



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alja RADEŽ

**OKOLJSKI VIDIKI PROTIMIKROBNE
ODPORNOSTI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alja RADEŽ

OKOLJSKI VIDIKI PROTIMIKROBNE ODPORNOSTI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

ENVIRONMENTAL ASPECTS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Marjetko Suhadolc.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Marjetka SUHADOLC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum predavitve: 14. september 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 504.5:604.4:615.33:579.25/.26(043.2)
- KG protimikrobna odpornost, okoljski vidik, antibiotiki, geni odporni proti protimikrobnim sredstvom
- AV RADEŽ, Alja
- SA SUHADOLC, Marjetka (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2018
- IN OKOLJSKI VIDIKI PROTIMIKROBNE ODPORNOSTI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 21 str., 3 pregl., 1 sl., 15 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Uporaba antibiotikov v humani medicini in veterini množično narašča. Protimikrobna sredstva v okolje vstopajo dnevno iz najrazličnejših virov, in sicer s proizvodnjo, uporabo in odlaganjem odpadkov zdravil. Preko kanalizacijskega sistema, iztoka iz KCN, se razširjajo v vodno okolje. Pomemben vir so tudi izcedne vode iz živinorejskih obratov in iztoki iz gojišč rib. Z uporabo živinskih gnojil in blata-KČN jih vnašamo na kmetijske površine, v tleh je njihov zadrževalni čas najdaljši. Usoda protimikrobnih sredstev in njihovih metabolitov v okolju je odvisna od njihovih kemijskih lastnosti in lastnosti okolja ter evolucijskih in ekoloških značilnosti bakterijskih populacij. Določajo jo trije pomembni procesi: adsorbcija, razgradnja in mobilnost v tleh in vodnem okolju. Bakterije odporne proti protimikrobnim sredstvom s horizontalnim genskim prenosom potencialno odpornih genov, genetskimi mutacijami in rekombinacijami vplivajo na pridobljeno okoljsko odpornost in pripomorejo k razvoju odpornih patogenih organizmov ter posledično zmanjšujejo učinkovitost zdravljenja s protimikrobnimi zdravili. Uporaba predhodno pravilno tretiranega gnoja in gnojevke pred nanosom na kmetijske površine je ključna za zmanjševanje tveganj, saj z ustreznim ravnanjem pred nanosom na kmetijsko površino lahko zmanjšamo ali popolnoma izničimo prisotnost nekaterih v veterini uporabljenih antibiotikov. Nadzor, ustrezne regulative in izobraževanje širše javnosti o preprečevanju vnosa antibiotikov humane in veterinarske uporabe v okolje so bistvenega pomena za zmanjševanje tveganja vplivov na ekološko zdravje, njihovo prisotnost v pitni vodi, rastlinski biomasii ter na splošno v prehranjevalni verigi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 504.5:604.4:615.33:579.25/.26(043.2)
- CX antimicrobial resistance, environmental aspects, antibiotics, antimicrobial resistance genes
- AU RADEŽ, Alja
- AA SUHADOLC, Marjetka (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2018
- TI ENVIRONMENTAL ASPECTS OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 21 p., 3 tab., 1 fig., 15 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The usage of antibiotics in human as well as in veterinary medicine has increased immensely. Antimicrobial substances enter the environment daily from various sources, be it production, usage or disposal of waste products. They reach the water environment through sewer systems, waste water treatment plant outlet, and from animal and fish farms outlets. Through the use of livestock fertilisers and sewage sludge they reach agricultural lands. In soil their retention time is the longest. The fate of antimicrobial substances and their metabolites in the environment depends on their chemical properties and environmental characteristics, and the evolutionary and ecological characteristics of bacterial populations. It is determined by three important processes: adsorption, degradation and transfer in soil and aquatic environment. Antimicrobial resistant bacteria through horizontal gene transfer, genetic mutations and recombinations are influencing environmental resistance and can also contribute to the development of resistant pathogenic organisms, subsequently reducing antimicrobial medication treatment effectivity. The usage of properly pretreated manure plays a key role in reducing or completely eradicating the presence of veterinary-used antibiotics. Control, appropriate regulation and education of the general public about the prevention of human and veterinary antibiotics' entry into the environment are crucial for reducing ecological health risks, antibiotic presence in drinking water, plant biomass and in the food chain in general.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO PREGLEDNIC	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
2 VIRI ANTIBIOTIKOV V OKOLJU	1
2.1 EMISIJE IZ PROIZVODNJE	2
2.2 ČISTILNE NAPRAVE	2
2.2.1 Uporaba blata KČN na kmetijskih zemljiščih	3
2.3 VETERINA IN ŽIVINOREJA	3
2.4 RIBOGOJNIŠTVO	4
3 USODA ANTIBIOTIKOV V OKOLJU	4
3.1 ADSORBCIJA V TLEH	5
3.2 RAZGRADNJA V TLEH	6
3.1 ODTOK V POVRŠINSKE VODE IN IZPIRANJE V PODTALNICO	8
3.2 SPREJEM V RASTLINE	8
4 RAZVOJ IN PRENOSI ODPORNIH GENOV V OKOLJU	9
4.1 GENETSKI DEJAVNIKI IN MEHANIZMI PRENOSA GENOV POVEZANIH Z ARG	10
5 UKREPI ZA BLAŽENJE ŠIRJENJA AMR	11
5.1 ANAEROBNA RAZGRADNJA ŽIVINSKIH GNOJIL	12
5.1.1 Razgradnja antibiotikov	12
5.1.2 Protimikrobna odpornost	12
5.2 KOMPOSTIRANJE ŽIVINSKIH GNOJIL	13
5.2.1 Usoda antibiotikov med kompostiranjem	13
5.2.2 Usoda antibiotično odpornih mikrobov med kompostiranjem	13
5.2.3 Usoda antibiotično odpornih genov pri kompostiranju	13
6 ZAKLJUČEK	14
7 VIRI	15

KAZALO SLIK

Slika 1: Prenos antibiotikov in antimikrobnih genov v okolju, z modro so označene točke vnosa in uporabe antibiotikov, črne puščice pa nakazujejo poti prenosa med posameznimi okolji in populacijami (prirejeno po pig333.com, 3. 9. 2018)	2
---	---

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o biorazgradnji antibiotikov v različnih testnih sistemih (Kumar in sod., 2005)	7
Preglednica 2: Vsebnosti antibiotikov v gnojevki, tleh, rastlinah, površinskih in podzemnih vodah (podatki iz Kumar in sod. 2005).	8
Preglednica 3: Vsebnosti izbranih antibiotikov v različnih živinskih gnojilih (Kumar in sod., 2005).	14

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMR *antimicrobial resistance* slov. protimikrobna odpornost

ARG *antimicrobial resistance genes* slov. geni odporni proti protimikrobni sredstvom

ARB *antimicrobial resistance bacteria* slov. bakterije odporne proti protimikrobnim sredstvom

CFU *colony forming units* slov.

DNK deoksiribonukleinska kislina

ECDC *European Center for Disease Prevention Control* slov. Evropski center za preventivo in preprečevanje bolezni

FAS farmakološko aktivna substanca

FDA *Food and Drug Administration* slov. Zvezna agencija za hrano in zdravila

WHO *World Health Organisation* slov. Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

Protimikrobna odpornost (AMR) je oblika odpornosti proti zdravilom, kjer se mikroorganizmi, kot so bakterije, glive, virusi in praživali ob izpostavljenosti protimikrobnim sredstvom (na primer antibiotikom, antimikotikom, protivirusnim zdravilom, fungicidom), spremenijo in so sposobni preživeti kljub izpostavljenosti protimikrobnemu sredstvu.

Antibiotiki in determinante odpornosti proti antibiotikom so naravni pojav in so bili v okolju prisotni dolgo pred odkritjem in uporabo antibiotikov. Mikroorganizmi jih proizvajajo, da lahko hitreje rastejo in se branijo pred konkurenčnimi organizmi. Antibiotiki v mikrobnih populacijah delujejo tudi kot selekcijske molekule. Naravno okolje je torej že samo po sebi rezervoar determinant odpornosti, vključno z geni odpornosti in mobilnimi genskimi elementi, ki delujejo kot vektorji zanje. Različni geni odpornosti imajo dolgo filogenetsko zgodovino, ki se je razvila v milijonih let, odporni genotipi lahko nastanejo tudi zaradi mutacij. Protimikrobna odpornost je biološki pojav, ki ga lahko povzročijo številni dejavniki (Berkner in sod., 2014)

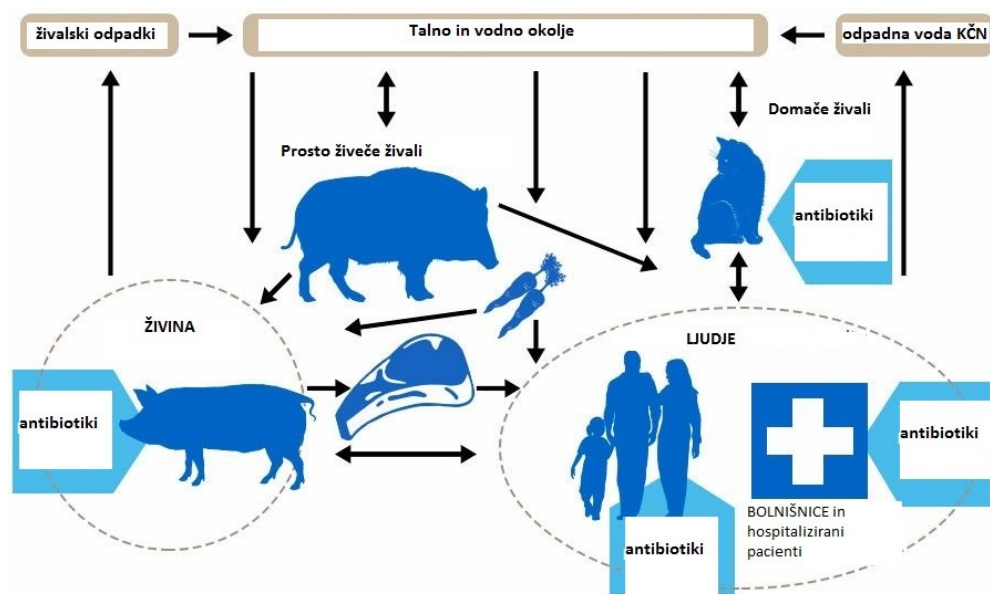
Zaradi prekomerne uporabe antibiotikov v humani medicini in živinoreji ter prepočasnega razvoja novih zdravil protimikrobna odpornost (AMR) postaja globalni problem za zdravje ljudi in živali. Določanje obsega protimikrobne odpornosti v okolju je ključnega pomena za ocenjevanje in preprečevanje tveganja za zdravje ljudi in živali. Z razvojem novih orodij za odkrivanje genov protimikrobne odpornosti (ARG) je karakterizacija postala hitrejša, a obenem bolj kompleksna (Williams in sod., 2016). Na antibiotike odporni geni (ARG) so geni v mikroorganizmu, ki mikroorganizmu omogočajo, da je odporen na antibiotik. To se zgodi na več načinov, in sicer s kodiranjem encimov, ki ga uničijo, s kodiranjem površinskih proteinov, ki preprečujejo vstop v mikroorganizem ali z mutiranjem mesta, kjer antibiotik deluje.

