedia, DD018). Katalázový test byl proveden s využitím 3% peroxidu vodíku. U kmenů s pozitivním katalázovým a oxidázovým testem byla provedena konečná identifikace pomocí soupravy NEFERMtest 24 (Erba Lachema, MLT00010).

Tabulka 6 *Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie Pseudomonas aeruginosa v odpadních vodách*

Kultivační metoda/protokol	Pomnožení v tekutém médiu	Vyočkování	Pevné médium
Metoda s pomnožením odpadní vody			
BHI/CET agar (A)	90 ml BHI bujónu + 10 ml odpadní vody 36 ± 1 °C, 21–24 hodin	roztěr 100 µl příslušných ředění pomnožené kultury	CET agar
TSB/CET agar (B)	90 ml TSB bujónu + 10 ml odpadní vody 36 ± 1 °C, 21–24 hodin	roztěr 100 µl příslušných ředění pomnožené kultury	CET agar
Metoda přímého roztěru L-hokejkou			
roztěr/CET agar (C)	---	roztěr 100 µl odpadní vody a dalších ředění	CET agar

BHI bujón – mozko-srdcová infúze; TSB bujón – trypton-sójový bujón; CET agar – cetrimidový agar

Z každého pozitivního vzorku odpadní vody byly vybrány dva až tři potvrzené kmeny *P. aeruginosa* k vyšetření antibiotické citlivosti. Pro bakterie *P. aeruginosa* byla vybrána sestava šesti antibiotik zahrnující piperacilin-tazobaktam, ceftazidim, meropenem,

ciprofloxacin, aztreonam a amikacin. Sestava antibiotických disků pro bakterii *P. aeruginosa* je uvedena v Tabulce 7.

Tabulka 7 *Sestava antibiotických disků pro bakterii Pseudomonas aeruginosa*

Sestava antibiotických disků pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa*					
Piperacilin-tazobaktam	Ceftazidim	Meropenem	Ciprofloxacin	Aztreonam	Amikacin
30-6 µg	10 µg	10 µg	5 µg	30 µg	30 µg

2.1.6.2 Výsledková část a diskuse

Bakterie *P. aeruginosa* byla prokázána alespoň jedním z použitých kultivačních protokolů v 87,5 % (42/48) vyšetřovaných vzorků odpadních vod. Vysoká míra výskytu bakterie *P. aeruginosa* byla zaznamenána ve všech typech odpadních vod. Podíl pozitivních vzorků se pohyboval v rozmezí od 75,0 % do 100 % (Tabulka 8). Velmi vysoký výskyt bakterie *P. aeruginosa* (92 %) v odpadních vodách byl zaznamenán i ve studii Crone *et al.* (2019), ve které odpadní voda současně představovala environmentální matrici s nejvyšším zastoupením bakterie *P. aeruginosa*. Ve studii Slekovec *et al.* (2012) byla bakterie *P. aeruginosa* zjištěna v 95,5 % vyšetřovaných vzorků, které zahrnovaly jak nemocniční a městskou odpadní vodu, tak i čistírenské kaly a říční vodu, do které ústily výpustě čistíren odpadních vod.

Vysoká frekvence výskytu bakterie *P. aeruginosa* v odpadních vodách je přisuzována její přítomnosti v lidském gastrointestinálním traktu, který je považován za jeden z jejich nejvýznamnějších rezervoárů (Okuda *et al.* 2010; Heimesaat *et al.* 2019). *P. aeruginosa* běžně kolonizuje gastrointestinální trakt pacientů hospitalizovaných v nemocnicích, ale v menší míře se nachází i v gastrointestinálním traktu zdravých jedinců jako součást normální střevní mikroflóry (Christofi *et al.* 2019; Pachori *et al.* 2019). Uvádí se, že přibližně každý šestý zdravý člověk je gastrointestinálním přenašečem bakterie *P. aeruginosa*. To podporuje skutečnost, že lidské výkaly jsou hlavním zdrojem kontaminace odpadních vod bakterií *P. aeruginosa* (Crone *et al.* 2019).

Do nemocničních odpadních vod se *P. aeruginosa* uvolňuje nejenom z kolonizovaných pacientů, ale také z kontaminovaného nemocničního prostředí a zdravotnického vybavení (Pachori *et al.* 2019). Vysoká prevalence bakterie *P. aeruginosa* v nemocničním prostředí vede k tomu, že se v nemocničních odpadních vodách vyskytuje v daleko vyšších koncentracích než v městských odpadních vodách (Slekovec *et al.* 2012).

Tabulka 8 *Výskyt bakterie Pseudomonas aeruginosa v různých typech odpadních vod*

Typ vzorku odpadní vody	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních vzorků
Surová městská OV	12	12 (100 %)
Přečištěná městská OV	12	9 (75,0 %)
Infekční nemocniční OV	12	9 (75,0 %)
Nemocniční OV	12	12 (100 %)
Celkem	48	42 (87,5 %)

OV – odpadní voda

Nejvyšší míru detekce bakterie *P. aeruginosa* v odpadních vodách poskytl kultivační protokol s neselektivním pomnožením v TSB bujónu (B). Naproti tomu kultivační protokol s neselektivním pomnožením v BHI bujónu (A) poskytl nejnižší míru detekce *P. aeruginosa*. Tyto podmínky neselektivního pomnožení nefungovaly adekvátně a vedly k nepřijatelně vysokému počtu falešně negativních výsledků (Tabulka 9).

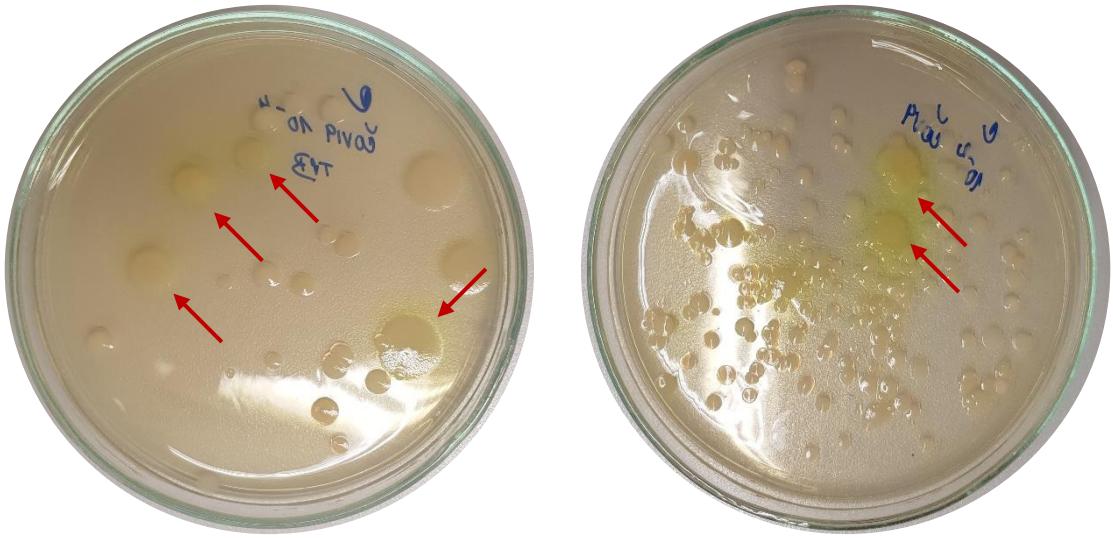
Tabulka 9 *Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie Pseudomonas aeruginosa na základě použitého kultivačního protokolu*

Kultivační metoda/protokol	Surová městská OV (n=12)	Přečištěná městská OV (n=9)	Infekční nemocniční OV (n=9)	Nemocniční OV (n=12)	Celkový počet pozitivních vzorků (n=42)
Metoda s pomnožením odpadní vody					
BHI/CET agar (A)	3 (25,0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (7,1 %)
TSB/CET agar (B)	12 (100 %)	6 (66,7 %)	9 (100 %)	12 (100 %)	39 (92,9 %)
Metoda přímého roztěru L-hokejkou					
roztěr/CET agar (C)	12 (100 %)	3 (33,3 %)	5 (55,6 %)	12 (100 %)	32 (76,2 %)

OV – odpadní voda; BHI bujón – mozko-srdcová infúze; TSB bujón – trypton-sójový bujón; CET agar – cetrimidový agar

Značné ovlivnění izolace bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod podmínkami neselektivního pomnožení ukazuje na důležitost správného výběru tekutého pomnožovacího média. Přestože je použití BHI bujónu jako růstového média pro bakterii *P. aeruginosa* běžnou praxí, uplatnění nachází především ve studiích, které se zabývají tvorbou nebo inhibicí biofilmu. A dále při posuzování antimikrobiální aktivity látek vůči *P. aeruginosa* (Dave *et al.* 2019; Wijesinghe *et al.* 2019; Gosal *et al.* 2021). Při izolaci *P. aeruginosa* z odpadních vod není použití neselektivního pomnožení příliš běžné. Ve studii Imanah *et al.* (2017) byly zředěné vzorky surové nemocniční odpadní vody pomnoženy v TSB bujónu před roztěrem na pevná média. Ve studiích Fuentefria *et al.* (2011) a Miranda *et al.* (2015) byly membránové filtry po filtraci odpadní vody selektivně pomnoženy v asparaginovém bujónu. Kultury pozitivní na růst *P. aeruginosa* byly následně inkubovány v acetamidovém bujónu a rozetřeny na acetamidový agar.

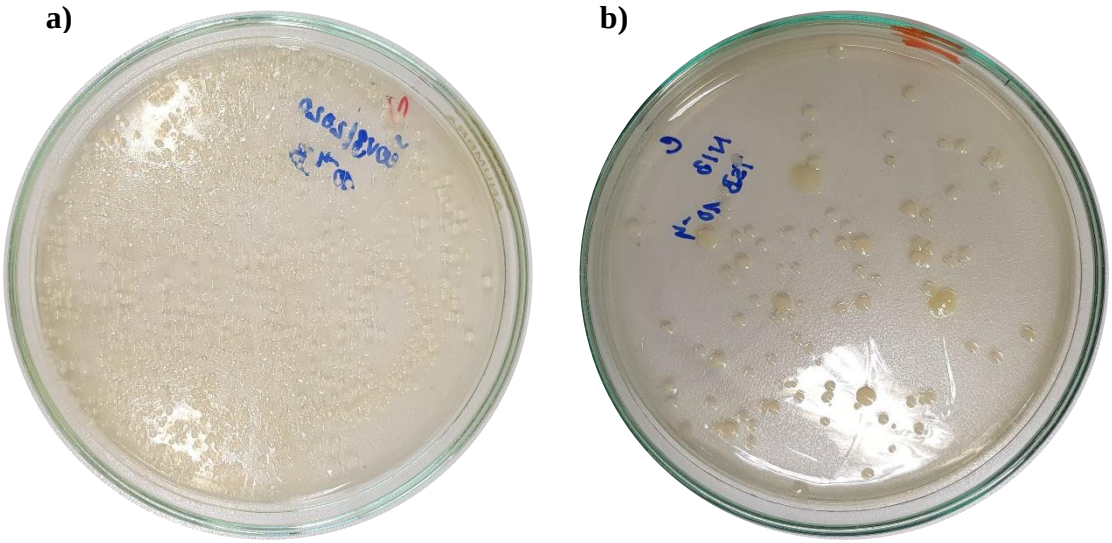
Roztěr pomnožených kultur namísto jejich vyočkování křížovým roztěrem, se pro izolaci *P. aeruginosa* ukázal jako velmi přínosný přístup. Vzhledem ke značné velikosti presumptivních kolonií *P. aeruginosa* na cetrimidovém agaru poskytlo využití celé plochy agarové plotny dostatečný prostor pro jejich růst a umožnilo také jejich jednodušší identifikaci. Navíc pro rozvoj charakteristického zbarvení presumptivních kolonií bakterie *P. aeruginosa* na cetrimidovém agaru bylo nutné plotny inkubovat 48 hodin a roztěr pomnožené kultury zajistil, že presumptivní kolonie nebyly ovlivněny růstem doprovodné mikroflóry (Obrázek 5).



Obrázek 5 *Presumptivní kolonie bakterie Pseudomonas aeruginosa na cetrimidovém agaru po 48hodinové inkubaci (označeny červenou šipkou) po vyočkování neselektivně pomnožených kultur získaných z TSB bujónu*

Vysokou míru detekce bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod kultivačním protokolem s přímým roztěrem odpadní vody (C), která byla srovnatelná s kultivačním protokolem zahrnujícím pomnožení v TSB bujónu (B), lze přičíst značně adaptabilní povaze a vysoké schopnosti přežití bakterie *P. aeruginosa* v nepříznivých podmínkách (Pachori *et al.* 2019). Cetrimidový agar se totiž vyznačuje velmi vysokou selektivitou, která je zajištěna obsahem relativně vysoké koncentrace cetrimidu (0,3 mg/ml) (Tang *et al.* 2017). Roztěr odpadní vody na cetrimidový agar představuje nejběžnější postup pro izolaci bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod. V řadě studií byl použit jak pro městské, tak nemocniční odpadní vody (Santoro *et al.* 2015; Oliveira *et al.* 2017; Crone *et al.* 2019; Chávez *et al.* 2020). Metoda roztěru na cetrimidový agar je běžně využívána i ke stanovení počtu bakterií *P. aeruginosa* ve vzorcích odpadních vod (Igbinosa *et al.* 2017; Govender *et al.* 2021). Jednoznačná morfologie a typické zabarvení presumptivních kolonií bakterie *P. aeruginosa* na cetrimidovém agaru umožnují jejich snadné vizuální rozlišení.

V této práci nebyl na cetrimidovém agaru zjištěn výskyt falešně pozitivních kolonií. Růst doprovodné mikroflóry ale nebyl zcela potlačen a na cetrimidovém agaru byl zaznamenán výskyt bakterií rodu *Klebsiella* a *Proteus*. Ke značnému nárůstu doprovodné mikroflóry docházelo zejména po vyočkování kultur pomnožených v BHI bujónu. Při vyočkování kultur pomnožených v TSB bujónu, stejně tak jako při přímém roztěru odpadní vody, byl nárůst doprovodné mikroflóry minimální (Obrázek 6).



Obrázek 6 *Nárůst doprovodné mikroflóry na cetrimidovém agaru po vyočkování neselektivně pomnožené kultury získané z BHI bujónu (ředění 10^{-3}) (a) a neselektivně pomnožené kultury získané z TSB bujónu (b)*

Nadřazenost cetrimidového agaru pro izolaci bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod dokládá skutečnost, že použití jiných pevných médií, jakými jsou agar s glutamátem, škrobem a fenolovou červení, pseudomonádový izolační agar nebo Kingovo médium B, je omezeno pouze na jednotky studií (Igbinosa *et al.* 2012; Odjadjare *et al.* 2012; Falodun and Adekanmbi 2016).

Metoda membránových filtrů je dalším z přístupů používaných pro izolaci bakterie *P. aeruginosa* z odpadních vod. Ve studiích převládá filtrace zředěných odpadních vod o objemu 100 ml za využití membránových filtrů o porozitě 0,45 μm (Moges *et al.* 2014; Luczkiewicz *et al.* 2015; Hosu *et al.* 2021; Mapipa *et al.* 2021). Metoda membránových filtrů je pro izolaci a stanovení počtu bakterií *P. aeruginosa* ve vodách standardizována. Metoda, kterou specifikuje norma ČSN EN ISO 16266, je ale primárně určena pro balené pitné vody, pro které jediné je bakterie *P. aeruginosa* předepsána jako mikrobiologický ukazatel. Přestože lze metodu použít i pro jiné druhy vod, podmínkou zůstává nízký počet doprovodné mikroflóry ve vyšetřovaném vzorku. Tu splňují například vody z bazénů nebo vody určené k lidské spotřebě. Určeným médiem pro inkubaci membránových filtrů je CN agar, který obsahuje nižší koncentraci cetrimidu než cetrimidový agar. Membránové filtry se vyhodnocují po 44 ± 4 hodinách (ČSN EN ISO 16266). Prodloužení doby inkubace na 48 hodin při přímém roztěru na cetrimidový agar bylo nezbytné i v této práci. Podobně jako při roztěru pomnožených kultur byl tento přístup potřebný pro rozvoj charakteristického zbarvení presumptivních kolonií bakterie *P. aeruginosa*.

Pro vyšetření citlivosti k antibiotikům bylo vybráno 89 kmenů *P. aeruginosa* izolovaných z odpadních vod. U 97,8 % izolátů (87/89) byla zjištěna citlivost ke všem testovaným antibiotikům (Tabulka 10). Vysoký podíl izolátů *P. aeruginosa* citlivých ke všem testovaným antibiotikům (81,5 %, 22/27) byl zjištěn v surových a přečištěných odpadních vodách pocházejících z městské čistírny odpadních vod v jihovýchodní Brazílii s 24000 připojenými obyvateli (Oliveira *et al.* 2017). Podobně i ve studii Slekovec *et al.* (2012) byla hlášena vysoká míra citlivosti izolátů *P. aeruginosa* získaných z městské čistírny odpadních vod ve východní Francii se 120000 připojenými obyvateli. Zde bylo 76,5 % získaných izolátů citlivých ke všem testovaným antibiotikům. Ve studii Luczkiewicz *et al.* (2015) byla u všech izolátů *P. aeruginosa* pocházejících z městské čistírny odpadních vod v severním Polsku zjištěna citlivost k devíti z patnácti testovaných antibiotik. Jediný multirezistentní kmen byl zachycen na odtoku z této městské čistírny odpadních vod.

V této práci byly jako multirezistentní klasifikovány dva izoláty *P. aeruginosa* (2,2 %, 2/89), přičemž oba byly zachyceny ve vzorcích nemocniční odpadní vody. Jeden multirezistentní

izolát vykazoval rezistenci ke všem šesti testovaným antibiotikům. U druhého izolátu byla zjištěna rezistence k pěti testovaným antibiotikům. Bakterie *P. aeruginosa* má značný potenciál k rozvoji multirezistence, neboť se vedle přirozené rezistence k celé řadě antibiotik, vyznačuje i schopností snadno získat geny antibiotické rezistence horizontálním přenosem (Feng *et al.* 2017; Golle *et al.* 2017).

Tabulka 10 *Antibiotická citlivost kmenů Pseudomonas aeruginosa izolovaných z odpadních vod*

Antibiotikum (obsah disku)	**Počet kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (n=89)**		
	S	**I**	**R**
Piperacilin-tazobaktam (30-6 μg)	0 (0 %)	87 (97,8 %)	2 (2,2 %)
Ceftazidim (10 μg)	0 (0 %)	87 (97,8 %)	2 (2,2 %)
Meropenem (10 μg)	81 (91,0 %)	6 (6,7 %)	2 (2,2 %)
Ciprofloxacin (5 μg)	0 (0 %)	87 (97,8 %)	2 (2,2 %)
Aztreonam (30 μg)	0 (0 %)	88 (98,9 %)	1 (1,1 %)
Amikacin (30 μg)	87 (97,8 %)	0 (0 %)	2 (2,2 %)

S – citlivý, standardní dávkovací režim; I – citlivý, zvýšená expozice; R – rezistentní

V nemocničních odpadních vodách není výskyt multirezistentních kmenů překvapující, neboť se předpokládá, že jsou do nich kontinuálně uvolňovány z nemocničního prostředí. V něm je vznik multirezistentních profilů u bakterie *P. aeruginosa* podpořen kontinuálně působícím selektivním tlakem. Vysoká prevalence multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* v nemocničních odpadních vodách, hlášená v některých studiích, je alarmující situací. V surových nemocničních odpadních vodách v Nigérii byl multirezistentní profil zjištěn u 93,2 % izolátů *P. aeruginosa* (Falodun *et al.* 2019). Ve studii Divyashree *et al.* (2022) bylo 89,4 % izolátů *P. aeruginosa* v surových nemocničních odpadních vodách, pocházejících ze dvou nemocnic v indickém městě Maglurár, multirezistentních. Vysoký podíl multirezistentních kmenů (82,0 %) byl zjištěn i mezi izoláty *P. aeruginosa* v nemocniční čistírně odpadních vod v areálu nemocnice v brazilském městě Rio de Janeiro (Miranda *et al.* 2015). Na druhou stranu ve studii Santoro *et al.* (2015), která byla provedena v totožné nemocniční čistírně odpadních vod, byl zjištěný podíl multirezistentních izolátů *P. aeruginosa* 22,2 %. Proměnlivost výskytu multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* v nemocničních odpadních vodách dokazuje i studie Fuentefria *et al.* (2011). Ve studii byl zjištěn značný rozdíl

ve frekvenci výskytu multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* v nemocničních odpadních vodách z areálu brazilské nemocnice São Vicente de Paulo, a to v závislosti na místě odběru odpadní vody. Zatímco na jednom odběrovém místě vykazovalo 85,7 % izolátů *P. aeruginosa* multirezistentní profil, na dalších dvou bylo jako multirezistentních klasifikováno 12,0 % resp. 4,8 % izolátů.

Rozdíly ve výskytu rezistentních a multirezistentních kmenů *P. aeruginosa* v nemocničních odpadních vodách v České republice byly zaznamenány i ve studii (viz Příloha 1):

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. (2022). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water and Health*, 20(4), 692–701.

Do studie bylo zařazeno šest nemocnic různé velikosti v České republice, ve kterých byl proveden jednorázový odběr prostého vzorku surové nemocniční odpadní vody. *P. aeruginosa* byla ze vzorků nemocničních odpadních vod izolována kultivačním protokolem zahrnujícím pomnožení odpadní vody v TSB bujónu s následným roztěrem zředěné pomnožené kultury na cetrimidový agar. U získaných izolátů byla vyšetřena citlivost vůči řadě sedmi antibiotik diskovou difúzní metodou. Rezistence byla zjištěna ke všem testovaným antibiotikům. V nejvyšší míře vůči ciprofloxacinu (30,5 %, 18/59), gentamicinu (28,8 %, 17/59) a meropenemu (27,2 %, 16/59). Multirezistentní profil vykazovalo 28,8 % (17/59) izolátů *P. aeruginosa*. Přítomnost rezistentních kmenů *P. aeruginosa* byla zaznamenána ve všech vyšetřovaných vzorcích nemocničních odpadních vod, ale frekvence jejich výskytu se v jednotlivých vzorcích značně lišila a pohybovala se v rozmezí od 15,4 % do 63,6 %. Přítomnost multirezistetních kmenů *P. aeruginosa* byla zjištěna ve čtyřech (66,7 %, 4/6) vzorcích nemocničních odpadních vod.

2.1.7 *Yersinia enterocolitica*

2.1.7.1 Experimentální část

Pro průkaz bakterie *Yersinia (Y.) enterocolitica* v odpadních vodách byly využity dvě kultivační metody, lišící se především zpracováním vzorků odpadních vod před selektivním pomnožením. V jedné metodě bylo použito přímé naočkování odpadní vody do selektivního pomnožovacího média, zatímco ve druhé metodě byly vzorky odpadní vody před selektivním pomnožením zkoncentrovány centrifugací. V obou kultivačních metodách byly použity dvě selektivní tekutá pomnožovací média a jedno pevné médium. S ohledem na použité selektivní pomnožovací médium a alkalické ošetření pomnožených kultur byly kultivační metody dále rozděleny do

jednotlivých kultivačních protokolů. S ohledem na všechny možné kombinace byl každý vzorek odpadní vody za účelem průkazu bakterie *Y. enterocolitica* paralelně vyšetřován pomocí šesti kultivačních protokolů. Při návrhu kultivačních metod pro průkaz bakterie *Y. enterocolitica* v odpadních vodách bylo částečně vycházeno z normy ČSN EN ISO 10273, která specifikuje horizontální metodu průkazu *Y. enterocolitica* v potravinách a krmivech. Schéma kultivačních protokolů použitých pro izolaci bakterie *Y. enterocolitica* z odpadních vod je uvedeno v Tabulce 11. Izolace byla provedena následovně:

Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody: 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml bujónu s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným (ITC bujón) (HiMedia, M1220 s přídavkem FD102 a FD103). Dalších 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml bujónu s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB bujón) (HiMedia, M941I). Naočkované bujóny byly inkubovány při 25 ± 1 °C po dobu 44 ± 4 hodin. Po ukončení inkubace byla každá pomnožená kultura křížovým roztěrem vyočkována na dvě plotny agaru s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (CIN agar) (HiMedia, M843 s přídavkem FD034). Současně byla každá pomnožená kultura ošetřena roztokem hydroxidu draselného (KOH). Do 4,5 ml sterilního roztoku KOH bylo přidáno 0,5 ml pomnožené kultury a promícháno. Po 20 ± 5 sekundách byla alkalizovaná kultura pomocí kličky vyočkována čarami na povrch CIN agaru. Současně bylo 100 µl alkalizované kultury rozetřeno na povrch další plotny CIN agaru L-hokejkou. Vyočkování alkalizovaných kultur bylo oběma způsoby provedeno v dupletu. Pro každé vyočkování na CIN agar byla připravena nová alkalizovaná kultura. Všechny naočkované plotny CIN agaru byly inkubovány při 30 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Roztok KOH byl připraven den před použitím rozpuštěním příslušné navážky KOH ve sterilním fyziologickém roztoku (0,9 %) dle postupu definovaném v normě ČSN EN ISO 10273. Koncentrace roztoku KOH pro alkalické ošetření pomnožených kultur se pohybovala v rozmezí od 0,3 do 0,5 %.

Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody: 50 ml odpadní vody bylo zkoncentrováno centrifugací při 4688 x *g* po dobu 30 minut při 4 °C (ROTINA 420R, Hettich). Získané pelety byly resuspendovány v 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku (0,9 %) a následně přidány do 10 ml ITC bujónu a 10 ml PSB bujónu. Naočkované bujóny byly inkubovány při 25 ± 1 °C po dobu 44 ± 4 hodin. Po ukončení inkubace byla každá pomnožená kultura ošetřena roztokem KOH. Do 4,5 ml sterilního roztoku KOH bylo přidáno 0,5 ml pomnožené kultury a promícháno. Po 20 ± 5 sekundách byla alkalizovaná kultura pomocí kličky vyočkována čarami na povrch CIN agaru. Současně bylo 100 µl alkalizované kultury rozetřeno na povrch další plotny CIN agaru L-hokejkou. Vyočkování alkalizovaných kultur

bylo oběma způsoby provedeno v dupletu. Pro každé vyočkování na CIN agar byla připravena nová alkalizovaná kultura. Všechny naočkované plotny CIN agaru byly inkubovány při 30 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin.

