

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Alena Juračková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití řas k odstraňování léčiv z vod
Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Alena Juračková**
Osobní číslo: **C23305**
Studijní program: **N0711A130014 Udržitelný rozvoj v chemii a technologii**
Téma práce: **Využití řas k odstraňování léčiv z vod**
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku léčiv ve vodách a možnost jejich odstranění pomocí řas. Z léčiv zaměřte svou pozornost zejména na antibiotika.
2. V laboratorních podmínkách na modelových odpadních vodách experimentálně ověřte možnost odstranění 3-4 vytipovaných léčiv pomocí řas.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a pokuste se zhodnotit možnost využití řas k redukci léčiv ve vodách.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **Ing. Marek Tykva**

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Liběna Tetřevová, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 5. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití řas k odstraňování léčiv z vod 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 7. 5. 2025

Alena Juračková v.r.

Diplomová práce vznikla za podpory projektu Modernizace praktické výuky a zkvalitnění praktických dovedností v technicky zaměřených studijních programech, reg. číslo CZ.02.2.67/0.0/0.0/16_016/0002458 operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání. Tento projekt je spolufinancován Evropskou unií.

Diplomová práce vznikla v rámci řešení projektu „Využití mikrořas k redukci množství antibiotik, rezistentních bakterií a genů rezistence v digestátu ze zemědělských bioplynových stanic“, reg. číslo SS07020305 v rámci 7. veřejné soutěže Programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací v oblasti životního prostředí - Prostředí pro život, TA ČR.

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, přínosné rady a vstřícný přístup po celou dobu jejího zpracování. Dále bych ráda poděkovala Ing. Marku Tykvovi za pomoc během experimentální části i s následnými korekturami. Poděkování patří také Ing. Michalu Kašparovi, Ph.D., za provedení analýz antibiotik, které byly nedílnou součástí všech experimentů.

V neposlední řadě děkuji své rodině, přátelům a partnerovi za podporu a pochopení nejen během celého studia, ale zejména v jeho závěrečných týdnech.

ANOTACE

Tato práce se zabývá možnostmi využití sladkovodních mikrořas k odstraňování antibiotik z vod. Antibiotika patří mezi časté kontaminanty životního prostředí, které mohou mít nepříznivý vliv na ekosystémy i lidské zdraví. V posledních letech se výzkum intenzivně zaměřuje na vývoj účinných a šetrných metod jejich eliminace z různých složek životního prostředí. Bioremediace pomocí řas se zdá být perspektivní a environmentálně přívětivý přístup k této problematice.

V rámci experimentální části byly vybrány druhy sladkovodních mikrořas, a to *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* a *Pseudokirchneriella subcapitata*, použity k degradaci čtyř antibiotik z různých terapeutických skupin (ampicilin, ciprofloxacin, chloramfenikol, tetracyklin) v modelových odpadních vodách. Výsledky prokázaly, že některé druhy mikrořas dokážou významně snižovat množství antibiotik ve vodě. Účinnost je kromě použitého druhu mikrořasy ovlivněna též druhem a koncentrací léčiva, intenzitou záření a dalšími vlivy.

KLÍČOVÁ SLOVA

Emerging contaminants; zelené mikrořasy; antibiotika; odstranění antibiotik; fykoremediace; digestát

TITLE

Algae utilization for removal of pharmaceuticals from water

ANNOTATION

This thesis explores the potential of freshwater microalgae to remove antibiotics from water. Antibiotics are common environmental contaminants that can have adverse effects on ecosystems and human health. In recent years, research has focused intensively on developing effective and environmentally friendly methods for their elimination from various environmental compartments. Algae-based bioremediation appears to be a promising and sustainable approach to this issue.

In the experimental part, selected species of freshwater microalgae, namely *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, were used to remove four antibiotics from different therapeutic groups (ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol, tetracycline) in model wastewaters. The results showed that some microalgae species can significantly reduce antibiotic concentrations in water. The efficiency depends not only on the algal species used but also on the type and concentration of the antibiotic, light intensity, and other factors.

KEYWORDS

Emerging contaminants; green microalgae; antibiotics; antibiotic removal; phycoremediation; digestate

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	11
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Emerging contaminants.....	17
1.1.1 Rizika pro ekosystémy i člověka	19
1.1.2 Přírozená degradace	22
1.1.3 Analytické stanovení kontaminantů	23
1.2 Antibiotika.....	24
1.2.1 Ampicilin	26
1.2.2 Ciprofloxacin	29
1.2.3 Chloramfenikol	31
1.2.4 Tetracyklin	34
1.2.5 Negativní důsledky přítomnosti antibiotik v životním prostředí	37
1.2.6 Detekovaná množství antibiotik ve vodách.....	40
1.2.7 Degradace a odstraňování antibiotik	42
1.2.8 Regulace přítomnosti antibiotik v prostředí v rámci Evropské unie.....	43
1.3 Zelené mikořasy.....	45
1.3.1 Interakce kontaminantů s mikrořasami	47
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	52
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	53
3.1 Příprava roztoků antibiotik.....	54
3.2 Příprava živného média.....	55
3.3 Kultivace řas.....	56
3.4 Stanovení chlorofylu a biomasy	57
3.5 Stanovení koncentrace antibiotik.....	58
3.6 Vyhodnocení účinnosti degradace léčiv	58
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	61
4.1 Degradace pomocí řasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	61
4.2 Degradace pomocí řasy <i>Chlorella vulgaris</i>	66
4.3 Degradace pomocí řasy <i>Chlorella kessleri</i>	70
4.4 Degradace pomocí řasy <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	73

4.5	Degradace pomocí řasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> v modelové odpadní vodě na bázi digestátu	77
5	ZÁVĚR	82
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
7	PŘÍLOHY	99

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Struktura ampicilinu	27
Obrázek 2: Struktura ciprofloxacinu	30
Obrázek 3: Struktura chloramfenikolu	32
Obrázek 4: Struktura tetracyklinu	35
Obrázek 5: Buněčná struktura řasy rodu <i>Chlorella</i>	46
Obrázek 6: Buněčná struktura řasy rodu <i>Chlamydomonas</i>	46
Obrázek 7: Mikroskopický snímek <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	54
Obrázek 8: Mikroskopický snímek <i>Chlorella</i> spp.....	54
Obrázek 9: Mikroskopický snímek <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	54
Graf 1: Nárůst biomasy – <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	62
Graf 2: Změna turbidity – <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63
Graf 3: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	63
Graf 4: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	64
Graf 5: Degradace antibiotik v BBM – <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	65
Graf 6: Nárůst biomasy – <i>Chlorella vulgaris</i>	66
Graf 7: Změna turbidity – <i>Chlorella vulgaris</i>	67
Graf 8: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, <i>Chlorella vulgaris</i>	68
Graf 9: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, <i>Chlorella vulgaris</i>	69
Graf 10: Degradace antibiotik – <i>Chlorella vulgaris</i>	69
Graf 11: Nárůst biomasy – <i>Chlorella kessleri</i>	70
Graf 12: Změna turbidity – <i>Chlorella kessleri</i>	71
Graf 13: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, <i>Chlorella kessleri</i>	72
Graf 14: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, <i>Chlorella kessleri</i>	72
Graf 15: Degradace antibiotik – <i>Chlorella kessleri</i>	73
Graf 16: Nárůst biomasy – <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	74
Graf 17: Změna turbidity – <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	75
Graf 18: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	75
Graf 19: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	76
Graf 20: Degradace antibiotik – <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	76
Graf 21: Nárůst biomasy v odpadní vodě na bázi digestátu – <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	77