Uporaba antibiotikov pri ljudeh in živalih predstavlja veliko tveganje za prenos ARG. Ti ARG so pogosto, če ne vedno, najdeni v bakterijah z drugimi geni, ki spodbujajo odpornost na druge potencialno škodljive kemikalije (Subirats in sod., 2016). Obstajajo trije razredi odpornih kemikalij, in sicer antitimikrobna sredstva, s štirimi podrazredi: antibiotiki, antimikotiki, protivirusna zdravila in antiparazitiki, ter strupene kovine in biocidi (razkužila in površinsko aktivne snovi). Vendar pa je dokazano, da tudi številne druge kemikalije lahko povzročajo protimikrobno odpornost (Friedman, 2015).

Namen diplomskega seminarja je predstaviti usodo protimikrobnih sredstev v okolju ter razvoj in prenos na antibiotike odpornih genov. Naloga je osredotočena na antibiotike, ki jih uporabljamo v humani medicini in veterini, saj se v okolju pojavljajo v največjem obsegu. Antibiotiki in na antibiotike odporni geni pogosto končajo v talnem ekosistemu, kjer so njihovi zadrževalni časi najdaljši. Naloga povzema tudi ukrepe za zmanjševanje širjenja protimikrobne odpornosti na kmetijskih zemljiščih.

2 VIRI ANTIBIOTIKOV V OKOLJU

Velike vsebnosti antibiotikov lahko najdemo v odpadnih vodah zdravstvenih ustanov, odpadnih vodah komunalnih sistemov, blatu čistilnih naprav, odpadnih vodah farmacevtskih obratov (Diaz-Cruz in Barcelo, 2004), ribogojnicah in živinorejskih obratih. Za zgoraj omenjene vire so značilne visoke vsebnosti antibiotikov in lahko predstavljajo znaten vnos ARG in ARB v okolje. ARG in ARB pa lahko vnašamo v okolje tudi posredno z gnojenjem kmetijskih površin z biogenimi odpadki, vendar pa so vsebnosti antibiotikov in njihovih ostankov na kmetijskih zemljiščih praviloma nizke.



Slika 1: Prenos antibiotikov in antimikrobnih genov v okolju, z modro so označene točke vnosa in uporabe antibiotikov, črne puščice pa nakazujejo poti prenosa med posameznimi okolji in populacijami (prirejeno po pig333.com, 2018)

2.1 EMISIJE IZ PROIZVODNJE

Proizvodnja farmacevtskih izdelkov sestoji iz dveh stopenj, in sicer proizvodnje farmakološko aktivnih substanc (FAS) in proizvodnje končnega zdravila (npr. tablete, kapsule) (Velagaleti in sod., 2002). Pri proizvodnji FAS sinteza in čiščenje potekata z organskimi topili, ki so ponovno uporabljeni pri nadaljnji sintezi in nazadnje zavrženi s sežiganjem. Pri proizvodnji farmacevtskih izdelkov so končni odpadki večinoma v trdnem stanju in se jih zavrže s sežiganjem (Williams, 2005). Odpadki farmacevtskih obratov so zaradi številnih regulativ v razvitih državah načeloma dobro urejeni, vendar to ne velja za države v razvoju. Na primer, v raziskavi, v katero je bilo vključenih 90 farmacevtskih obratov v Indiji, so bile vsebnosti fluorokinolon ciprofloksacina v odpadnih vodah tudi do 31000 mg/L (Larsson in sod., 2007).

2.2 ČISTILNE NAPRAVE

Komunalne odpadne vode iz čistilnih naprav veljajo za enega glavnih onesnaževalcev vodnih okolij z AMR (Alder in sod., 2001). Po uporabi se AMR in njihovi metaboliti izločajo v čistilne naprave, kjer so pred izpustom podvrženi postopkom čiščenja. Uspešnost odstranjevanja AMR in njihovih metabolitov med postopkom čiščenja v čistilni napravi je odvisna od fizikalnih in kemičnih lastnosti. Obdelana odpadna voda lahko onesnažuje tla z uporabo recikliranega blata iz čistilnih naprav kot gnojila na kmetijskih površinah (Oppel in sod., 2004).

Velik delež antibiotikov, ki jih uporabljamo ljudje, se izloča z urinom in blatom v biološko aktivni obliki (Verlicci in Zambello, 2016). Antibiotiki, ki jih izločamo ljudje, vstopijo v čistilne naprave, kjer so podvrženi različnim oblikam transformacije: biološki razgradnji (Chen in sod., 2015), absorpciji v blato čistilnih naprav (Li in Zang, 2010) ali pa čistilno napravo zapustijo nespremenjeni (Rivera- Utrilla in sod., 2013, Luo in sod., 2014). Zadrževanje antibiotikov v čistilni napravi je odvisno od: osnovne komponente (Gardner in sod., 2013; Larsson, 2014), slanosti, temperature, vrste čistilne naprave (npr. aktivnega blata, membranskega bioreaktorja) in

hidravličnega retenzijskega časa. Raziskava 16 britanskih čistilnih naprav je v vseh razkrila prisotnost vseh treh antibiotikov, ki so jih določali (eritromicina, atloksacina in oksitetraciklina) (Gardner in sod., 2013). Preferenčna odstranitev nekaterih antibiotikov iz blata, na primer sulfoamidov (Yang in sod., 2012) in ciprofloksacina (Polesel in sod., 2015), nakazuje, da se tveganja, ki jih povzroča uporaba blata na zemljiščih, razlikujejo od tveganj, ko komunalne odpadne vode končajo v rekah. Poročali so o pospešeni razgradnji zdravil, ko se v primarno fazo čiščenja na KČN doda železo, ki se uporablja za odstranjevanje fosforja. Po dodatku železa se je vrednost eritromicina zmanjšala za 20 %, atloksacina za 74 % in oksitetraciklina za 51 % (Gardner in sod., 2013).

2.2.1 Uporaba blata KČN na kmetijskih zemljiščih

Ena od najpogostejših praks za odstranjevanje blata iz čistilnih naprav je njegova uporaba za obogatitev zemlje na kmetijskih zemljiščih. Več kot 80 odstotkov blata, nastalega v KČN, se na Irskem raztrosi na kmetijska zemljišča (Urban ..., 2016). V Nemčiji se kazalec ustavi na malo manj kot 60 odstotkov. V Avstriji, Švici in Nizozemskem se več kot 36 odstotkov blata iz čistilnih naprav trenutno sežiga, kot alternativo preprečevanju onesnaževanja tal (Diaz-Cruz s sod., 2004). Po ocenah Kinney in soavtorjev (2008) se v Evropi za obogatitev tal uporablja 37 % organskih snovi iz blata KČN, kar ustreza približno $2,39 \times 10^6$ suhih ton organske snovi letno. Med najpogostejšimi antibiotiki, ki se nahajajo v aktivnem blatu, so v vodi manj topni antibiotiki, in sicer norfloksacin, ofloksacin, ciprofloksacin, trimetoprim, sulfametoksazol in doksiciklin (McClellan in Halden, 2010).

2.3 VETERINA IN ŽIVINOREJA

Tako kot ljudje so tudi živali v živinorejskih obratih izpostavljene vnosu antibiotikov. Precejšen del, 30 do 90 % porabljenih antibiotikov, se iz živali izloči v urin (gnojnico) oz. zmes urina in blata (gnojevko) (Berendsen in sod., 2015). Izkazalo se je, da iztrebki živali poleg antibiotikov vsebujejo tudi na antibiotike odporne bakterije (Wichmann in sod., 2014). Nedavna raziskava, izvedena v 20 komercialnih prašičjih in 20 govedorejsko usmerjenih kmetijah na Nizozemskem, je poročala o 55 odstotni prisotnosti antibiotikov v prašičji gnojevki od kar 80 odstotkov prašičjih farm in o 75 odstotni prisotnosti antibiotikov v gnojevki goveda od 95 odstotkov govedorejskih farm (Berendsen in sod., 2015). Najpogosteje zaznani antibiotiki so bili: oksitetraciklin, doksiciklin in sulfadiazin. Sledili so jim tetraciklin, flumekvin, lincomicin in tilozin. Več kot tretjina vzorcev gnojevke je vsebovala več kot en antibiotik. V gnojevki prašičev so odkrili tri različne antibiotike in kar osem različnih pri govedu. Avtorji so ugotovili, da vsota vsebnosti različnih antibiotikov v vzorcu presega vsebnosti, ki spodbujajo antibiotično rezistenco. Dokazan prenos AMG preko okužene krave na teleta in tla opozarja na potrebo po ločevanju živali, ki se zdravijo, od ostale črede (Liu in sod., 2016). Pomembno je, da uporabljene stelje, kjer so bile nameščene okužene živali, ne odlagajo tja, kamor se odlaga gnojevka zdravih živali. (Mitchell in sod., 2015). Izkazalo se je, da intramuskularno zdravljenje telet s florfenikolom, v skladu s priporočili proizvajalca, že zadošča za razvoj proti zdravilom odpornega E. Coli v blatu, tleh in stelji živali (Liu in sod., 2016). Študija ponazarja različne dejavnike, ki otežujejo kontrolo AMR v veterinarskem okolju, in sicer: nenehno odvajanje zdravil z gnojevko in posledično vnos antibiotikov v okolje ter prenos antibiotikov v ekosistemu (Liu in sod., 2016). Prenos bakterij in genov, odpornih na antibiotike, iz živali na ljudi, je bil prav tako omenjen v literaturi (Smith in sod., 2013). Nedavni pregled akademske literature, ki obravnava uporabo antibiotikov v kmetijstvu, kaže, da le 5 % študij trdi, da ni povezave med uporabo antibiotikov pri živalih in odpornostjo pri ljudeh, medtem ko je 72 % študij ugotovilo povezavo (O'Neill, 2015). Stopnja

prenosa iz živali na ljudi in obratno predstavlja velik problem in ima pomembne posledice za javno zdravje in zdravje živali (Klous in sod., 2016).