Z každé pozitivní plotny CIN agaru bylo vybráno tři až pět presumptivních kolonií bakterie *Y. enterocolitica* pro biochemické potvrzení. Jako presumptivní byly na CIN agaru považovány malé, kruhové, hladké kolonie s úzkým ostře ohraničeným tmavě červeným středem (tzv. „býčí oko“) obklopeným průsvitným nebo průhledným hladkým okrajem. Vybrané presumptivní kolonie byly inkubovány na trypton-sójovém agaru (TSA agar) (HiMedia, M290) při 30 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Předběžná identifikace byla provedena na základě fermentace laktózy, průkazu ureázy a utilizace citrátu. Průkaz fermentace laktózy byl proveden za využití Kliglerova agaru (HiMedia, M078A). Pro průkaz tvorby ureázy byl použit Christensenův agar s močovinou (HiMedia, M112 s přídavkem FD048). Zjištění utilizace citrátu bylo provedeno za použití Simmonsova citrátového agaru (Oxoid, CM0155). U kmenů s pozitivním průkazem ureázy a negativní fermentací laktózy a utilizací citrátu byla dále zkoušena fermentace sacharózy a ramnózy a dekarboxylace lyzinu. Zkoušky na fermentaci sacharózy a ramnózy byly provedeny v peptonové vodě s fenolovou červení (HiMedia, M028I), do které byly přidány komerční disky obsahující příslušný sacharid (HiMedia, DD010, DD013). Dekarboxylace lyzinu byla zkoušena v bujónu s L-lyzinem (HiMedia, M376I). Všechny biochemické zkoušky byly provedeny za podmínek stanovených normou ČSN EN ISO 10273. Izoláty, u nichž byly výsledky konfirmačních zkoušek v souladu s interpretací uvedenou v normě ČSN EN ISO 10273, byly následně identifikovány pomocí soupravy ENTERO test 24 N (Erba Lachema, MLT00008).

U izolátů identifikovaných jako *Y. enterocolitica* byla provedena biotypizace dle dříve popsaného biotypizačního schématu (Wauters *et al.* 1987). Kmeny *Y. enterocolitica* byly rozděleny na biotypy na základě zkoušky na eskulin, indol, tween-esterázu (lipázu), pyrazinamidázu, xylózu, trehalózu a salicin. K průkazu hydrolýzy eskulinu byl použit agar se žlučí a eskulinem (HiMedia, M972I). Průkaz tvorby indolu byl proveden v bujónu s L-tryptofanem (HiMedia, M1784I). Pro tween-esterázovou zkoušku byl použit agar s obsahem Tween80 (HiMedia, M1912 s přídavkem GRM159). Průkaz pyrazinamidázy byl proveden na sójovém agaru s kaseinem (HiMedia, M290). Zkoušky na fermentaci xylózy, trehalózy a salicinu byly provedeny v peptonové vodě s fenolovou červení (HiMedia, M028I), do které byly přidány komerční disky obsahující příslušný sacharid (HiMedia, DD011, DD014, DD031). Biotypizační zkoušky byly provedeny a jejich výsledky interpretovány dle ČSN EN ISO 10273. Získané izoláty *Y. enterocolitica* nebyly v této práci serotypizovány.

Tabulka 11 *Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterie Yersinia enterocolitica v odpadních vodách*

Kultivační metoda/protokol	Selektivní pomnožení	Alkalické ošetření	Vyočkování	Pevné médium
Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody				
ITC/ALK/ CIN agar (A)	90 ml ITC bujónu + 10 ml odpadní vody 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	0,5 ml kultury + 4,5 ml roztoku KOH 20 ± 5 sekund	čarami pomocí kličky roztěr 100 µl alkalizované kultury	CIN agar
ITC/CIN agar (B)	90 ml ITC bujónu + 10 ml odpadní vody 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	bez alkalického ošetření	křížový roztěr	CIN agar
PSB/ALK/ CIN agar (C)	90 ml PSB bujónu + 10 ml odpadní vody 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	0,5 ml kultury + 4,5 ml roztoku KOH 20 ± 5 sekund	čarami pomocí kličky roztěr 100 µl alkalizované kultury	CIN agar
PSB/CIN agar (D)	90 ml PSB bujónu + 10 ml odpadní vody 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	bez alkalického ošetření	křížový roztěr	CIN agar
Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody				
CENT/ITC/ALK/ CIN agar (E)	10 ml ITC bujónu + 50 ml odpadní vody/ centrifugace 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	0,5 ml kultury + 4,5 ml roztoku KOH 20 ± 5 sekund	čarami pomocí kličky roztěr 100 µl alkalizované kultury	CIN agar
CENT/PSB/ALK/ CIN agar (F)	10 ml PSB bujónu + 50 ml odpadní vody/ centrifugace 25 ± 1 °C, 44 ± 4 hodin	0,5 ml kultury + 4,5 ml roztoku KOH 20 ± 5 sekund	čarami pomocí kličky roztěr 100 µl alkalizované kultury	CIN agar

ITC bujón – bujón s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným; PSB bujón – bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi; CIN agar – agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem; ALK – alkalizace; CENT – centrifugace

Z každého pozitivního vzorku odpadní vody byly vybrány dva až tři potvrzené kmeny *Y. enterocolitica* k vyšetření antibiotické citlivosti. Pro bakterie *Y. enterocolitica* byla vybrána sestava šesti antibiotik zahrnující ampicilin, cefotaxim, ciprofloxacin, gentamicin, tetracyklin a trimetoprim-sulfametoxazol. Sestava antibiotických disků pro bakterii *Y. enterocolitica* je uvedena v Tabulce 12.

Tabulka 12 *Sestava antibiotických disků pro bakterii Yersinia enterocolitica*

Sestava antibiotických disků pro bakterii *Yersinia enterocolitica*					
Ampicilin	Cefotaxim	Ciprofloxacin	Gentamicin	Tetracyklin	Trimetoprim-sulfametoxazol
10 µg	5 µg	5 µg	10 µg	30 µg	1,25-23,75 µg

2.1.7.2 Výsledková část a diskuse

Bakterie *Y. enterocolitica* byla prokázána alespoň jedním z použitých kultivačních protokolů v 69,6 % (39/56) vyšetřovaných vzorků odpadních vod. Podíl pozitivních vzorků se v jednotlivých typech odpadních vod pohyboval od 21,4 % do 100 %. Značný rozdíl ve výskytu bakterie *Y. enterocolitica* byl zejména mezi městskými a nemocničními odpadními vodami. Zatímco v surových a přečištěných městských odpadních vodách byl zaznamenán konzistentní výskyt bakterie *Y. enterocolitica*, v nemocničních odpadních vodách byl výskyt této bakterie výrazně nižší. To bylo patrné zejména pro infekční nemocniční odpadní vody, ve kterých byla bakterie *Y. enterocolitica* prokázána pouze ve 21,4 % vyšetřovaných vzorků (Tabulka 13). Všechny izoláty *Y. enterocolitica* získané z odpadních vod patřily do biotypu 1A.

Tabulka 13 *Výskyt bakterie Yersinia enterocolitica v různých typech odpadních vod*

Typ vzorku odpadní vody	**Celkový počet vzorků**	**Počet pozitivních vzorků**
Surová městská OV	14	14 (100 %)
Přečištěná městská OV	14	14 (100 %)
Infekční nemocniční OV	14	3 (21,4 %)
Nemocniční OV	14	8 (57,1 %)
Celkem	56	39 (69,6 %)

OV – odpadní voda

Pro izolaci bakterie *Y. enterocolitica* z odpadních vod bylo účinnější pomnožení v PSB bujónu ve srovnání s pomnožením v ITC bujónu. Konkrétně kultivační protokoly C (PSB/ALK/CIN agar) a F (CENT/PSB/ALK/CIN agar) poskytly nejvyšší míru detekce bakterie *Y. enterocolitica*. Kultivační protokol C (PSB/ALK/CIN agar) byl současně jediným protokolem, kterým byla *Y. enterocolitica* izolována ze vzorků infekčních nemocničních odpadních vod. Pokud jde o zpracování vzorků odpadních vod, bakterie *Y. enterocolitica* byla častěji detekována protokoly s přímým očkováním odpadní vody do selektivních pomnožovacích médií než protokoly, ve kterých bylo využito zkoncentrování odpadní vody centrifugací (Tabulka 14). Snížená účinnost těchto protokolů byla primárně přisouzena příliš malému objemu tekutých selektivních médií (10 ml), který byl použit pro pomnožení pelet získaných po centrifugaci odpadní vody. Je ale nutné podotknout, že účelem použití takto malého objemu bylo zjednodušení metody detekce a snížení nákladů. Současně bylo také přihlédnuto k vysoké selektivitě obou tekutých pomnožovacích médií. Aby byl ověřen vliv objemu tekutého pomnožovacího média na míru izolace bakterie *Y. enterocolitica* kultivačními protokoly se zkoncentrováním odpadní vody centrifugací, byla u osmi vzorků odpadních vod odebraných v roce 2022 (dva vzorky na každém odběrovém místě) peleta získaná centrifugací pomnožena jak v 10 ml tak v 90 ml obou tekutých selektivních médií. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že objem tekutého média pro pomnožení pelety, nemá žádný vliv na míru izolaci bakterie *Y. enterocolitica* z odpadních vod, a tedy neovlivňuje účinnost těchto kultivačních protokolů.

Jako klíčové se pro úspěšnou izolaci bakterie *Y. enterocolitica* z odpadních vod ukázalo alkalické ošetření pomnožených kultur před vyočkováním na CIN agar. Důležitost zařazení alkalizačního kroku do metody průkazu odráží nulová míra izolace bakterie *Y. enterocolitica* kultivačními protokoly B (ITC/CIN agar) a D (PSB/CIN agar), ve kterých nebyly pomnožené kultury alkalizovány. Vyočkování pomnožených kultur bez úpravy roztokem KOH vychází z normy ČSN EN ISO 10273. Zatímco ve druhém vydání normy z roku 2017 byl tento postup povinný, po revizi normy v roce 2020 byl postup změněn na volitelný. Přesto může mít vyočkování nealkalizovaných kultur své výhody, zejména s přihlédnutím ke skutečnosti, že při alkalickém ošetření je pomnožená kultura desetinásobně zředěna, čímž se může snížit i počet bakterií *Y. enterocolitica* v roztoku (ČSN EN ISO 10273). Nealkalizované kultury nebyly v této práci vyočkovány u protokolů se zkoncentrováním odpadní vody centrifugací, neboť bylo předpokládáno současné navýšení množství doprovodné mikroflóry, čímž se zvýšily nároky na selektivitu kultivačního protokolu.

Tabulka 14 *Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterie Yersinia enterocolitica na základě použitého kultivačního protokolu*

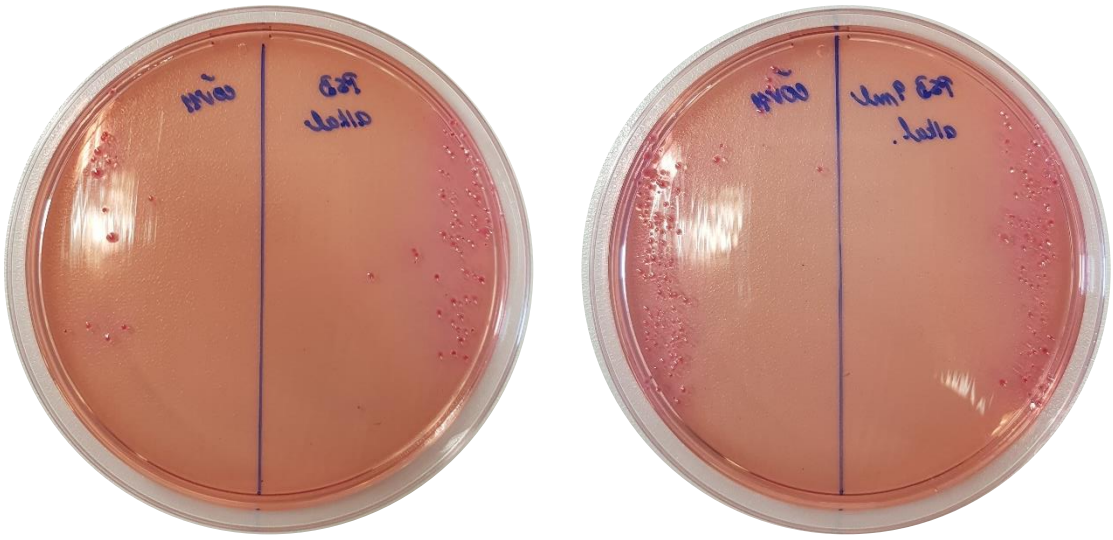
Kultivační metoda/protokol	Surová městská OV (n=14)	Přečištěná městská OV (n=14)	Infekční nemocniční OV (n=3)	Nemocniční OV (n=8)	Celkový počet pozitivních vzorků (n=39)
Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody					
ITC/ALK/ CIN agar (A)	9 (64,3 %)	9 (64,3 %)	0 (0 %)	5 (62,5 %)	23 (59,0 %)
ITC/CIN agar (B)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
PSB/ALK/ CIN agar (C)	14 (100 %)	12 (85,7 %)	3 (100 %)	6 (75,0 %)	35 (89,7 %)
PSB/CIN agar (D)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody					
CENT/ITC/ ALK/ CIN agar (E)	8 (57,1 %)	3 (21,4 %)	0 (0 %)	4 (50,0 %)	15 (38,5 %)
CENT/PSB/ ALK/ CIN agar (F)	14 (100 %)	10 (71,4 %)	0 (0 %)	6 (75,0 %)	30 (76,9 %)

OV – odpadní voda; ITC bujón – bujón s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným; PSB bujón – bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi; CIN agar – agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem; ALK – alkalizace; CENT – centrifugace

Úspěšná izolace baterie *Y. enterocolitica* z alkalicky ošetřených kultur byla ale podmíněna volbou správné koncentrace roztoku KOH. V této práci byly pro alkalické ošetření pomnožených kultur zkoušeny roztoky KOH o koncentracích 0,3 %, 0,4 % a 0,5 %. I přesto, že byl rozdíl v koncentracích roztoků KOH poměrně malý, měl zásadní vliv na izolaci bakterie *Y. enterocolitica* z odpadních vod. Použití 0,5% roztoku KOH, předepsaného normou ČSN EN ISO 10273, nevedlo k přítomnosti presumptivních kolonií na CIN agaru, a to ani v případě zkrácení doby alkalizace z 20 na 10 sekund. Přestože použití 0,5% roztoku KOH potlačilo na CIN agaru růst veškeré doprovodné mikroflóry, současně vedlo k inhibici samotné bakterie *Y. enterocolitica.* Naproti tomu použití 0,3% roztoku KOH dostatečně nepotlačilo růst doprovodné mikroflóry na CIN agaru, což značně ztěžovalo identifikace presumptivních

kolonií *Y. enterocolitica*. Navíc v důsledku hustého nárůstu doprovodné mikroflóry byl růst *Y. enterocolitica* na CIN agaru často značně potlačen. Nejlepších výsledků bylo nakonec dosaženo při použití 0,4% roztoku KOH. Tato koncentrace roztoku KOH při alkalickém ošetření zajistila dostatečné potlačení růstu doprovodné mikroflóry, ale nevedla k inhibici samotné bakterie *Y. enterocolitica.* Ošetření pomnožených kultur roztokem KOH o koncentraci 0,4 % bylo postačující pro potlačení doprovodné mikroflóry jak u protokolů s přímým očkováním odpadní vody do tekutých selektivních médií, tak i u protokolů, kde byla odpadní voda zkoncentrována centrifugací.

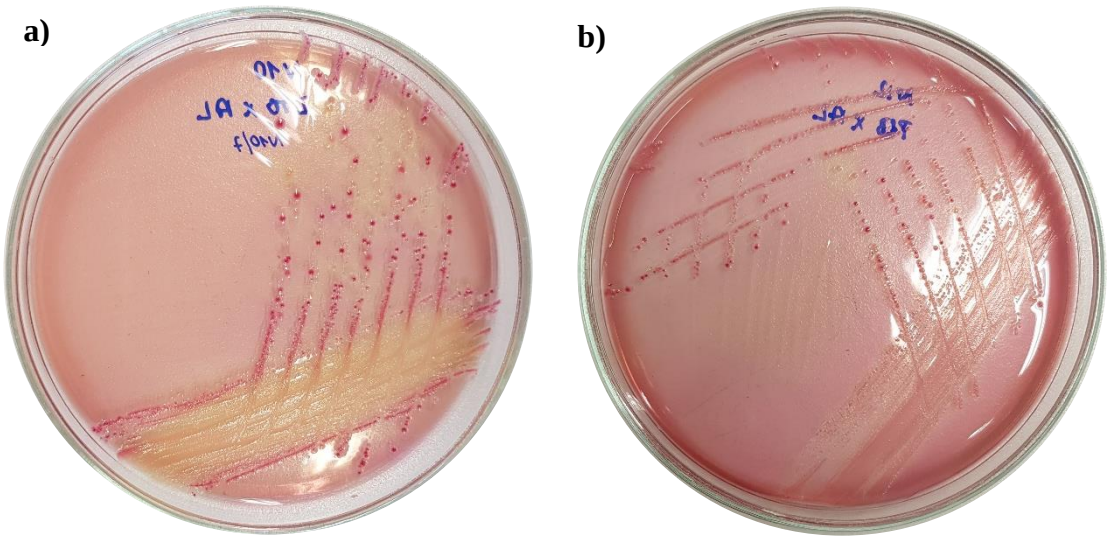
Způsob vyočkování alkalizovaných kultur na CIN agar také ovlivňoval přítomnost presumptivních kolonií bakterie *Y. enterocolitica*. Nejlepších výsledků bylo dosaženo, pokud byly alkalizované kultury vyočkovány pomocí kličky čarami na povrch CIN agaru. Pro tento způsob vyočkování byla navíc dostačující polovina Petriho misky o průměru 90 mm, čímž se snížil počet potřebných agarových ploten a tím i náklady (Obrázek 7). Roztěr 100 µl alkalizovaných kultur nevedl ke zvýšení počtu presumptivních kolonií *Y. enterocolitica* na CIN agaru. Naopak po roztěru alkalizovaných kultur často nebyly na CIN agaru přítomny presumptivní kolonie, a to i v případě, že po vyočkování kličkou byl výskyt presumptivních kolonií zaznamenán.



Obrázek 7 *Vyočkování alkalizovaných kultur na CIN agar čarami za pomocí kličky*

CIN agar je považován za nejlepší pevné médium pro izolaci bakterie *Y. enterocolitica* a je taktéž součástí standardizované metody průkazu, přesto je ale jeho použití spojeno s určitými omezeními (Petsios *et al.* 2016). Jednou z nevýhod CIN agaru je to, že na něm další manitol

fermentující druhy bakterií mohou vyrůstat v koloniích vzhledově velmi podobným presumptivním koloniím *Y. enterocolitica.* Jedná se například o druhy *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans,* a dále o zástupce rodů *Citrobacter, Aeromonas, Providencia* nebo *Morganella* (Tan *et al.* 2014, Morka *et al.* 2016; Petsios *et al.* 2016). Výskyt falešně pozitivních kolonií byl na CIN agaru zaznamenán i v této práci, a to při vyočkování alkalizovaných i nealkalizovaných kultur (Obrázek 8). Ačkoliv se tyto kolonie vyznačovaly zbarvením typickým pro presumptivní kolonie *Y. enterocolitica* byly od nich relativně dobře vizuálně rozlišitelné. Nejnápadnějším rozdílem byl širší, často až světle růžově zbarvený střed. Z hlediska morfologie byly falešně pozitivní kolonie větší velikosti, často vypouklé a některé až mukózní. Z těchto důvodů nepředstavoval výskyt falešně pozitivních kolonií na CIN agaru přílišné zvýšení náročnosti identifikace bakterie *Y. enterocolitica*, zejména pokud byl výběr presumptivních kolonií prováděn pečlivě. Je ale nutné dodat, že správný výběr presumptivních kolonií bakterie *Y. enterocolitica* na CIN agaru byl do značné míry závislý na zkušenostech pracovníka.



Obrázek 8 *Falešně pozitivní kolonie na CIN agaru po vyočkování nealkalizované kultury získané z ITC bujónu (a) a nealkalizované kultury získané z PSB bujónu (b)*

Pro vyšetření citlivosti k antibiotikům bylo vybráno 98 kmenů *Y. enterocolitica* izolovaných z odpadních vod. U 92,9 % (91/98) izolátů *Y. entererocolitica* byla zjištěna rezistence k ampicilinu. Rezistence vůči ampicilinu, podobně jako rezistence vůči amoxicilinu, amoxicilin-klavulanové kyselině, ampicilin-sulbaktamu, tikarcilinu, cefazolinu, cefalotinu, cefalexinu, cefadroxilu a cefoxitinu, je u bakterie *Y. enterocolitica* dle EUCAST kategorizována jako očekávaný rezistentní fenotyp (EUCAST 2023b). Dále byla u šesti izolátů

(6,1 %, 6/98) zjištěna rezistence k ciprofloxacinu. Kmeny *Y. enterocolitica* rezistentní vůči ciprofloxacinu byly zaznamenány ve všech typech odpadních vod. Všechny izoláty *Y. enterocolitica* byly citlivé k cefotaximu, gentamicinu, tetracyklinu a trimetoprim-sulfametoxazolu (Tabulka 15).

Tabulka 15 *Antibiotická citlivost kmenů Yersinia enterocolitica izolovaných z odpadních vod*

Antibiotikum (obsah disku)	**Počet kmenů *Yersinia enterocolitica* (n=98)**		
	S	**I**	**R**
Ampicilin (10 μg)	7 (7,1 %)	0 (0 %)	91 (92,9 %)
Cefotaxim (5 μg)	98 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Ciprofloxacin (5 μg)	86 (87,8 %)	6 (6,1 %)	6 (6,1 %)
Gentamicin (10 μg)	98 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Tetracyklin (30 μg)	98 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 μg)	98 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

S – citlivý, standardní dávkovací režim; I – citlivý, zvýšená expozice; R – rezistentní

Část výsledků získaných o bakterii *Y. enterocolitica* v odpadních vodách prezentovaných v této části disertační práce se stala součástí publikace (viz Příloha 2):

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I., Swiontek Brzezinska, M. & Pejchalová, M. (2022). Detection, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in different types of wastewater in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2255–2266.

Cílem této studie bylo zhodnotit výskyt bakterie *Y. enterocolitica* v různých typech odpadních vod a charakterizovat izoláty z hlediska biotypu, sérotypu a antibiotické citlivosti. Vzhledem k tomu, že jsou údaje o bakterii *Y. enterocolitica* v odpadních vodách celosvětově velmi omezené, jednalo se o vůbec první studii, která hodnotila prevalenci *Y. enterocolitica* v různých typech odpadních vod. Do studie bylo zařazeno 44 vzorků odpadních vod pocházejících z 11 různých zdrojů, které zahrnovaly tři městské čistírny odpadních vod, pět nemocnic, dvoje jatka s primární porážkou prasat a jeden velkokapacitní kravín. Současně byla v této studii hodnocena účinnost navržených a výše popsaných kultivačních protokolů pro průkaz bakterie *Y. enterocolitica* v odpadních vodách. Výsledky získané v této studii jsou zcela v souladu s výše prezentovanými závěry a dále je doplňují. Bakterie *Y. enterocolitica* byla detekována

v 84,1 % (37/44) vyšetřovaných vzorků odpadních vod. Míra výskytu se však mezi jednotlivými typy odpadních vod lišila. Konzistentní přítomnost *Y. enterocolitica* byla zjištěna v surových a přečištěných městských odpadních vodách, jatečních odpadních vodách i odpadních vodách z kravína. Surová městská odpadní voda a jateční odpadní voda byly hlavními zdroji izolátů, což naznačovalo, že je bakterie *Y. enterocolitica* v těchto odpadních vodách všudypřítomná. Navzdory vysokému podílu pozitivních vzorků přečištěných městských odpadních vod a odpadních vod z kravína, byl ale počet izolátů zachycených v jednotlivých vzorcích nízký. Nejnižší výskyt bakterie *Y. enterocolitica* byl zaznamenán v nemocničních odpadních vodách (64,7 %, 11/17). Přesto ale byla *Y. enterocolitica* detekována alespoň jednou ve všech nemocnicích. Ve všech typech odpadních vod byl zjištěn výhradní výskyt biotypu 1A (98,3 %, 175/178). Většina kmenů *Y. enterocolitica* biotypu 1A nepatřila k žádnému z testovaných sérotypů. Výskyt patogenních biosérotypů 4/O:3 a 3/O:3 byl zaznamenán pouze v jatečních odpadních vodách. U 106 izolátů *Y. enterocolitica* byla vyšetřena citlivost vůči ředě 12 antibiotik. Nejvyšší míra rezistence byla zjištěna vůči ampicilinu (92,5 %, 98/106) a amoxicilin-klavulanové kyselině (36,8 %, 39/106). Dále byla u osmi izolátů zaznamenána rezistence vůči ciprofloxacinu (7,5 %) a u jednoho izolátu vůči cefotaximu (0,9 %).

Pomnožení v PSB bujónu bylo pro izolaci *Y. enterocolitica* z odpadních vod účinnější než pomnožení v ITC bujónu. Přímé očkování odpadní vody do tekutých selektivních médií poskytlo podstatně více pozitivních vzorků, než zkoncentrování vody centrifugací a pomnožení získané pelety. Ošetření pomnožených kultur roztokem KOH bylo zásadní pro úspěšnou izolaci *Y. enterocolitica* z odpadních vod, což dokazuje skutečnost, že všechny izoláty v této studii byly získány po vyočkování alkalizovaných kultur. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s roztokem KOH o koncentraci 0,4 %. Výsledky získané v této studii potvrdily, že kultivační protokoly navržené pro průkaz *Y. enterocolitica* v odpadních vodách jsou použitelné v široké škále typů odpadních vod. Ve studii je rozsáhle diskutována prevalence *Y. enterocolitica* v různých typech odpadních vod, charakter získaných izolátů a jejich antibiotická citlivost a také účinnost kultivačních protokolů.

2.1.8 *Salmonella* spp.