Graf 22: Změna turbidity v odpadní vodě na bázi digestátu – Chlamydomonas reinhardtii....	78
Graf 23: Stanovení chlorofylu v odpadní vodě na bázi digestátu dle rovnic 1–3, Chlamydomonas reinhardtii.....	79
Graf 24: Stanovení chlorofylu a karotenoidů v odpadní vodě na bázi digestátu dle rovnic 4–6, Chlamydomonas reinhardtii.....	79
Graf 25: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – Chlamydomonas reinhardtii	80
Graf 26: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – Chlamydomonas reinhardtii, směsný vzorek E1	81
Graf 27: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – Chlamydomonas reinhardtii, směsný vzorek E2	81

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Příklady léčiv patřících do jednotlivých skupin dle podílu léčiva vyloučeného v nezměněné podobě	19
Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti ampicilinu	28
Tabulka 3: Toxikologická data ampicilinu.....	28
Tabulka 4: Fyzikálně-chemické vlastnosti ciprofloxacinu	30
Tabulka 5: Toxikologická data ciprofloxacinu.....	30
Tabulka 6: Ekotoxikologická data ciprofloxacinu	31
Tabulka 7: Fyzikálně-chemické vlastnosti chloramfenikolu	33
Tabulka 8: Toxikologická data chloramfenikolu.....	33
Tabulka 9: Ekotoxikologická data chloramfenikolu	34
Tabulka 10: Fyzikálně-chemické vlastnosti tetracyklinu	35
Tabulka 11: Toxikologická data tetracyklinu.....	36
Tabulka 12: Ekotoxikologická data tetracyklinu	37
Tabulka 13: Hodnoty EC ₅₀ pro řasu <i>Chlorella vulgaris</i> (96 h)	38
Tabulka 14: Účinnost mikrobiální biodegradace ciprofloxacinu a tetracyklinu.....	51
Tabulka 15: Specifikace použitých antibiotik.....	55
Tabulka 16: Složení BBM média	55
Tabulka 17: Vysvětlení symbolů použitých pro značení jednotlivých vzorků	56
Tabulka 18: Vstupní data pro příklad vyhodnocení degradace ciprofloxacinu	59

SEZNAM ZKRATEK

AMR	Antimikrobiální rezistence
AP NAP	Akční plán Národního antibiotického programu
ARGs	Geny antibiotické rezistence
BAF	Bioakumulační faktor
BG11	Živné médium
CZEPAR	Česká platforma antibiotické rezistence
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DAD	Detekce pomocí diodového pole
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECs	Emerging contaminants
EC ₅₀	Účinná koncentrace pro 50 % jedinců
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EPS	Extracelulární polymerní látky
EU	Evropská unie
FL	Fluorescenční detekce
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	Koncentrace látky způsobující inhibici 50 %
kg _{dw}	Kilogram sušiny
K _{ow}	Rozdělovací koeficient oktanol–voda
LC ₅₀	Letální dávka pro 50 % jedinců
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDLO	Nejnižší smrtelná dávka
LLE	Extrakce kapalina–kapalina
LOAEL	Nejnižší dávka, při které byl pozorován nežádoucí účinek
LPME	Mikroextrakce v kapalně fázi
MAE	Mikrovlnná extrakce

MS	Hmotnostní spektrometrie
mRNA	Mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> rezistentní na methicilin
NADPH	Nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
NOAEL	Nejvyšší dávka, při které nebyl pozorován nežádoucí účinek
NOEC	Nejvyšší koncentrace v prostředí, při které nebyl pozorován žádný účinek
OECD	Živné médium dle standardů Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PLE	Tlaková kapalinová extrakce
PM ₁₀ a PM _{2,5}	Tuhé částice o průměru menším než 10, resp. 2,5 μm
PPCPs	Léčiva a složky kosmetických přípravků
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SBSE	Sorpční extrakce na míchadélku
SPE	Extrakce na tuhé fázi
SPME	Mikroextrakce na tuhé fázi
TDLO	Nejnižší známá toxická dávka
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UAE	Extrakce pomocí ultrazvuku
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové záření

ÚVOD

Kosmetika, přípravky osobní hygieny, plasty či léčiva. Nejen to jsou v dnešní společnosti každodenně používané produkty, jejichž složky představují zdroj kontinuální kontaminace životního prostředí. Přestože se dnes běžně sleduje složení a množství odpadních proudů z průmyslových i komunálních zdrojů a společně s tím i vstupy různých polutantů do životního prostředí, stále existuje řada látek, které nejsou běžně monitorovány a často ani regulovány. Důvodem může být jejich donedávna neznámý či podceňovaný nepříznivý vliv na životní prostředí, případně náročná detekce, jelikož tyto látky bývají v životním prostředí přítomny ve velmi nízkých koncentracích [1]. Tato skupina látek bývá označována anglickým slovním spojením *emerging contaminants*. Tyto látky se vyznačují svou biotoxicitou, persisterací a schopností bioakumulace. Mohou narušovat růst, reprodukci i chování širokého spektra flory i fauny [2]. Ovlivňují vodní ekosystémy, rostliny, akumulují se v potravním řetězci, čímž nepříznivě ovlivňují i živočichy a člověka. V posledních dekadách se však těmto kontaminantům věnuje větší pozornost a provádí se široký výzkum týkající se jejich výskytu ve všech složkách životního prostředí a možností jejich odstraňování. Nicméně tradiční způsoby čištění používané v čistírnách odpadních vod nejsou pro odstraňování těchto látek dostačující [2; 3]. Mezi tyto polutanty patří mimo jiné pesticidy, endokrinní disruptory či farmaceuticky aktivní látky. Zvláštní pozornost je v poslední době věnována antibiotikům, kterým se bude blíže věnovat tato diplomová práce. Antibiotika se do vodního prostředí dostávají především v důsledku jejich širokého používání a nedostatečného odstranění v běžných čistírenských procesech. Přítomnost antibiotik v životním prostředí představuje závažné riziko zejména kvůli podpoře vzniku a šíření antibiotické rezistence.