2.4 RIBOGOJNIŠTVO

Ko se veterinarska uporaba antibiotikov, biocidov v ribogojnicah poveča, se povečata njihovo sproščanje v okolje in sočasna selekcija odpornih genov. AMR vztrajajo pri kroničnih izpostavitvah rek, estuarijskih in obalnih območjih (Samuelson in sod., 1992) ter se širijo v usedline in sedimente (Sandaa in sod., 1992). Svetovna organizacija za zdravje živali (OIE) je v kodeksu o zdravstvenem varstvu vodnih živali zapisala standarde o odgovorni in preudarni rabi protimikrobnih sredstev pri vodnih živalih ter seznam protimikrobnih sredstev pomembnih za veterino. Namen tega dokumenta je optimizacija rabe protimikrobnih sredstev in ravnovesje med zdravjem živali in javnozdravstvenimi interesi (List of antimicrobials ..., 2015). Na žalost vse do danes še ni urejenega, usklajenega sistema nadzora in uporabe ter obtoka protimikrobnih sredstev v ribogojništvu po svetu.

Antimikrobna sredstva se v ribogojništvu uporabljajo za preprečevanje in zdravljenje bakterijskih okužb pri ribah in nevretenčarjih (Cabello in sod., 2013). V mnogih nerazvitih državah pa jih uporabljajo tudi zaradi sanitarnih pomankljivosti pri vzreji rib (Cabello in sod., 2006). V Združenem kraljestvu so leta 2014 porabili kar 2 tona antibiotikov pri vzreji rib (Veterinary Medicines Directorate, 2014). V Kanadi, na Norveškem in v ZDA je pri gojenju rib dovoljena uporaba oksitetraciklina. Florfenikol se uporablja v Kanadi in na Norveškem, medtem ko se kinoloni uporabljajo samo na Norveškem (Cabello in sod., 2013). Količine antibiotikov, ki se uporabljajo v posameznih državah, se lahko razlikujejo kar do 175-krat na 1 tona lososa (npr 0,008-1,4 kg antimikrobnega sredstva) (Cabello in sod., 2013). Uporaba in zloraba antibiotikov v ribogojništvu je privedla do višje odpornosti pri ribjih patogenih, pri prenosu determinant odpornosti na in iz mikrobnih sedimentov (Cabello in sod., 2006; Cabello in sod., 2013). AMR iz ribogojništva vplivajo na mikrobiom rib in okolice (DePaola in sod., 1988). Spremembe ribjega mikrobioma imajo neznane posledice, ki predstavljajo veliko skrb in pomembno vrzel za raziskovalce (Guardabassi in sod., 2000).

3 USODA ANTIBIOTIKOV V OKOLJU

Ostanki antibiotikov in bakterije, odporne na antibiotike, lahko vstopijo na zemljišča z neposrednim ali posrednim vnosom. Do neposrednega vnosa pride med pašo živali na travinju, posredni vnos antibiotikov se pojavi pri uporabi živinskih gnojil ali blata čistilnih naprav na kmetijskih površinah. Izločki živali med pašo, nanašanje gnojnice/gnojevke ali blata čistilnih naprav na kmetijska zemljišča ter uporaba komunalnih odpadnih voda za namakanje tako predstavljajo vstop AMR v tla (Kemper, 2008). Zdravila za humano uporabo tako lahko onesnažujejo tla tudi preko gnojenja zemljišč z blatom KČN ter preko namakanja s komunalnimi odpadnimi vodami (Ternes in sod., 2007). AMR se lahko ob močnem deževju, raztopljeni v talni vodi ali vezani na talne delce, prenesejo v površinske vode (površinski odtok, erozija). Uhajanje vode iz kanalizacijskega sistema lahko ob močnem deževju povzroči prenos AMR v površinske vode (Pederson in sod. 2005). AMR in njihove metabolite vsebujejo tudi odpadne vode iz zdravstvenih ustanov bolnišnice (Kümmerer, 2001, 2004).

V tleh prihaja do procesov razgradnje, adsorpcije in prenosa ostankov antibiotikov in AMR v vodne vire in organizme v okolici. Usodo protimikrobnih sredstev in njihovih metabolitov v tleh

primarno določata dva pomembna procesa: adsorbcija in razgradnja (Diaz-Cruz in sod., 2003). Vnos ostankov protimikrobnih snovi in bakterij lahko vpliva na talne mikrobne združbe. Tudi rastline lahko absorbirajo AMR in antibiotike, ki posredno nazaj vplivajo na živali in ljudi, ki te rastline uživajo (Van der Vijer in sod., 2012). Usodo ARG in ARB v okolju je težko predvideti zaradi razvoja novih mehanizmov odpornosti ter širjenja AMR in mobilnih genetskih elementov, kot tudi evolucijskih, ekoloških in okoljskih dejavnikov bakterijskih populacij, saj imajo različna okolja različne profile odpornosti (Williams in sod., 2016).

3.1 ADSORBCIJA V TLEH

Sorbcija protimikrobnih sredstev v tleh je pomemben proces, saj njihovo povezovanje z delci in razporeditev med vodno in trdno fazo vpliva na njihovo dostopnost ter s tem na prenose in razgradnjo (Occurrence ..., 2003). Stopnja adsorbcije protimikrobnih sredstev v tleh je odvisna od vrste protimikrobnega sredstva, sestave tal in pH (Halling-Sørensen in sod., 2002). Sorbcija poteka na različne načine, protimikrobna sredstva se lahko povezujejo z organsko snovjo, izmenjujejo ione, se adsorbirajo na mineralne površine in glinene delce, vežejo vodik in tvorijo kompleksne ione, med katere prištevamo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} (Diaz-Cruz in sod., 2003). Potencial adsorpcije kemikalij na talne delce je običajno ocenjen s koeficientom porazdelitve tla/voda (K_d) (Wegst-Uhrich, 2014). Parametri tal, ki vplivajo na adsorbcijo so: vsebnost organskega ogljika, vsebnost glinenih delcev ter pH za ionizirajoče spojine. Modeli sorbcije na splošno domnevajo, da je koeficient porazdelitve tla/voda povezan z vsebnostjo organskega ogljika v tleh: $K_d = K_{oc} \times f_{oc}$, kjer je K_{oc} porazdelitveni koeficient med organskim ogljikom in vodo, f_{oc} pa vsebnost organskega ogljika. Vrednost K_{oc} lahko izračunamo tudi iz koeficienta porazdelitve med oktanolom in vodo (K_{ow}). K_{ow} odraža le hidrofobne interakcije in ne predstavlja natančno drugih fizikalnih in kemičnih lastnosti antibiotičnega ostanka, kot so elektrostatične interakcije, vodikove vezave in kationske izmenjave, ki se lahko močno razlikujejo s spremembami v pH, vsebnosti organske snovi in ionski jakosti (Tolls, 2001).

Večina protimikrobnih sredstev je ionizirana, zato je pH pomemben parameter pri upoštevanju njihove sorbcije na talne delce. Sorbcija kislih spojin, kot na primer klofibrinske kisline, naproksena, sulfonamidov, fluorokinolonov in salicilne kisline, je odvisna od pH. Naboj spojin je odvisen od pH-ja tal. Pri pH vrednostih nižjih od PZC (zero charge) mineralov, je površina pozitivno nabita in taka površina privlači anionske spojine (Dubus in sod., 2001). Če pa so vrednosti pH nad PZC, se zgodi nasprotno, celotna površina je negativno nabita in anionske spojine se odbijajo, kationske pa privlačijo (Kah in Brown, 2006). Ionska moč lahko zmanjšuje tudi negativni površinski naboj in poveča sorbcijo anionskih spojin (Sorption ..., 2005).

Organska snov v tleh zagotavlja specifična adsorpcijska mesta za organske spojine, ki so neodvisne od njihove polarnosti (Pignatello, 1998). Organska snov tal je negativno nabita, zato se pričakuje boljša sorbcija osnovnih farmacevtikov, saj so pri pH vrednosti tal take spojine prisotne v kationski obliki (npr. fluoksetin). Dubus in sod. (2001) so poročali o povečani sorbciji salicilne kisline in klofenceta z globino, ko se je zmanjšala organska snov v tleh. V isti študiji so ugotovili, da organska snov ne vpliva na sorbcijo ionizirajočih spojin. Ko opisujemo sorpcijske lastnosti nevtralnih organskih spojin, je organski ogljik v tleh najpomembnejši, vendar pa je njegova uporaba neprimerna za ionizirajoče spojine, ker lahko take spojine sorbirajo na druge sestavine tal (npr. glino, aluminijeve in železove okside/ hidrokside) (Dubus in sod., 2001).

Zaradi njihove majhnosti in velike specifične površine, imajo glineni minerali veliko sposobnost sorbcije (McGechan in Lewis, 2002). Adsorbcija spojin na glinenih površinah temelji na izmenjavi

kationov (Calvet, 1989). Znano je, da se fluorokinolni in tetraciklinski antibiotiki močno adsorptivno vežejo na glinene minerale (Nowara in sod., 1997), posledično je njihov potencial izpiranja manjši (Golet in sod., 2003). Sorbcija analgetikov, protivnetnih zdravil, beta zaviralca izopropanolola in sulfonamida, pa je šibkejša (Drillia in sod., 2005).