2.1.8.1 Experimentální část

Pro průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách byly využity tři kultivační metody, lišící se především počtem pomnožovacích kroků a zpracováním vzorků odpadních vod. Jedna metoda zahrnovala jak neselektivní, tak selektivní pomnožení, zatímco další dvě metody využívaly pouze selektivní pomnožení. Tyto metody se lišily ve zpracování vzorků odpadních vod. Jedna metoda zahrnovala přímé naočkování odpadní vody do selektivního pomnožovacího média, zatímco ve druhé metodě byly vzorky odpadní vody před selektivním pomnožením zkoncentrovány centrifugací. Ve všech třech kultivačních metodách byly použity dvě selektivní tekutá pomnožovací média a čtyři pevná média. V závislosti na selektivním pomnožovacím médiu a inkubační teplotě selektivního pomnožení byly kultivační metody dále rozděleny do jednotlivých protokolů. S ohledem na všechny možné kombinace byl každý vzorek odpadní vody za účelem průkazu bakterií rodu *Salmonella* paralelně vyšetřován pomocí deseti kultivačních protokolů. Při návrhu kultivačních metod pro průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách bylo vycházeno z normy ČSN ISO 19250, která specifikuje metodu průkazu přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* ve vzorcích vod. Schéma kultivačních protokolů použitých pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod je uvedeno v Tabulce 16. Izolace byla provedena následovně:

Metoda s neselektivním a selektivním pomnožením: 10 ml odpadní vody bylo naočkováno do 90 ml pufrované peptonové vody (PPV) (HiMedia, M1494I) a inkubováno při 36 ± 1 °C po dobu 16 hodin. Po inkubaci byl 1 ml pomnožené kultury přenesen do 10 ml bujónu podle Mullera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem (MKTTn bujón) (Oxoid, CM1048B s přídavkem SR0181E a roztoku jodu v jodidu draselném). Zkumavky s naočkovaným MKTTn bujónem byly inkubovány při 36 ± 1 °C a 41,5 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin. Paralelně bylo 0,1 ml pomnožené kultury přeneseno do 10 ml bujónu podle Rappaporta a Vassiliadise se sójou (RVS bujón) (Oxoid, CM0866B). Zkumavky s naočkovaným RVS bujónem byly inkubovány při 36 ± 1 °C a 41,5 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin.

Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody: 1 ml odpadní vody byl naočkován do 10 ml MKTTn bujónu. Zkumavky s naočkovaným MKTTn bujónem byly inkubovány při 36 ± 1 °C a 41,5 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin. Paralelně byl 1 ml odpadní vody naočkován do 10 ml RVS bujónu. Zkumavky s naočkovaným RVS bujónem byly inkubovány při 36 ± 1 °C a 41,5± 1 °C po dobu 21–24 hodin.

Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody: 50 ml odpadní vody bylo zkoncentrováno centrifugací při 4688 x g po dobu 30 minut při 4 °C (ROTINA 420R, Hettich). Získané pelety byly resuspendovány v 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku (0,9 %) a následně přidány do 10 ml MKTTn bujónu a 10 ml RVS bujónu. Zkumavky s naočkovaným MKTTn a RVS bujónem byly inkubovány při 41,5 ± 1 °C po dobu 21–24 hodin. Selektivně pomnožené kultury ze všech kultivačních protokolů byly křížovým roztěrem vyočkovány na povrch dvou ploten agaru s xylózou, lyzinem a deoxycholanem (XLD agar) (HiMedia, M031), dvou ploten deoxycholát citrátový agaru (DC agar) (HiMedia, M065), dvou ploten agaru s briliantovou zelení (BG agar) (HiMedia, M016A) a dvou ploten Rambach agaru (Merck Millipore; 1.07500). Naočkované plotny byly inkubovány při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin.

Z každé pozitivní plotny bylo vybráno tři až pět presumptivních kolonií bakterií rodu *Salmonella* pro biochemické potvrzení. Na XLD agaru byly za presumptivní považovány kolonie s černým středem a světlou průhlednou zónou červené barvy. Na DC agaru byly za presumptivní považovány bezbarvé kolonie s černým středem. Na agaru s briliantovou zelení byly za presumptivní považovány červené, růžové nebo bílé neprůhledné kolonie. Na Rambach agaru byly za presumptivní považovány červeně zbarvené kolonie. Vybrané presumptivní kolonie byly inkubovány na krevním agaru (HiMedia, M834 se 7 % sterilní defibrinované beraní krve) při 36 ± 1 °C po dobu 24 ± 3 hodin. K biochemickému potvrzení izolátů byl použit agar s třemi cukry a železem (HiMedia, M021), Christensenův agar s močovinou (HiMedia, M112 s přídavkem FD048) a bujón s L-lyzinem (HiMedia, M376I). Biochemické zkoušky byly provedeny a jejich výsledky interpretovány dle normy ČSN ISO 19250. Izoláty s typickými biochemickými reakcemi dle normy ČSN ISO 19250 byly identifikovány pomocí soupravy ENTERO test 24 N (Erba Lachema, MLT00008). Získané izoláty *Salmonella* spp. nebyly v této práci serotypizovány.

Tabulka 16 *Schéma kultivačních protokolů pro průkaz bakterií rodu Salmonella v odpadních vodách*

Kultivační metoda/protokol	Neselektivní pomnožení	Selektivní pomnožení	Pevné médium
Metoda s neselektivním a selektivním pomnožením			
PPV/MKTTn 37 °C (A)	10 ml odpadní vody + 90 ml PPV 36 ± 2 °C, 16 hodin	1 ml kultury z PPV 10 ml MKTTn bujónu 36 ± 2 °C, 21–24 h.	XLD agar DC agar BG agar Rambach agar
PPV/MKTTn 41,5 °C (B)		1 ml kultury z PPV 10 ml MKTTn bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	
PPV/RVS 37 °C (C)		0,1 ml kultury z PPV 10 ml RVS bujónu 36 ± 2 °C, 21–24 h.	
PPV/RVS 41,5 °C (D)		0,1 ml kultury z PPV 10 ml RVS bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	
Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody			
MKTTn 37 °C (E)	---	1 ml odpadní vody 10 ml MKTTn bujónu 36 ± 2 °C, 21–24 h	XLD agar DC agar BG agar Rambach agar
MKTTn 41,5 °C (F)		1 ml odpadní vody 10 ml MKTTn bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	
RVS 37 °C (G)		1 ml odpadní vody 10 ml RVS bujónu 36 ± 2 °C, 21–24 h.	
RVS 41,5 °C (H)		1 ml odpadní vody 10 ml RVS bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	
Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody			
CENT/MKTTn 41,5 °C (I)	---	50 ml odpadní vody centrifugace 10 ml MKTTn bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	XLD agar DC agar BG agar Rambach agar
CENT/RVS 41,5 °C (J)		50 ml odpadní vody centrifugace 10 ml RVS bujónu 41,5 ± 1 °C, 21–24 h.	

PPV – pufrovaná peptonová voda; MKTTn bujón – bujón podle Mullera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem; RVS bujón – bujón dle Rappaporta a Vassiliadise se sójou; XLD – agar s xylózou, lyzinem a deoxycholanem; DC – deoxycholát citrátový agar; BG – agar s briliantovou zelení; CENT – centrifugace

Z každého pozitivního vzorku odpadní vody byly vybrány dva až tři potvrzené kmeny *Salmonella* spp. k vyšetření antibiotické citlivosti. Pro bakterie rodu *Salmonella* byla vybrána sestava šesti antibiotik zahrnující ampicilin, pefloxacin, cefotaxim, gentamicin, chloramfenikol a trimetoprim-sulfametoxazol. Sestava antibiotických disků pro bakterie rodu *Salmonella* je uvedena v Tabulce 17.

Tabulka 17 *Sestava antibiotických disků pro bakterie rodu Salmonella*

Sestava antibiotických disků pro bakterie rodu *Salmonella*					
Ampicilin	Pefloxacin	Cefotaxim	Gentamicin	Chloramfenikol	Trimetoprim-sulfametoxazol
10 µg	5 µg	5 µg	10 µg	30 µg	1,25-23,75 µg

2.1.8.2 Výsledková část a diskuse

Bakterie rodu *Salmonella* byly prokázány alespoň jedním z použitých kultivačních protokolů v 71,4 % (40/56) vyšetřovaných vzorků odpadních vod. Vysoká míra výskytu bakterií rodu *Salmonella* byla zaznamenána v surových (85,7 %) i přečištěných (78,6 %) městských odpadních vodách (Tabulka 18). Ve studii Masarikova *et al.* (2016) byl výskyt bakterií rodu *Salmonella* zjištěn ve všech 37 vzorcích přečištěných městských odpadních vod, které byly odebrány na odtoku z městské čistírny v Brně. Ve studii Santiago *et al.* (2018) byly bakterie rodu *Salmonella* detekovány v 61,9 % a 45,8 % vzorků odpadních vod pocházejících ze dvou městských čistíren ve španělském městě Valencie, které byly vybaveny terciálním dezinfekčním krokem (chlorace, UV záření). Kontaminace bakteriemi rodu *Salmonella* byla zjištěna výhradně v surové městské odpadní vodě, zatímco po dezinfekčním ošetření byly pozitivní pouze dva vzorky. Ve studii Yanagimoto *et al.* (2020) byly bakterie rodu *Salmonella* izolovány z 99 % vzorků přítoků do dvou městských čistíren odpadních vod v japonské prefektuře Yamanashi.

Značný rozdíl ve výskytu bakterií rodu *Salmonella* byl zjištěn v jednotlivých typech nemocničních odpadních vod. Zatímco vzorky nemocničních odpadních vod odpovídaly stupněm kontaminace (85,7 %) městským odpadním vodám, v infekčních nemocničních odpadních vodách byl záchyt bakterií rodu *Salmonella* vůbec nejnižší ze všech typů odpadních vod (35,7 %) (Tabulka 18).

Tabulka 18 *Výskyt bakterií rodu Salmonella v různých typech odpadních vod*

Typ vzorku odpadní vody	Celkový počet vzorků	Počet pozitivních vzorků
Surová městská OV	14	12 (85,7 %)
Přečištěná městská OV	14	11 (78,6 %)
Infekční nemocniční OV	14	5 (35,7 %)
Nemocniční OV	14	12 (85,7 %)
Celkem	56	40 (71,4 %)

OV – odpadní voda

Klíčovým faktorem pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod byl krok selektivního pomnožení. Použité selektivní pomnožovací médium a inkubační teplota zásadně ovlivňovaly účinnost pevných médií a tím i míru izolace bakterií rodu *Salmonella*. Naproti tomu primární neselektivní pomnožení odpadních vod, stejně tak jako způsob jejich zpracování před selektivním pomnožením, neměli na účinnost jednotlivých kultivačních protokolů zásadní vliv. Pomnožení v MKTTn bujónu bylo pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod účinnější než pomnožení v RVS bujónu. Z hlediska inkubační teploty selektivního pomnožení byly bakterie rodu *Salmonella* častěji izolovány při zvýšené teplotě 41,5 °C, a to bez ohledu na použité selektivní pomnožovací médium. Kultivační protokoly B (PPV/MKTTn 41,5 °C), F (MKTTn 41,5 °C) a I (CENT/MKTTn 41,5 °C) poskytly nejvyšší míru detekce bakterií rodu *Salmonella*. Naproti tomu kultivační protokoly A (PPV/MKTTn 37 °C) a J (CENT/RVS 41,5 °C) poskytly nejnižší míru detekce a fungovaly špatně ve srovnání s ostatními kultivačními protokoly. Bakterie rodu *Salmonella* nebyly v odpadních vodách detekovány kultivačními protokoly se selektivním pomnožením v RVS bujónu při 37 °C (C a G). Tyto výsledky ukázaly, že inkubační teplota výrazně ovlivňuje účinnost selektivních pomnožovacích médií (Tabulka 19).

Tabulka 19 *Počet vzorků odpadních vod pozitivních na přítomnost bakterií rodu Salmonella na základě použitého kultivačního protokolu*

Kultivační metoda/protokol	Surová městská OV (n=12)	Přečištěná městská OV (n=11)	Infekční nemocniční OV (n=5)	Nemocniční OV (n=12)	Celkový počet pozitivních vzorků (n=40)
Metoda s neselektivním a selektivním pomnožením					
PPV/MKTTn 37 °C (A)	1 (8,3 %)	1 (9,1 %)	0 (0 %)	4 (33,3 %)	6 (15,0 %)
PPV/MKTTn 41,5 °C (B)	7 (58,3 %)	8 (72,7 %)	2 (40,0 %)	9 (75,0 %)	26 (65,0 %)
PPV/RVS 37 °C (C)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
PPV/RVS 41,5 °C (D)	5 (41,7 %)	2 (18,2, %)	2 (40,0 %)	5 (41,7 %)	14 (35,0 %)
Metoda s přímým selektivním pomnožením odpadní vody					
MKTTn 37 °C (E)	6 (50,0 %)	3 (27,3 %)	0 (0 %)	6 (50,0 %)	15 (37,5 %)
MKTTn 41,5 °C (F)	9 (75,0 %)	6 (54,5 %)	2 (40,0 %)	7 (58,3 %)	24 (60,0 %)
RVS 37 °C (G)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
RVS 41,5 °C (H)	9 (75,0 %)	2 (18,2 %)	0 (0 %)	6 (50,0 %)	17 (42,5 %)
Metoda se selektivním pomnožením zkoncentrovaného vzorku odpadní vody					
CENT/MKTTn 41,5 °C (I)	10 (83,3 %)	6 (54,5 %)	0 (0 %)	7 (58,3 %)	23 (57,5 %)
CENT/RVS 41,5 °C (J)	5 (41,7 %)	2 (18,2 %)	0 (0 %)	1 (8,3 %)	8 (20,0 %)

OV – odpadní voda; PPV – pufrovaná peptonová voda; MKTTn bujón – bujón podle Mullera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem; RVS bujón – bujón dle Rappaporta a Vassiliadise se sójou; CENT – centrifugace

Pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod byl nejúčinnější XLD agar, dále DC agar a Rambach agar. Naproti tomu z BG agaru nebyly získány žádné izoláty bakterií rodu *Salmonella.* Na všech použitých pevných médiích byl zaznamenán výskyt falešně pozitivních kolonií. Na XLD agaru a DC agaru vyrůstaly nejčastěji v koloniích vzhledově podobným presumptivním koloniím bakterie rodu *Proteus.* Na Rambach agaru falešně pozitivní kolonie nejčastěji vytvářel *Cirobacter freundii*, zatímco bakterie rodu *Proteus* byly jednoznačně vizuálně rozlišitelné a vyrůstaly ve světle oranžových koloniích. Na BG agaru byla nejčastějším původcem falešně pozitivních kolonií bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Konkrétní podmínky selektivního pomnožení měly zásadní vliv na výskyt presumptivních kolonií bakterií rodu *Salmonella* na pevných médiích, i na množství a složení přítomné doprovodné mikroflóry. Pomnožení v MKTTn bujónu vedlo nezávisle na inkubační teplotě k výskytu presumptivních kolonií na XLD a DC agaru téměř ve všech vyšetřovaných vzorcích. Avšak podíl vzorků, ve kterých byly presumptivní kolonie potvrzeny jako bakterie rodu *Salmonella,* byl nízký a kombinace MKTTn bujónu s XLD a DC agarem poskytovala vysoké množství falešně pozitivních výsledků. Jedinou výjimkou byla kombinace protokolu F (MKTTn 41,5 °C) a XLD agaru. K falešně pozitivním výsledkům přispívala i skutečnost, že na většině ploten DC agaru byly po vyočkování kultur pomnožených v MKTTn bujónu přítomny pouze bezbarvé kolonie s černými středy. To značně ztěžovalo až znemožňovalo jednoznačné rozlišení presumptivních kolonií bakterií rodu *Salmonella*. K tomuto jevu ale na DC agaru nedocházelo při vyočkování kultur pomnožených v RVS bujónu. I přesto ale kultivační protokoly kombinující selektivní pomnožení v MKTTn bujónu při 41,5 °C s vyočkováním na XLD a DC agar poskytly vůbec nejvyšší míru detekce bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách.

Při kombinaci RVS bujónu s XLD a DC agarem měla inkubační teplota zásadní vliv na výskyt presumptivních kolonií. Pomnožení v RVS bujónu při 37 °C vedlo k vysokému podílu vzorků s presumptivními koloniemi na XLD a DC agaru, podobně jako při pomnožení v MKTTn bujónu. Všechny přítomné presumptivní kolonie ale byly falešně pozitivní. Naproti tomu pomnožení v RVS bujónu při 41,5 °C vedlo k podstatně nižšímu počtu vzorků s presumptivními koloniemi na XLD a DC agaru. Avšak ve vysokém podílu těchto vzorků byly přítomné presumptivní kolonie identifikovány jako bakterie rodu *Salmonella*. Kombinace pomnožení v RVS bujónu při 41,5 °C a XLD agaru byla nejúčinnější v potlačení výskytu falešně pozitivních kolonií, ale současně vedla k vysokému počtu falešně negativních výsledků. Při vyočkování kultur pomnožených v RVS bujónu při 41,5 °C byl na XLD a DC byl v nejvyšší míře potlačen růst doprovodné mikroflóry.

Podobně jako u XLD a DC agaru vedla nižší inkubační teplota RVS bujónu ke značnému zvýšení počtu vzorků s presumptivními koloniemi na Rambach agaru. Avšak žádná z těchto kolonií nebyla pozitivně potvrzena Ve srovnání s XLD a DC agarem byl podíl pozitivně potvrzených vzorků s presumptivními koloniemi přítomnými na Rambach agaru po vyočkování kultur pomnožených v RVS bujónu při 41,5 °C podstatně nižší.
Přítomnost presumptivních kolonií na BG agaru byla zaznamenána pouze po vyočkování kultur pomnožených v MKTTn bujónu, ale žádná z těchto kolonií nebyla pozitivně potvrzena jako bakterie rodu *Salmonella*.

Výsledky získané v oblasti detekce bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách se staly základem publikace (viz Příloha 3):
Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. (2023). Comparison of culture methods for the detection of *Salmonella* in wastewater. *Scientific Papers of the University of Pardubice Series A*, 29.
V publikaci jsou rozsáhle diskutovány získané výsledky, především s důrazem na zhodnocení vlivu jednotlivých proměnných na účinnost izolace bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod. Navržené kultivační protokoly byly srovnány se standardizovanou metodou specifikovanou v normě ČSN ISO 19250, zejména pak s konkrétními postupy, která norma doporučuje přímo pro odpadní vody. Dále jsou vysvětleny pravděpodobné důvody rozdílné prevalence bakterií rodu *Salmonella* v různých typech odpadních vod. Publikace obsahuje podrobné výsledky pro kombinace jednotlivých kultivačních protokolů a pevných médií ve formě souhrnných tabulek. Publikace je doplněna rozsáhlou fotografickou dokumentací.

Pro vyšetření citlivosti k antibiotikům bylo vybráno 93 kmenů *Salmonella* spp. izolovaných z odpadních vod. U 71,0 % (66/93) izolátů byla zjištěna citlivost ke všem testovaným antibiotikům. Rezistence byla v nejvyšší míře zaznamenána vůči pefloxacinu (18,3 %, 17/93) (Tabulka 20). Disk s 5 µg pefloxacinu lze u bakterií rodu *Salmonella* využít pro screening rezistence k fluorochinolonům. Od diskového difúzního testu s pefloxacinem lze také odvodit citlivost bakterií rodu *Salmonella* k ciproflaxinu, neboť disk s 5 µg ciprofloxacinu není spolehlivý k detekci nízkého stupně rezistence k ciprofloxacinu u bakterií rodu *Salmonella* (EUCAST 2022). Dále byla u šesti izolátů zjištěna rezistence vůči gentamicinu (6,5 %) a shodně u tří izolátů rezistence vůči ampicilinu a trimetoprim-sulfametoxazolu (3,2 %). Všechny izoláty vykazovaly citlivost vůči cefotaximu a chloramfenikolu (Tabulka 20). Výskyt rezistentních kmenů (29,0 %, 27/93) byl zaznamenán ve všech typech odpadních vod. U dvou

izolátů z přečištěných městských odpadních vod (7,4 %, 2/27) byla zaznamenána rezistence ke dvěma antibiotikům, ostatní izoláty byly rezistentní vůči jednomu antibiotiku (92,6 %, 25/27). Ve studii Masarikova *et al.* (2016) byly rezistentní kmeny *Salmonella* spp. zaznamenány v 89 % vzorků přečištěných odpadních vod odebraných na odtoku městské v Brně. Nejčastěji byla zjištěna rezistence k tetracyklinu a sulfonamidům (52 %), kyselině nalidoxové (38 %) a ampicilinu (33 %). Rezistence k tetracyklinu je mezi izoláty *Salmonella* spp. z odpadních vod široce rozšířena, a v řadě studií je hlášena jako nejčastější (Santiago *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019; Yanagimoto *et al.* 2020). Dále se mezi izoláty z odpadních vod ve vysoké míře vyskytuje rezistence vůči streptomycinu, sulfametoxazolu a ampicilinu (Odjadjare and Olaniran 2015; Mhongole *et al.* 2017; Santiago *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019; Yanagimoto *et al.* 2020). V různé míře je v odpadních vodách hlášen výskyt multirezistetních kmenů *Salmonella* spp. (Oubrim *et al.* 2012; Masarikova *et al.* 2016; Santiago *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2019).

Tabulka 20 *Antibiotická citlivost kmenů Salmonella spp. izolovaných z odpadních vod*

Antibiotikum (obsah disku)	**Počet kmenů *Salmonella* spp. (n=93)**		
	S	**I**	**R**
Ampicilin (10 μg)	90 (96,8 %)	0 (0 %)	3 (3,2 %)
Pefloxacin (5 μg)	76 (81,7 %)	0 (0 %)	17 (18,3 %)
Cefotaxim (5 μg)	93 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Gentamicin (10 μg)	87 (93,5 %)	0 (0 %)	6 (6,5 %)
Chloramfenikol (30 μg)	93 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25-23,75 μg)	90 (96,8 %)	0 (0 %)	3 (3,2 %)

S – citlivý, standardní dávkovací režim; I – citlivý, zvýšená expozice; R – rezistentní

2.2 Příjem polyfluorovaných léčiv efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami za hydroponických podmínek a jejich detekce v rostlinných extraktech

Cílem druhé části disertační práce bylo zhodnotit příjem polyfluorovaných léčiv efavirenzu a kyseliny flufenamové z kontaminované vody různými druhy rostlin, a to řeřichou setou (*Lepidium sativum*), roketou setou (*Eruca sativa*), ředkvičkou setou (*Raphanus sativus*) a hrachem setým (*Pisum sativum*). Schopnost přirozené absorpce cílových léčiv vybranými modelovými rostlinami byla posuzována pomocí hydroponických experimentů za využití vodných roztoků jednotlivých léčiv jako pěstebních médií. V této části disertační práce byly navrženy podmínky hydroponického pěstování rostlin, metoda pro zpracování rostlinného materiálu před extrakcí cílových léčiv a optimalizována metoda jejich extrakce z rostlinné matrice. Dále byla navržena analytická metoda, založená na HPLC/MS analýze, pro detekci efavirenzu a kyseliny flufenamové v rostlinných extraktech.

2.2.1 Experimentální část

2.2.1.1 Modelové rostliny a pěstební médium

Jako modelové rostliny pro sledování přirozené absorpce efavirenzu a kyseliny flufenamové z vodných roztoků byly vybrány následující druhy: řeřicha setá (*Lepidium sativum*), roketa setá (*Eruca sativa*), ředkvička setá (*Raphanus sativus*) a hrách setý (*Pisum sativum*). Osiva všech modelových rostlin byla získána od firmy MoravoSeed a. s.

Jako pěstební média byly použity roztoky standardů efavirenzu a kyseliny flufenamové (LGC Standards) v destilované vodě. Pěstební média obsahovala cílová léčiva ve třech koncentračních úrovních, a to 1,00, 3,75 a 7,50 mg/l. Příslušná navážka léčiv byla v ultrazvukové lázni (Kraintek) rozpuštěna ve 2 ml směsi metanolu (99,9 %, Sigma-Aldrich) a 1M NaOH (Penta) (10:1, v/v) a následně doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 1 litru. Destilovaná voda pro přípravu pěstebních médií byla sterilizována v autoklávu (V-40, Systec) při 120 ± 2 °C po dobu 15 minut. Připravená pěstební média byla skladována ve tmě při teplotě 4 °C a používána maximálně jeden den po přípravě. Před použitím byla pěstební média vytemperována na laboratorní teplotu.

2.2.1.2 Podmínky hydroponického pěstování rostlin

Hydroponické pěstování rostlin probíhalo ve skleněných Petriho miskách o průměru 12 cm, jejichž celá plocha byla pokryta dvěma vrstvami syntetické vaty z polyesterových vláken (Cellona). Pěstování probíhalo v malých plastových sklenících bez umělého osvětlení. Skleníky byly umístěny na vnitřních okenních parapetech v místnosti s kontrolovanou teplotou, která se pohybovala v rozmezí 21 ± 1 °C. Všechny pomůcky používané pro pěstování rostlin byly sterilní a veškeré operace byly prováděny za aseptických podmínek, aby bylo omezeno riziko kontaminace pěstebního systému. Petriho misky byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru (5104.2, BMT Medical Technology) při 180 °C. Plastové pomůcky a syntetická vata byly sterilizovány v autoklávu (STERILAB®, BMT Medical Technology) při 105 °C po dobu 15 minut.

2.2.1.3 Expozice rostlin efavirenzem a kyselinou flufenamovou

Rostliny byly pěstovány po dobu sedmi dní, přičemž období pěstování začínalo vždy v pondělí prvního týdne a bylo ukončeno v pondělí následující týdne. Rostliny byly léčivům prostřednictvím pěstebního média vystaveny po celou dobu 7denního období pěstování, tj. i v období klíčení. Vrstva syntetické vaty byla v den setí rostlin zvlhčena 40 ml pěstebního média s obsahem příslušného léčiva. Následně byl 1 gram semínek řeřichy seté, rokety seté a ředkvičky seté nebo 20 kusů semen hrachu setého rovnoměrně rozprostřeno na povrch navlhčené syntetické vaty v Petriho miskách. Zálivka pěstebním médiem s obsahem léčiv probíhala po dobu dalších čtyř dnů (úterý až pátek). Přes víkend nebyly rostliny zalévány. V pondělí následujícího týdne taktéž nedocházelo k zálivce, neboť v tomto dni bylo období pěstování ukončeno. Celkový objem zálivky za 7denní období pěstování byl 150 ml. Denní objem zálivky nebyl totožný a měnil se v závislosti na růstové fázi rostlin (Tabulka 21). Aby byly minimalizovány změny v koncentraci léčiv v Petriho miskách, byla zálivka rostlin prováděna následujícím způsobem: zbytek pěstebního média z předešlého dne byl odsán pomocí automatické pipety, následně byla Petriho miska propláchnuta 20 ml čerstvého pěstebního média, a po jeho odstranění byly rostliny zality příslušným objemem pěstebního média pro daný den. Pěstební médium bylo vždy naléváno pod syntetickou vatu, tak aby se zabránilo ulpívaní léčiv z pěstebního média přímo na rostlinách.

Kontrola růstu jednotlivých druhů rostlin za navržených podmínek hydroponického pěstování byla prováděna pomocí zálivky destilovanou vodou. Kontrolní vzorky byly nasazovány ve třech replikátech pro každý druh rostliny při každém pěstebním období. Podmínky pěstování

a systém zálivky kontrolních vzorků byly totožné s rostlinami, které byly vystaveny účinkům léčiv.