S rostoucím povědomím o rizicích spojených s výskytem antibiotik i dalších biologicky aktivních látek v životním prostředí se široce rozvíjí výzkum zaměřený na jejich odstraňování. Uplatňují se pokročilé oxidační procesy, enzymatické degradace, nanomateriály nebo bioremediační techniky, které využívají k odstraňování kontaminantů rostliny či mikroorganismy. V tomto směru se stále více uplatňují mikrořasy, zejména zástupci tzv. zelených mikrořas (*Chlorophyta*). Řasy jakožto zástupci nižších zelených rostlin a součást fytoplanktonu jsou významnou součástí globálního ekosystému. Vyznačují se rychlým růstem a vysokou citlivostí k velkému množství látek. Z toho důvodu se využívají při ekotoxikologickém testování látek, přičemž se hodnotí inhibice růstu či změny ve fotosyntetické aktivitě. Dále se řasy využívají právě při odstraňování kontaminujících látek z vodního prostředí. Tento proces se označuje jako fykoremediace [4].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Emerging contaminants

Pojem *emerging contaminants* (ECs) označuje syntetické i přírodní látky, které jsou kontinuálně přiváděny do životního prostředí, nejsou běžně monitorovány a mají potenciál nepříznivě působit na ekosystémy či lidské zdraví. Do životního prostředí vstupují kontinuálně kvůli jejich hojnému používání v průmyslu, zemědělství nebo domácnostech a tento jejich vstup do prostředí je v současnosti regulován zcela nedostatečně. Lze mezi ně zařadit povrchově aktivní látky, léčiva, hormonální látky, kosmetické a hygienické produkty, zpomalovače hoření, pesticidy, přísady pohonných hmot a další. Léčiva a složky kosmetických přípravků bývají souhrnně označovány zkratkou PPCPs vycházející z anglického *pharmaceuticals and personal care products*. Tyto kontaminanty se do vodního prostředí dostávají skrze splaškové vody, exkrecí, nevhodnou likvidací či prostřednictvím nehod a úniků. Kvůli tomu, že jsou do prostředí vnášeny neustále a kontinuálně bývají tyto polutantů označovány jako „pseudopersistentní“ [2; 5].

V odborné literatuře se lze také setkat s pojmem *contaminants of emerging concern*, který bývá často užíván jako synonymum k *emerging contaminants*. V některých případech se však tyto pojmy rozlišují. *Emerging contaminants* označují nové látky vstupující na trh a následně do životního prostředí, u nichž se již od počátku předpokládají potenciálně nepříznivé ekotoxikologické účinky, zatímco pojem *contaminants of emerging concern* zahrnuje i dobře známé látky, které jsou používány již několik let, avšak rizika spojená s jejich přítomností v životním prostředí byla dříve neznámá či podceňovaná [5; 6].

ECs bývají ve vodách přítomny ve stopových množstvích v rozmezích ng/l až µg/l [7]. Ačkoliv se tyto koncentrace mohou zdát zanedbatelně nízké, u některých sloučenin (např. ethinylestradiol) bylo prokázáno, že narušují funkci žláz s vnitřní sekrecí a způsobují patologické změny u ryb (*Danio rerio*) ve vývojové fázi již při koncentracích 10 ng/l [8].

Osud většiny těchto látek po vstupu do vodního prostředí není zcela jasný. Ovlivňujícími faktory jsou vlastnosti dané sloučeniny, vlastnosti konkrétního vodního systému, jakým způsobem a kdy sloučenina vstoupila do životního prostředí, dále pak vliv biotického i abiotického rozkladu nebo vazba látky na pevné částice [9]. Ve vodním prostředí se totiž kontaminanty mohou vázat na nerozpuštěné látky nebo sedimenty. Např. tetracyklin má vyšší tendenci se takto vázat v porovnání s jinými antibiotiky jako jsou sulfonamidy či chinolony. Tato adsorpce na tuhý materiál napomáhá transportu kontaminantů ve vodním prostředí [9].

Těkavé kontaminanty se mohou odparem z povrchových vod, čistíren odpadních vod nebo jako emise při výrobě či spalování dostat do atmosféry. Mezi tyto kontaminanty patří např. endokrinní disruptory, jako dibutylftalát nebo nonylfenol, které se mohou vázat na tuhé částice v ovzduší (PM₁₀ a PM_{2,5}). Tyto asociáty pak mohou vstupovat do respiračního systému a mít negativní vliv na zdraví živočichů i člověka. Ve vzduchu vnitřních prostor byly naměřeny vyšší koncentrace těchto látek (až v řádu µg/m³) než v prostorech venkovních (desítky ng/m³) [10]. Do atmosféry mohou vstupovat také např. herbicidy v důsledku jejich aplikace rozprašováním [9].

Některé kontaminanty mohou přetrvávat a akumulovat se v půdě a půdní biotě a tím nepříznivě ovlivňovat dané ekosystémy – bakterie a houby, prvoky, bezobratlé i rostliny. Hlavními přímými vstupy kontaminantů do půdy jsou likvidace odpadů, výluhy ze skládek, úniky odpadních vod a chov skotu. Nepřímo se pak může půda kontaminovat prostřednictvím mokré či suché depozice z atmosféry. Z povrchu pak kontaminanty mohou přes půdní profil pronikat až k podzemní vodě [6].

Farmaceuticky aktivní látky se do prostředí primárně dostávají z komunálních odpadních vod či odpadních vod z nemocnic a farmaceutických výrobních závodů [11]. V životním prostředí mohou mít tyto z podstaty bioaktivní látky negativní dopad na živé organismy, včetně člověka, jelikož se mohou dostat do povrchových i podzemních vod a následně i do vody pitné [12].

Léčiva v těle nejsou často kompletně metabolizována a je tedy z těla vyloučen určitý podíl farmaceuticky aktivní látky v nezměněné formě. Dle toho, jaký podíl farmaceuticky aktivní látky se vyloučí v nezměněné podobě, lze tyto látky rozdělit do čtyř skupin. Tabulka 1 uvádí několik příkladů tohoto rozdělení. U některých léčiv může být vyloučeno a vneseno do odpadních vod v nezměněné formě až 95 % podané dávky léčiva. Takto vstupují do čistíren odpadních vod a jelikož většina léčiv není v čistírnách odpadních vod kompletně odstraněna, vstupují pak dále do životního prostředí [13].