3.2 RAZGRADNJA V TLEH

Razgradnja protimikrobnih sredstev v tleh je pomemben proces in vključuje mikrobiološke, fotokemične ter kemične procese. Nekatera protimikrobna sredstva so v tleh bolj razgradljiva kot druga, lahko se razgradijo do osnovnih, neškodljivih spojin (ogljikov dioksid, voda,...), lahko pa pride do tvorbe novih komponent. Razgradnja antibiotikov v tleh je odvisna od številnih dejavnikov. Okoljski dejavniki, ki vplivajo na razgradnjo protimikrobnih sredstev v tleh so lastnosti tal (struktura, pH, tekstura, vsebnost organske snovi) ter podnebne razmere (temperatura in padavine) (Topp in sod., 2008). Njihova razgradnja v tleh je v splošnem biološko pogojena oziroma je rezultat mikrobni aktivnosti z encimskimi reakcijami (na primer hidroksilacija in oksidativna dekarboksilacija), lahko pa poteče tudi abiotsko, na primer kemijsko in foto-kemijsko. Foto-razgradnja lahko prispeva k splošnemu zmanjšanju vsebnosti ostankov antibiotikov predvsem v določenih vodnih okoljih. Predpostavlja se, da protimikrobna sredstva, ki v tla pridejo iz blata čistilnih naprav, gnoja ali gnojevke niso foto-razgradljiva, saj so svetlobi manj izpostavljena (Sengeløv in sod., 2003).

Topp in sod. (2008) so preučevali vpliv temperature, vsebnosti vode v tleh in organske snovi v tleh na razgradnjo naproksena. Obstojnost antibiotikov (oksitetraciklina, sarafloksacina) v tleh se, glede na preteklo literaturo, razlikuje v razponu od nekaj dni pa vse do 300 dni (Tasho in Cho, 2016). Bondarczuk in sod. (2016) predvidevajo, da se obstojnost antibiotikov pri nizkih temperaturah in odsotnosti svetlobe (v globjih plasteh tal) in v okolju, kjer so bolj prisotne organske snovi (blatu ali organskih tleh), povečuje.

Iz preglednice 1 je razvidno, da se tilozin v dvajsetih dneh pri temperaturah od 20 do 30°C popolnoma razgradijo. Redki antibiotiki se deloma razgradijo šele v 30 do 80 dneh. Na tem mestu ne smemo prezreti dejstva, da na biorazgradnjo poleg njihove dostopnosti, strukture in lastnosti tal, vpliva tudi temperatura. Kot je tudi razvidno iz preglednice 1, nižje temperature zmanjšujejo stopnjo razgradnje.

Preglednica 1: Podatki o biorazgradnji antibiotikov v različnih testnih sistemih (Kumar in sod., 2005)

BIORAZGRADNJA			
Antibiotik	Stopnja razgradnje (%)	Čas (dni)	Metoda
Ciprofloksacin	0	40	test v zaprtih steklenicah
Ofloksacib	0	40	OECD 301D
Metronidazol	5	40	ni podatka
Virginiamicin	12 do 40	64	aerobna inkubacija, 6 vzorcev tal, sobna temperatura
Klortetraciklin			tla z dodatkom gnojevke
30°C	56	30	
20°C	12	30	
4°C	0	30	
Bacitracin			tla z dodatkom gnojevke
30°C	71	30	
20°C	67	30	
4°C	77	30	
Tilozin			tla z dodatkom gnojevke
30°C	100	30	
20°C	100	30	
4°C	60	30	
Penicilin	36	40	OECD 301D

Zbirka nepovezanih raziskav o prisotnosti različnih antibiotikov, odkritih v gnojevki, tleh, rastlinah in površinskih vodah, je predstavljena v preglednici 2. V preglednici je vključena tudi dnevna sprejemljiva vrednost (ADI), določena glede na FDA, oziroma toleranca za posamezni antibiotik. Iz preglednice 2 je razvidno, da so vsebnosti antibiotikov v gnojevki izredno visoke, z vsakim nadaljnjim korakom razgradnje pa se aktivnosti antibiotikov zmanjšujejo. Na primer vsebnosti antibiotikov v vzorcih tal so približno 1000-krat nižje od vsebnosti, ki jih najdemo v gnojevki. To pomeni, da so vsebnosti antibiotikov (po nanašanju na zemljišča), ki jih najdemo v rastlinah in površinskih vodah, skoraj 100.000-krat nižje od tistih v gnojevki in med 20 do 100-krat nižje od vrednosti ADI oziroma tolerančne ravni, ki jih predpisuje FDA.

Preglednica 2: Vsebnosti antibiotikov v gnojevki, tleh, rastlinah, površinskih in podzemnih vodah (podatki iz Kumar in sod. 2005).

Antibiotik	c v gnojevki (mg/kg)	c v tleh (µg/kg)	polovična življenjska doba (dan/okolje)	stopnja razgradnje pri 20°C, % dni	c v rastlinah (vrst/c) ng/g	c v površinskih vodah (P) ali podzemnih vodah (POD) (µg/L)	FDA ADI oziroma toleranca
oksitetraciklin	0.82-19.0	<7	47 (sedimenti)	/	ne zaznано	0.07-1.34 (P)	25.00 µg/kg BW
tilozin	0.1-7.9	<10	3.3-8.1 (gnojevka)	100 30	ne zaznано	/	0.2 ppm
tetraciklin	0.04-24.0	86-172	/	/	ne testirano	0.11 (P)	25 µg/kg BW
klorotetraciklin	0.1-14.0	4.6-7.3	7-20 (gnojevka)	12 30	2.0-17.0	0.15 (P)	25 µg/kg BW
amprolium	0.0-77.0	/	/	30 90	ne testirano	/	0.5 ppm
sulfametazin	0.13-8.7	/	50-100* (sedimenti)	/	ne zaznано	0.076-0.22 ppb (POD)	0.1 ppm
sulfatiazol	v sledeh-12.4	/	50-100* (sedimenti)	/	ne zaznано	0.8 ppb (POD)	0.1 ppm

c=konzentracija, /= ne znano, *=vrednost za sulfadiazin, BW=telesna masa

3.1 ODTOK V POVRŠINSKE VODE IN IZPIRANJE V PODTALNICO

Antibiotiki se z mesta vnosa v okolje lahko prenašajo tako v podtalnico (z izpiranjem) kot v površinske vode (površinsko in lateralno odtekanje, erozija) (Burkhardt in sod., 2005). Stopnja prenosa antibiotikov v tleh je odvisna od več dejavnikov, in sicer lastnosti antibiotika, lastnosti tal (tekstura, vsebnost organske snovi, hidro-geološke značilnosti), časa uporabe gnojila in vremenskih razmer (padavine, temperatura) (Sarmah in sod., 2006).

Površinsko odtekanje predstavlja gibanje antibiotikov z vodo po nagnjenem terenu. Antibiotiki se s površinskim odtekanjem v okolje prenašajo kot spojine raztopljene v vodi ali vezani na erodirajoče delce tal. Do odtekanja pride tudi takrat, ko je vode na površini več kot se jo lahko infiltrira v tla. Z izpiranjem se antibiotiki skozi tla v podtalnico spirajo vertikalno s padavinami ali z namakalno vodo. Hitrost gibanja antibiotikov skozi talni profil je v veliki meri odvisna tudi od velikosti por v tleh (poroznosti tal). Manjše pore (mikropore) na prenos antibiotikov z gravitacijskim odtekanjem vplivajo manj kot večje pore (makropore) (Kay in sod., 2004). Burkhardt in soavtorji (2005) so v raziskavi ugotovili, da z inkorporacijo gnojevke v tla dosežemo manjše odtekanje antibiotičnih snovi v vodne vire. Pri polivanju gnojevke po travinju so ugotovili celo do dvakrat večje odtekanje v vodne vire.

Vodno okolje predstavlja končno točko odtokov s kmetijskih površin in iz čistilnih naprav, zato lahko deluje kot tako imenovano zbirališče za AMR (Williams in sod., 2016).

3.2 SPREJEM V RASTLINE

V literaturi obstaja veliko dokumentov, ki izpostavljajo občutljivost in absorpcijo antibiotikov iz namakalnih vod, gnojevke in aktivnega blata v rastlinsko biomaso (Kang in sod., 2013; Azanu in sod., 2016). Rastline (kot so pšenica, koruza, riž, zelena solata, zelje, špinaca, korenje, kumare,

paradižnik in krompir) lahko antibiotike iz rastnega medija črpajo skozi korenine in jih kopičijo v različnih rastlinskih tkivih (Schujit in sod., 2013).

Dokazano je bilo, da se v rastlinsko maso fitoekstrahira le peščica antibiotikov, in sicer sulfatiazol, sulfadiazin, sulfametazin, sulfadimetoksin, klorotetraciklin in trimetoprim (Tasho in Cho, 2016). Med antibiotiki, ki se lahko fitoekstrahirajo, so nekateri pokazali, da se lahko fitokoncentrirajo (Du in sod., 2016). Tisti, ki so sposobni fitokoncentracije, so teoretično lahko odporni v mikrobiomu rastline in organizmu, ki se s to rastlino prehranjuje, navkljub neselektivnim vsebnostim antibiotikov v okolju (Na in sod., 2013; Azanu in sod., 2016). Migliore in sod. (2010), so v svoji raziskavi ugotovili, da se različni rastlinski organi in tkiva drugače odzovejo na antibiotike. Toksično delujejo na glavne korenine in kotiledone, medtem ko internodiji in listi pri nizkih vsebnostih antibiotikov rastejo hitreje ter so toksični šele ob visokih vsebnostih.

Učinek kronične izpostavljenosti antibiotikom na vodnih rastlinah je zanemarljiv, vendar obstajajo dokazi, da določeni prisotni antibiotiki vplivajo na spremembo mikroflore v filozferi, ki imajo neznane ekološke posledice (Rico in sod., 2014). Prisotnost rastlin lahko pripomore k hitrejši razgradnji antibiotikov v tleh. Lee in sod. (2009) poročajo o uporabnosti fitomediacije (fitostabilizacija, fitotekstrakcija, fitovolatizacija in fitoakumulacija) pri odstranjevanju antibiotikov iz tal. Čeprav so posledice v rastlini prisotnih antibiotikov večinoma neznane, predvidevajo, da le-te obstajajo (Lee in sod., 2009).