2.2.1.4 Odběr a zpracování vzorků rostlin

Vzorky rostlin byly odebírány buď jednorázově na konci 7denního období pěstování, nebo každodenně během celého 7denního období pěstování. Podmínky pěstování a systém zálivky byl pro obě metodiky odběru vzorků totožný (Tabulka 21).

Při jednorázovém odběru vzorků byly vzorky odebírány v pondělí následujícího týdne, v případě, že byly rostliny zasety v pondělí týdne předcházejícího. Pro každý druh rostliny a každou koncentrační hladinu efavirenzu a kyseliny flufenamové v pěstebním médiu (1,00, 3,75 a 7,50 mg/l) byly nasazovány tři replikáty ve dvou sériích opakování (n=6).

Při každodenním odběru vzorků byl odběr započat ihned první den po zasetí rostlin, tj. v úterý, pokud byly rostliny zasety v pondělí. Následně byly vzorky odebírány denně, a to včetně víkendu. Za 7denní období pěstování byly tedy vzorky odebírány 7krát, aby bylo možné sledovat změnu koncentrace léčiv v rostlinách v závislosti na době expozice. Pro každý druh rostliny a každou koncentrační hladinu efavirenzu a kyseliny flufenamové v pěstebním médiu (1,00, 3,75 a 7,50 mg/l) byly nasazovány tři replikáty v jedné sérii opakování (n=3).

Před sklizením byly rostliny řádně opláchnuty destilovanou vodou a osušeny papírovou utěrkou, aby došlo k odstranění zbytků pěstebního média, které v průběhu pěstování mohlo ulpít na povrchu rostlin. K analýze byly odebírány všechny rostliny narostlé v dané Petriho misce, a to včetně kořenové části. Rostlinný materiál byl po odběru přenesen do čistých Petriho misek a přesně zvážen, aby bylo možné přepočítat výsledky na hmotnost živé rostliny. Následně byly rostliny zamrazeny při teplotě −20 °C po dobu nejméně 24 hodin. Po uplynutí této doby byl rostlinný materiál vysušen mrazem v lyofilizátoru (L4-110, Gregor Instruments) po dobu 25 hodin. Lyofilizované rostliny byly rozetřeny na jemný prášek pomocí třecí misky s tloučkem a přemístěny do 50ml centrifugačních zkumavek (Corning, 430829), ve kterých byla provedena extrakce cílových léčiv z rostlinného materiálu.

Tabulka 21 *Systém zálivky rostlin a metodika odběru vzorků*

Den pěstování	Denní objem zálivky	Jednorázový odběr vzorků	Každodenní odběr vzorků
SETÍ (pondělí)	40 ml	---	---
1. den (úterý)	30 ml	---	ANO
2. den (středa)	20 ml	---	ANO
3. den (čtvrtek)	20 ml	---	ANO
4. den (pátek)	40 ml	---	ANO
5. den (sobota)	bez zálivky	---	ANO
6. den (neděle)	bez zálivky	---	ANO
7. den (pondělí)	bez zálivky	ANO	ANO

2.2.1.5 Extrakce efavirenzu a kyseliny flufenamové z rostlinné matrice

Efavirenz a kyselina flufenamová byly z rostlinné matrice izolovány extrakcí kapalinou. Po optimalizaci extrakčních podmínek byla extrakce provedena pomocí 20 ml směsi metanolu (99,9 %, Sigma-Aldrich) a 1M NaOH (Penta) (10:1, v/v) v ultrazvukové lázni (Kraintek) po dobu 60 minut. Rostlinný materiál byl od extrakčního činidla oddělen centrifugací při 4688 x *g* po dobu 30 minut při 4 °C (ROTINA 420R, Hettich). Supernatant byl po centrifugaci odpipetován pomocí automatické pipety a do HPLC/MS analýzy uchováván v zamrazeném stavu při teplotě −20 °C.

2.2.1.6 HPLC/MS analýza efavirenzu a kyseliny flufenamové v rostlinných extraktech

Analýza efavirenzu a kyseliny flufenamové v rostlinných extraktech byla provedena pomocí HPLC v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) spojené s MS detekcí. Pro kvantifikaci cílových léčiv byla použita metoda kalibrační přímky.

Systém HPLC byl vybaven binárním gradientovým čerpadlem HPG-3400RS, termostatem kolon TCC-3000 a autosamplerem WPS-3000TRS (Thermo Fisher Scientific). HPLC systém byl spojen s hmotnostním detektorem Orbitrap Q Exactive Focus s hmotnostním rozsahem 70–1000 m/z pracujícím po dobu 6 minut v pozitivním módu s iontovým zdrojem Probe-HESI-M2 a Assy-APCI Probe-USI (Thermo Fisher Scientific).

Optimální separace bylo dosaženo na koloně Ascentis Express C18 (150 × 3,0 mm, 2,7 μm) (Supelco) za použití gradientové eluce. Mobilní fáze byla složena z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě (A) a z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v metanolu (B). Gradientový profil byl následující: 0–2 min: 20 % B, 2,5–3 min: 90 % B a 6 min: 20 % B. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 0,4 ml/min a kolona byla termostatem vytemperována na 25 °C. Objem vstřikovaného vzorku byl 10 μl.

2.2.2 Výsledková část a diskuse

2.2.2.1 Hydroponické experimenty

Navržené podmínky hydroponického pěstování minimalizovaly ovlivnění experimentů mikrobiální činností. Použití malých plastových skleníků pro kultivaci rostlin bránilo vzdušné kontaminaci, a na Petriho miskách nebyl zaznamenán růst plísní. Současně nedocházelo k odpařování pěstebního média a během pěstování bylo možné udržovat konstantní teplotu. Syntetická vata z polyesterových vláken sloužila jako výborný podklad pro ukotvení kořenů rostlin během růstu. Největší výhodou syntetické vaty však byla možnost její sterilizace v autoklávu. Nebylo zjištěno, že by docházelo k absorpci cílových léčiv z pěstebního média na syntetickou vatu.

Je třeba poznamenat, že navržené podmínky hydroponického pěstování měly určitá omezení. Zásadním omezením byla skutečnost, že ne všechny faktory ovlivňující růst rostlin byly plně kontrolovány. V tomto ohledu se jednalo zejména o využití přirozeného světla namísto vhodného umělého světelného zdroje. Vzhledem k tomu, že experimenty byly prováděny v průběhu roku během různých ročních období, měnila se i délka denního slunečního svitu. Tím byl přirozeně ovlivněn růst rostlin, a pravděpodobně i příjem léčiv z pěstebního média. Z tohoto důvodu by bylo vhodnější použít umělé osvětlení a nastavit konstantní světelný režim, například 12 hodin světlo a 12 hodin tma, čímž by se minimalizoval vliv vnějších podmínek na růst rostlin. Během hydroponického pěstování by pak bylo vhodné kontrolovat vedle teploty i relativní vlhkost vzduchu. Dalším omezením byl samotný systém zálivky. Ačkoliv byly rostliny vystaveny účinkům léčiv po celou dobu 7denního období pěstování, v průběhu víkendu nebylo možné zajistit jejich zálivku a výměnu pěstebního média. Tím nebyla zajištěna konstantní koncentrace cílových léčiv v Petriho miskách. Období pěstování nebylo v této práci rozděleno na fázi klíčení a období růstu. Tento systém je ve studiích zabývajících se studiem příjmu léčiv rostlinami za hydroponických podmínek velmi rozšířený. V období klíčení jsou rostliny zavlažovány pitnou vodou a k expozici léčivy dochází obvykle třetí den po setí

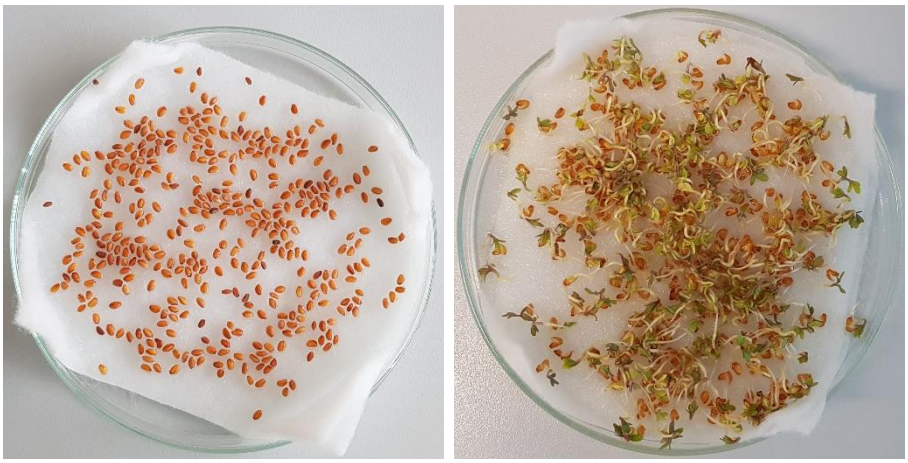
(Emhofer *et al.* 2017; Reichl *et al.* 2018; Emhofer *et al.* 2019). Při zpětném pohledu by proto bylo výhodnější, rozdělit 7denní období pěstování na dvoudenní fázi klíčení, která by probíhala během víkendu, a pětidenní fázi růstu, při které by byly rostliny vystaveny účinkům léčiv. Tato fáze by byla započata v pondělí. Tímto způsobem by mohla být výměna pěstebního média prováděna denně po celou dobu 5denní fáze růstu rostlin (pondělí až pátek). Avšak tento systém by byl použitelný pouze u řeřichy a rokety, neboť k vyklíčení ředkvičky a hrachu docházelo za více než dva dny. Na druhou stranu ale nebyl důvod předpokládat, že během klíčení semen nedochází k příjmu léčiv z pěstebního média.

Rozhodujícími atributy pro výběr modelových rostlin byl rychlý růst a možnost hydroponického pěstování. Taktéž bylo přihlédnuto k tomu, aby byly vybrané druhy rostlin jedlé. Řeřicha setá je často využívána jako modelová rostlina pro studium příjmu a metabolizace léčiv ze závlahové vody, neboť splňuje požadavky pro hydroponické pěstování a vyznačuje se krátkým růstovým cyklem (Reichl *et al.* 2018). Roketa setá je taktéž rychle rostoucí rostlina, pro níž představuje hydroponické pěstování ideální přístup, neboť vyžaduje stálé zavlažování (Marsoni *et al.* 2014). Jako modelová rostlina byla roketa setá použita ve studii Cuellar *et al.* (2021), ve které byl zkoumán příjem a akumulace šestimocného chrómu z kontaminované závlahové vody. Semena ředkvičky seté byla využita ve studii Rhodes *et al.* (2021), a to pro sledování příjmu a akumulace cefalexinu za hydroponických podmínek po dobu šesti dnů. Naproti tomu sazenice ředkvičky seté pěstované za hydroponických podmínek byly využity pro pochopení metabolismu diazepamu a jeho vlivu na vybrané metabolické enzymy v rostlinách (Dudley *et al.* 2019). Hrách setý byl použit jako modelová rostlina při studiu přijmu beta-blokátoru atenololu, antiepileptika karbamazepinu a antibiotika sulfametoxazolu z kontaminované půdy (Klement *et al.* 2020). Za hydroponických podmínek byl hrách setý využit ke studiu metabolitů vznikajících po příjmu léčiva telmisartanu (Lang *et al.* 2021).

U řeřichy a rokety byla maximální doba trvání hydroponických experimentů omezena na sedm dní. Po této době docházelo k postupnému odumírání rostlin a jejich zahnívání. Tento jev lze připsat skutečnosti, že řeřicha i roketa klíčily velmi rychle, obvykle druhý až třetí den po zasetí (Obrázek 9). Ke klíčení ředkvičky a hrachu docházelo až okolo čtvrtého dne od zasetí a hydroponické experimenty s těmito rostlinami bylo možné prodloužit až na dobu 14 dnů. Ve studii Mlynek *et al.* (2021) byla celková doba hydroponického pěstování řeřichy seté 15 dnů, avšak prvních sedm dnů zahrnovalo klíčení semen v kohoutkové vodě. K expozici léčivy docházelo až od osmého dne.

Maximální koncentrace léčiv, kterým bylo možné všechny druhy rostlin vystavit, odpovídaly 7,50 mg/l. Při vyšších koncentracích nedocházelo k vyklíčení rostlin. Nejvyšší zkoušená koncentrace byla u obou cílových léčiv 10 mg/l.

a) **b)**



Obrázek 9 *Semena řeřichy seté v den setí (a) a vyklíčená semena řeřichy seté po 72 hodinách hydroponického pěstování (b)*

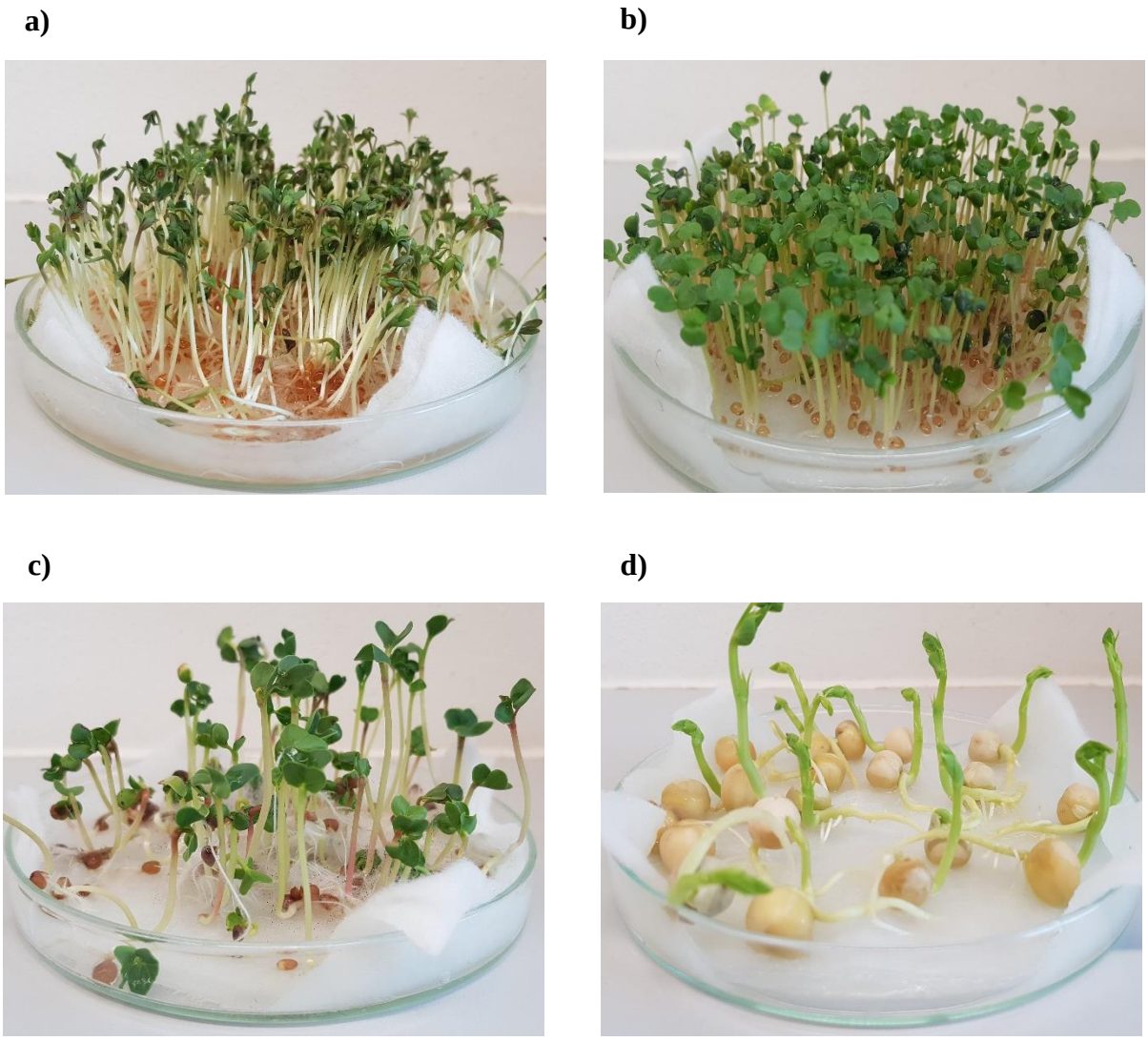
2.2.2.2 Vzhled rostlin po expozici efavirenzem a kyselinou flufenamovou

Morfologie rostlin, které byly vystaveny účinkům polyfluorovaných léčiv v pěstebním médiu, se výrazně nelišila od kontrolních rostlin zalévaných pouze destilovanou vodou, a to ani při nejvyšší koncentraci léčiv v pěstebním médiu (7,50 mg/l). Nebyly zjištěny žádné vyznané rozdíly v hmotnosti rostlinného materiálu narostlého za přítomnosti léčiv v pěstebním médiu a v kontrolních vzorcích. Tato skutečnost naznačuje nulovou míru fytotoxicity cílových léčiv při koncentračních úrovních, ve kterých byly přítomny v pěstebním médiu.

Pouze u řeřichy byl v případě expozice kyselinou flufenamovou pozorován viditelný odklon od vzhledu kontrolních rostlin, a to v podobě úzkého až nitkovitého stonku, jehož šířka nepřesahovala 0,5 mm. Tento jev měl za následek značnou nestabilitu rostlin, která vedla až k jejich ohnutí. Tato morfologická odchylka od kontrolních rostlin nebyla u řeřichy zaznamenána při zálivce pěstebním médiem s obsahem efavirenzu. V tomto případě byl stonek pevný s šířkou okolo 1 mm, což odpovídalo kontrolním rostlinám.

Nejnápadnějším rozdílem mezi rostlinami, které byly vystaveny působení efavirenzu a kyseliny flufenamové, byla jejich výška. Rostliny zalévané pěstebním médiem s obsahem kyseliny flufenamové byly vyšší než rostliny zalévané pěstebním médiem s obsahem efavirenzu o totožné koncentraci. Jedinou výjimku představoval hrách, u kterého tento výškový rozdíl

nebyl pozorován. Vzhled modelových rostlin po 7denní expozici kyselinou flufenamovou o koncentraci 3,75 mg/l v pěstebním médiu je zobrazen na Obrázku 10.



Obrázek 10 *Vzhled rostlin po 7denní expozici kyselinou flufenamovou o koncentraci 3,75 mg/l v pěstebním médiu: řeřicha setá (a), roketa setá (b), ředkvička setá (c) a hrách setý (d)*

2.2.2.3 Optimalizace extrakce efavirenzu a kyseliny flufenamové z rostlinných matric

Byla provedena optimalizace extrakčního postupu pro extrakci efavirenzu a kyseliny flufenamové z rostlin. V rámci optimalizace byl testován druh extrakčního rozpouštědla, doba extrakce v ultrazvukové lázni a celková časová a manuální náročnost extrakce, včetně procesu sušení. Pro extrakci cílových léčiv byly vyzkoušeny tři extrakční směsi, zahrnující metanol s HCl (10:1, v/v), acetonitril s HCl (125:1, v/v) a metanol s 1M NaOH (10:1, v/v). Zkoušená doba trvání extrakce v ultrazvukové lázni byla 15, 30, 45 a 60 minut. Nejlepší extrakční

výtěžnosti pro obě cílová léčiva bylo dosaženo při použití směsi metanolu s 1M NaOH (10:1, v/v), a to při extrakci v ultrazvukové lázni po dobu 60 minut. U získaného extraktu byly zkoušeny různé formy zpracování před HPLC/MS analýzou, a to odpaření pod proudem dusíku a SPE extrakce.

Extrakt byl odpařen pod proudem dusíku a následně rozpuštěn v 1 ml směsi o složení odpovídající mobilní fázi na začátku gradientu (20% metanol). Dále byl pro rozpuštění odpařeného extraktu zkoušen 90% metanol a 20% acetonitril. Získané výsledky ukázaly, že odpaření a následné rozpuštění vysušeného extrakčního zbytku snížilo výtěžnost v porovnání s analýzou neupraveného extraktu získaného přímo po extrakci 20 ml směsi metanolu s 1M NaOH (10:1, v/v). Kroky odpařování a rekonstituce proto nebyly do navrženého extrakčním postupu zařazeny.

Dále byla zkoušena SPE extrakce na kolonkách s různou stacionární fází. Byly zkoušeny kolonky Strata C18 (Phenomenex) a Oasis HBL (Waters). Získaný extrakt o objemu 20 ml byl zředěn deionizovanou vodou na celkový objem 400 ml a byla provedena SPE extrakce. Eluce byla provedena metanolem o objemu 3 ml. Získaný eluát byl odpařen pod proudem dusíku a následně rozpuštěn v 1 ml 90% metanolu. Použití kolonky Oasis HBL je široce rozšířeno jak pro zakoncentrování léčiv nebo jejich metabolitů v rostlinných extraktech, tak pro přečištění rostlinných extraktů před další analýzou (Hu *et al.* 2010; Di Baccio *et al.* 2017; He *et al.* 2017; González García *et al.* 2018). V této práci však ani jednou ze zkoušených SPE kolonek nebyly získány uspokojivé výsledky. SPE krok nejenže prodlužoval dobu zpracování vzorku, ale také přispíval ke ztrátě cílových léčiv. SPE krok proto nebyl do navrženého extrakčního postupu zahrnut.

2.2.2.4 Příjem efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami

Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách na konci 7denního období pěstování jsou uvedeny v Tabulce 22. V tabulce jsou uvedeny průměry ze všech analyzovaných rostlinných extraktů (n=6).

Obě cílová léčiva byla detekována ve všech druzích rostlin, a to při všech třech koncentračních úrovních v pěstebním médiu. Žádné z léčiv nebylo detekováno v kontrolních vzorcích rostlin. Dle očekávání byla nejvyšší koncentrace obou léčiv v rostlinách zjištěna při jejich nejvyšší koncentraci v pěstebním médiu (7,50 mg/l). Z hlediska použitých druhů rostlin byla nejvyšší schopnost příjmu obou polyfluorovaných léčiv zaznamenána u ředkvičky. Naopak vůbec nejnižší příjem obou léčiv vykazovala roketa.

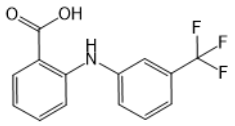
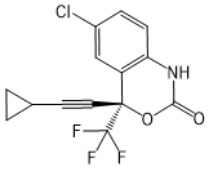
Tabulka 22 *Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny)*

Léčivo	Koncentrace léčiva v pěstebním médiu	Modelová rostlina			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Kyselina flufenamová	7,50 mg/l	2,33 ± 0,17	0,85 ± 0,08	6,80 ± 0,24	1,80 ± 0,17
	3,75 mg/l	0,89 ± 0,20	0,69 ± 0,19	2,09 ± 0,15	1,59 ± 0,15
	1,00 mg/l	0,37 ± 0,06	0,45 ± 0,18	1,41 ± 0,22	0,77 ± 0,10
Léčivo	**Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Efavirenz	7,50 mg/l	7,46 ± 0,82	2,20 ± 0,26	23,60 ± 5,11	9,92 ± 1,13
	3,75 mg/l	6,15 ± 0,99	1,94 ± 0,28	17,46 ± 1,43	4,68 ± 0,62
	1,00 mg/l	0,75 ± 0,10	1,04 ± 0,30	4,68 ± 0,51	2,17 ± 0,20

[a] průměrná koncentrace (n=6)

Vyšší příjem rostlinami byl zjištěn pro efavirenz. Při totožných koncentračních úrovních obou cílových léčiv v pěstebním médiu byly v případě efavirenzu v rostlinách stanoveny až o řád vyšší koncentrace v µg/g v porovnání s kyselinou flufenamovou. Tento jev lze přičíst skutečnosti, že příjem chemických látek rostlinami do značné míry závisí na jejich lipofilitě, vyjádřené hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol/voda (Log K_{ow}) a ionizačním stavu, který je silně ovlivněn hodnotou disociační konstanty (pKa) a pH prostředí (Wu *et al.* 2013; Marsoni *et al* 2014; Barreales-Suárez *et al.* 2018). Hodnoty Log K_{ow} a pKa pro kyselinu flefenamovou a efavirenz jsou uvedeny v Tabulce 23. Zatímco hodnota Log K_{ow} je u obou cílových léčiv srovnatelná, hodnota pKa kyseliny flufenamové (3,88) je výrazně nižší než hodnota pKa efaverinzu (12,52). Důsledkem nízké hodnoty pKa je omezený příjem daného léčiva kořenovým systémem (Marsoni *et al* 2014). Tato skutečnost může vysvětlovat, proč byly v této práci v rostlinách stanoveny nižší koncentrace kyseliny flufenamové v porovnání s efavirenzem.