Tabulka 1: Příklady léčiv patřících do jednotlivých skupin dle podílu léčiva vyloučeného v nezměněné podobě [13]

Podíl vyloučený v nezměněné formě			
Nízký (<5 %)	Středně nízký (6–39 %)	Relativně vysoký (40–69 %)	Vysoký (≥70 %)
Paracetamol	Diklofenak	Trimethoprim	Amoxicilin
Karbamazepin	Ampicilin	Atropin	Tetracyklin
Aspirin	Sulfamethoxazol		Ciprofloxacín
Chloramfenikol	Lidokain		

1.1.1 Rizika pro ekosystémy i člověka

Jedním typem ECs jsou pesticidy, které představují hlavní zdroj kontaminace půdy, avšak běžně se vyskytují i ve vodním prostředí. Pesticidy mohou být v životním prostředí degradovány chemickou (fotolýza, hydrolyza, oxidace, redukce) či mikrobiologickou cestou. Některé degradační produkty mohou mít vyšší mobilitu či být více toxické než původní molekula. Toxický účinek pesticidů spočívá v narušení funkce neurotransmiterů, narušení hormonálních funkcí a tvorbě oxidativního stresu. Dlouhodobá expozice pesticidů může vést k narušení endokrinního systému a metabolismu u dospělých ryb a k poklesu jejich populace. Pesticidy rovněž způsobují chronický stres u korýšů, řas, hmyzu a ryb. Významným stresorem pro vodní ekosystémy je např. herbicid diuron, jehož koncentrace ve vzorcích vod po povodních v Izraeli dosáhla dle studie z roku 2020 hodnoty 55 µg/l [6; 11; 14]. V Evropské unii je diuron zařazen na seznamu prioritních látek, které představují riziko pro vodní prostředí a je u nich potřeba nastavit hodnoty mezních koncentrací [15]. Ve studii z roku 2008 bylo hodnoceno riziko avermektinů na půdní organismy. Avermektiny jsou fermentační produkty bakterie *Streptomyces avermitilis*, které se pro svůj insekticidní účinek používají v zemědělství a jako anthelmintikum (léčivo proti parazitům) ve veterinární medicíně. Jedním z testovaných organismů byl druh žížaly *Eisenia andrei*. Hodnota smrtelné koncentrace pro 50 % jedinců testované populace (LC₅₀, z angl. *lethal concentration 50 %*) byla uvedena v mg/kg vysušené půdy (dolní index dw, z angl. *dry weight*). Pro abamectin byla tato hodnota 18 mg/kg_{dw}, pro doramectin 228 mg/kg_{dw} [16].

PPCPs mohou u obratlovců narušovat hormonální systém, způsobovat inhibici enzymů, oxidativní stres, histologické i cytologické změny. Ve studii z roku 2013 byly pozorovány

cytotoxické účinky na druh sladkovodního mlže (*Dreissena polymorpha*) pěti různých látek v koncentracích v rozmezí 154–318 ng/l během 96 hodin [11; 17].

Jelikož léčivé látky jsou cíleně biologicky aktivní, tedy i vysoce biologicky dostupné a často též perzistentní, jsou potenciálně velmi nebezpečné pro necílené organismy, a to i v malých dávkách. Například léčivé látky obsahující atom fluoru mají významně vyšší lipofilitu a metabolickou stabilitu oproti analogům bez atomu fluoru, což zvyšuje jejich klinickou účinnost, ale i potenciální negativní vliv na ekosystémy. Mezi léčiva obsahující ve své molekule fluor patří např. ciprofloxacin, levofloxacin, flunitrazepam či efavirenz. U léčiva sitagliptin, jehož molekula obsahuje několik atomů fluoru, byla prokázána karcinogenita u myší a potkanů [11].

PPCPs nejsou nynějšími technologiemi v čistírnách odpadních vod dostatečně odstraňovány. Autoři studie z roku 2018 z České republiky, která sledovala obsah těchto látek v řece Jizeře na několika místech po dobu dvou let, zjistili, že ze 44 analyzovaných látek byla koncentrace 18 sloučenin v toku za čistírnou odpadních vod v Mladé Boleslavi vyšší a pouze u třech sloučenin nižší než před čistírnou. Koncentrace zbylých látek byly srovnatelné před i za čistírnou. Sloučeniny, jejichž obsah se snížil, byly diklofenak, sacharin a paracetamol [18].

Také studie z roku 2020 z České republiky sledovala obsah PPCPs ve vodě. Konkrétně sledovala koncentrace 112 léčiv, jejich metabolitů a dalších kontaminantů v letech 2017–2019 na přítocích vodní nádrže Švihov. Tato nádrž je zdrojem pitné vody pro obyvatele Prahy a okolí. V jednotlivých přítocích byly koncentrace různé, což je pravděpodobně dáno různým průtokem vody a efektivitou jednotlivých čistíren odpadních vod. Nejčastěji detekovanými látkami ve vysokých koncentracích byly acesulfam, azithromycin, kofein, gabapentin, hydrochlorothiazid, ibuprofen a jeho metabolity, oxypurinol, paraxantin a sacharin. Méně časté, ale stále přítomné byly iopromid, metoprolol, paracetamol a tramadol. Koncentrace velké části látek se snížila vlivem zadržetí vody v nádrži (doba zadržetí bývá 413 dní). Poté byla také analyzována již upravená pitná voda. Autoři studie ji zhodnotili jako vysoce kvalitní, jelikož obsahovala menší množství těchto kontaminantů, z nichž většina byla pod mezí detekce nebo ve velmi nízkých koncentracích. Avšak na koncentraci některých látek neměla zádrž vody v nádrži ani procesy úpravy vody významný vliv. Jednalo se např. o estron, progesteron, chloramfenikol, oxypurinol či sulfamerazin [19].

Mezi ECs lze kvůli jejich všudypřítomnosti a potenciálním nežádoucím účinkům zařadit i mikroplasty. Ty jsou schopny adsorbovat různé organické i anorganické látky, čímž usnadňují

přenos znečišťujících látek v ekosystémech. V interakci s fytoplanktonem snižují hustotu buněk i obsah chlorofylu, čímž je snížen příjem CO₂ a absorpce živin. Také mohou narušovat buněčné membrány, způsobují oxidativní stres a vyvolávají zánět. V koncentracích mezi 0,05–10 mg/l také zvyšují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), což bylo pomocí *in vitro* studií spojeno s letálními účinky na mozkovou tkáň. V lidském těle mohou pronikat do kapilár a narušit hemato-encefalickou bariéru, což může vést k cytotoxicitě, neadekvátní imunitní reakci či hemolýze [2; 11].

ECs mají potenciál k bioakumulaci. Nejčastěji používanými organismy k posuzování bioakumulace jsou ryby, měkkýši, korýši a drobní bezobratlí. Preferovanými studovanými tkáněmi jsou svalovina, mozková tkáň, játra, dále pak ledviny nebo žábry. Obecně, aby byla látka považována za bioakumulativní, musí hodnota bioakumulačního faktoru (BAF) přesáhnout 2000 l/kg. Pokud je hodnota BAF větší než 5000 l/kg, je látka považována za vysoce bioakumulativní. BAF je poměr koncentrace kontaminantu v organismu, často uváděné v mg/kg, a v okolním prostředí, uváděné v mg/l. Z toho pak vyplývá jednotka BAF l/kg. Z farmaceuticky aktivních látek lze za bioakumulativní považovat např. erytromycin, chloramfenikol či sulfadiazin [20]. Studie z roku 2023 z Argentiny poukázala na bioakumulační potenciál některých léčivých látek. Stanovovala farmaceuticky aktivní látky ve svalovině, játrech a tukové tkáni ropuch *Rhinella arenarum*. V nejvyšších koncentracích byly stanoveny acetaminofenon, desloratadin a fenazon, a to v desítkách ng/g_{dw} [21]. Ve studii z roku 2021 bylo v krevní plasmě ryb z Bezdrevského potoka v jižních Čechách detekováno 18 farmaceuticky aktivních látek z 94 testovaných. U léčivé látky flupentixol byla dokonce koncentrace v krevní plasmě ryby vyšší, než je terapeutická koncentrace v krevní plasmě člověka [22].