4 RAZVOJ IN PRENOSI ODPORNIH GENOV V OKOLJU

Naravni antibiotiki naj bi se pojavili že pred 2 milijardama let. Prav tako je starodavna tudi odpornost na antibiotike. Širjenje ARG v okolju vsekakor ni nov pojav, saj so bili geni povezani z odpornostjo na antibiotike odkriti tako v naravnih kot industrijskih okoljih s povečanimi vsebnostmi antibiotikov že pred njihovo množično proizvodnjo (Sanderson in sod., 2016). Geni naravne odpornosti so poznani kot okoljski rezistom. Ti geni se lahko prenesejo iz bakterij, ki ne povzročajo bolezni, na tiste bakterije, ki bolezen povzročajo, kar vodi do klinično pomembne odpornosti na antibiotike (Wright, 2010).

Splošne značilnosti ARG-jev so primerljive s tradicionalnimi spojinami, ki jih uvrščamo med onesnaževalce okolja, vendar pa imajo nekatere posebne lastnosti, ki jih ne smemo prezreti. Najbolj edinstvena lastnost je njihov biološki izvor ter sposobnost prenosa skozi genske procese v številne organizme in na dolge razdalje. Za ARG ne obstajajo enotni viri kontaminacije, saj je širjenje in razvoj ARG lahko stranski proizvod številnih človeških dejavnosti, ki segajo vse od klinične uporabe antibiotikov do čiščenja odpadnih voda, kmetijstva in živinoreje (Sanderson in sod., 2016).

Z razvojem sekvenčne tehnologije je odkrivanje in kvantifikacija ARG v okolju postala hitrejša, hkrati pa raziskovalcem omogoča odkrivanje neznanih in neokarakteriziranih ARG. Odkritje novih genov je ključno za preprečevanje globalnega širjenja AMR, kljub vsemu pa zastrašujoče, ker se sooča z razvojem novih mehanizmov odpornosti in razširjanjem protimikrobno odpornih bakterij (AMB) in protimikrobno odpornih genov (ARGs) v okolju (Williams in sod., 2016). Povečano širjenje ARB v okolju verjetno povzročajo trije osnovni mehanizmi in njihove kombinacije: horizontalni genski prenos protimikrobno odpornih genov, genske mutacije in rekombinacije (obstoj hipermutiranih bakterijskih sevov) ter proliferacija ARB zaradi selektivnih pritiskov, ki jih povzročajo protimikrobne spojine in drugi osnaževalci, kot so biocidi in strupene kovine.

4.1 GENETSKI DEJAVNIKI IN MEHANIZMI PRENOSA GENOV POVEZANIH Z ARG

Genetske značilnosti odpornosti proti antibiotikom, kot na primer genetske mutacije ali pridobljena odpornost (prenesena iz druge bakterije), predstavljajo ovire za preprečevanje širjenja ARG. Poznanih je več genetskih mehanizmov, ki so odgovorni za nastanek odpornosti proti antibiotikom. Lahko vključujejo en sam gen ali nastanejo kot posledica večih genov. Odpornost je lahko tudi sekundarna funkcija, saj lahko vključuje gene, ki niso nujno povezani z odpornostjo na antibiotike, ampak se lahko razvijejo kot naključna mutacija in se nato preko genov prenesejo na druge organizme. Raznolikost mehanizmov prenosa in mobilni genski elementi (MGE) predstavljajo številne ovire pri preprečevanju širjenja ARG (Sanderson in sod., 2016).

Geni za odpornost proti antibiotikom se lahko prenašajo med mikroorganizmi relativno enostavno, in sicer preko horizontalnega prenosa genov, kot del naravnega adaptivnega procesa, lahko pa se generirajo z genetskimi mutacijami in rekombinacijami. Horizontalni prenos genov poteka z različnimi mehanizmi: transformacijo, transdukcijo in konjugacijo. Transformacija se pojavi, ko organizem sprejme eksogeni DNK fragment, medtem ko v procesu transdukcije bakteriofag vstavi svojo DNK v bakterijsko celico. Tekom konjugacije pa se DNK z neposrednim celičnim stikom preko multi-proteinskega kompleksa prenese iz donorske v akceptorsko celico. Vsi omenjeni mehanizmi sodelujejo pri prenosu genskih informacij iz okolja pri različnih bakterijskih vrstah (Sanderson in sod., 2016).

Horizontalni prenos genov je omejen ali podprt z ekološkimi in okoljskimi dejavniki, ki se razlikujejo glede na posamezno okolje. Med okoljske dejavnike uvrščamo razpoložljivost virov, gostoto in raznolikost mikrobne populacije. Okoljske dejavnike, ki vplivajo na horizontalni genski prenos, delimo na abiotske in biotske. Abiotski dejavniki vključujejo temperaturo, pH, vsebnost vlage, razpoložljivost mikro in makrohranil ter dostopnost kisika. Biotski dejavniki vključujejo plenjenje, pašo, antagonistične, tekmovalne in sintrofične organizme in rastline. Do horizontalnega genskega prenosa z visoko frekvenco prihaja, ko so v okolju ugodne razmere za kolonizacijo, mešanje in aktivnost bakterijske vrste (Sanderson in sod., 2016).

Prenosljive gene najdemo na mobilnih genskih elementih (MGE), vključno s plazmidi, transpozoni in integriromi ter bakteriofagi, v času transdukcije. Najbolj preučeni MGE so plazmidi, kljub temu, da gostiteljem zagotavljajo dodatne gene za nebitvene funkcije, lahko geni še vedno dajejo fenotip, ki je ugoden za gostitelja in mu zagotavlja prilagoditev na lokalno okolje in dejavnike. Plazmidi niso vključeni v kromosom prejemnika in se lahko prenesejo na nove gostitelje. Transpozoni so glavni dejavniki genske reorganizacije in lahko prenašajo gene na druga mesta na kromosomih, na plazmide ali fagno DNK za prenos v novo celico. Integriromi so pogosto del transpozonov in vsebujejo genetske determinante za rekombinacijo, specifično za posamezno mesto. Integriromi razreda I so najpogosteje povezani s prenosom ARG, saj prepoznajo, integrirajo in posredujejo reverzibilno gibanje genskih kaset. Genske kasete so fragmenti genskega materiala, ki lahko vsebujejo več ARG, geni pa se lahko nenehno preurejajo in prenašajo kot genske kasete na MGE. Raznolikost MGE in mehanizmi prenosa omogočajo, da se ARG nahajajo v številnih okoljih in različnih mikroorganizmih. Geni za odpornost proti antibiotikom se lahko razvijejo z naključno mutacijo in/ali kot posledica stresorjev oziroma drugih zunanjih vplivov, ki niso protimikrobna sredstva. Po vnosu se geni na določenem območju lahko kopičijo, kar predstavlja številne škodljive učinke na ekosistem, ki v okolju ustvarijo kompleksnejši problem (Sanderson in sod., 2016).

Sočasna selekcija genov, odpornih proti nevarnim kemikalijam (topila, biocidi, antibiotiki in kovine), je potencialen ekološki in klinično pomemben pojav. Do sočasne selekcije pride na dva načina: soodpornost, pri čemer izbira za en gen spodbuja vzdrževanje drugega odpornega gena, ki ne zahteva nujno selektivne prednosti za izbrano kemikalijo (Johnson in sod., 2016) in navzkrižna odpornost, kjer en odporni gen nudi zaščito pred mnogimi strupenimi kemikalijami (Curiao in sod., 2016).

Kljub temu, da kompostiranje zmanjšuje vsebnost antibiotikov, je nedavna raziskava pokazala 156 edinstvenih ARG in MGE-jev, ki po kompostiranju blata čistilnih naprav kodirajo odpornost proti skoraj vsem glavnim skupinam antibiotikov. Ugotovili so, da se spremembe v vzorcih ARG v bakterijskih skupnostih pojavljajo zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti pri kompostiranju. Posledično domnevajo, da bi uporaba kompostiranega aktivnega blata na polju verjetno povzročila širjenje ARG v tleh in širšem okolju (Su in sod., 2015). Calero-Cáceres in soavtorji (2014) so povzeli, da bi povečana razširjenost odpornih bakterijskih genov in bakteriofagnih frakcij po presnovi in uporabi obdelanega blata na kmetijskih površinah močno pripomogla k širjenju ARG v okolju. Po gnojenju s prašičjo gnojevko so Byrne in sod. ugotovili, da je stopnja integronov razreda 1 (intl1) v tleh povečana do nekaj mesecev (Byrne-Baily in sod., 2011). Prisotnost in spremembe rezistoma (t.j. skupka genov, ki v določenih organizmih izzove antimikrobno odpornost) po nanosu aktivnega blata, anaerobno razgrajenega blata ali kompostiranega blata, so šele pred kratkim postale ključne za razumevanje antimikrobne odpornosti (Dantes in Sommer, 2012). Raziskave ali antibiotiki in ARG vplivajo na zdravje talnega ekosistema so ključne za ugotavljanje okoljskih regulatorjev, ki spadajo v obseg vpliva na zdravje ljudi.

5 UKREPI ZA BLAŽENJE ŠIRJENJA AMR

Širjenje genov v okolje lahko omejita predvsem tehnologija in politika. Akademiki in politiki stremijo k višji ozaveščenosti širše javnosti in na ta način nižjemu vnosu protimikrobnih sredstev in AMR v okolje (Sanderson in sod., 2016). Širjenje AMR v okolju je moč omejiti z opredelitvijo kritičnih točk nadzora, izboljšanim rokovanjem z AMR, njihovo preiščeno in omejeno uporabo ter z razvojem novih protimikrobnih sredstev (Williams in sod., 2016).

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) v globalnem akcijskem načrtu navaja pet strateških ciljev za zmanjševanje AMR v okolju: izboljšanje ozaveščenosti in razumevanja AMR, znanje podkrepiti z nadzorom in raziskavami, optimizacija uporabe protimikrobnih sredstev, zagotoviti trajnostne naložbe v boju proti AMR, zmanjšanje možnosti okužb (Global ..., 2015).

Farmakološko aktivne sestavine (FAS) za antibiotike je potrebno izdelati tako, da onesnaževanje z ostanki FAS med proizvodnjo ostane minimalno. Obstaja vedno več dokazov, da temu ni tako. Večina proizvodnje FAS zaradi nizkih stroškov proizvodnje poteka na Kitajskem in v Indiji ter so od tam prodani farmacevtskim podjetjem po vsem svetu. Proizvodnja FAS v teh predelih predstavlja hudo breme za lokalno skupnost, saj odpadne odplake sproščene v okolico vsebujejo izredno povišane ravni FAS in njihovih metabolitov.