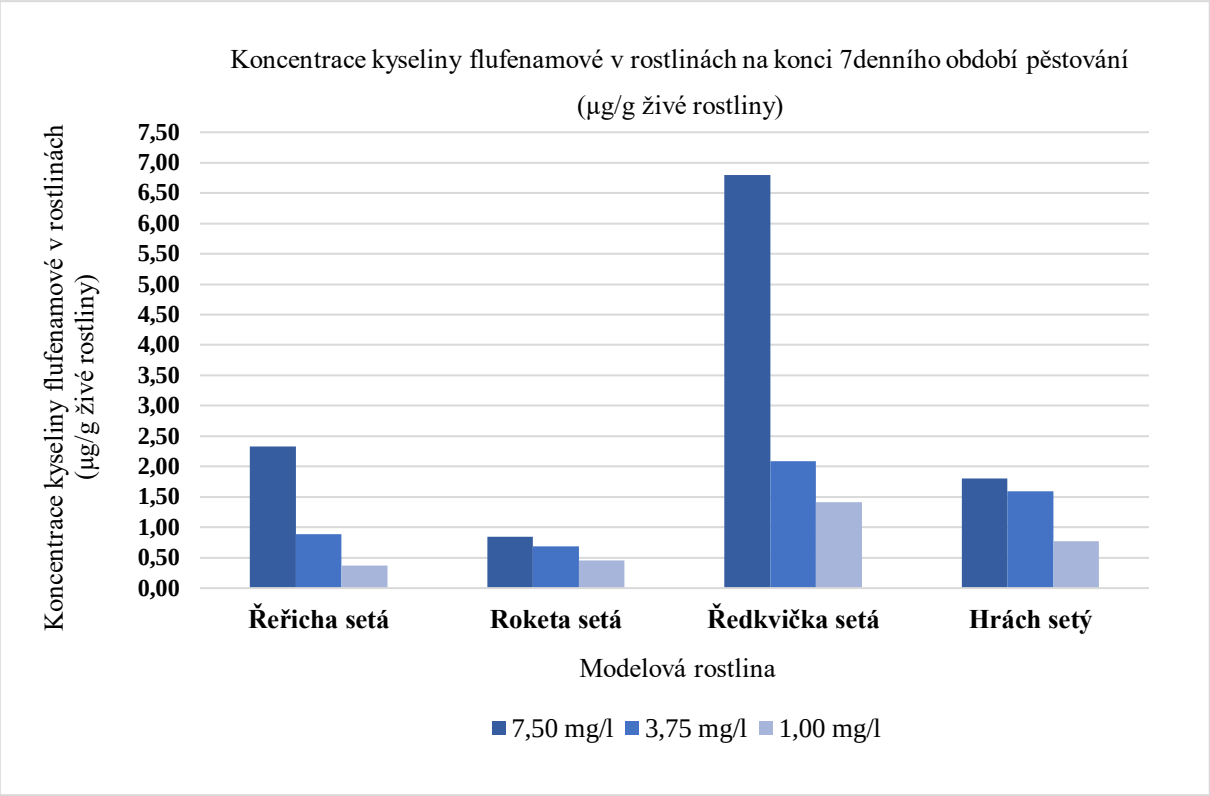
Tabulka 23 *Molekulární struktura a vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny flufenamové a efavirenzu*

Léčivo	Struktura	Molekulární hmotnost (g/mol)	Log K_{ow}[a]	pKa[a]
Kyselina flufenamová **($C_{14}H_{10}F_3NO_2$)**		281,23	5,25	3,88
Efavirenz **($C_{14}H_9ClF_3NO_2$)**		315,67	4,46	12,52

[a] zjištěno z DrugBank https://go.drugbank.com/

Při koncentraci 7,50 mg/l kyseliny flufenamové v pěstebním médiu bylo v ředkvičce detekováno 6,80 µg/g tohoto léčiva. V roketě byla zjištěna koncentrace 0,85 µg/g. V řeřiše a hrachu bylo při nejvyšší koncentraci kyseliny flufenamové v pěstebním médiu stanoveno 2,33 µg/g, respektive 1,80 µg/g tohoto léčiva.

V řeřiše a ředkvičce byl shodně pozorován výrazný pokles detekovaného množství kyseliny flufenamové při snížení koncentrace tohoto léčiva v pěstebním médiu na 3,75 mg/l a 1,00 mg/l. V roketě a hrachu byl naproti tomu rozdíl mezi detekovaným množstvím kyseliny flufenamové při jednotlivých koncentračních úrovních tohoto léčiva v pěstebním médiu výrazně menší. Tento jev byl patrný zejména pro roketu, ve které se koncentrace kyseliny flufenamové při všech koncentračních úrovních tohoto léčiva v pěstebním médiu pohybovala v rozmezí od 0,45 do 0,85 µg/g. V hrachu bylo detekováno srovnatelné množství kyseliny flufenamové (1,59 µg/g a 1,80 µg/g) při koncentracích 3,75 mg/l a 7,50 mg/l tohoto léčiva v pěstebním médiu. Ke snížení detekované množství v hrachu (0,77 µg/g) došlo až při nejnižší koncentraci kyseliny flufenamové v pěstebním médiu (Graf 1).

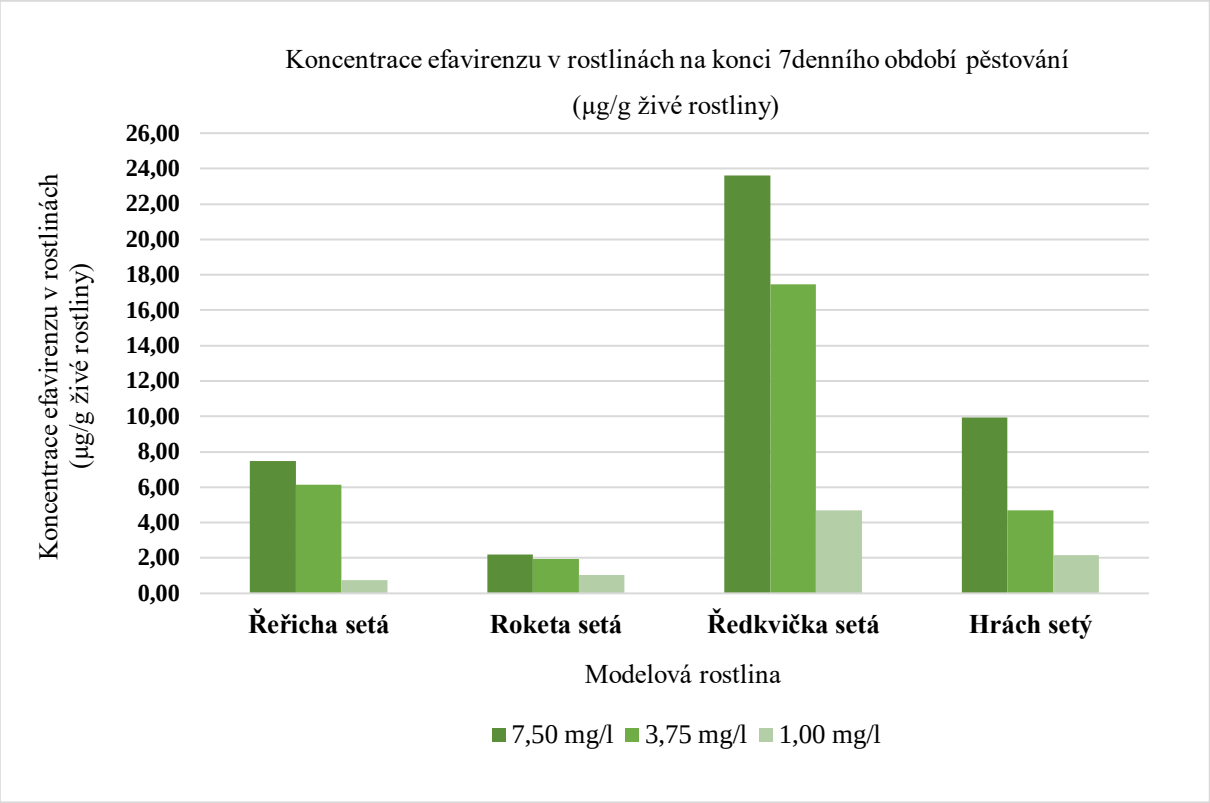


Graf 1 *Koncentrace kyseliny flufenamové v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny)*

Při koncentraci 7,50 mg/l efavirenzu v pěstebním médiu bylo v ředkvičce detekováno 23,60 µg/g tohoto léčiva. V roketě byla zjištěna koncentrace 2,20 µg/g. V hrachu bylo při nejvyšší koncentraci efavirenzu v pěstebním médiu detekováno 9,92 µg/g tohoto léčiva, v řeřiše 7,46 µg/g.

V řeřiše a ředkvičce byl pokles detekovaného množství efavirenzu pozorován až při nejnižší koncentraci tohoto léčiva v pěstebním médiu (1,00 mg/l). Při koncentracích 7,50 mg/l a 3,75 mg/l efavirenzu v pěstebním médiu bylo detekované množství léčiva v řeřiše a ředkvičce srovnatelné. U rokety byl opět patrný pouze malý rozdíl mezi koncentracemi efavirenzu, které byly detekovány při různých koncentračních úrovních tohoto léčiva v pěstebním médiu. V hrachu trend poklesu detekovaného množství efaverinzu odpovídal postupnému poklesu koncentrace tohoto léčiva v pěstebním médiu (Graf 2). Ve studii Mlunguza *et al.* (2020) byl studován příjem efavirenzu a dalších dvou antiretrovirových léčiv vodním hyacintem z přirozeně kontaminovaných vodních útvarů. Efavirenz byl ze všech cílových léčiv zjištěn v nejvyšší koncentraci ve všech částech rostlin. Maximální koncentrace byla zaznamenána v kořenové části, a to 29,6 µg/kg. Ve studii Akenga *et al.* (2021) byl studován příjem antivirotik a antiretrovirotik sazenicemi salátu za hydroponických podmínek. U efavirenzu byla zaznamenána vůbec nejvyšší akumulace v rostlinných tkáních. V salátu, který byl po dobu

21 dnů vystaven působení pěstebního média s obsahem 100 µg/l efavirenzu, bylo detekováno 3,46 µg/g tohoto léčiva.



Graf 2 *Koncentrace efavirenzu v rostlinách na konci 7denního období pěstování (µg/g živé rostliny)*

2.2.2.5 Příjem efavirenzu a kyseliny flufenamové rostlinami v průběhu 7denního období pěstování

Zjištěné koncentrace léčiv v rostlinách v závislosti na době expozice jsou uvedeny v Tabulkách 24, 25 a 26. V tabulkách jsou uvedeny průměry ze všech analyzovaných rostlinných extraktů (n=3). Nad každým sloupcem je vyobrazen trend příjmu léčiva v závislosti na době expozice ve formě minigrafu. Z minigrafů je na první pohled zřejmé, že absorpční trend nebyl závislý na druhu léčiva, ale na druhu rostliny. Současně bylo zjištěno, že absorpční trend nezávisel na koncentraci léčiv v pěstebním médiu.

U řeřichy a rokety vykazoval příjem kyseliny flufenamové a efaverinzu podobný trend. Ten sestával z velmi rychlého nárůstu koncentrace léčiv v rostlinách, kdy bylo maximálních detekovaných koncentrací dosaženo ve třetím nebo čtvrtém dnu pěstování. Poté následovala fáze charakterizovaná strmým poklesem koncentrace léčiv v rostlinách s časem expozice. Velmi intenzivní příjem léčiv z pěstebního média během prvních tří dnů období pěstování odpovídal u řeřichy i rokety fázi klíčení. Následný prudký pokles koncentrace léčiv v rostlinách

mohl být způsoben poškozením rostlin v průběhu klíčení. Následkem čehož nadzemní části rostliny přestaly absorbovat léčiva a pozorovaný pokles koncentrace byl důsledkem degradace léčiv v rostlině (Barreales-Suárez *et al.* 2018). Kromě toho lze snížení koncentrace mateřských léčiv v rostlinách přisoudit tvorbě transformačních produktů (Rhodes *et al.* 2021). Výše popsaný absorpční trend pro řeřichu a roketu nebyl zaznamenán pouze u řeřichy vystavené účinkům nejvyšších koncentrací kyseliny flufenamové a efavirenzu v pěstebním médiu. V případě přijmu kyseliny flufenamové byla v řeřiše nejvyšší koncentrace zjištěna až šestý den expozice. V případě efavirenzu byl sice zaznamenán velmi intenzivní příjem během prvních čtyř dnů období pěstování, avšak k poklesu koncentrace léčiva v řeřiše došlo pouze následující den. Další dny expozice naopak docházelo k opětovnému nárůstu koncentrace efavirenzu v rostlině.

U ředkvičky a hrachu byl příjem kyseliny flufenamové i efaverinzu charakterizován kontinuálním nárůstem koncentrace léčiv v rostlinách s časem expozice. Nejvyšší koncentrace léčiv byla v rostlinách zjištěna v sedmém, tedy posledním dnu pěstování. Odlišný trend příjmu léčiv v porovnání s řeřichou a roketou je možné přisoudit pozdějšímu vyklíčení hrachu a ředkvičky, ke kterému docházelo až během čtvrtého dne období pěstování. Skutečnost, že ke zvyšování koncentrace léčiv v ředkvičce a hrachu docházelo až do konce expozice naznačuje, že po příjmu léčiv nedocházelo k jejich transformaci. U ředkvičky a hrachu by proto bylo vhodné prodloužit dobu expozice a zjistit, zda dochází k dalšímu zvyšování koncentrace léčiv v rostlinách s časem expozice, nebo naopak k jejímu poklesu, což by naznačovalo tvorbu transformačních produktů. Výše popsanému absorpčnímu trendu pro hrách a ředkvičku neodpovídal pouze příjem kyseliny flufenamové o koncentraci 1,00 mg/l v pěstebním médiu ředkvičkou. V tomto případě byla nejvyšší koncentrace léčiva v rostlině zjištěna ve třetím dnu období pěstování a následně byl zaznamenán její postupný pokles. To odpovídalo absorpčním trendům popsaným pro řeřichu a roketu.

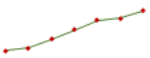
Rozdílné koncentrace obou léčiv v rostlinách na konci 7denního období pěstování, zjištěné při jednorázovém odběru vzorků a každodenním odběru vzorků, lze dát do souvislosti s výše popsaným omezením hydroponických experimentů. Konkrétně využití přirozeného světla k pěstování rostlin. Zatímco experimenty s jednorázovým odběrem vzorků na konci období pěstování byly prováděny v jarních měsících, závislost příjmu léčiv rostlinami na čase expozice byla hodnocena v podzimních měsících.

Tabulka 24 *Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 1,00 mg/l)*

Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Kyselina flufenamová **1,00 mg/l**					
	1	0,39 ± 0,05	0,28 ± 0,09	0,40 ± 0,10	0,30 ± 0,06
	2	0,66 ± 0,11	0,55 ± 0,16	0,63 ± 0,13	0,36 ± 0,09
	3	1,29 ± 0,28	1,10 ± 0,30	2,41 ± 0,55	0,32 ± 0,11
	4	1,13 ± 0,12	0,67 ± 0,40	2,00 ± 0,18	0,29 ± 0,04
	5	0,74 ± 0,22	0,52 ± 0,12	1,49 ± 0,23	0,30 ± 0,06
	6	0,44 ± 0,12	0,46 ± 0,03	1,29 ± 0,43	0,50 ± 0,12
	7	0,38 ± 0,11	0,20 ± 0,12	1,30 ± 0,11	0,88 ± 0,22
Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Efavirenz **1,00 mg/l**					
	1	0,33 ± 0,04	0,39 ± 0,07	0,64 ± 0,03	0,28 ± 0,05
	2	0,91 ± 0,06	0,74 ± 0,08	1,55 ± 0,17	0,31 ± 0,05
	3	1,29 ± 0,11	1,61 ± 0,12	2,76 ± 0,20	0,34 ± 0,01
	4	1,14 ± 0,08	1,36 ± 0,06	4,29 ± 0,44	0,70 ± 0,09
	5	0,98 ± 0,16	1,19 ± 0,04	3,90 ± 0,27	1,19 ± 0,12
	6	0,74 ± 0,06	0,96 ± 0,16	3,02 ± 0,39	1,72 ± 0,04
	7	0,53 ± 0,07	0,41 ± 0,08	3,95 ± 0,52	2,05 ± 0,04

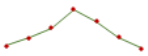
[a] průměrná koncentrace (n=3)

Tabulka 25 *Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 3,75 mg/l)*

Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Kyselina flufenamová **3,75 mg/l**					
	1	0,27 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,91 ± 0,15	0,57 ± 0,05
	2	0,53 ± 0,09	1,24 ± 0,16	1,24 ± 0,10	0,72 ± 0,09
	3	1,55 ± 0,33	1,94 ± 0,24	4,43 ± 0,41	1,17 ± 0,13
	4	1,30 ± 0,20	2,30 ± 0,30	7,05 ± 0,98	1,29 ± 0,14
	5	0,99 ± 0,16	2,05 ± 0,20	7,50 ± 0,60	1,49 ± 0,20
	6	0,85 ± 0,05	0,35 ± 0,08	8,82 ± 1,01	1,60 ± 0,23
	7	0,96 ± 0,11	0,44 ± 0,10	11,38 ± 1,53	1,95 ± 0,19
Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Efavirenz **3,75 mg/l**					
	1	1,22 ± 0,01	1,15 ± 0,18	1,46 ± 0,34	1,82 ± 0,19
	2	3,11 ± 0,21	3,12 ± 0,43	3,68 ± 0,11	1,97 ± 0,13
	3	5,44 ± 0,15	3,64 ± 0,39	5,96 ± 0,82	2,48 ± 0,35
	4	4,65 ± 0,15	3,74 ± 0,57	8,30 ± 0,89	3,01 ± 0,29
	5	0,74 ± 0,07	2,93 ± 0,29	9,35 ± 0,55	3,56 ± 0,47
	6	1,08 ± 0,12	2,43 ± 0,11	12,90 ± 1,48	3,68 ± 0,41
	7	3,11 ± 0,39	2,04 ± 0,37	16,03 ± 1,73	4,14 ± 0,21

[a] průměrná koncentrace (n=3)

Tabulka 26 *Koncentrace kyseliny flufenamové a efavirenzu v rostlinách (µg/g živé rostliny) v průběhu 7denního období pěstování (koncentrace léčiv v pěstebním médiu 7,50 mg/l)*

Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Kyselina flufenamová **7,50 mg/l**					
	1	0,24 ± 0,07	0,87 ± 0,09	1,69 ± 0,15	0,99 ± 0,11
	2	0,38 ± 0,04	1,32 ± 0,12	2,91 ± 0,31	1,34 ± 0,18
	3	0,95 ± 0,09	1,92 ± 0,20	7,71 ± 0,89	1,44 ± 0,17
	4	2,16 ± 0,20	3,00 ± 0,39	13,71 ± 1,51	2,45 ± 0,19
	5	2,83 ± 0,21	2,30 ± 0,24	14,59 ± 1,99	3,50 ± 0,31
	6	3,04 ± 0,33	1,38 ± 0,17	16,08 ± 1,64	3,90 ± 0,32
	7	2,66 ± 0,31	0,71 ± 0,08	18,96 ± 2,01	4,37 ± 0,53
Léčivo **Koncentrace léčiva v pěstebním médiu**	**Den pěstování**	**Modelová rostlina**			
		Řeřicha setá	**Roketa setá**	**Ředkvička setá**	**Hrách setý**
		Koncentrace léčiva v µg/g živé rostliny[a]			
Efavirenz **7,50 mg/l**					
	1	0,50 ± 0,01	2,32 ± 0,32	3,20 ± 0,25	1,53 ± 0,38
	2	3,38 ± 0,66	5,99 ± 1,40	7,53 ± 0,40	2,20 ± 0,77
	3	5,49 ± 0,99	6,20 ± 1,36	9,10 ± 1,36	2,50 ± 0,59
	4	5,98 ± 1,13	5,69 ± 0,43	11,52 ± 0,49	2,60 ± 0,25
	5	4,25 ± 0,75	4,26 ± 1,25	18,14 ± 2,65	3,14 ± 0,80
	6	6,48 ± 1,01	3,97 ± 1,46	23,52 ± 3,12	4,05 ± 0,42
	7	7,50 ± 1,60	3,84 ± 1,07	30,00 ± 2,99	6,50 ± 0,57

[a] průměrná koncentrace (n=3)

2.3 Hodnocení akutní toxicity v průběhu fotokatalytické degradace chloracetanilidových herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru

Cílem třetí části disertační práce bylo zhodnotit změny akutní toxicity reakčních roztoků v průběhu heterogenní fotokatalýzy chloracetanilidových herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru pomocí zkoušky inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri.* Hodnocení toxicity přestavovalo jeden z přístupů, jejichž prostřednictvím byla posuzována vhodnost různých experimentálních uspořádání heterogenní fotokatalýzy (TiO_2/UV-A) pro odstranění vybraných chloracetanilidových herbicidů z vodných roztoků. Zkouškou inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri* bylo možné v průběhu procesu heterogenní fotokatalýzy zaznamenat změny v akutní toxicitě reakčního roztoku, které odrážely vznik toxických fotokatalytických degradačních produktů. Ty by při reálné aplikaci konkrétního experimentálního nastavení procesu, jako pokročilé technologie pro čištění kontaminovaných odpadních vod, představovaly potenciální ekologické riziko pro vodní recipient.

2.3.1 Vzorky pro hodnocení akutní toxicity

Vzorky, u nichž byla hodnocena akutní toxicita, pocházely z procesu heterogenní fotokatalýzy vodných roztoků alachloru, metolachloru a acetochloru. Fotokatalytická degradace byla provedena ve vsádkovém laboratorním systému, který byl tvořen nerezovou reakční nádobou (reaktorem) a nad ní umístěnou UV-A lampou. Byly použity dvě různé reakční nádoby lišící se v rozměrech, objemu a velikosti ozařované plochy. Vodné prostředí bylo tvořeno deionizovanou vodou s vodivostí menší než 0,1 S/cm. Počáteční koncentrace příslušného herbicidu v reakčním roztoku byla 10 mg/l, přičemž objem reakčního roztoku na začátku experimentu byl 1000 ml. Reakční roztok byl míchán magnetickým míchadlem frekvencí 500 otáček za minutu a zahříván na teplotu 25 °C. Jako fotokatalyzátory byly použity dva komerčně dostupné oxidy titaničité (TiO_2), a to Aeroxide® P25 a Pretiox® AV-01 (dále jen P25 a AV-01). Koncentrace fotokatalyzátoru v reakčním roztoku byla 1 g/l.

Na začátku experimentu byl roztok příslušného herbicidu homogenizován mícháním magnetických míchadlem po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl odebrán počáteční vzorek, který představoval pouze roztok herbicidu o koncentraci 10 mg/l bez fotokatalyzátoru (označen jako 0/0). Následně byl do reakčního roztoku přidán fotokatalyzátor, který byl v roztoku dispergován mícháním magnetických míchadlem po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby byl odebrán další vzorek, který představoval roztok herbicidu o koncentraci 10 mg/l s fotokatalyzátorem o koncentraci 1 mg/l (označen jako 0/TiO_2). Následně byl zapnut světelný

UV-A zdroj, čímž byla zahájená fotokatalytická degradace. V průběhu fotokatalytické degradace byly v pravidelných 15minutových intervalech odebírány vzorky reakční směsi o objemu 20 ml. První vzorek byl odebrán v 15. minutě experimentu. Dále byly vzorky odebírány ve 30., 45., 60., 75., 90., 105., 120. a 150. minutě. Poslední vzorek byl odebrán ve 180. minutě, což odpovídalo době ukončení experimentu. Z odebraných vzorků byl centrifugací odstraněn fotokatalyzátor a odstředěné vzorky byly do provedení zkoušky akutní toxicity uloženy ve tmě při 4 °C. Pro hodnocení toxicity byly odebrané vzorky 1000x zředěny sterilní deionizovanou vodou.

Do hodnocení toxicity byly zahrnuty všechny odebrané vzorky, včetně počátečního roztoku samotných herbicidů a roztoku herbicidů s přídavkem fotokatalyzátoru. Účelem hodnocení toxicity u těchto vzorků bylo posouzení případného toxického účinku samotných fotokatalyzátorů vůči zelené řase *Chlorella kessleri.*

2.3.2 Experimentální část

2.3.2.1 Zkušební organismus a růstové médium

Zkušebním organismem byla sladkovodní jednobuněčná zelená řasa *Chlorella (Ch.) kessleri* Fott & Nováková (kmen LARG/1), která byla získána ze sbírky kultur autotrofních organismů Botanického ústavu Akademie věd České republiky (CCALA). Jako růstové médium pro zkoušku inhibice růstu zelené řasy *Ch. kessleri* bylo použito OECD médium připravené dle metodiky OECD 201. K přípravě růstového média byla použita deionizovaná voda s vodivostí menší než 0,1 S/cm, která byla připravena pomocí čisticího zařízení Milli-Q® Direct 8 (Merck Millipore). Deionizovaná voda byla sterilizována v autoklávu (V-40, Systec) při 120 ± 2 °C po dobu 15 minut. Jednotlivé zásobní roztoky pro přípravu růstového média byly sterilizovány dle pokynů v OECD 201. pH růstového média bylo v případě potřeby upraveno na hodnotu 8,1 ± 0,2. Složení OECD média včetně koncentrací všech složek je uvedeno v Tabulce 27. Všechny chemikálie použité při přípravě OECD média byly analytické čistoty p.a.

Zásobní kultury řasy *Ch. kessleri* o objemu 250 ml byly uchovávány v 300ml Erlenmeyerových baňkách uzavřených zátkou z buničiny při 26 ± 2 °C pod bílým světlem při světelném režimu 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Světelná intenzita na povrchu řasových kultur odpovídala 6000 lx, čehož bylo dosaženo za pomocí čtyř zářivek s univerzálním bílým světlem s teplotou chromatičnosti 4300 K umístěných přibližně ve vzdálenosti 0,5 m od povrchu řasové kultury. Aby byla zásobní kultura udržena v exponenciální fázi růstu, bylo každý týden 10 ml narostlé zásobní kultury přeneseno do 250 ml čerstvého růstového média.

Tabulka 27 *Složení růstového média OECD dle metodiky OECD 201*

Zásobní roztok	Chemikálie	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku	Konečná hmotnostní koncentrace v růstovém médiu
I	NH_4Cl	1,50 g/l	15 mg/l
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,20 g/l	12 mg/l
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,80 g/l	18 mg/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,50 g/l	15 mg/l
	KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
II	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l	64 µg/l
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l	100 µg/l
III	H_3BO_3	185 mg/l	185 µg/l
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l	415 µg/l
	$ZnCl_2$	3 mg/l	3 µg/l
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l	1,5 µg/l
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l	0,01 µg/l
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l	7 µg/l
IV	$NaHCO_3$	50 g/l	50 mg/l

2.3.2.2 Zkouška inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri*

Provedení zkoušky inhibice růstu vycházelo z metodiky popsané v OECD 201, ale metoda byla upravena s ohledem na použití zelené řasy *Ch. kessleri* jako zkušebního organismu. Všechny pomůcky používané pro zkoušku byly sterilní a veškeré operace byly prováděny za aseptických podmínek. Účelem bylo udržení axenické kultury *Ch. kessleri* bez kontaminace bakteriemi nebo jinými řasami.

Předkultura o objemu 250 ml s počáteční hustotou buněk $5 \cdot 10^4$ buněk/ml byla připravena ze zásobní kultury a inkubována v 300ml Erlenmeyerových baňkách uzavřených zátkou z buničiny. Předkultivace byla započata 72 hodin před začátkem zkoušky. Podmínky inkubace předkultury odpovídaly vlastní zkoušce. Inkubace probíhala při 28 ± 2 °C po dobu 72 ± 2 hodin za míchání na orbitální třepačce (Rotamax 120, Heidolph) o frekvenci kmitů 120 za minutu

v kultivačním boxu pod bílým světlem ve světelném režimu 18 hodin světlo a 6 hodin tma. Světelná intenzita na povrchu řasových kultur odpovídala 9000 lx, čehož bylo dosaženo za pomocí čtyř zářivek s univerzálním bílým světlem s teplotou chromatičnosti 4300 K umístěných přibližně ve vzdálenosti 0,3 m od povrchu řasové kultury.