Také je nutno brát v potaz tzv. koktejlový efekt. V dnešní době je životní prostředí neustále vystavováno různorodým směsím kontaminantů, nelze tedy snadno předvídat důsledky těchto chronických expozičních na zasažené ekosystémy. Různé kontaminanty spolu mohou interagovat synergicky, antagonicky či může jejich účinek být aditivní. Konkrétně může být účinek směsi vyšší než účinek jednotlivých složek, nižší než účinek jednotlivých složek, nebo může směs vykazovat značné toxické účinky, i když jednotlivé složky jsou přítomny v tak nízkých koncentracích, které by samy o sobě toxické nebyly [14; 23; 24].

ECs mohou mít vedle potenciálních nežádoucích účinků na ekosystémy i negativní vliv na člověka. Nejen že s nimi můžeme přijít do kontaktu prostřednictvím ovzduší, ale také některé tyto kontaminanty mohou kolovat v potravním řetězci a nakonec se hromadit v lidském

těle [11; 25]. Jejich přítomnost v povrchových vodách může být závažným problémem v oblastech, kde je tato voda využívána jako zdroj vody pitné [26]. Chronická expozice ECs může mít vliv na lidskou obranyschopnost a zvyšovat pravděpodobnost chronických poruch endokrinního systému či reprodukce [2].

1.1.2 Přirozená degradace

V přírodě do určité míry dochází k přirozené degradaci organických kontaminantů. Způsoby degradace mohou být biologické či fyzikálně-chemické, kam patří oxidace, hydrolýza, fotolýza či sorpce na tuhé částice [27]. Mikroorganismy jako bakterie, řasy, houby a prvoci mají schopnost rozkládat či až mineralizovat organické kontaminanty. Hlavní roli v tomto procesu hrají enzymatické reakce zahrnující hydrolýzu, oxidaci, alkylaci a dealkylaci. Ačkoliv přesné degradační mechanismy jsou mnohdy nejasné, obecně lze říci, že dochází k této sekvenci kroků:

- 1) Transport kontaminantu k mikroorganismu v biologicky dostupné formě (např. některé asociáty s tuhými částicemi nejsou biologicky dostupné).
- 2) Adsorpce a difúze kontaminantu skrze buněčnou stěnu k intracelulárním enzymům.
- 3) Vazba na aktivní/reakční místo enzymu a vznik komplexu kontaminant–enzym.
- 4) Vlastní reakce často zprostředkována kofaktory či koenzymy.
- 5) Uvolnění vzniklého produktu.

Rozsah a rychlost biologické degradace bude samozřejmě záviset na environmentálních faktorech (teplota, pH, typ půdy, obsah vody, dostupnost kyslíku) a vlastnostech kontaminantu. Hydrofobní látky budou snadněji procházet přes buněčné membrány a budou snadněji degradovány než molekuly hydrofilní. Tohoto procesu se využívá v čistírnách odpadních vod ve fázi čištění pomocí aktivovaného kalu [9; 27].

Kromě biologického rozkladu dochází také k hydrolýze, sorpci na tuhé částice či fotochemické degradaci organických kontaminantů. Při hydrolýze dochází ke štěpení chemických vazeb za účasti molekuly vody. K fotolýze dochází buď přímo absorpcí slunečního záření nebo nepřímo prostřednictvím fotosenzibilizovaných látek. Dojde k porušení kovalentních vazeb a typicky ke vzniku látek snáze odbouratelných. Mezi faktory ovlivňující účinnost fotodegradace patří chemický charakter kontaminantu, pH, teplota, intenzita záření spojená s oblačností, nadmořskou výškou či vzdáleností látky od vodní hladiny (např. většina UV záření je absorbována v povrchové vrstvě vody do hloubky 2 m). Avšak u látek vázaných

na tuhé částice či sedimenty (např. tetracyklin) nemusí k fotodegradaci docházet vůbec [9; 27; 28; 29].

1.1.3 Analytické stanovení kontaminantů

K analýze těchto organických kontaminantů se používá kapalinová či plynová chromatografie (LC, resp. GC) spojená s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. *high-performance liquid chromatography*) spojená s UV detekcí, detekcí pomocí diodového pole (DAD), fluorescenční detekcí (FL) či hmotnostním detektorem. Hmotnostní spektrometrie je jednou z nejspolehlivějších detekčních technik, jelikož je vysoce citlivá a selektivní. GC–MS a LC–MS jsou široce užívané techniky pro analýzu léčiv, endokrinních disruptorů, zpomalovačů hoření a dalších látek. Pro analýzu léčiv se též často využívá ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC, z angl. *ultra-performance liquid chromatography*), u níž je kratší čas potřebný k analýze a nižší spotřeba rozpouštědel [12; 30]. K analýze antibiotik se používá hlavně kapalinová chromatografie, jelikož většina antibiotik je velmi polární a termicky nestabilní [31].

Analýze musí předcházet patřičná úprava vzorku, jejímž cílem je separace cílové sloučeniny z komplexní matrice k prevenci interferencí a taktéž zakoncentrování cílové molekuly, zvláště u analýz látek ve stopových koncentracích. Pro úpravu vzorku se používají různé typy extrakce: extrakce kapalina–kapalina (LLE, z angl. *liquid–liquid extraction*), extrakce na tuhé fázi (SPE, z angl. *solid–phase extraction*), mikroextrakce na tuhé fázi (SPME, z angl. *solid–phase microextraction*), mikroextrakce v kapalně fázi (LPME, z angl. *liquid–phase microextraction*) nebo sorpční extrakce na míchadélku (SBSE, z angl. *stir–bar sorptive extraction*). LLE je založena na rozdělení rozpuštěného analytu mezi organické rozpouštědlo a vodný roztok na základě jeho rozdělovacího koeficientu. Postup je však zdlouhavý a spotřebuje relativně velké množství organického rozpouštědla, proto LLE už nebývá moc využívána. U SPME se používají vlákna siliky pokrytá polymerní fází. Mezi její výhody patří to, že je zcela eliminováno používání organických rozpouštědel a také zahrnuje vzorkování, extrakci a zakoncentrování v jednom kroku. Vlákno se vloží do vzorku (vzorek se nemusí nějak dávkovat), na sorbent se nachytají cílové molekuly (extrakce) a na malé množství sorbentu se zachytí velké množství analytu (koncentrace bude větší než ve vzorku). Princip SBSE je založen na použití magnetické míchací tyčinky potažené vrstvou sorbentu, často polydimethylsiloxanu. Ta se vloží do roztoku vzorku, který se ponechá míchat. Poté bývá analyt tepelně desorbován a analyzován pomocí GC–MS. Jedná se o vysoce citlivou metodu. Nejčastěji používanou extrakční metodou je SPE. Jejím principem je sorpce analytu na tuhý