Preko ljudi, živali, živalskih proizvodov in pridelkov, se antibiotično odporne bakterije in geni ter ostanki antibiotikov, širijo po celem svetu. Preko onesnaženega kopenskega in vodnega okolja se AMR lahko razpršijo s pomočjo prosto živečih živali, vodnih tokov in vodnih živali. Za preprečevanje širjenja so predlagani že številni ukrepi. Za enega izmed prvih korakov velja preprečevanje širjenja humanih in veterinarskih antibiotikov, ki vstopajo v ekosistem. Vnos veterinarskih antibiotikov se lahko zmanjša s preventivnim managementom, zmanjševanjem

gostote živali, boljše krmo, zmanjševanjem stresa, gojenjem živine v naravnih pogojih in z omejitvijo uporabe samo na terapevtske antibiotike ter uporabo alternativnih substanc, kot so probiotiki, fitoterapevtiki in zelišča (Hume, 2011). Ključno vlogo igra tudi zmanjšanje uporabe antibiotikov v humani medicini preko ozaveščanja javnosti o težavah, ki jih povzročajo odpornost na antibiotike ter o pravilnem in zmernem kupovanju ter jemanju antibiotikov ter zavrženju neporabljenimi zdravili. ECDC (European Center for Disease Prevention Control) organizira dan ozaveščenosti na antibiotike, njihov poudarek je na težavah, ki jih povzročajo antibiotiki humane uporabe. Raziskovalci rešitev vidijo tudi pri spreminjanju potrošniških navad, saj ljudje še vedno preveč kupujejo sorazmerno poceni hrano, kar spodbuja prehrabno industrijo, da hrano proizvajajo čim ceneje in s tem spodbujajo intenzivno kmetijstvo z visoko uporabo antibiotikov.

5.1 ANAEROBNA RAZGRADNJA ŽIVINSKIH GNOJIL

Anaerobna razgradnja živinskih gnojil zmanjšuje vsebnost antibiotikov in odpornih organizmov na antibiotike, vendar jih ne odstrani popolnoma. Raziskave kažejo, da se pri anaerobni razgradnji zmanjšajo morebitni patogeni v gnojevki za več kot 99 %. Kljub vsemu pa obstaja verjetnost, da raven potencialnih patogenov ostane nad varno (Borchardt in sod., 2013). Harrison in soavtorji (2005) so ugotovili zmanjšanje potencialnih povzročiteljev bolezni z anaerobno razgradnjo za kar 98 %, vendar pa anaerobna razgradnja gnojnice ne odpravi vseh biološko nevarnih patogenov. Crolla (2010) je ugotovila 70-95 % zmanjšanje števila patogenov pri anaerobni razgradnji dveh mlečnih kmetij v Ontariju. *E. Coli* se je zmanjšal iz 1,6 milijonov na 30.000 CFU/100mL. Pandey in Soupir (2011) sta ugotovila, da se potencialni patogeni med anaerobno razgradnjo gnojke pri termofilnih (52,5°C) temperaturah uničijo v manj kot štirih dneh, pri 37°C v 40 dneh in pri 25°C v več kot 60 dneh.

5.1.1 Razgradnja antibiotikov

Razgradnja antibiotikov se poveča zaradi višjih temperatur in višje biološke aktivnosti (Masse in sod., 2014). Avtorji predvidevajo, da je termofilna razgradnja mnogo bolj učinkovita kot mezofilna. Antibiotiki se najbolj razgradijo med kompostiranjem, sledi anaerobna razgradnja, na koncu skladiščenje gnojil. Najpočasneje pa se razgrajujejo v tleh (Masse in sod., 2014). V zadnjih raziskavah na Kitajskem, so v odplakah anaerobne presnove prašičjega gnoja odkrili sedem antibiotikov in gene za odpornost na antibiotike (Zeng in sod., 2015).

5.1.2 Protimikrobna odpornost

Pri mezofilni razgradnji gnoja krav mlekaric se je potencialna patogenost zmanjšala, med anaerobno razgradnjo pa se protimikrobna odpornost ni spremenila (Resende in sod., 2014). Termofilna anaerobna razgradnja znatno zmanjšuje protimikrobno odpornost organizmov (Beneragama in sod., 2011). Ihara in soavtorji (2013) trdijo, da mezofilna anaerobna razgradnja živalskih gnojil, skupaj s kemično oksidacijo, zmanjša potencialne patogene in količino genov za protimikrobno odpornost. V šestih bioplinarnah v Nemčiji so Schauss in soavtorji (2014) ugotovili prisotnosti *E. Coli*, ki proizvaja ESBL. Sklepamo lahko, da se po anaerobni razgradnji živalskih gnojil tveganje za antibiotsko odpornost sicer zmanjšuje, a ni v celoti odpravljeno.

5.2 KOMPOSTIRANJE ŽIVINSKIH GNOJIL

Kompostiranje živinskih gnojil velja za eno boljših strategij za zmanjšanje protimikrobne odpornosti, preden se gnojevko uporabi za gnojenje kmetijskih površin. Patogeni organizmi, odporni na antibiotike, so med kompostiranjem hitro odstranjeni, medtem ko so geni protimikrobne odpornosti prisotni dlje časa (Masse in sod., 2014).

5.2.1 Usoda antibiotikov med kompostiranjem

Masse in soavtorji (2014) so ugotovili, da je kompostiranje učinkovitejše od anaerobne razgradnje in uporabe surove gnojnice direktno za gnojenje. Intenzivno kompostiranje s povečano razgradnjo zmanjša vsebnost treh antibiotikov, prisotnih v konjski in goveji gnojnici, in sicer klorotetraciklina, tilozina in monenzina (Storteboom in sod., 2007). Dolliver in soavtorji (2008) so poročali o več kot 99 % zmanjšanosti vsebnosti klorotetraciklina in 54-76 % zmanjšani vsebnosti monenzina in tilozina. Vsebnost sulfametazina se po 35 dneh kompostiranja ni zmanjšala.

5.2.2 Usoda antibiotično odpornih mikrobov med kompostiranjem

Skladen in skrbno nadzorovan proces kompostiranja, kjer je temperatura v vseh predelih naravnana na 55-60°C, uniči večino potencialno škodljivih in antibiotično odpornih mikrobov. Sharama in soavtorji (2009) so pri kompostiranju gnoja goveda izmerili znatno zmanjšanje *E. coli* odpornega proti tetraciklinu in ampicilinu, vendar so ugotovili, da so odporni geni prevladovali dlje časa. Gao in soavtorji (2015) so v raziskavi, opravljeni na Kitajskem, ugotovili, da se odpornost *E. coli* proti antibiotikom bistveno zmanjša v kompostiranem gnojilu v primerjavi s surovim prašičjim gnojem.

5.2.3 Usoda antibiotično odpornih genov pri kompostiranju

Kompostiran gnoj vsebuje za kar sedem redov manj AMG kot gnoj obdelan z drugimi tehnologijami, vključno z aerobno in anaerobno obdelavo (Chen in sod., 2010). Wang in soavtorji so poročali, da geni za odpornost na eritromicin in tetraciklin v 17 dneh kompostiranja bistveno upadejo, po 31 dneh kompostiranja prašičjega gnojila pa dramatično. Za zmanjšanje AMG v konjskem in kravjem gnoju je potrebno več kot šest mesečno kompostiranje (Stroorteboom in sod., 2007). Keen (2009) je v svoji raziskavi izmeril hitro izginotje patogenov med kompostiranjem gnoja iz perutninskega obrata, vendar se je vsebnost AMG za odpornost proti tetraciklinu zmanjšala zelo malo.

S kompostiranjem lahko nadzorujemo izvor odpornosti na antibiotike, brez da bi v živinoreji zmanjšali uporabo antibiotikov. Pruden in soavtorji (2013) priporočajo kompostiranje za zmanjšanje tveganj, povezanih z uporabo živalskega gnoja na zemljiščih. Marin in soavtorji (2014) pravijo, da je kompostiranje praktična metoda, ki lahko učinkovito odpravi patogene v gnojevki ali vsaj spodbudi zmanjšanje števila patogenih celic. Wang in soavtorji (2015) so sklenili, da je kompostiranje lahko učinkovit in praktičen pristop za zmanjšanje razširjanja antimikrobne odpornosti s prašičjih farm v okolje.

Pri določanju vsebnosti antibiotikov v tleh po uporabi gnojila je bilo opravljenih le nekaj raziskav. Iz preglednice 3 je razvidno, da antibiotiki ostanejo stabilni med skladiščenjem gnoja pred njegovo uporabo na kmetijskih površinah.

Preglednica 3: Vsebnosti izbranih antibiotikov v različnih živalskih gnojilih (Kumar in sod., 2005).

VRSTA oz. IZVOR GNOJA	ANTIBIOTIK	KONCENTRACIJA (mg/kg ali mg/L)	DRŽAVA
svinjina, govedo	tetraciklin	0.0005-200	ZDA
svinjska gnojnica	klortetraciklin	3.5-5.2	ZDA
	tilozin	3.3-7.9	
govedo	klortetraciklin	5.3	ZDA
	oksitetraciklin	11.3	
govedo			
svež	klortetraciklin	14.0	ZDA
Fstaran	klortetraciklin	0.34	
govedo	monenzin	1-5	Kanada
perutnina	klortetraciklin	23	Kanada
svinjska gnojnica	tetraciklin	20	Nemčija
svinjska gnojnica	tetraciklin	0.04-0.70	Danska
govedo (30- 135 dni)	oksitetraciklin	2-19	Italija
	tilozin	0.001-0.1	

6 ZAKLJUČEK

Uporaba antibiotikov in ostalih protimikrobnih sredstev za zdravljenje živine in ljudi predstavlja glavni razlog za prisotnost ostankov antibiotikov in antibiotično odpornih bakterij in genov v okolju. Različni razredi antibiotikov imajo različne vplive in posledice na okolje. Geni, odporni na antibiotike, se lahko na kmetijskih površinah zadržujejo več let po uporabi gnojevke. Številni avtorji so ugotovili pozitivne učinke pri tretiranju gnojevke z anaerobno razgradnjo in pri procesu kompostiranja, pred uporabo na kmetijskih zemljiščih, zato bi takšni ukrepi morali postati del vsakdanje prakse pri zmanjševanju protimikrobne odpornosti v okolju. Potrebna bi bila tudi ocena tveganja za prenos odpornosti proti antibiotikom na ljudi in živali, ko pridejo v neposreden stik s tlemi, tretiranimi z gnojevko, ter ko uživajo s protimikrobno odpornimi geni potencialno onesnažene pridelke, vzgojene na teh površinah.