Exponenciálně rostoucí předkultivace byla použita jako inokulum pro vlastní zkoušku. Bezprostředně před použitím byla v předkultuře stanovena hustota buněk, a byl spočítán potřebný objem inokula, tak aby hustota buněk na začátku zkoušky byla $5 \cdot 10^4$ buněk/ml. Zkoušené sady o objemu 30 ml byly připraveny smícháním zkoušeného vzorku nebo zásobního roztoku referenční látky, růstového média a inokula ve zkušebních nádobách. Jako zkušební nádoby byly použity 50ml Erlenmeyerovy baňky, jejichž hrdlo bylo zakryto tenkou vrstvou buničiny, aby se zabránilo vzdušné kontaminaci a odpařování růstového média. Kontrolní sady o objemu 30 ml byly připraveny smícháním inokula a růstového média. Doba trvání zkoušky byla 72 ± 2 hodin. Zkouška probíhala za inkubačních podmínek výše popsaných pro předkultivaci. Každá zkoušená sada byla připravena ve třech replikátech. Kontrolní sady byly připraveny v šesti replikátech.

Na konci zkoušky byla stanovena hustota buněk v každé zkoušené a kontrolní sadě na základě měření optické hustoty při 684 nm (OD_{684}) pomocí spektrofotometru (RD6000, Hach Lange). Pro spektrofotometrické vyhodnocení zkoušek toxicity byla stanovena korelace mezi počtem buněk v řasové kultuře a absorbancí. Hustota řasových kultur pro vytvoření korelační závislosti byla stanovena pomocí počítací komůrky Cyrus I.

Růstové rychlosti pro každý replikát zkoušené a kontrolní sady a inhibice růstové rychlosti v procentech pro každou zkoušenou sadu replikátů byly vypočteny dle metodiky OECD 201. Procentuální inhibice růstové rychlosti byly vyneseny do grafu proti době trvání heterogenní fotokatalýzy, aby bylo možné vyhodnotit změny akutní toxicity reakčního roztoku v průběhu fotokatalytické degradace.

Hodnoty EC_{50} pro zkoušenou referenční látku byly vypočteny v programu GraphPad Prism (verze pro Windows, GraphPad Software), ve kterém byl pro experimentální data regresivní analýzou sestrojen vhodný nelineární model.

2.3.3 Výsledková část a diskuse

2.3.3.1 Modifikace zkoušky inhibice růstu zelené řasy *Chlorella kessleri*

Podmínky zkoušky inhibice růstu sladkovodních řas definované metodikou OECD 201 jsou určeny výhradně pro metodikou přímo doporučené druhy řas, kterými jsou *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. Při použití druhu *Ch. kessleri* bylo proto nezbytné podmínky zkoušky upravit tak, aby byla splněna požadovaná kritéria platnosti. Především pak podmínka, že by se mělo množství biomasy v kontrolních sadách během 72hodinové zkoušky nejméně 16x zvýšit. Tento přírůstek hustoty buněk odpovídá minimální růstové rychlosti v kontrolních sadách 0,92 d^{-1} (OECD 201). Dále bylo nutné zajistit exponenciální růst řasové kultury po celou dobu trvání zkoušky.

Pro zajištění dostatečného přírůstku biomasy během 72 hodin bylo nezbytné použít řádově vyšší počáteční hustotu buněk, než je doporučováno metodikou OECD 201. Pro zvýšení růstové rychlosti bylo také potřebné zvýšit teplotu inkubace z doporučené rozmezí 21 až 24 °C až na hodnotu 28 °C. Dalším potřebným krokem bylo použití osvětlení o intenzitě, která na povrchu řasových kultur odpovídala 9000 lx. Ačkoliv tyto podmínky vedly při kontinuálním osvětlení k růstové rychlosti přesahující 1,4 d^{-1}, současně způsobily rychlé vyčerpání řasových kultur. To se projevilo přechodem z exponenciální do stacionární fáze růstu už po 48 hodinách trvání zkoušky. Udržení kultur v exponenciální fázi růstu po celou dobu trvání zkoušky bylo dosaženo změnou světelného režimu. Ten byl z kontinuálního osvětlení změněn na režim 18 hodin světla a 6 hodin tmy. I při tomto světelném režimu byla zachována světelná intenzita odpovídající 9000 lx na povrchu řasových kultur, neboť bylo zjištěno, že druh *Ch. kessleri* nedosahuje požadované růstové rychlosti při nižších intenzitách světla (6000–70000 lx), a to ani v případě kontinuálního osvětlení. Současně bylo vyloučeno, že při světelné intenzitě 9000 lx dochází k poškození řasových kultur *Ch. kessleri*. Přestože takto nastavený světelný režim vedl k mírnému snížení růstové rychlosti, průměrné růstové rychlosti v kontrolních sadách se stále pohybovaly nad hodnotou 0,92 d^{-1}, čímž bylo toto kritérium platnosti zkoušky splněno. Při nastaveném světelném režimu se růstová rychlost v kontrolních sadách pohybovala v rozmezí od 1,2 d^{-1} do 1,3 d^{-1}.Variační koeficient růstové rychlosti v kontrolních sadách v žádné ze zkoušek nepřekročil 2,5 %. Pro platnost zkoušky nesmí variační koeficient překročit 5 % (OECD 201).

2.3.3.2 Zkouška s referenční látkou dichromanem draselným

Jako prostředek kontroly zkušebního postupu byly v pravidelných intervalech prováděny zkoušky s referenční látkou dichromanem draselným ($K_2Cr_2O_7$) (Penta). Dichroman draselný je spolu s 3,5-dichlorofenolem doporučen jako referenční látka pro zelené řasy metodikou OECD 201. Z obecného hlediska poskytují zkoušky s referenčními látkami informace o případných změnách citlivosti zkušebního organismu v průběhu času. Změny citlivosti na cílovou toxickou látku mohou ukazovat na špatnou kondici řasových kultur. Proto je při zkouškách toxicity mimořádně důležité využívat pouze zdravé kultury zkušebních organismů, které zajistí spolehlivé určení úrovní toxicity zkoušeného vzorku pro vodní prostředí (Kikuchi *et al.* 2017).

Rozsah zkoušených koncentrací dichromanu draselného při zkoušce na zelené řase *Ch. kessleri* byl 0,25–4 mg/l s koeficientem 2. Zkouška s dichromanem draselným byla prováděna v pravidelných tříměsíčních intervalech. Celkově byly provedeny čtyři zkoušky, přičemž stanovené hodnoty $72hEC_{50}$ pro dichroman draselný na zelené řase *Ch. kessleri* byly 1,20 mg/l, 1,26 mg/l, 1,26 mg/l a 1,30 mg/l. Získané výsledky ukazují, že během ročního testovacího období nedošlo ke změně citlivosti zkušebního organismu. Ve studii Rojíčková-Padrtová and Maršálek (1999) byla zjištěná hodnota $72hEC_{50}$ pro dichroman draselný na zelené řase *Ch. kessleri* 0,575 mg/l. *Ch. kessleri* byla současně druhým nejcitlivějším druhem vůči dichromanu draselnému, a to ze sedmi druhů zelených a modrých řas, jejichž citlivost byla v této studii hodnocena.

2.3.3.3 Změny akutní toxicity reakčních roztoků v průběhu fotokatalytické degradace alachloru, metolachloru a acetochloru

Vzhledem k vysoké koncentraci chloracetanilidových herbicidů v reakčním roztoku na počátku fotokatalytických experimentů (10 mg/l), byly všechny odebrané vzorky bezprostředně před zkouškou toxicity 1000x zředěny sterilní deionizovanou vodou. Účelem bylo získat koncentrace přibližně odpovídající odhadovaným hodnotám EC_{50} pro alachlor, metolachlor a acetochlor.

U obou použitých fotokatalyzátorů nebyla zjištěna toxicita vůči zelené řase *Ch. kessleri*. Přidání fotokatalyzátoru P25 ani AV-01 do reakčního roztoku nevedlo ke zvýšení toxicity, neboť nebyla pozorována žádná výrazná změna v inhibici růstu zelené řasy *Ch. kessleri* pro vzorky 0/0 a $0/TiO_2$.

Přestože bylo pomocí různých experimentálních uspořádání heterogenní fotokatalýzy dosaženo odstranění 98,2 % metolachloru, 97,5 % alachloru a 93,1 % acetochloru z reakčního roztoku, nebyla tato účinnost dostatečná pro snížení toxicity. Nebyl tedy potvrzen počáteční předpoklad, že s klesající koncentrací cílových herbicidů v reakčním roztoku bude současně klesat i jeho toxicita. Během degradace metolachloru byl zaznamenán kontinuální růst toxicity reakčního roztoku s časem fotokatalýzy. Výsledkem bylo, že toxicita reakčního roztoku byla nejvyšší na konci procesu fotokatalýzy ve 180. minutě. Naproti tomu při degradaci acetochloru se toxicita reakčního roztoku s časem fotokatalýzy měnila jen minimálně a závislost mezi procentuální inhibicí růstové rychlosti zelené řasy *Ch. kessleri* a časem fotokatalýzy představovala prakticky rovnoběžku s osou x. Při degradaci alachloru bylo jako u jediného herbicidu zaznamenáno snížení toxicity reakčního roztoku v průběhu procesu heterogenní fotokatalýzy. K poklesu toxicity reakčního roztoku však docházelo pouze prvních 15 minut procesu, zatímco od 30. minuty toxicita reakčního roztoku postupně stoupala. Ve 180. minutě odpovídala toxicita konečného reakčního roztoku toxicitě počátečního roztoku alachloru. U všech herbicidů bylo tedy zjištěno, že akutní toxicita konečného reakčního roztoku, odebraného po 180 minutách procesu heterogenní fotokatalýzy, je buď srovnatelná nebo dokonce vyšší než akutní toxicita počátečního roztoku samotného herbicidu o koncentraci 10 µg/l. Vzhledem k tomu, že koncentrace všech herbicidů během průběhu heterogenní fotokatalýzy poklesla, je pravděpodobné, že za zvýšení akutní toxicity reakčních roztoků je zodpovědná tvorba fotokatalytických degradačních produktů, které ovlivnily růst řas ve větší míře než původní mateřské herbicidy. Avšak kyselina ethansulfonová ani kyselina oxanilová, které jsou považovány za hlavní metabolity vznikající při degradaci chloracetanilidových herbicidů, nebyly v reakčních roztocích detekovány.

Výsledky hodnocení akutní toxicity v průběhu fotokatalytické degradace alachloru, metolachloru a acetochloru se staly součástí publikace (viz Příloha 4):

Roulová, N., Hrdá, K., Kašpar, M., Peroutková, P., Josefová, D. & Palarčík, J. (2022). Removal of Chloroacetanilide Herbicides from Water Using Heterogeneous Photocatalysis with TiO_2/UV-A. *Catalysts*, 12(6), číslo článku 597.

Součástí publikace jsou závislosti procentuální inhibice růstové rychlosti zelené řasy *Ch. kessleri* na době trvání heterogenní fotokatalýzy pro alachlor, metolachlor a acetochlor, a to pro oba použité fotokatalyzátory a všechny experimentální uspořádání procesu.

3 ZÁVĚR

Společným jmenovatelem všech tří částí této disertační práce byla odpadní voda, na kterou však bylo nahlíženo z různých úhlů pohledu. Jednak jako na specifickou matrici pro mikrobiologický rozbor, ale také jako na zdroj znečišťujících látek pro životní prostředí, které mohou pronikat až do potravinového řetězce a jejichž odstranění z odpadních vod vyžaduje použití pokročilých technologií čistění.

Pro izolaci bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byly shodně využity kultivační metody lišící se primárně v použití pomnožovacího kroku před vyočkováním na pevná média. Nejvyšší míru detekce obou patogenních bakterií poskytly kultivační metody s pomnožovacím krokem. Pro dostatečnou účinnost těchto metod byla ale rozhodující správná volba tekutého pomnožovacího média. Předpoklad, že přímá izolace patogenních bakterií na pevných médiích není pro vzorky odpadních vod dostatečně účinná, byl potvrzen jenom částečně. Pro bakterii *Staphylococcus aureus* poskytla tato metoda vůbec nejnižší míru detekce a ve srovnání s kultivačními protokoly s pomnožovacím krokem fungovala špatně. Naproti tomu u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* byla účinnost metody s přímým roztěrem odpadní vody na pevné médium srovnatelná s nejúčinnějším kultivačním protokolem s pomnožovacím krokem. Získané výsledky naznačují, že přímou izolaci na pevných médiích lze úspěšně využít jen pro detekci těch bakteriálních druhů, které se vyznačují velmi vysokou odolností a schopností přežití v nepříznivých podmínkách. Pro izolaci bakterie *Yersinia enterocolitica* a bakterií rodu *Salmonella* byly použity pouze kultivační metody zahrnující pomnožovací krok. Zásadním faktorem pro izolaci bakterie *Yersinia enterocolitica* byla alkalizace pomnožených kultur. Při alkalickém ošetření bylo ale nezbytné upravit koncentraci roztoku KOH, aby se zabránilo inhibici samotné bakterie *Yersinia enterocolitica.* Pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* byl klíčový krok selektivního pomnožení, který měl zásadní vliv na účinnost pevných médií. Cílem první části disertační práce bylo stanovit optimální kultivační protokol pro izolaci vybraných patogenních bakterií z odpadních vod. V případě bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* byl tento cíl splněn. Pro izolaci bakterii *Staphylococcus aureus* z odpadních vod lze za optimální považovat kultivační protokol zahrnující pomnožení v BHI bujónu s 6,5 % NaCl s následným vyočkováním na B-P agar. Optimální kultivační protokol pro izolaci bakterie *Pseudomonas aeruginosa* zahrnuje pomnožení v TSB bujónu s následným vyočkováním na cetrimidový agar. V případě bakterie *Yersinia enterocolitica* a bakterií rodu *Salmonella* by ale nebylo vhodné doporučovat jen jediný kultivační protokol, neboť bylo zřejmé, že se účinnost jednotlivých kultivačních protokolů u jednotlivých typů odpadních vod

lišila. Přesto je ale možné uvést, že kultivační protokol pro izolaci bakterie *Yersinia enterocolitica* z odpadních vod by měl zahrnovat pomnožení v PSB bujónu s následnou alkalizací pomnožené kultury před vyočkováním na CIN agar. U bakterií rodu *Salmonella* nejlépe fungovalo selektivní pomnožení v MKTTn bujónu při 41,5 °C v kombinaci s XLD agarem. Tato kombinace by tedy mohla představovat nejlepší přístup k izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod. Je však na místě připomenout, že rozsah proměnných, které je možné hodnotit v rámci optimalizace kultivačního protokolu je značný, a v této práci zdaleka nebyly zhodnoceny všechny.

Polyfluorovaná léčiva efavirenz a kyselina flufenamové byla v nezměněné formě detekována ve všech použitých modelových druzích rostlin, čímž byl potvrzen jejich příjem za hydroponických podmínek. Zatímco pěstební média obsahovala cílová léčiva v mg/l (7,50, 3,75 a 1,00 mg/l), v rostlinách pak byla léčiva detekována v nezměněné formě na koncentrační úrovni µg/g. Nejvyšší schopnost příjmu obou polyfluorovaných léčiv byla zaznamenána u ředkvičky. Naopak vůbec nejnižší příjem obou cílových léčiv vykazovala roketa. Z hlediska polyfluorovaných léčiv byl rostlinami ve vyšší míře přijímám efavirenz. Při totožných koncentračních úrovních obou cílových léčiv v pěstebním médiu byly v případě efavirenzu v rostlinách stanoveny až o řád vyšší koncentrace v µg/g ve srovnání s kyselinou flufenamovou. Tato skutečnost může souviset s nízkou hodnotou pKa kyseliny flufenamové, která mohla být důvodem omezeného přijmu tohoto léčiva z pěstebního média kořenových systémem. Při sledování přijmu efavirenzu a kyseliny flufenamové v závislosti na době expozice bylo zjištěno, že absorpční trend není závislý na druhu léčiva, ale na druhu rostliny. U řeřichy a rokety byl zaznamenán podobný absorpční trend, kdy během tří až čtyř dnů došlo k nárůstu koncentrace léčiv až na maximum. Poté v rostlinách následoval postupný pokles koncentrace léčiv až do konce expozice. Naproti tomu ředkvička a hrách přijímaly léčiva z pěstebního média po celou dobu expozice. Rozdílné absorpční trendy mohly být spojeny s odlišnou dobou klíčení jednotlivých druhů rostlin a tím rozvojem kořenového systému. Všechny druhy modelových rostlin použité v této práci byly jedlé. Je pravděpodobné, že při zálivce vodou kontaminovanou efavirenzem a kyselinou flufenamovou bude docházet k příjmu těchto léčiv, čímž dojde k jejich vnesení do potravinového řetězce. Na druhou stranu je ale nutné zdůraznit, že v této práci byly rostliny vystaveny pěstebním médiím obsahující cílová léčiva v daleko vyšších koncentracích, než jsou očekávatelné ve skučených přečištěných odpadních vodách.

Heterogenní fotokatalýza za využití oxidu titaničitého jako fotokatalyzátoru se ukázala být vhodnou technologií pro odstranění chloracetanilidových herbicidů alachloru, metolachloru a acetochloru z vodných roztoků. Avšak ani její maximální účinnost, kdy bylo z reakčního

roztoku odstraněno 98,2 % metolachloru, 97,5 % alachloru a 93,1 % acetochloru, nebyla dostatečná ke snížení toxicity. Ačkoliv se koncentrace všech herbicidů během fotokatalytické degradace snížila, akutní toxicita reakčních roztoků byla na konci procesu srovnatelná nebo vyšší než akutní toxicita počátečního roztoku samotných herbicidů o koncentraci 10 µg/l. Tento jev lze přičíst tvorbě degradačních fotokatalytických produktů, které ovlivňovaly růst zelené řasy *Chlorella kessleri* ve větší míře než původní mateřské herbicidy. Skutečnost, že žádný z hlavních metabolitů vznikajících při degradaci chloracetanilidových herbicidů nebyl v reakčních roztocích detekován, svědčí o složitosti fotokatalytického procesu a o existenci různých degradačních cest, jejichž výsledkem je různorodá směs degradačních produktů. Z tohoto úhlu pohledu jsou testy toxicity velmi cenným nástrojem pro optimalizaci navržené technologie čištění kontaminované vody.

4 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G., Asif Tahir, M. & Iqbal, M. (2018). *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment*, 626, 1295–1309.

2. Abdelhaleem, A., Chu, W. & Farzana, S. (2020). Diphenamid photodegradation using Fe (III) impregnated N-doped TiO_2/sulfite/visible LED process: Influence of wastewater matrix, kinetic modeling, and toxicity evaluation. *Chemosphere*, 256, číslo článku 127094.

3. Abulreesh, H. H., Paget, T. A. & Goulder, R. (2005). Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. *Water Research*, 39(13), 2877–2882.

4. Adekanmbi, A. O. & Falodun, O. I. (2015). Heavy metals and antibiotics susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from several points receiving daily input from the Bodija abattoir in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Advances in Microbiology*, 5(13), 871–880.

5. Afify, A. E. M. M. R., El Baroty, G. S., El Baz, F. K., Abd El Baky, H. H. & Murad, S. A. (2018). *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 399–408.

6. Akenga, P., Gachanja, A., Fitzsimons, M. F., Tappin, A. & Comber, S. (2021). Uptake, accumulation and impact of antiretroviral and antiviral pharmaceutical compounds in lettuce. *Science of the Total Environment*, 766, číslo článku 144499.

7. Akya, A., Chegenelorestani, R., Shahvaisi-Zadeh, J. & Bozorgomid, A. (2020). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from hospital wastewater in Kermanshah, Iran. *Risk Management and Healthcare Policy*, 13, 1035–1042.

8. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128, 1037–1050.

9. Alenzi, A., Hunter, C., Spencer, J., Roberts, J., Craft, J., Pahl, O. & Escudero, A. (2021). Pharmaceuticals effect and removal, at environmentally relevant concentrations, from sewage sludge during anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 319, číslo článku 124102.

10. Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E. S., Nahhas, E. N. & Mabrok, M. A. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infection and Drug Resistance*, 13, 3255–3265.

11. Alhamlan, F. S., Al-Qahtani, A. A. & Al-Ahdal, M. N. (2015). Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(2), 128–135.

12. Amirsoleimani, A., Brion, G. M., Diene, S. M., François, P. & Richard, E. M. (2019). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in wastewater treatment plants by whole genomic sequencing. *Water Research*, 158, 193–202.

13. Antonopoulou, M., Kosma, C., Albanis, T. & Konstantinou, I. (2021). An overview of homogeneous and heterogeneous photocatalysis applications for the removal of pharmaceutical compounds from real or

synthetic hospital wastewaters under lab or pilot scale. *Science of the Total Environment*, 765, číslo článku 144163.

14. Asfaw, T., Negash, L., Kahsay, A. & Weldu, Y. (2017). Antibiotic resistant bacteria from treated and untreated hospital wastewater at Ayder Referral Hospital, Mekelle, North Ethiopia. *Advances in Microbiology*, 7(12), 871–886.

15. Aydın, S., Ulvi, A., Bedük, F. & Aydın, M. E. (2022). Pharmaceutical residues in digested sewage sludge: Occurrence, seasonal variation and risk assessment for soil. *Science of the Total Environment*, 817, číslo článku 152864.

16. Babu, D. S., Srivastava, V., Nidheesh, P. V. & Kumar, M. S. (2019). Detoxification of water and wastewater by advanced oxidation processes. *Science of the Total Environment*, 696, číslo článku 133961.

17. Barreales-Suárez, S., Callejón-Mochón, M., Azoulay, S., Bello-López, M. Á. & Fernández-Torres, R. (2018). Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry determination of six pharmaceuticals in vegetal biota. Uptake study in *Lavandula dentata*. *Science of the Total Environment*, 622–623, 655–663.

18. Ben Mordechay, E., Tarchitzky, J., Chen, Y., Shenker, M. & Chefetz, B. (2018). Composted biosolids and treated wastewater as sources of pharmaceuticals and personal care products for plant uptake: A case study with carbamazepine. *Environmental Pollution*, 232, 164–172.

19. Ben Said, M., Abbassi, M. S., Gómez, P., Ruiz-Ripa, L., Sghaier, S., Ibrahim, C., Torres, C. & Hassen, A. (2017). *Staphylococcus aureus* isolated from wastewater treatment plants in Tunisia: Occurrence of human and animal associated lineages. *Journal of Water and Health*, 15(4), 638–643.

20. Blanco, M., Pérez-Albaladejo, E., Piña, B., Kušpilić, G., Milun, V., Lille-Langøy, R., Karlsen, O., Goksøyr, A. & Porte, C. (2018). Assessing the environmental quality of sediments from Split coastal area (Croatia) with a battery of cell-based bioassays. *Science of the Total Environment*, 624, 1640–1648.

21. Bondarczuk, K., Markowicz, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2016). The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environment International*, 87, 49–55.

22. Boopathy, R. (2017). Presence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sewage treatment plant. *Bioresource Technology*, 240, 144–148.

23. Börjesson, S., Matussek, A., Melin, S., Löfgren, S. & Lindgren, P. E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: An uncharted threat? *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1244–1251.

24. Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1–9.

25. Buta, M., Hubeny, J., Zieliński, W., Harnisz, M. & Korzeniewska, E. (2021). Sewage sludge in agriculture – the effects of selected chemical pollutants and emerging genetic resistance determinants on the quality of soil and crops – a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, číslo článku 112070.

26. Carraro, E., Bonetta, S., Bertino, C., Lorenzi, E., Bonetta, S. & Gilli, G. (2016). Hospital effluents management: Chemical, physical, microbiological risks and legislation in different countries. *Journal of Environmental Management*, 168, číslo článku 185e199.

27. Carrique-Mas, J. J., Barnes, S., McLaren, I. & Davies, R. (2009). Comparison of three plating media for the isolation of *Salmonella* from poultry environmental samples in Great Britain using ISO 6579:2002 (Annex D). *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1976–1983.

28. Carter, L. J., Williams, M., Martin, S., Kamaludeen, S. P. B. & Kookana, R. S. (2018). Sorption, plant uptake and metabolism of benzodiazepines. *Science of the Total Environment*, 628–629, 18–25.

29. Carvalho, I. T. & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757.

30. Carvalho, P. N., Zhang, Y., Lyu, T., Arias, C. A., Bester, K. & Brix, H. (2018). Methodologies for the analysis of pesticides and pharmaceuticals in sediments and plant tissue. *Analytical Methods*, 10(30), 3791–3803.

31. Cassar, R. & Cuschieri, P. (2003). Comparison of *Salmonella* chromogenic medium with DCLS agar for isolation of *Salmonella* species from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3229–3232.

32. Cavalcante, G. I. T., Chaves Filho, A. J. M., Linhares, M. I., de Carvalho Lima, C. N., Venâncio, E. T., Rios, E. R. V., de Souza F. C. F., Vasconcelos, S. M. M., Macêdo, D. & de França Fonteles, M. M. (2017). HIV antiretroviral drug Efavirenz induces anxiety-like and depression-like behavior in rats: evaluation of neurotransmitter alterations in the striatum. *European Journal of Pharmacology*, 799, 7–15.

33. Collivignarelli, M. C., Abbà, A., Alloisio, G., Gozio, E. & Benigna, I. (2017). Disinfection in wastewater treatment plants: Evaluation of effectiveness and acute toxicity effects. *Sustainability*, 9(10), číslo článku 1704.

34. Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Gomez-Puerto, C. M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R. & Bjarnsholt, T. (2020). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, 128(3), 220–231.

35. Cuellar, M., Baroni, V., Pfaffen, V., Griboff, J., Ortiz, P. & Monferrán, M. V. (2021). Uptake and accumulation of Cr in edible parts of *Eruca sativa* from irrigation water. Effects on polyphenol profile and antioxidant capacity. *Heliyon*, 7, číslo článku e06086.

36. Cuerda-Correa, E. M., Alexandre-Franco, M. F. & Fernández-González, C. (2020). Advanced oxidation processes for the removal of antibiotics from water. An overview. *Water*, 12, číslo článku 102.

37. Cycoń, M., Mrozik, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment – degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 10, číslo článku 338.

38. ČSN 75 6406 (2020). *Nakládání s odpadními vodami ze zdravotnických zařízení (ZZ) vypouštěnými do stokové sítě pro veřejnou potřebu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a zkušebnictví.

39. ČSN ISO 19250 (2011). *Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu Salmonella.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a zkušebnictví.

40. ČSN EN ISO 6888-1 (2022). *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků (Staphylococcus aureus a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a zkušebnictví.

41. ČSN EN ISO 10273 (2020). *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu patogenních Yersinia enterocolitica.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a zkušebnictví.

42. ČSN EN ISO 16266 (2008). *Jakost vod – Stanovení Pseudomonas aeruginosa – Metoda membránových filtrů.* Praha: Český normalizační institut.

43. da Silva, W. P., Destro, M. T., Landgraf, M. & Franco, B. D. G. M. (2000). Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2), 103–106.