sorbent uvnitř patry nebo disku, zatímco roztok proteče skrz. Poté je analyt ze sorbentu eluován pomocí jiného vhodného rozpouštědla. SPE má vyšší výtěžnost, specifitu i reprodukovatelnost než metody uvedené výše. Také trvá kratší dobu, spotřebuje menší množství rozpouštědel a lze ji automatizovat. Kritickým krokem při SPE je vhodná volba sorbentu. Sorbentem může být silika, na kterou jsou navázány uhlíkové řetězce C8, C18 či iontoměnič nebo pak různé polymerní materiály, imunosorbenty a další [26; 30].

Co se týče extrakce analytu, konkrétně antibiotik, z pevných vzorků (půda, sediment, kal), kde může být sloučenina pevně vázána na matici, běžně se využívá tlaková kapalinová extrakce (PLE, z angl. *pressurised liquid extraction*), extrakce pomocí ultrazvuku (UAE, z angl. *ultrasound assisted extraction*) či mikrovlnná extrakce (MAE, z angl. *microwave assisted extraction*). Extrahovadlem bývají směsi pufrů a organických rozpouštědel jako acetonitril nebo methanol. Tetracykliny a fluorochinolony se silně vážou na půdní prostředí. Tetracykliny mají sklon k tvorbě chelátových komplexů s kovovými ionty, pro jejich vyvázání se tedy používá např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA). Extrakce fluorochinolonů je účinnější při nižším pH, kdy jsou molekuly i povrch kalu protonovány a elektrostaticky se odpuzují. Získaný extrakt může být poté čištěn pomocí SPE [31].

1.2 Antibiotika

Antibiotika jsou nízkomolekulární sekundární metabolity mikroorganismů, které již v nízkých koncentracích inhibují růst jiných mikroorganismů. Také se mezi ně řadí analoga těchto přírodních látek a v dnešní době i syntetická chemoterapeutika působící proti mikroorganismům (antimikrobiální léčiva). Vedle čistě inhibice bakteriálního růstu (bakteriostatický účinek) mohou antibiotika též některé mikroorganismy usmrcovat (baktericidní účinek). Mikroorganismy tyto látky produkují pro svoji ochranu či k osídlení určitého stanoviště. Větší část antibiotik je produkována bakteriemi. Z hub patří mezi producenty antibiotik rody *Aspergillus* a *Penicillium*. V moderní medicíně jsou antibiotika hojně využívána k prevenci a léčbě infekčních onemocnění bakteriálního a fungálního původu v humánní i veterinární péči [12; 32; 33; 34].

Antibiotika mohou působit na mikroorganismy více mechanismy [34]:

- inhibicí syntézy buněčné stěny – např. β -laktamová antibiotika,
- změnou permeability buněčné membrány – např. polyenová antibiotika,
- inhibicí proteosyntézy (inhibicí transkripce a translace genetického materiálu) – např. erythromyciny, aminoglykosidy a tetracykliny,
- inhibicí syntézy nukleových kyselin – např. chinolony, sulfonamidy.

Jedná se o velmi heterogenní chemické látky, které lze rozdělit do skupin podle podobností v chemické struktuře. Těmito skupinami jsou β -laktamová antibiotika, glykopeptidová antibiotika, tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, ansamyciny a další. Avšak častěji se využívá dělení humánních i veterinárních antibiotik na tyto skupiny: β -laktamová antibiotika, chinolony, fluorochinolony, makrolidy, tetracykliny, sulfonamidy, amfenikoly a glykopeptidy [32].

Základem struktury penicilinů, které se řadí mezi β -laktamová antibiotika, je 6-aminopenicilanová kyselina. Jednotlivé peniciliny se pak liší strukturou postranních řetězců. Penicilin G a V byly první peniciliny s širokým klinickým využitím. Mezi třetí generaci penicilinů patří ampicilin a amoxicilin. Rezistentní kmeny bakterií dokážou rozkládat peniciliny pomocí enzymu β -laktamasy. Cefalosporiny, které též patří mezi β -laktamová antibiotika, jsou vůči tomuto enzymu odolné. Podařilo se však vyvinout inhibitory β -laktamasy, které se podávají společně s peniciliny a chrání je tak před nežádoucí enzymatickou degradací. [32; 34; 35].

Nejnámějším zástupcem aminoglykosidových antibiotik je streptomycin, což je trisacharid produkovaný bakterií *Streptomyces griseus* a je účinný proti gramnegativním bakteriím. Používá se hlavně proti *Mycobacterium tuberculosis*, kterou však nelze striktně zařadit mezi grampozitivní či gramnegativní mikroorganismy. Má totiž atypickou buněčnou stěnu [34; 36].

Makrolidy obsahují makrocyclický laktonový kruh obsahující obvykle 14–16 atomů, ke kterému jsou připojené cukry. K nejvýznamnějším zástupcům patří erythromyciny produkované *Streptomyces erythreus*, které se používají k léčbě stafylokokových infekcí rezistentních vůči penicilinu či se podávají pacientům s alergií na penicilin [34].

Sulfonamidy jsou syntetická antimikrobiální chemoterapeutika se širokým spektrem účinku. Jedná se o organické sloučeniny síry, obsahující skupinu $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ nebo $-\text{SO}_2\text{NH}-$.

Sulfonamidy jsou strukturními analogy a kompetitivními antagonisty kyseliny *p*-aminobenzoové při syntéze kyseliny listové, která je nezbytná pro tvorbu bakteriální DNA. Konkrétně je klíčová pro syntézu purinů a pyrimidinů, které jsou součástí nukleových kyselin. Mezi sulfonamidy patří např. sulfadiazin, sulfamethoxazol či sulfanilamid [37].

Tetracykliny, jak už název napovídá, obsahují ve své struktuře 4 šestičlenné kruhy. Jsou produkovány bakteriemi *Streptomyces* žijícími v půdě. Tetracykliny byly dlouho používány pro léčbu infekce dýchacích cest, zánětu dutin, zánětu středního ucha, infekce močových cest a kapavky, dokud nedošlo k tvorbě rezistence u některých patogenů, čímž se snížila jejich účinnost. Mechanismem antibakteriálního účinku tetracyklinů je blokáce translace mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA), a tedy inhibice proteosyntézy [38].