Ko so antibiotiki že prisotni v okolju, pa lahko njihove vsebnosti zmanjšamo z vezavo na različne adsorbente in s pospešeno razgradnjo (bioremediacijo), metodi sta učinkoviti za zmanjševanje prisotnosti vsaj nekaterih razredov antibiotikov v okolju. Potrebno bi bilo izvesti natančne študije o pojavu in usodi širšega spektra farmacevtskih izdelkov; trenutno so v množični uporabi številna zdravila, okoljski podatki pa so na voljo le za nekatera. Nužen je razvoj natančnejših analitskih metod, ki bi omogočale odkrivanje širšega spektra antibiotikov v okolju pri realnih vsebnostih. Razpoložljiva znanja in podatke pa bi morali uporabiti za ovrednotenje obstoječih modelov izpostavljenosti protimikrobnim sredstvom in se osredotočiti na nadaljnji razvoj teh modelov, kar bi pripomoglo k boljšemu določanju okoljskih tveganj novih farmacevtskih izdelkov.

Ključno je pridobiti nova in podrobnejša znanja, ki bi pomagala razumeti vse kemične in okoljske lastnosti, ki vplivajo na sorbcijo, obstojnost, razgradnjo in kopičenje protimikrobnih sredstev v različnih okoljih. To znanje bi omogočilo razvoj modelnih pristopov za spremljanje dejanskega in

napovedovanje bodočega stanja ter obnašanja protimikrobnih sredstev za različne okoljske profile in razmere.

Nadzorovanje in preprečevanje vnosa odpornih sevov iz humane in veterinarske rabe v okolje je ključnega pomena za vzpostavitev nadaljnjih ukrepov za zmanjševanje vnosa. Glede na dosedanje znanje se zdi, da sta pravilna in preudarna uporaba antibiotikov in drugih protimikrobnih sredstev na vseh področjih bistvena za uspešno reševanje protimikrobne odpornosti v okolju in zmanjševanje tveganj za splošno javnost.

7 VIRI

- Ahel M., Jeličić I. 2001. Phenazone analgesics in soil and groundwater below a municipal solid waste landfill. V: *Pharmaceuticals and hair products in environment*. Daughton. C.G. and Jones-Lepp T. (ur.). Washington, American Chemical Society, l: 100–115
- Ahmad M., Vithanage M., Kim K., Cho J.-S., Lee Y. H., Joo Y. K. 2014. Inhibitory effect of veterinary antibiotics on denitrification in groundwater: a microcosm approach. *Scientific World Journal*, 2014, 879831, doi: 10.1155/2014/879831: 7 str.
- Alder A.C., McArdell C.S., Golet E.M., Ibrić S., Molnar E., Nipales N.S., Giger W. 2001. Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfanamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. V: *Pharmaceuticals and care products in the environment*. Daughton C.G., Jones-Lepp T. (ur.). Washington D.C., American Chemical Society: 56–69
- Amini S., Hottes A. K., Smith L. E., Tavazoie S. 2011. Fitness landscape of antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathology*, 7: e1002298, doi: 10.1371/journal.ppat.1002298: 13 str.
- Azanu D., Mortey C., Darko G., Weisser J. J., Styrišave B., in Abaidoo R. C. 2016. Uptake of antibiotics from irrigation water by plants. *Chemosphere*, 157: 107–114
- Berkner S., Konradi S., Schönfeld J. 2014. Antibiotic resistance and the environment—there and back again. *EMBO Reports*, 15, l: 740–744
- Berendsen B. J. A., Wegh R. S., Memelink J., Zuidema T., Stolker L. A. M. 2015. The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta*, 132, l: 258–268
- Beneragama N., Yusuke, M., Yamashiro T., Iwasaki M., Adekunle L.S., Umetsu K. 2011. The survival of cefazolin resistant bacteria in thermophilic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Journal of Agricultural Science and Technology, A*, 1: 1181–1186
- Bondarczuk K., Markowicz A., Piotrowska-Seget Z. 2016. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environmental International*, 87, l: 49–55
- Burkhardt M., Stamm C., Waul C., Singer H., Müller S. 2005. Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality*, 34, l: 1363–1371
- Byrne-Bailey K. G., Gaze W. H., Zhang L., Kay P., Boxall A., Hawkey P. M. 2011. Integron prevalence and diversity in manured soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, l: 684–687
- Cabello F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8, l: 1137–1144

- Cabello F. C., Godfrey H. P., Tomova A., Ivanova L., Dölz H., Millanao A. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15, 1: 1917–1942
- Calero-Cáceres W., Melgarejo A., Colomer-Lluch M., Stoll C., Lucena F., Jofre J. 2014. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions. *Environmental Science and Technology*, 48, 1: 7602–7611
- Calvet R. 1989 Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ Health Perspect*, 83, 1: 145–177
- Chen J., Michel Jr., F.C. Sreevatsan S., Morrison M., Yu Z. 2010. Occurrence and persistence of erythromycin resistance genes (erm) and tetracycline resistance genes (tet) in waste treatment systems on swine farms. *Microbial Ecology*, 60, 1: 479–486
- Chen C.-E., Zhang H., Ying G.-G., Zhou L. J., Jones K. C. 2015. Passive sampling: a cost-effective method for understanding antibiotic fate, behaviour and impact. *Environmental International*, 85: 284–291
- Collucci M., Bork H., Topp E. 2001 Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils (I - 17-beta estradiol and estrone). *Journal of Environmental Quality*, 30, 1: 2070–2076
- Crolla A. 2010. Assessment of environmental impacts from on-farm manure digesters. Presentation at IEA Bioenergy 2010.
http://task37.ieabioenergy.com/files/datenredaktion/download/publications/Workshops/1/Anna%20Crolla_Digestate%20Canada_.pdf (27. 5. 2010)
- Curiao T., Marchi E., Grandgirard D., León-Sampedro R., Viti C., Leib S. L. 2016. Multiple adaptive routes of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocide and antibiotic exposure. *BMC Genomics*, 17, 491, doi: 10.1186/s12864-016-2778-z: 16 str.
- De Paola A., Flynn P. A. McPhearson R. M., Levy S. B. 1988. Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline- and oxytetracycline-resistant *Aeromonas hydrophila* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 1: 1861–1863
- Díaz-Cruz M., S., Lopez de Alda M. J., Barceló D. 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soil, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 1: 340–351
- Díaz-Cruz S. Barcelo D. 2004. Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in wastewaters, sludge and sediments. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5, 1: 227–260
- Dolliver H., Gupta S., Noll S. 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *Journal of Environmental Quality*, 37, 1: 1245–1253
- Drillia P., Stamatelatos K., Lyberatos G. 2005. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere*, 60, 8, 1: 1034–1044
- Dubus I., G., Barriuso E., Calvet R. 2001. Sorption of weak organic acids in soils: clofencet 2,4-D and salicylic acid. *Chemosphere*, 45, 1: 767–774
- Friedman M. 2015. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 1: 3805–3822
- Gao L., Hu J., Zhang X., Wei L., Li S., Miao Z., Chai T. 2015. Application of swine manure on agricultural fields contributes to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* spread in Taiwan. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1: e313, doi: 10.3389/fmicb.2015.00313: 7 str.

- Gardner M., Jones V., Comber S., Scrimshaw M. D., Coello-Garcia T., Cartmell E. 2013. Performance of UK wastewater treatment works with respect to trace contaminants. *Science of Total Environment*, 45, 1: 359–369
- Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. (2015). Geneva, WHO: 19 str.
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193736/1/9789241509763eng.pdf?ua=1> (5. 5. 2015)
- Golet E., M., Xifra I., Siegrist H., Alder A. C., Giger W. 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental Science and Technology*, 37, 1: 3243–3249
- Guardabassi L., Dalsgaard A., Raffatellu M., Olsen J. E. 2000. Increase in the prevalence of oxolinic acid resistant *Acinetobacter spp.* observed in a stream receiving the effluent from a freshwater trout farm following the treatment with oxolinic acid-medicated feed. *Aquaculture*, 188, 1: 205–218
- Halling-Sørensen B., Sengeløv G., Tjørnelund J. 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 1: 263–271
- Harrison J. H., Hancock M., Gamroth D., Davidson J. L., Oak J., Evermann T. 2005. Evaluation of the pathogen reduction from plug flow and continuous feed anaerobic digesters. V: Symposium – state of the science animal manure and waste management: 6 str.
https://www.researchgate.net/profile/Tamilee_Nennich/publication/265988245_Evaluation_of_the_pathogen_reduction_from_plug_flow_and_continuous_feed_anaerobic_digesters/links/54ce91ca0cf29ca810fc7ef3/Evaluation-of-the-pathogen-reduction-from-plug-flow-and-continuous-feed-anaerobic-digesters.pdf (26. 8. 2018)
- Hume M. E. 2011. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poultry Science*, 90, 1: 2663–2669
- Ihara I., Yoshitake M., Toyoda K., Iwasaki M., Umetsu K. 2013. Risk reduction of antibiotic resistant bacterial by anaerobic digestion and electrochemical oxidation for manure application. *Bio-Robotics*, 1, doi: 0.3182/20130327-3-JP-3017.00054: 4 str.
- Johnson A. C., Sumpter J. P. 2016. Are we going about chemical risk assessment for the aquatic environment the wrong way?. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35, 1: 1609–1616
- Kah M., Brown C. 2006. Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 188, 1: 149–217
- Kang D. H., Gupta S., Rosen C., Fritz V., Singh A., Chander Y. 2013. Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 1: 9992–10001
- Kay P., Blackwell P. A., Boxall A. B. A. 2004. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1: 1136–1144
- Keen P.L. 2009. Seasonal dynamics of tetracycline resistance genes and antibiotics in a British Columbia agricultural watershed. PhD Thesis, University of British Columbia, Resource Management and Environmental Studies.
<https://open.library.ubc.ca/media/download/pdf/24/1.0067264/1> (13. 2. 2018)
- Kemper N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8, 1: 1–13
- Kinney C. A., Furlong E. T., Kolpin D. W., Burkhardt M. R., Zaugg S. D., Werner, S. L. 2008. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. *Environmental Science and Technology*, 42, 1: 1863–1870