44. Daquigan, N., Grim, C. J., White, J. R., Hanes, D. E. & Jarvis, K. G. (2016). Early recovery of *Salmonella* from food using a 6-hour non-selective pre-enrichment and reformulation of tetrathionate broth. *Frontiers in Microbiology*, 7, číslo článku 2103.

45. Dave, V. P., Joseph, J., Jayabhasker, P., Pappuru, R. R., Pathengay, A. & Das, T. (2019). Does ophthalmic-grade silicone oil possess antimicrobial properties? *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 9(1), číslo článku 20.

46. Davies, P. R., Turkson, P. K., Funk, J. A., Nichols, M. A., Ladely, S. R. & Fedorka-Cray, P. J. (2000). Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. *Journal of Applied Microbiology*, 89(1), 169–177.

47. Davis, J. A., Farrah, S. R. & Wilkie, A. C. (2006). Selective growth of *Staphylococcus aureus* from flushed dairy manure wastewater using acriflavine-supplemented mannitol salt agar. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 606–611.

48. De Baat, M. L., Kraak, M. H. S., Van der Oost, R., De Voogt, P. & Verdonschot, P. F. M. (2019). Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks. *Water Research*, 159, 434–443.

49. Di Baccio, D., Pietrini, F., Bertolotto, P., Pérez, S., Barcelò, D., Zacchini, M. & Donati, E. (2017). Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 584–585, 363–373.

50. Dires, S., Birhanu, T., Ambelu, A. & Sahilu, G. (2018). Antibiotic resistant bacteria removal of subsurface flow constructed wetlands from hospital wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4265–4272.

51. Divyashree, M., Mani, M. K. & Karunasagar, I. (2022). Association of exopolysaccharide genes in biofilm developing antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater. *Journal of Water and Health*, 20(1), 176–184.

52. Doicheva, L., Foumadzhieva, S., Pilarski, P., Andreeva, R. & Nyagulov, L. (2009). Evaluation of the acute toxicity of the herbicide stomp 33ec (pendimethalin) with a test object *Chlorella kessleri*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23, 289–292.

53. Dudley, S., Sun, C., McGinnis, M., Trumble, J. & Gan, J. (2019). Formation of biologically active benzodiazepine metabolites in *Arabidopsis thaliana* cell cultures and vegetable plants under hydroponic conditions. *Science of the Total Environment*, 662, 622–630.

54. Ebrahimi, S. M., Reyhani, R. D., Asghari-JafarAbadi, M. & Fathifar, Z. (2020). Diversity of antibiotics in hospital and municipal wastewaters and receiving water bodies and removal efficiency by treatment processes: A systematic review protocol. *Environmental Evidence*, 9, číslo článku 19.

55. El Boujnouni, H., Nait Balla, K., Belkadi, B. & Rahouti, M. (2022). Comparison between the recovery rate of three concentration protocols of water samples intended for analysis by Molecular Biology: Membrane filtration, filtration on gauze pad and centrifugation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1592–1597.

56. Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W. & Klampfl, C. W. (2017). High-performance liquid chromatography – mass spectrometry analysis of the parent drugs and their metabolites in extracts from cress

(*Lepidium sativum*) grown hydroponically in water containing four non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Chromatography A*, 1491, 137–144.

57. Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W. & Klampfl, C. W. (2018). Insights into the uptake, metabolization, and translocation of four non-steroidal anti-inflammatory drugs in cress (*Lepidium sativum*) by HPLC-MS^2. *Electrophoresis*, 39(9–10), 1294–1300.

58. Emhofer, L., Himmelsbach, M., Buchberger, W. & Klampfl, C. W. (2019). High-performance liquid chromatography drift-tube ion-mobility quadrupole time-of-flight/mass spectrometry for the identity confirmation and characterization of metabolites from three statins (lipid-lowering drugs) in the model plant cress (*Lepidium sativum*) after uptake from water. *Journal of Chromatography A*, 1592, 122–132.

59. EUCAST (2019). Redefining susceptibility testing categories S, I and R, valid from 2019-01-01 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST_-_Intermediate_category_-_information_for_all.pdf (cit. 2023-03-08).

60. EUCAST (2020). EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0, valid from 2020-01-01 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf (cit. 2023-03-08).

61. EUCAST (2021). EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 11.0, valid from 2021-01-01 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf (cit. 2023-03-08).

62. EUCAST (2022). EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0, valid from 2022-01-01 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf (cit. 2023-03-08).

63. EUCAST (2023a). Disk diffusion method version 11.0, valid from 2023-01-02 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Manual_v_11.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf (cit. 2023-03-08).

64. EUCAST (2023b). Expected Resistant Phenotypes Version 1.2, valid from 2023-01-13 [online]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2023/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf (cit. 2023-03-25).

65. Falodun, O. I. & Adekanmbi, A. O. (2016). Antibiogram of *Escherichia coli* and *Pseudomonas* strains isolated from wastewater generated by an abattoir as it journeys into a receiving river. *Advances in Microbiology*, 06(04), 303–309.

66. Falodun, O. I., Feyikemi Akinbamiro, T. & Ganiyu Rabiu, A. (2019). Hospital wastewater: reservoir of antibiotic resistant *Pseudomonas* strains in Ibadan, Nigeria. *Emergent Life Sciences Research*, 5(1), 1–7.

67. Fekete-Kertész, I., Kunglné-Nagy, Z., Gruiz, K., Magyar, Á., Farkas, É. & Molnár, M. (2015). Assessing toxicity of organic aquatic micropollutants based on the total chlorophyll content of *Lemna minor* as a sensitive endpoint. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 59(4), 262–271.

68. Feng, W., Sun, F., Wang, Q., Xiong, W., Qiu, X., Dai, X. & Xia, P. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 142–147.

69. Ferro, G., Guarino, F., Castiglione, S. & Rizzo, L. (2016). Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H_2O_2 process. *Science of the Total Environment*, 560–561, 29–35.

70. Founou, R. C., Founou, L. L. & Essack, S. Y. (2018). Extended spectrum beta-lactamase mediated resistance in carriage and clinical gram-negative ESKAPE bacteria: A comparative study between a district and tertiary hospital in South Africa. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, číslo článku 134.

71. Fuentefria, D. B., Ferreira, A. E. & Corção, G. (2011). Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? *Journal of Environmental Management*, 92(1), 250–255.

72. Gaida, R., Truter, I. & Grobler, C. (2015). Efavirenz: A review of the epidemiology, severity and management of neuropsychiatric side-effects. *South African Journal of Psychiatry*, 21(3), 94–97.

73. Gar Alalm, M., Tawfik, A. & Ookawara, S. (2015a). Comparison of solar TiO_2 photocatalysis and solar photo-Fenton for treatment of pesticides industry wastewater: Operational conditions, kinetics, and costs. *Journal of Water Process Engineering*, 8, 55–63.

74. Gar Alalm, M., Tawfik, A. & Ookawara, S. (2015b). Combined solar advanced oxidation and PAC adsorption for removal of pesticides from industrial wastewater. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(3), 800–809.

75. Garrido-Cardenas, J. A., Polo-López, M. I. & Oller-Alberola, I. (2017). Advanced microbial analysis for wastewater quality monitoring: metagenomics trend. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 7445–7458.

76. Gatch, M. B., Kozlenkov, A., Huang, R. Q., Yang, W., Nguyen, J. D., González-Maeso, J., Rice, K., France, C., Dillon, G., Forster, M. & Schetz, J. A. (2013). The HIV antiretroviral drug efavirenz has LSD-like properties. *Neuropsychopharmacology*, 38(12), 2373–2384.

77. Gatica, J. & Cytryn, E. (2013). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3529–3538

78. Ghosh, P., Thakur, I. S. & Kaushik, A. (2017). Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 259–270.

79. Girijan, S. K. & Pillai, D. (2021). Identification and characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewaters: Evidence of horizontal spread of antimicrobial resistance. *Journal of Water and Health*, 19(5), 785–795.

80. Golle, A., Janezic, S. & Rupnik, M. (2017). Low overlap between carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* genotypes isolated from hospitalized patients and wastewater treatment plants. *PLoS ONE*, 12(10), číslo článku e0186736.

81. Gomes, J., Frasson, D., Quinta-Ferreira, R. M., Matos, A. & Martins, R. C. (2019). Removal of enteric pathogens from real wastewater using single and catalytic ozonation. *Water*, 11(1), číslo článku 127

82. Gómez, P., Lozano, C., Benito, D., Estepa, V., Tenorio, C., Zarazaga, M. & Torres, C. (2016). Characterization of staphylococci in urban wastewater treatment plants in Spain, with detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398. *Environmental Pollution*, 212, 71–76.

83. González García, M., Fernández-López, C., Pedrero-Salcedo, F. & Alarcón, J. J. (2018). Absorption of carbamazepine and diclofenac in hydroponically cultivated lettuces and human health risk assessment. *Agricultural Water Management*, 206, 42–47.

84. Gosal, L., Hutomo, S. & Sooai, C. M. (2021). Garlic (*Allium sativum* L.) Ethanolic Extract Capability to Inhibit *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Journal of Medicine and Health*, 3(1), 1–8.

85. Govender, R., Amoah, I. D., Adegoke, A. A., Singh, G., Kumari, S., Swalaha, F. M., Bux, F. & Stenström, T. A. (2021). Identification, antibiotic resistance, and virulence profiling of *Aeromonas* and *Pseudomonas* species from wastewater and surface water. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(5), číslo článku 294.

86. Guinamard, R., Simard, C. & Del Negro, C. (2013). Flufenamic acid as an ion channel modulator. *Pharmacology and Therapeutics*, 138, 272–284.

87. Guo, M. T., Yuan, Q. B. & Yang, J. (2015). Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater. *Environmental Science and Technology*, 49(9), 5771–5778.

88. Hammad, H. M., Zia, F., Bakhat, H. F., Fahad, S., Ashraf, M. R., Wilkerson, C. J., Shah, G., Nasim, W., Khosa, I. & Shahid, M. (2018). Uptake and toxicological effects of pharmaceutical active compounds on maize. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 258, 143–148.

89. Hampel, B., Kovács, G., Czekes, Z., Hernádi, K., Danciu, V., Ersen, O., Girleanu, M., Focşan, M., Baia, L. & Pap, Z. (2018). Mapping the Photocatalytic Activity and Ecotoxicology of Au, Pt/TiO_2 Composite Photocatalysts. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(10), 12993–13006.

90. Han, Y., Yang, L., Chen, X., Cai, Y., Zhang, X., Qian, M., Chen, X., Zhao, H., Sheng, M., Cao, G. & Shen, G. (2020). Removal of veterinary antibiotics from swine wastewater using anaerobic and aerobic biodegradation. *Science of the Total Environment*, 709, číslo článku 136094.

91. Harnisz, M., Korzeniewska, E., Ciesielski, S. & Gołaś, I. (2015). Tet genes as indicators of changes in the water environment: Relationships between culture-dependent and culture-independent approaches. *Science of the Total Environment*, 505, 704–711.

92. He, Y., Langenhoff, A. A. M., Sutton, N. B., Rijnaarts, H. H. M., Blokland, M. H., Chen, F., Huber, C. & Schröder, P. (2017). Metabolism of Ibuprofen by *Phragmites australis*: Uptake and Phytodegradation. *Environmental Science and Technology*, 51(8), 4576–4584.

93. Heimesaat, M. M., Escher, U., Grunau, A., Kühl, A. A. & Bereswill, S. (2019). Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* accelerate intestinal, Extra-Intestinal, and systemic inflammatory responses in human Microbiota-Associated mice with subacute ileitis. *Frontiers in Immunology*, 10, číslo článku 49.

94. Helmi, K., Barthod, F., Méheut, G., Henry, A., Poty, F., Laurent, F. & Charni-Ben-Tabassi, N. (2015). Methods for microbiological quality assessment in drinking water: A comparative study. *Journal of Water and Health*, 13(1), 34–41.

95. Herraiz-Carboné, M., Cotillas, S., Lacasa, E., Sainz de Baranda, C., Riquelme, E., Cañizares, P., Rodrigo, M. & Sáez, C. (2021). A review on disinfection technologies for controlling the antibiotic resistance spread. *Science of the Total Environment*, 797, číslo článku 149150.

96. Hocquet, D., Muller, A. & Bertrand, X. (2016). What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. *Journal of Hospital Infection*, 93(4), 395–402.

97. Hosu, M. C., Vasaikar, S., Okuthe, G. E. & Apalata, T. (2021). Molecular detection of antibiotic-resistant genes in *Pseudomonas aeruginosa* from nonclinical environment: public health implications in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Microbiology*, 2021, číslo článku 8861074.

98. Hsu, B. M., Huang, K. H., Huang, S. W., Tseng, K. C., Su, M. J., Lin, W. C., Ji, D., Shih, F., Chen, J. & Kao, P. M. (2011). Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 409(20), 4435–4441.

99. Hu, J., Xu, Q., Li, X., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, J., Zhang, D., Yang, Q, & Zeng, G. (2018). Sulfamethazine (SMZ) affects fermentative short-chain fatty acids production from waste activated sludge. *Science of the Total Environment*, 639, 1471–1479.

100. Hu, N., Xu, Y., Sun, C., Zhu, L., Sun, S., Zhao, Y. & Hu, C. (2021). Removal of atrazine in catalytic degradation solutions by microalgae *Chlorella* sp. and evaluation of toxicity of degradation products via algal growth and photosynthetic activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, číslo článku 111546.

101. Hu, X., Zhou, Q. & Luo, Y. (2010). Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution*, 158(9), 2992–2998.

102. Huang, J. J., Hu, H. Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S. Q. & Lu, Y. (2011). Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 45(9), 2775–2781.

103. Huang, T., Huang, Y., Huang, Y., Yang, Y., Zhao, Y. & Martyniuk, C. J. (2020). Toxicity assessment of the herbicide acetochlor in the human liver carcinoma (HepG2) cell line. *Chemosphere*, 243, číslo článku 125345.

104. Hutinel, M., Fick, J., Larsson, D. G. J. & Flach, C. F. (2021). Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer. *Environmental Pollution*, 276, číslo článku 116733.

105. Hyeon, J. Y., Park, J. H., Chon, J. W., Wee, S. H., Moon, J. S., Kim, Y. J. & Seo, K. H. (2012). Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for *Salmonella* detection in highly contaminated chicken carcasses. *Poultry Science*, 91(5), 1222–1226.

106. Chang, X., Liang, J., Sun, Y., Zhao, L., Zhou, B., Li, X. & Li, Y. (2020). Isolation, degradation performance and field application of the metolachlor-degrading fungus Penicillium oxalicum MET-F-1. *Applied Sciences*, 10, číslo článku 8556.

107. Chaufan, G., Juárez, Á., Basack, S., Ithuralde, E., Sabatini, S. E., Genovese, G., Oneto, M., Kesten, E. & Ríos de Molina, M. (2006). Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (*Chlorella kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology*, 227(3), 262–270.

108. Chávez, M., Cabezas, A. F., Ferauds, M., Castillo, J. E. & Caicedo, L. D. (2020). Antimicrobial resistance patterns and genotypic diversity between clinical and water systems isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Cali, Colombia. *Tropical Biomedicine*, 37(3), 650–662.

109. Chen, X., O'Halloran, J. & Jansen, M. A. K. (2016). The toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* (*L.*) is predominantly caused by dissolved Zn. *Aquatic Toxicology*, 174, 46–53.

110. Chen, Z., Chen, Y., Vymazal, J., Kule, L. & Koželuh, M. (2017). Dynamics of chloroacetanilide herbicides in various types of mesocosm wetlands. *Science of the Total Environment*, 577, 386–394.

111. Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C. & Liu, Y. (2016). Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: A review. *Chemical Engineering Journal*, 284, 582–598.

112. Christofi, T., Panayidou, S., Dieronitou, I., Michael, C. & Apidianakis, Y. (2019). Metabolic output defines *Escherichia coli* as a health-promoting microbe against intestinal *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1), číslo článku 14463.

113. Chuang, Y. H., Liu, C. H., Sallach, J. B., Hammerschmidt, R., Zhang, W., Boyd, S. A. & Li, H. (2019). Mechanistic study on uptake and transport of pharmaceuticals in lettuce from water. *Environment International*, 131, číslo článku 104976.

114. Igbinosa, I. H., Nwodo, U. U., Sosa, A., Tom, M. & Okoh, A. I. (2012). Commensal *Pseudomonas* species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(7), 2537–2549.

115. Igbinosa, I. H., Beshiru, A. & Igbinosa, E. O. (2017). Antibiotic resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from aquaculture and abattoir environments in urban communities. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(1), 47–52.

116. Imanah, E. O., Beshiru, A. & Igbinosa, E. O. (2017). Antibiogram profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from some selected hospital environmental drains. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(10), 604–609.

117. Isari, A. A., Payan, A., Fattahi, M., Jorfi, S. & Kakavandi, B. (2018). Photocatalytic degradation of rhodamine B and real textile wastewater using Fe-doped TiO_2 anchored on reduced graphene oxide (Fe-TiO_2/rGO): Characterization and feasibility, mechanism and pathway studies. *Applied Surface Science*, 462, 549–564.

118. ISO/TS 12869:2019 (2019). *Water quality — Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR).* Geneva: International Organization for Standardization.

119. Jaén-Gil, A., Buttiglieri, G., Benito, A., Mir-Tutusaus, J. A., Gonzalez-Olmos, R., Caminal, G., Barceló, D., Sarrà, M. & Rodriguez-Mozaz, S. (2021). Combining biological processes with UV/H_2O_2 for metoprolol and metoprolol acid removal in hospital wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 404, číslo článku 126482.

120. Jamshidi, F., Dehghani, M., Yousefinejad, S. & Azhdarpoor, A. (2019). Photocatalytic degradation of alachlor by TiO_2 nanoparticles from aqueous solutions under UV radiation. *Journal of Experimental Nanoscience*, 14(1), 116–128.

121. Jauregi, L., Epelde, L., Alkorta, I. & Garbisu, C. (2021). Agricultural Soils Amended With Thermally-Dried Anaerobically-Digested Sewage Sludge Showed Increased Risk of Antibiotic Resistance Dissemination. *Frontiers in Microbiology*, 12, číslo článku 666854.

122. Kaeoboon, S., Suksungworn, R. & Sanevas, N. (2021). Toxicity response of *Chlorella* microalgae to glyphosate herbicide exposure based on biomass, pigment contents and photosynthetic efficiency. *Plant Science Today*, 8(2), 293–300.

123. Kalaji, H. M. & Rastogi, A. (2017,). Pharmaceutical compounds: An emerging pollutant (A review on plant-pharmaceuticals interaction). *Chiang Mai Journal of Science*, 44(2), 287–297.

124. Kampouris, I. D., Agrawal, S., Orschler, L., Cacace, D., Kunze, S., Berendonk, T. U. & Klümper, U. (2021). Antibiotic resistance gene load and irrigation intensity determine the impact of wastewater irrigation on antimicrobial resistance in the soil microbiome. *Water Research*, 193, číslo článku 116818.

125. Kanakaraju, D., Glass, B. D. & Oelgemöller, M. (2018). Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review. *Journal of Environmental Management*, 219, 189–207.

126. Khan, I. U. H., Hill, S., Nowak, E. & Edge, T. A. (2013). Effect of incubation temperature on the detection of thermophilic *Campylobacter* species from freshwater beaches, nearby wastewater effluents, and bird fecal droppings. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7639–7645.

127. Khan, N. A., Ahmed, S., Vambol, S., Vambol, V. & Farooqi, I. H. (2019). Field hospital wastewater treatment scenario. *Ecological Questions*, 30(3), 57–69.

128. Khan, N. A., Ahmed, S., Farooqi, I. H., Ali, I., Vambol, V., Changani, F., Yousefi, M., Vambol, S., Khan, S. & Khan, A. H. (2020). Occurrence, sources and conventional treatment techniques for various antibiotics present in hospital wastewaters: A critical review. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 129, číslo článku 115921.

129. Khan, M. T., Shah, I. A., Ihsanullah, I., Naushad, M., Ali, S., Shah, S. H. A. & Mohammad, A. W. (2021a). Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. *Journal of Water Process Engineering*, 41, číslo článku 101990.

130. Khan, N. A., Vambol, V., Vambol, S., Bolibrukh, B., Sillanpaa, M., Changani, F., Esrafili, A. & Yousefi, M. (2021b). Hospital effluent guidelines and legislation scenario around the globe: A critical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9, číslo článku 105874.

131. Kikuchi, M., Syudo, A., Hukumori, M., Naito, C. & Sawai, J. (2017). Changes in aquatic toxicity of potassium dichromate as a function of water quality parameters. *Chemosphere*, 170, 113–117.

132. Kim, J., Oh, E., Banting, G. S., Braithwaite, S., Chui, L., Ashbolt, N. J., Neumann, N. & Jeon, B. (2016). An improved culture method for selective isolation of *Campylobacter jejuni* from wastewater. *Frontiers in Microbiology*, 7, číslo článku 1345.

133. Klampfl, C. W. (2019). Metabolization of pharmaceuticals by plants after uptake from water and soil: A review. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, 111, 13–26.

134. Klement, A., Kodešová, R., Golovko, O., Fér, M., Nikodem, A., Kočárek, M. & Grabic, R. (2020). Uptake, translocation and transformation of three pharmaceuticals in green pea plants. *Journal of Hydrology and Hydromechanics*, 68(1), 1–11.

135. Koczura, R., Mokracka, J., Jabłońska, L., Gozdecka, E., Kubek, M. & Kaznowski, A. (2012). Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*, 414, 680–685.

136. Korzeniewska, E. & Harnisz, M. (2013). Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Enterobacteriaceae* in municipal sewage and their emission to the environment. *Journal of Environmental Management*, 128, 904–911.

137. Korzeniewska, E., Korzeniewska, A. & Harnisz, M. (2013). Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 96–102.

138. Kotlarska, E., Luczkiewicz, A., Pisowacka, M. & Burzyński, A. (2015). Antibiotic resistance and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from two wastewater treatment plants, and their receiving waters (Gulf of Gdansk, Baltic Sea, Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(3), 2018–2030.

139. Kozajda, A. & Jeżak, K. (2020). Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* in the wastewater treatment plants environment. *Medycyna Pracy*, 71(3), 265–278.

140. Krzeminski, P., Tomei, M. C., Karaolia, P., Langenhoff, A., Almeida, C. M. R., Felis, E., Gritten, F., Andersen, H., Fernandes, T., Manaia, C., Rizzo, L. & Fatta-Kassinos, D. (2019). Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review. *Science of the Total Environment*, 648, 1052–1081.

141. Kuijpers, L. M. F., Post, A. S. & Jacobs, J. (2018). Chromogenic media for the detection of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A in human stool samples: evaluation in a reference setting. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(11), 2181–2190.

142. Lan, L., Kong, X., Sun, H., Li, C. & Liu, D. (2019). High removal efficiency of antibiotic resistance genes in swine wastewater via nanofiltration and reverse osmosis processes. *Journal of Environmental Management*, 231, 439–445.

143. Lang, T., Himmelsbach, M., Mlynek, F., Buchberger, W. & Klampfl, C. W. (2021). Uptake and bio-transformation of telmisartan by cress (*Lepidium sativum*) from sewage treatment plant effluents using high-performance liquid chromatography/drift-tube ion-mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(36), 50790–50798.

144. Laukkanen, R., Hakkinen, M., Lundén, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Johansson, T. & Korkeala, H. (2010). Evaluation of isolation methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig intestinal content. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 956–964.

145. Le, T. H., Ng, C., Tran, N. H., Chen, H. & Gin, K. Y. H. (2018). Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems. *Water Research*, 145, 498–508.

146. Lee, C. M., Palaniandy, P. & Dahlan, I. (2017). Pharmaceutical residues in aquatic environment and water remediation by TiO_2 heterogeneous photocatalysis: a review. *Environmental Earth Sciences*, 76(17).

147. Lee, K. M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R. & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264–276.

148. Lévesque, S., St-Pierre, K., Frost, E., Arbeit, R. D. & Michaud, S. (2011). Determination of the optimal culture conditions for detecting thermophilic campylobacters in environmental water. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 82–88.

149. Li, Y., Lian, J., Wu, B., Zou, H. & Tan, S. K. (2020). Phytoremediation of pharmaceutical-contaminated wastewater: Insights into rhizobacterial dynamics related to pollutant degradation mechanisms during plant life cycle. *Chemosphere*, 253, číslo článku 126681.

150. Liang, C., Wei, D., Zhang, S., Ren, Q., Shi, J. & Liu, L. (2021). Removal of antibiotic resistance genes from swine wastewater by membrane filtration treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 210, číslo článku 111885.

151. Libralato, G., Volpi Ghirardini, A. & Avezzù, F. (2012). To centralise or to decentralise: An overview of the most recent trends in wastewater treatment management. *Journal of Environmental Management*, 94(1), 61–68.

152. Lien, L., Lan, P., Chuc, N., Hoa, N., Nhung, P., Thoa, N., Diwan, V., Tamhankar, A. & Lundborg, C. S. (2017). Antibiotic resistance and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from hospital

wastewater in Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(7), číslo článku 699.

153. Liu, H., Whitehouse, C. A. & Li, B. (2018). Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. *Frontiers in Public Health*, 6, číslo článku 159.

154. López, A., Rodríguez-Chueca, J., Mosteo, R., Gómez, J. & Ormad, M. P. (2020). Microbiological quality of sewage sludge after digestion treatment: A pilot scale case of study. *Journal of Cleaner Production*, 254, číslo článku 120101.

155. Lorenzo, P., Adriana, A., Jessica, S., Carles, B., Marinella, F., Marta, L., Luis, B. & Pierre, S. (2018). Antibiotic resistance in urban and hospital wastewaters and their impact on a receiving freshwater ecosystem. *Chemosphere*, 206, 70–82.

156. Lou, Y. Y., Geneste, F., Soutrel, I., Amrane, A. & Fourcade, F. (2020). Alachlor dechlorination prior to an electro-Fenton process: Influence on the biodegradability of the treated solution. *Separation and Purification Technology*, 232, číslo článku 115936.

157. Lucas, F. S., Therial, C., Gonçalves, A., Servais, P., Rocher, V. & Mouchel, J. M. (2014). Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), 5318–5328.

158. Luczkiewicz, A., Jankowska, K., Fudala-Ksiazek, S. & Olańczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 44(17), 5089–5097.

159. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K. & Fudala-Ksiazek, S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19823–19834.

160. Lutterbeck, C. A., Colares, G. S., Dell'Osbel, N., da Silva, F. P., Kist, L. T. & Machado, Ê. L. (2020). Hospital laundry wastewaters: A review on treatment alternatives, life cycle assessment and prognosis scenarios. *Journal of Cleaner Production*, 273, číslo článku 122851.