Ansamyciny jsou sekundární metabolity převážně produkovány aktinomycetami. Struktura ansamycinů obsahuje aromatické jádro a alifatický můstek, jenž spojuje dvě nesousední pozice tohoto jádra. Mezi klinicky používané léky, které patří mezi typické zástupce ansamycinů, patří například rifamyciny, maytansinoidy a geldanamyciny [39].

V následujících podkapitolách budou podrobněji popsána čtyři antibiotika, která byla využita v experimentální části této diplomové práce.

1.2.1 Ampicilin

Ampicilin společně s amoxicilinem patří do 3. generace semisyntetických penicilinů, tedy mezi β -laktamová antibiotika. Je to širokospektrální aminopenicilin [38].

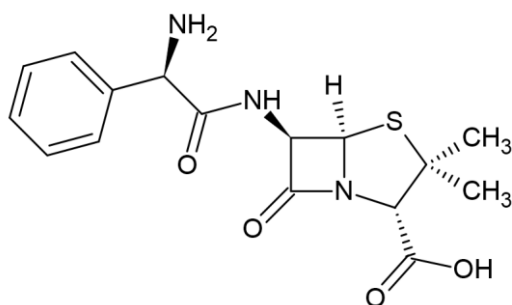
β -laktamová antibiotika, mezi která kromě penicilinů patří i cefalosporiny, obsahují charakteristický β -laktamový kruh (čtyřatomový cyklický amid). Jelikož úhly mezi vazbami jsou 90° , je kruh vysoce napjatý. β -laktamový kruh bývá kondenzovaný s heterocyklem – v případě penicilinů thiazolidinem, v případě cefalosporinů dihydrothiazinem. Mají baktericidní účinek, který je vyvolán inhibicí syntézy peptidoglykanu, který je nezbytnou složkou bakteriální buněčné stěny [32; 34; 38].

Výchozí látkou pro všechny peniciliny a prvním objeveným penicilinem je Penicilin G (benzylpenicilin), který je produkován plísněmi *Penicillium notatum* či *Penicillium chrysogenum*. Není účinný při perorálním podání, jelikož se rozkládá v kyselém prostředí žaludku, podává se tedy parenterálně. Taktéž má úzké antimikrobiální spektrum účinku. Ostatní peniciliny se pak syntetizují z kyseliny 6-aminopenicilanové, která se z Penicilinu G získá

hydrolytickou reakcí za účasti penicilinamidasy. Mezi penicilinové deriváty patří např. Penicilin V (fenoxymethylpenicilin), ampicilin, amoxicilin či oxacilin [34; 38].

Peniciliny jsou účinné především proti grampozitivním bakteriím. Buněčná stěna těchto bakterií je přibližně z poloviny tvořena peptidoglykanem. Mechanismem účinku penicilinů je inhibice posledního stupně syntézy buněčné stěny – inhibicí transpeptidáz je blokováno spojování peptidoglykanových řetězců, čímž dochází k deformaci a lýze buněčné stěny. Naproti tomu buněčná stěna gramnegativních bakterií obsahuje zdaleka méně peptidoglykanu a zároveň je chráněna vnější fosfolipidovou membránou, která představuje další bariéru zabraňující difuzi mnoha penicilinů. To je hlavní příčinou tak vysoké odolnosti gramnegativních bakterií vůči penicilinům [35].

Ačkoliv ampicilin je oproti penicilinu odolný vůči kyselému prostředí, po perorálním podání se vstřebává jen částečně (z 20–40 %). Je tedy také podáván parenterálně. Zavedením OH skupiny do molekuly ampicilinu byl syntetizován amoxicilin, který se resorbuje již z 60–80 % a je proto podáván perorálně. V porovnání s penicilinem má ampicilin širší spektrum účinku, působí i na některé gramnegativní patogeny. Mezi nežádoucí účinky ampicilinu patří hlavně kožní reakce ve formě exantémů, většinou v oblasti trupu [35]. Na Obrázku 1 je znázorněna struktura ampicilinu.



Obrázek 1: Struktura ampicilinu

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Ampicilin je bílá krystalická látka bez zápachu s hygroskopickými vlastnostmi. Tabulka 2 uvádí hodnoty některých fyzikálně-chemických veličin ampicilinu či jeho sodné soli.

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti ampicilinu

Veličina	Forma	Jednotka	Hodnota	Zdroj
Molární hmotnost	čistý	g/mol	349,4	[40]
Bod tání		°C	208	[40]
Bod tání	sodná sůl	°C	215	[41]
Rozpustnost ve vodě 21 °C		g/l	10,1	[42]
Rozpustnost v ethanolu		mg/ml	2	[43]
Rozpustnost v DMF		mg/ml	20	[43]
Log K _{ow}		-	1,35	[42]
pK _a		-	2,5 (COOH) 7,3 (NH ₂)	[42]
pH	1% roztok	-	8 – 10	[41]

Toxikologická data

V následující tabulce (Tabulka 3) jsou uvedeny nalezené toxikologické parametry sodné soli ampicilinu [43].

Tabulka 3: Toxikologická data ampicilinu

Parametr	Testovaný organismus, způsob podání	Hodnota [mg/kg]
LD ₅₀	Myš, orálně	>5 314
	Potkan, orálně	5 314
	Myš, intraperitoneálně	5 700
	Potkan, intraperitoneálně	7 400
	Myš, subkutánně	>5 314
	Potkan, subkutánně	>5 314
TDLO (doba expozice 5 dní)	Lidský organismus	100

Ekotoxikologická data

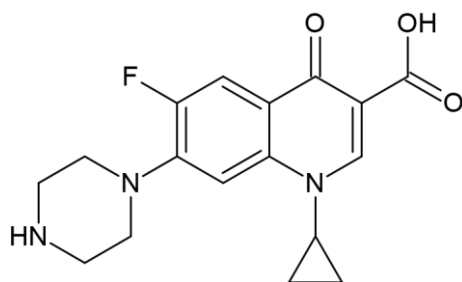
Z dostupných ekotoxikologických údajů o ampicilinu byla nalezena pouze hodnota účinné koncentrace pro 50 % jedinců (EC₅₀, z angl. *effective concentration 50 %*) u mikrořasy *Pseudokichneriella subcapitata*, která po 72 hodinách expozice vykazala hodnotu vyšší než 2000 mg/l [44].

1.2.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin je syntetické antimikrobiální chemoterapeutikum ze skupiny fluorochinolonů. Fluorochinolony jsou třetí generací derivátů chinolonů. Atom fluoru je vázán na uhlíku C6 v bicyklickém chinolonu. Za první chinolon s antimikrobiálním účinkem je považována kyselina nalidixová, která vznikala jako vedlejší produkt při syntéze antimalarika chlorochinu. Kyselina nalidixová se nyní syntetizuje z 2-amino-6-methylpyridinu a je i výchozí látkou pro syntézu těchto antibiotik. Obměňováním struktury chinolonů se zjistilo, že zavedením fluoru do polohy 6 se zvýší jejich aktivita, sníží toxicita a rozšíří se spektrum antibakteriálního účinku [34; 35; 38].