- Klous G., Huss A., Heederik D. J. J., Coutinho R. A. 2016. Human–livestock contacts and their relationship to transmission of zoonotic pathogens, a systematic review of literature. *One Health*, 2, 1: 65–76
- Kumar K., Gupta, S. C., Chander Y., Singh A. K. 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy*, 87, 1: 1-54
- Kümmerer K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere*, 45, 1: 957–96
- Kümmerer K. 2004. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. 2. izd. New York: 499 str.
- Larsson D. G. J. 2014. Pollution from drug manufacturing: review and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Science*, e1656, doi: 10.1098/rstb.2013.0571: 8 str.
- Larsson J., Pedro C., Paxeus N. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Mater*, 148, 1: 751–755
- Lee H. Y., Lim J. E., Kwon K. K., Seo Y. H., Yang J. E., Ok Y. S. 2009. Removal of antibiotics in soil and water: a literature review. *Journal of Agricultural Life and Science*, 20, 1: 45–54
- Li B., Zhang T. 2010. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environmental Science and Technology*, 44, 1: 3468–3473
- Liu J., Zhao Z., Orfe L., Subbiah M., Call D. R. 2016. Soil-borne reservoirs of antibiotic-resistant bacteria are established following therapeutic treatment of dairy calves. *Environmental Microbiology*, 18, 1: 557–564
- Luo Y., Guo W., Ngo H. H., Nghiem L. D., Hai F. I., Zhang J. 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of Total Environment*, 47, 1: 619–641
- Marin J. M., Maluta R. P., Borges C. A., Beraldo L. G., Maesta S. A., Lemos M. V. F., Ruiz U. S., Ávila F. A. Rigobelo E. C. 2014. Fate of non O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ovine manure composting. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 1: 1771-1778
- Massé D. I., Cata Saady N. M., Gilbert Y. 2014. Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals*, 4, 1: 146-163
- McClellan K., Halden R. U. 2010. Pharmaceuticals and personal care products in archived U.S. biosolids from the 2001 EPA national sewage sludge survey. *Water Research*, 44, 1: 658–668
- McGechan M., B. Lewis D., R. 2002. Soil and water: transport of particulate and colloid sorbed contaminants through soil, part 1: general principles. *Journal of Biosystems Engineering*, 83, 1: 255–273
- Migliore L., Godeas F., De Filippis S. P., Mantovi P., Bonazzi G., Barchi D., Testa C., Rubattu N., Brambilla G. 2010. Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environmental Pollution*, 158, 1: 129–134
- Mitchell S. M., Subbiah M., Ullman J. L., Frear C., Call D. R. 2015. Evaluation of 27 different biochars for potential sequestration of antibiotic residues in food animal production environments. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3, 1: 162–169
- Na G., Fang X., Cai Y., Ge L., Zong H., Yuan X. 2013. Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian China. *Marine Pollution Bulletin*, 69, 1: 233–237
- Nowara A., Burhenne J., Spittler M. 1997. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1: 1459–1463

- List of antimicrobial agents of veterinary importance. 2015. Pariz, OIE: 9 str.
<https://www.oie.int/doc/ged/D9840.PDF> (1. 5. 2018)
- Occurrence of antibiotics in wastewater effluents and their mobility in soils: a case study for Wisconsin. 2003. Wisconsin, Wisconsin Department of Natural Resources and Wisconsin Department of Agriculture, Trade, and Consumer Protection: 18 str
<https://www.wri.wisc.edu/wp-content/uploads/FinalWR01R020.pdf> datum (10. 10. 2003)
- O'Neill J. 2015. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. 2015. The Review on Antimicrobial Resistance: 44 str.
<http://amrreview.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf> (8. 12. 2015)
- Oppel J., Broll G., Löffler D., Römbke J., Meller M., Ternes T. 2004. Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of Total Environment*, 328, 1: 265–273
- Pandey P. K., Soupir M. L. 2011. Escherichia coli inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, 1, doi: 10.1186/2191-0855-1-18: 18 str.
- Pig333.com.
https://www.pig333.com/articles/antibiotic-resistance-the-role-of-animal-production_12572 (3. 9. 2018)
- Pignatello J. J. 1998. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid Interface Science*, 76, 1: 445–467
- Polesel F., Lehnberg K., Dott W., Trapp S., Thomas K. V., Plósz B. G. 2015. Factors influencing sorption of ciprofloxacin onto activated sludge: experimental assessment and modelling implications. *Chemosphere*, 119, 1: 105–111
- Pruden A., Larsson D. G. J., Amézquita A., Collignon P., Brandt K. K., Graham D. V., Lazorchak, J. M., Suzuki S., Silley P., Snape J. R., Topp V., Zhang V., Guan Zhu Y. 2013. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environmental Health Perspectives*, 121, 1: 878-885
- Resende J. A., Silva V. L., De Oliveira T. L. R., De Oliveira Fortunato S. J., Da Costa Carneiro Otenio M. H., Diniz G. 2014. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*, 153, 1: 284–291
- Rico A., Dimitrov M. R., Van Wijngaarden R. P. A., Satapornvanit K., Smidt H., Van den Brink P. J. 2014. Effects of the antibiotic enrofloxacin on the ecology of tropical eutrophic freshwater microcosms. *Aquatic Toxicology*, 147, 1: 92–104
- Rivera-Utrilla J., Sánchez-Polo M., Ferro-García M. Á., Prados-Joya G., Ocampo-Pérez R. 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere*, 93, 1: 1268–1287
- Samuelsen O. B., Torsvik V., Ervik A. 1992. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Science of Total Environment*, 114, 1: 25–36
- Sandaa R. A., Torsvik V. L., Goksøyr J. 1992. Transferable drug resistance in bacteria from fish-farm sediments. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1: 1061–1065

- Sarmah A. K., Meyer M. T., Boxall A. B. A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65, 1: 725–759
- Schauss T., Glaeser S. P., Gütschow A., Dott W., Kämpfer P. 2014. Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure. *PLoS ONE*, 10, 1: e0119791, doi: 10.1371/journal.pone.0119791: 24 str.
- Sengeløv G., Agersø Y., Hallig-Sørensen B., Baloda S. B., Andersen J. S., Jensen L. B. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International*, 28, 1: 587–595
- Smith T. C., Gebreyes W. A., Abley M. J., Harper A. L., Forshey B. M., Male M. J. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. *PLoS ONE*, 8, 1: e63704, doi: 10.1371/journal.pone.0063704: 6 str.
- Sorption to soil of hydrophobic and ionic organic compounds: measurement and modelling. Ph.D. Dissertation. 2005. Utrecht, Utrecht University: 163 str.
<http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-0529-200329/index.htm> (28. 8. 2018)
- Storteboom H. N., Kim S. C., Doesken K. C., Carlson K. H., Davis J. G., Pruden A. 2007. Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low intensity manure management. *Journal of Environmental Quality*, 36, 1: 1695-703
- Su J. Q., Wei B., Ou-Yang W. Y., Huang F. Y., Zhao Y., Xu H. J. 2015. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. *Environmental Science and Technology*, 49, 1: 7356–7363
- Subirats J., Sánchez-Melsió A., Borrego C. M., Balcázar J. L., Simonet P. 2016. Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48, 1: 163–167
- Tasho R. P., Cho J. Y. 2016. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. *Science of Total Environment*, 56, 1: 366–376
- Ternes T., Bonerz M., Herrmann N., Teiser B., Andersen H. R. 2007. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: an option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, 66, 1: 894–904
- Thiele-Bruhn S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166, 1: 145–167
- Tolls J. 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science and Technology*, 35, 1: 3397–3406
- Topp E., Hendel J., G., Lu Z., Chapman R. 2006. Biodegradation of caffeine in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 86, 1: 533–544
- Topp E., Hendel J., Lapen D., Chapman R. 2008. Fate of the non-steroidal antiinflammatory drug naproxen in agricultural soil receiving liquid municipal biosolids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, doi: 10.1897/07-644.1: 5 str.
- Velagaleti R., Burns P. K., Gill M., Prothro J. 2002. Impact of current good manufacturing practices and emission regulations and guidances on the discharge of pharmaceutical chemicals into the environment from manufacturing, use, and disposal. *Environmental and Health Perspectives*, 110, 1: 213–220
- UK veterinary antibiotic resistance and sales surveillance. 2014. London, Veterinary Medicines Directorate: 99 str.

Urban waste water treatment in 2015. 2016. Irland, EPA- Ireland: 80 str.

https://www.epa.ie/pubs/reports/water/wastewater/2015%20urban%20waste%20water%20report_Web%20Version.pdf (28. 6. 2018)

Wang L., Gutek A., Grewal S., Michel Jr. F. C., Wu Z. 2015. Changes in diversity of cultured bacteria resistant to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon storage. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 1: e24541, doi: 10.1111/lam.12450: 6 str.

Wegst-Uhrich S. R., Navarro D. A. G., Zimmerman L., Aga D. S. 2014. Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal*, 8, 1: 5

Wichmann F., Udikovic-Kolic N., Andrew S., Handelsman J. 2014. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure. *Mbio*, 5, 1:e 01017, doi: 10.1128/mBio.01017-13: 9 str.

Williams R. T. 2005. Human health pharmaceuticals in the environment: an introduction. V: *Human pharmaceuticals: assessing the impacts on aquatic ecosystems*. Allen Press/ACG Publishing: 368 str.

Williams M. R., Stedtfeld R. D., Guo X., Hashsham S. A. 2016. Antimicrobial resistance in the environment. *Water Environmental Research*, 88, 1: 1951-1967

Wright G. D. 2010. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 1: 589–594

Yang S. F., Lin C. F., Wu C. J., Ng K. K., Lin A. Y. C., Hong P. K. A. 2012. Fate of sulfonamide antibiotics in contact with activated sludge—sorption and biodegradation. *Water Research*, 46, 1: 1301–1308

ZAHVALA

Prisrčna hvala mentorici doc. dr. Marjetki Suhadolc za ves čas in strokovno pomoč pri pripravi in izdelavi diplomske naloge. Najlepša hvala za vse nasvete, podrobno branje in predvsem za vse spodbudne besede.

Hvala vsem najbližnjim, ki ste mi stali ob strani vsa leta študija.