161. Ma, Y. X., Wang, C. Y., Li, Y. Y., Li, J., Wan, Q. Q., Chen, J. H., Tay, F. & Niu, L. N. (2020). Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science*, 7, číslo článku 1901872.

162. Madikizela, L. M., Ncube, S. & Chimuka, L. (2018). Uptake of pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions and natural occurring plant species: A review. *Science of the Total Environment*, 636, 477–486.

163. Mahmoud, W. M. M., Rastogi, T. & Kümmerer, K. (2017). Application of titanium dioxide nanoparticles as a photocatalyst for the removal of micropollutants such as pharmaceuticals from water. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 6, 1–10.

164. Machado, M. D. & Soares, E. V. (2019). Sensitivity of freshwater and marine green algae to three compounds of emerging concern. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 399–408.

165. Machado, M. D. & Soares, E. V. (2020). Reproductive cycle progression arrest and modification of cell morphology (shape and biovolume) in the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to metolachlor. *Aquatic Toxicology*, 222, číslo článku 105449.

166. Machado, M. D. & Soares, E. V. (2021). Exposure of the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to environmentally relevant concentrations of the herbicide metolachlor: Impact on the redox homeostasis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, číslo článku 111264.

167. Majumder, A., Gupta, A. K., Ghosal, P. S. & Varma, M. (2021). A review on hospital wastewater treatment: A special emphasis on occurrence and removal of pharmaceutically active compounds, resistant microorganisms, and SARS-CoV-2. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), číslo článku 104812.

168. Malinovskaja-Gomez, K., Labouta, H. I., Schneider, M., Hirvonen, J. & Laaksonen, T. (2016). Transdermal iontophoresis of flufenamic acid loaded PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89, 154–162.

169. Manaia, C. M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D. & Nunes, O. C. (2016). Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 1543–1557.

170. Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I. & Nunes, O. C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International*, 115, 312–324.

171. Mapipa, Q., Digban, T. O., Nnolim, N. E. & Nwodo, U. U. (2021). Antibiogram profile and virulence signatures of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. *Scientific Reports*, 11(1), číslo článku 11800.

172. Marano, R. B. M., Zolti, A., Jurkevitch, E. & Cytryn, E. (2019). Antibiotic resistance and class 1 integron gene dynamics along effluent, reclaimed wastewater irrigated soil, crop continua: elucidating potential risks and ecological constraints. *Water Research*, 164, číslo článku 114906.

173. Margot, H., Stephan, R., O'Mahony, E. & Iversen, C. (2013). Comparison of rapid cultural methods for the detection of *Salmonella* species. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 47–50.

174. Markovic, M., Neale, P. A., Nidumolu, B. & Kumar, A. (2021). Combined toxicity of therapeutic pharmaceuticals to duckweed, *Lemna minor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, číslo článku 111428.

175. Marsoni, M., De Mattia, F., Labra, M., Bruno, A., Bracale, M. & Vannini, C. (2014). Uptake and effects of a mixture of widely used therapeutic drugs in *Eruca sativa* L. and *Zea mays* L. plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 52–57.

176. Masarikova, M., Manga, I., Cizek, A., Dolejska, M., Oravcova, V., Myskova, P., Karpiskova, R. & Literak, I. (2016). *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. *Science of the Total Environment*, 542, 102–107.

177. Mbiri, A., Wittstock, G., Taffa, D. H., Gatebe, E., Baya, J. & Wark, M. (2018). Photocatalytic degradation of the herbicide chloridazon on mesoporous titania/zirconia nanopowders. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(35), 34873–34883.

178. McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M. & Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 432–440.

179. Mejías, C., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I. & Alonso, E. (2021) Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: A review on their distribution and environmental risk assessment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 30, číslo článku e00125.

180. Mhongole, O. J., Mdegela, R. H., Kusiluka, L. J. M., Forslund, A. & Dalsgaard, A. (2017). Characterization of *Salmonella* spp. from wastewater used for food production in Morogoro, Tanzania. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), číslo článku 42.

181. Michael-Kordatou, I., Karaolia, P. & Fatta-Kassinos, D. (2018). The role of operating parameters and oxidative damage mechanisms of advanced chemical oxidation processes in the combat against antibiotic-resistant bacteria and resistance genes present in urban wastewater. *Water Research*, 129, 208–230.

182. Miranda, C. C., de Filippis, I., Pinto, L. H., Coelho-Souza, T., Bianco, K., Cacci, L. C., Picão, R. & Clementino, M. M. (2015). Genotypic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 118(6), 1276–1286.

183. Mir-Tutusaus, J. A., Jaén-Gil, A., Barceló, D., Buttiglieri, G., Gonzalez-Olmos, R., Rodriguez-Mozaz, S., Caminal, G. & Sarrà, M. (2021). Prospects on coupling UV/H_2O_2 with activated sludge or a fungal treatment for the removal of pharmaceutically active compounds in real hospital wastewater. *Science of the Total Environment*, 773, číslo článku 145374.

184. Mlunguza, N. Y., Ncube, S., Mahlambi, P. N., Chimuka, L. & Madikizela, L. M. (2020). Determination of selected antiretroviral drugs in wastewater, surface water and aquatic plants using hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 382, číslo článku 121067.

185. Mlynek, F., Himmelsbach, M., Buchberger, W. & Klampfl, C. W. (2021). Time study on the uptake of four different beta-blockers in garden cress (*Lepidium sativum*) as a model plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(42), 59382–59390.

186. Moges, F., Endris, M., Belyhun, Y. & Worku, W. (2014). Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from wastewater in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 7(1), číslo článku 215.

187. Mohanty, S. S. & Jena, H. M. (2019). A systemic assessment of the environmental impacts and remediation strategies for chloroacetanilide herbicides. *Journal of Water Process Engineering*, 31, číslo článku 100860.

188. Mohd Zulkeflle, S. N., NurFarahaida Mustafa, Othman, N. & Hara, H. (2019). Identification and assessment of fluroquinolone multidrug efflux pump in multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospital wastewater in Kuala Lumpur. *International Journal of Integrated Engineering*, 11(7), 7–13.

189. Morka, K., Bystroń, J., Bania, J., Korzeniowska-Kowal, A., Korzekwa, K., Guz-Regner, K. & Bugla-Płoskońska, G. (2018). Identification of *Yersinia enterocolitica* isolates from humans, pigs and wild boars by MALDI TOF MS. *BMC Microbiology*, 18(1), číslo článku 86.

190. Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, číslo článku 539.

191. Nedjimi, B. (2021) Phytoremediation: a sustainable environmental technology for heavy metals decontamination. *SN Applied Sciences*, 3, číslo článku 286.

192. Nnadozie, C. F., Kumari, S. & Bux, F. (2017). Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19, 491–515.

193. Novo, A. & Manaia, C. M. (2010). Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1157–1166.

194. Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2013). Antibiotic resistance, Antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water Research*, 47(5), 1875–1887.

195. Obayomi, O., Ghazaryan, L., Ben-Hur, M., Edelstein, M., Vonshak, A., Safi, J., Bernstein, N. & Gillor, O. (2019). The fate of pathogens in treated wastewater-soil-crops continuum and the effect of physical barriers. *Science of the Total Environment*, 681, 339–349.

196. Odjadjare, E. E., Igbinosa, E. O., Mordi, R., Igere, B., Igeleke, C. L. & Okoh, A. I. (2012). Prevalence of multiple antibiotics resistant (MAR) *Pseudomonas* species in the final effluents of three municipal wastewater treatment facilities in South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(6), 2092–2107.

197. Odjadjare, E. C. & Olaniran, A. O. (2015). Prevalence of antimicrobial resistant and virulent *Salmonella* spp. in treated effluent and receiving aquatic milieu of wastewater treatment plants in Durban, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 9692–9713.

198. OECD Test No. 201 (2011). Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test [online]. Dostupné z: https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264069923en.pdf?expires=1680113878&id=id&accname=guest&checksum=578EE7E500BF2FFB9A5A5156DFF91BF8 (cit. 2023-03-29).

199. Okuda, J., Hayashi, N., Okamoto, M., Sawada, S., Minagawa, S., Yano, Y. & Gotoh, N. (2010). Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na,K-ATPase regulator, FXYD3. *Infection and Immunity*, 78(11), 4511–4522.

200. Oladipo, A. O., Oladipo, O. G. & Bezuidenhout, C. C. (2019). Multi-drug resistance traits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other Staphylococcal species from clinical and environmental sources. *Journal of Water and Health*, 17(6), 930–943.

201. Oliveira, L. G., Ferreira, L. G. R., Nascimento, A. M. A., Reis, M. D. P., Dias, M. F., Lima, W. G. & Paiva, M. C. (2018). Antibiotic resistance profile and occurrence of Amp C between *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a domestic full-scale WWTP in southeast Brazil. *Water Science and Technology*, 2017(1), 108–114.

202. Orge, C. A., Pereira, M. F. R. & Faria, J. L. (2017). Photocatalytic-assisted ozone degradation of metolachlor aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 318, 247–253.

203. Orias, F. & Perrodin, Y. (2013). Characterisation of the ecotoxicity of hospital effluents: A review. *Science of the Total Environment*, 454–455, 250–276.

204. Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M. & Niestępski, S. (2017). The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent *Escherichia coli* strains in the municipal wastewater system and their environmental fate. *Science of The Total Environment*, 577, 367–375.

205. Pachori, P., Gothalwal, R. & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes and Diseases*, 6, 109-119.

206. Paíga, P., Rodrigues, M. J. E., Correia, M., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P. & Delerue-Matos, C. (2017). Analysis of pharmaceutical adulterants in plant food supplements by UHPLC-MS/MS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 219–227.

207. Parida, V. K., Sikarwar, D., Majumder, A. & Gupta, A. K. (2022). An assessment of hospital wastewater and biomedical waste generation, existing legislations, risk assessment, treatment processes, and scenario during COVID-19. *Journal of Environmental Management*, 308, číslo článku 114609.

208. Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U. & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Chemical Reviews*, 119, 3510−3673.

209. Paudel, I., Bar-Tal, A., Levy, G. J., Rotbart, N., Ephrath, J. E. & Cohen, S. (2018). Treated wastewater irrigation: Soil variables and grapefruit tree performance. *Agricultural Water Management*, 204, 126–137.

210. Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P. & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment*, 697, číslo článku 134023.

211. Perini, J. A. L., Tonetti, A. L., Vidal, C., Montagner, C. C. & Nogueira, R. F. P. (2018). Simultaneous degradation of ciprofloxacin, amoxicillin, sulfathiazole and sulfamethazine, and disinfection of hospital effluent after biological treatment via photo-Fenton process under ultraviolet germicidal irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 224, 761–771.

212. Petsios, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Sakkas, H. & Papadopoulou, C. (2016). Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 55–72.

213. Phoon, B. L., Ong, C. C., Mohamed Saheed, M. S., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., Lam, S. & Juan, J. C. (2020). Conventional and emerging technologies for removal of antibiotics from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 400, číslo článku 122961.

214. Pitkänen, T. (2013). Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *Journal of Microbiological Methods*, 95, 39–47.

215. Rahman, M. M., Devnath, P., Jahan, R. & Talukder, A. (2021). Detection of multiple antibiotic-resistant bacteria from the hospital and non-hospital wastewater sources of a small town in noakhali, bangladesh. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(3), 59–65.

216. Rathod, R. H., Chaudhari, S. R., Patil, A. S. & Shirkhedkar, A. A. (2019). Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS (UHPLC-MS/MS) in practice: analysis of drugs and pharmaceutical formulations. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5, číslo článku 6.

217. Reichl, B., Himmelsbach, M., Emhofer, L., Klampfl, C. W. & Buchberger, W. (2018). Uptake and metabolism of the antidepressants sertraline, clomipramine, and trazodone in a garden cress (*Lepidium sativum*) model. *Electrophoresis*, 39(9–10), 1301–1308.

218. Rhodes, G., Chuang, Y. H., Hammerschmidt, R., Zhang, W., Boyd, S. A. & Li, H. (2021). Uptake of cephalexin by lettuce, celery, and radish from water. *Chemosphere*, 263, číslo článku 127916.

219. Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C. Michael, I. & Fatta-Kassinos, D. (2013a). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447, 345–360.

220. Rizzo, L., Fiorentino, A. & Anselmo, A. (2013b). Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant *E. coli* strains. *Chemosphere*, 92(2), 171–176.

221. Rodríguez-Beltrán, J., Sørum, V., Toll-Riera, M., de la Vega, C., Peña-Miller, R. & Millán, Á. S. (2020). Genetic dominance governs the evolution and spread of mobile genetic elements in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(27), 15755–15762.

222. Rojíčková-Padrtová, R. & Maršálek, B. (1999). Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere*, 38(14), 3329–3338.

223. Rosenberg Goldstein, R. E., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., Davis, J. A., He, X., George, A., Kleinfelter, L., Schreiber, N., Mukherjee, S., Sapkota, A., Joseph, S. & Sapkota, A. R. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants. *Environmental Health Perspectives*, 120(11), 1551–1558.

224. Santana, J. M., Fraga, S. V. B., Zanatta, M. C. K., Martins, M. R. & Pires, M. S. G. (2021). Characterization of organic compounds and drugs in sewage sludge aiming for agricultural recycling. *Heliyon*, 7(4), číslo článku e06771.

225. Santiago, P., Jiménez-Belenguer, A., García-Hernández, J., Estellés, R. M., Hernández Pérez, M., Castillo López, M. A., Ferrús, M. & Moreno, Y. (2018). High prevalence of *Salmonella* spp. in wastewater reused for irrigation assessed by molecular methods. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(1), 95–101.

226. Santoro, D. O., Cardoso, A. M., Coutinho, F. H., Pinto, L. H., Vieira, R. P., Albano, R. M. & Clementino, M. M. (2015). Diversity and antibiotic resistance profiles of pseudomonads from a hospital wastewater treatment plant. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), 1527–1540.

227. Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D. & Montenegro, M. C. B. S. M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 461–462, 302–316.

228. Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A. & Kreyenschmidt, J. (2020). ESKAPE bacteria and extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater and process water from German poultry slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8), číslo článku e02748-19.

229. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4, číslo článku 47.

230. Sharma, A., Ahmad, J. & Flora, S. J. S. (2018). Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products. *Environmental Research*, 167, 223–233.

231. Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X. & Hocquet, D. (2012). Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS ONE*, 7(12), číslo článku e49300.

232. Směrnice Rady č. 91/271/EHS ze dne 21. května 1991, o čištění městských odpadních vod [online]. Dostupné z: https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0271:20081211:CS:PDF (cit. 2023-03-08).

233. Směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky [online]. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/133361 /_2000_60_ES.pdf (cit. 2023-03-08).

234. Souissi, Y., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Kusk, K. O., Sablier, M. & Andersen, H. R. (2013). Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. *Science of the Total Environment*, 458–460, 527–534.

235. Spoljaric, D., Cipak, A., Horvatic, J., Andrisic, L., Waeg, G., Zarkovic, N. & Jaganjac, M. (2011). Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis. *Aquatic Toxicology*, 105(3–4), 552–558.

236. Strakova, N., Korena, K., Gelbicova, T., Kulich, P. & Karpiskova, R. (2021). A rapid culture method for the detection of *Campylobacter* from water environments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(11), číslo článku 6098.

237. Sullivan, G., Guo, X., Tokman, J. I., Roof, S., Trmcic, A., Baker, R. C., Tang, S., Markwell, P., Wiedmann, M. & Kovac, J. (2020). Extended enrichment procedures can be used to define false-negative probabilities for cultural gold standard methods for *Salmonella* detection, facilitating comparisons between gold standard and alternative methods. *Journal of Food Protection*, 83(6), 1030–1037.

238. Sun, C., Li, W., Chen, Z., Qin, W. & Wen, X. (2019). Responses of antibiotics, antibiotic resistance genes, and mobile genetic elements in sewage sludge to thermal hydrolysis pre-treatment and various anaerobic digestion conditions. *Environment International*, 133, číslo článku 105156.

239. Tagun, R. & Boxall, A. B. A. (2018). The response of *Lemna minor* to mixtures of pesticides that are commonly used in Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(4), 516–523.

240. Tan, L. K., Ooi, P. T., Carniel, E. & Thong, K. L. (2014). Evaluation of a modified cefsulodin-irgasan-novobiocin agar for isolation of *Yersinia* spp. *PLoS ONE*, 9(8), číslo článku e106329.

241. Tang, Y., Ali, Z., Zou, J., Jin, G., Zhu, J., Yang, J. & Dai, J. (2017). Detection methods for: *Pseudomonas aeruginosa*: History and future perspective. *RSC Advances*, 7(82), 51789–51800.

242. Tang, X., Wen, Y., He, Y., Jiang, H., Dai, X., Bi, X., Wagner, M. & Chen, H. (2020). Full-scale semi-centralized wastewater treatment facilities for resource recovery: Operation, problems and resolutions. *Water Science and Technology*, 82(2), 303–314.

243. Tesfaye, H., Alemayehu, H., Desta, A. F. & Eguale, T. (2019). Antimicrobial susceptibility profile of selected *Enterobacteriaceae* in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8, číslo článku 134.

244. Thiam, A. & Salazar, R. (2019). Fenton-based electrochemical degradation of metolachlor in aqueous solution by means of BDD and Pt electrodes: influencing factors and reaction pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(3), 2580–2591.

245. Thompson, J. M., Gündoğdu, A., Stratton, H. M. & Katouli, M. (2013). Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in hospital wastewaters and sewage treatment plants with special reference to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 44–54.

246. Topic Popovic, N., Kazazic, S. P., Strunjak-Perovic, I., Barisic, J., Sauerborn Klobucar, R., Kepec, S. & Coz-Rakovac, R. (2015). Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 235–242.

247. Tran, N. H., Reinhard, M. & Gin, K. Y. H. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research*, 133, číslo článku 182e207.

248. Uyguner Demirel, C. S., Birben, N. C. & Bekbolet, M. (2018). A comprehensive review on the use of second generation TiO_2 photocatalysts: Microorganism inactivation. *Chemosphere*, 211, 420–448.

249. Varela, A. R. & Manaia, C. M. (2013). Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3550–3569.

250. Varela, A. R., André, S., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2014). Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Research*, 54, 327–336.

251. Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2011). Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: A case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(2), 245–257.

252. Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2013). Bacterial diversity from the source to the tap: A comparative study based on 16S rRNA gene-DGGE and culture-dependent methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), 361–374.

253. Verlicchi, P., Galletti, A., Petrovic, M. & Barceló, D. (2010). Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options. *Journal of Hydrology*, 389(3–4), 416–428.

254. Vivehananthan, K. & Luphzhy, M. P. D. L. (2021). Detection of mecA Gene and Identification of Potential Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* in Hospital Wastewater Samples. *Advances in Technology*, 1(1), 89–100.

255. Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., Savelkoul, P. & Wolffs, P. F. G. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, číslo článku 173.

256. Vyhláška č. 238/2011 Sb. ze dne 10. srpna 2011, o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch. [online]. Dostupné z: https://www.khsova.cz/docs/01_legislativa/files/238_2011.pdf (cit. 2023-03-25).

257. Vymazal, J. (2022) The historical development of constructed wetlands for wastewater treatment. *Land*, 11, číslo článku 174.

258. Wang, S., Cui, Y., Li, A., Wang, D., Zhang, W. & Chen, Z. (2019a). Seasonal dynamics of bacterial communities associated with antibiotic removal and sludge stabilization in three different sludge treatment wetlands. *Journal of Environmental Management*, 240, 231–237.

259. Wang, H., Meng, Z., Zhou, L., Cao, Z., Liao, X., Ye, R. & Lu, H. (2019b). Effects of acetochlor on neurogenesis and behaviour in zebrafish at early developmental stages. *Chemosphere*, 220, 954–964.

260. Wang, J. & Zhuan, R. (2020). Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Science of the Total Environment*, 701, číslo článku 135023.

261. Wang, S., Zhang, Y., Gao, J., Zhang, J., Tao, L. & Xu, W. (2021). The enantioselective study of the toxicity effects of chiral acetochlor in HepG2 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 218, číslo článku 112261.

262. Wauters, G., Kandolo, K. & Janssens, M. (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contributions to Microbiology and Immunology*, 9, 14–21.

263. Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranayake, L. & Weerasekera, M. (2019). Influence of laboratory culture media on in vitro growth, adhesion, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Medical Principles and Practice*, 28(1), 28–35.

264. Wu, X., Ernst, F., Conkle, J. L. & Gan, J. (2013). Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. *Environment International*, 60, 15–22.

265. Wu, X., Dodgen, L. K., Conkle, J. L. & Gan, J. (2015). Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. *Science of the Total Environment*, 536, 655–666.

266. Yanagimoto, K., Yamagami, T., Uematsu, K. & Haramoto, E. (2020). Characterization of *Salmonella* isolates from wastewater treatment plant influents to estimate unreported cases and infection sources of salmonellosis. *Pathogens*, 9(1), číslo článku 52.

267. Zagui, G. S., Tonani, K. A. A., Fregonesi, B. M., Machado, G. P., Silva, T. V., Andrade, L. N., Andrade, D. & Segura-Muñoz, S. I. (2022). Tertiary hospital sewage as reservoir of bacteria expressing mdr phenotype in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 82, číslo článku e234471.

268. Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., Cao, J. & He, Z. (2015). Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, 135, 138–145.

269. Zhang, C. M., Xu, L. M., Mou, X., Xu, H., Liu, J., Miao, Y. H., Wang, X. & Li, X. (2019). Characterization and evolution of antibiotic resistance of *Salmonella* in municipal wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Management*, 251, 461–470.

270. Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'brien, J., Hai, F. & Jiang, G. (2021). Molecular methods for pathogenic bacteria detection and recent advances in wastewater analysis. *Water*, 13, číslo článku 3551.

271. Zhen, X., Lundborg, C. S., Sun, X., Hu, X. & Dong, H. (2019). Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: A systematic review. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, číslo článku 137.

272. Zhou, Y., Meng, J., Zhang, M., Chen, S., He, B., Zhao, H., Li, Q., Zhang, S. & Wang, T. (2019). Which type of pollutants need to be controlled with priority in wastewater treatment plants: Traditional or emerging pollutants? *Environment International*, 131, číslo článku 104982.

273. Zhu, T., Su, Z., Lai, W., Zhang, Y. & Liu, Y. (2021). Insights into the fate and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes using biological wastewater treatment technology. *Science of the Total Environment*, 776, číslo článku 145906.

274. Zhuang, Y., Ren, H., Geng, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ding, L. & Xu, K. (2015). Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater by chlorination, ultraviolet, and ozonation disinfection. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(9), 7037–7044.

275. Zieliński, W., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Hubeny, J., Buta, M. & Rolbiecki, D. (2020). The prevalence of drug-resistant and virulent *Staphylococcus* spp. in a municipal wastewater treatment plant and their spread in the environment. *Environment International*, 143, číslo článku 105914.

5 SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Publikace v zahraničních a mezinárodních recenzovaných časopisech

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. (2022). Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic. *Journal of Water and Health*, 20(4), 692–701. **[IF 2022 = 2,264]**

Roulová, N., Hrdá, K., Kašpar, M., Peroutková, P., Josefová, D. & Palarčík, J. (2022). Removal of chloroacetanilide herbicides from water using heterogeneous photocatalysis with TiO_2/UV-A. *Catalysts*, 12(6), číslo článku 597. **[IF 2022 = 4,501]**

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I., Swiontek Brzezinska, M. & Pejchalová, M. (2022). Detection, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in different types of wastewater in the Czech Republic. *Journal of Applied Microbiology*, 133(4), 2255–2266. **[IF 2022 = 4,059]**

Publikace v ostatních vědeckých recenzovaných časopisech

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. (2023). Comparison of culture methods for the detection of *Salmonella* in wastewater. *Scientific Papers of the University of Pardubice Series A*, 29. **(článek přijatý k publikaci)**

Přednášky na domácích konferencích

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Stanovení vybraných mikroorganismů v odpadních vodách a metody jejich detekce, Mladí vedci – bezpečnosť potravinového reťazca, Nitra, Slovensko, 21. – 2. 11. 2018. Sborník: str. 179–183, ISBN 978-80-89738-18-2

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Porovnání kultivačních technik pro izolaci patogenních bakterií z odpadních vod, Čo nového v mikrobiológii, Štrbské Pleso, Slovensko, 14. – 17. 3. 2019. Sborník: str. 40, ISBN 978-80-971422-9-2

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Možnosti izolace vybraných patogenních bakterií z odpadních vod. Mladí vedci – bezpečnosť potravinového reťazca, Bratislava, Slovensko, 21. – 22. 11. 2019. Sborník: str. 177-181, ISBN 978-80-89738-19-9

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Metody izolace vybraných patogenních bakterií z nemocničních odpadních vod a jejich antibiotická citlivost. Čo nového v mikrobiológii, Štrbské Pleso, Slovensko, 2. – 5. 7. 2020. Sborník: str. 31, ISBN 978-80-973411-1-4

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Antibiotická citlivost vybraných patogenních bakterií izolovaných z nemocničních odpadních vod. Mladá voda břehy mele, Brno, Česká republika, 8. – 9. 9. 2020. Sborník: str. 32–40, ISBN 978-80-270-8323-7

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Sledování vybraných patogenních bakterií v odpadních vodách, Mikrobiologie vody a prostředí, Malá Morávka, Česká republika, 9. – 11. 6. 2021. Sborník: str. 11, ISBN 978-80-87402-81-8

Roulová, N., Moťková, P., Brožková, I. & Pejchalová, M. Detekce, charakterizace a antimikrobiální citlivost *Yersinia enterocolitica* v různých typech odpadních vod, 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické, Brno, Česká republika, 15. – 17. 9. 2022. Sborník: str. 63, ISBN 978-80-88379-18-8

Postery na zahraničních konferencích

Šilarová, P., **Roulová N.,** Šilha, D., Česlová, L., Optimization of SPE extraction and HPLC separation for monitoring pharmaceuticals in water, HPLC 2019, Miláno, Itálie, 16. – 20. 6. 2019.

Účast na grantových projektech

TJ02000134 Odstraňování polárních polyfluorovaných sloučenin z kontaminovaných materiálů. TAČR ZÉTA, doba řešení: 2019–2021.

TJ04000226 Kombinovaný postup eliminace chloracetanilidových pesticidů z kontaminovaných vod a zemin. TAČR ZÉTA, doba řešení: 2020–2022.

6 PŘÍLOHY

Příloha 1 Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital wastewater in the Czech Republic.

Příloha 2 Detection, characterization, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in different types of wastewater in the Czech Republic.

Příloha 3 Comparison of culture methods for the detection of *Salmonella* in wastewater.

Příloha 4 Removal of chloroacetanilide herbicides from water using heterogeneous photocatalysis with TiO_2/UV-A.