Fluorochinolony jsou širokospektrální baktericidní látky účinné proti grampozitivním i gramnegativním mikroorganismům. Co se týče mechanismu účinku, tyto látky blokují krok v replikaci bakteriálního DNA, konkrétně inhibují topoizomerázy typu II, které jsou důležité při „smotávání“ vláknů DNA. Topoizomerázy jsou enzymy, které mění terciární strukturu dvoušroubovice DNA danou nadšroubovicovým vinutím, aniž by přitom měnily strukturu primární (sekvenci nukleotidů) a sekundární (dvoušroubovici). Tato inhibice způsobí buněčnou smrt. Vedle ciprofloxacinu sem patří ještě norfloxacin nebo levofloxacin [34; 35; 38]. Mezi nežádoucí účinky těchto látek patří poruchy trávicího traktu, periferní neuropatie a poruchy funkcí centrální nervové soustavy (např. neklid, zmatenost, křeče). Také vyvolávají poruchy růstu, proto se nepodávají v období těhotenství, laktace ani dětem před skončením růstu [35; 45].

Ciprofloxacin je širokospektrální antibiotikum, užívané pro léčbu infekcí močových cest, dolních dýchacích cest, zánětu dutin a břišního tyfu. Také je používán při léčbě tuberkulózy. Lze ho užívat perorálně, intravenózně, intratympanicky (do ucha, obvykle formou kapek) či oftalmologicky (do oka, formou kapek či mastí) [35; 38; 45]. Na Obrázku 2 je znázorněna struktura ciprofloxacinu.



Obrázek 2: Struktura ciprofloxacinu

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Ciprofloxacin je krystalická látka lehce nažloutlé barvy. Tabulka 4 uvádí hodnoty některých fyzikálně-chemických veličin ciprofloxacinu.

Tabulka 4: Fyzikálně-chemické vlastnosti ciprofloxacinu

Veličina	Jednotka	Hodnota	Zdroj
Molární hmotnost	[g/mol]	331,34	[46]
Bod tání	°C	225 – 257	
Rozpustnost ve vodě 20 °C	mg/ml	0,067	[47]
Rozpustnost v ethanolu	mg/ml	0,046	
Zdánlivý rozdělovací koeficient (oktanol/voda) D			[48]
- pro pH = 5	-	0,0878	
- pro pH = 7	-	0,103	
- pro pH = 9	-	0,0343	
pH	-	3 – 4,5	[46]

Toxikologická data

Z toxikologických dat byly v bezpečnostním listu od společnosti Pfizer nalezeny pouze dvě hodnoty LD₅₀ pro injekční roztok ciprofloxacinu vypsané v následující tabulce (Tabulka 5) [49].

Tabulka 5: Toxikologická data ciprofloxacinu

Parametr	Testovaný organismus, způsob podání	Hodnota [mg/kg]
LD ₅₀	Potkan, orálně	>2 000
	Potkan, intravenózně	207

Ekotoxikologická data

Následující Tabulka 6 uvádí ekotoxikologická data ciprofloxacinu s příslušnými literárními zdroji.

Tabulka 6: Ekotoxikologická data ciprofloxacinu

Parametr	Doba expozice	Testovaný organismus	Hodnota [mg/l]	Zdroj
IC ₅₀	4–5 d	<i>Cylindrotheca closterium</i>	55,43	[50]
		<i>Navicula ramosissima</i>	72,12	
	72 h	<i>Chlorella vulgaris</i>	27,89	[51]
		<i>Chlorella sp.</i>	22,26	[24]
		<i>Desmodesmus spinosus</i>	28,5	
	96 h	<i>Chlorella vulgaris</i>	29,09	[51]
		<i>Chlorella sp.</i>	8,571	[24]
		<i>Desmodesmus spinosus</i>	16,55	
	EC ₅₀	72 h	<i>Pseudokichneriella subcapitata</i>	11,3 ± 0,7
16 h		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,067 ± 0,012	[52]
24 h			0,079 ± 0,025	
48 h		<i>Daphnia magna</i>	36,493	[53]
3 d		<i>Escherichia coli</i>	0,113	[54]
		<i>Sphingomonas sp.</i>	3,09	
72 h		<i>Anabaena flos-aquae</i>	0,0102	[55]
		<i>Lemna minor</i>	0,0625	
NOEC	72 h	<i>Chlorella vulgaris</i>	<20	[51]
LOEC	72 h	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	[51]

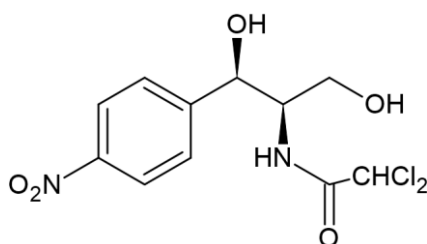
1.2.3 Chloramfenikol

Chloramfenikol se řadí mezi amfenikoly. Poprvé byl izolován z kultury *Streptomyces venezuelae* v roce 1947, později už byl vyráběn synteticky. Je účinný proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, včetně rodů *Ritsskesia* a *Chlamydia*. Účinek spočívá v inhibici proteosyntézy. Blokuje totiž enzym peptidyltransferáza, což vede k tomu, že na ribozomu

po napojení komplexu tRNA–aminokyselina znemožňuje připojení další přivedené aminokyseliny na prodlužující se peptidový řetězec. Lze ho podávat perorálně i parenterálně [32; 35].

Jedná se o antibiotikum se širokým spektrem účinku, což jej spolu s jeho fyzikálně-chemickými vlastnostmi jako je nízká molekulová hmotnost a slabě kyselý charakter činí vysoce biologicky dostupným a účinným na velké množství mikroorganismů. Jeho rozdělovací koeficient svědčí o vyšší rozpustnosti v organických rozpouštědlech než ve vodě, což mu usnadňuje prostup biologickými membránami [56].

Má řadu nežádoucích účinků včetně poškození krvetvorby a nepříznivého účinku na funkci kostní dřeně. Z toho důvodu je dnes jeho používání v mnoha zemích zakázáno či velmi přísně omezeno na podání pouze ve velmi závažných případech. Nejvíce je využíván proti kombinaci *Salmonella typhi* a *Haemophilus influenzae* (zejména v případě meningitidy) a *Bacteroides fragilis*, který způsobuje cerebrální absces. Dále jsou klinicky využívány některé deriváty chloramfenikolu, např. thiamfenikol [32; 34; 35]. Na Obrázku 3 je znázorněna struktura chloramfenikolu.



Obrázek 3: Struktura chloramfenikolu

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Chloramfenikol je nažloutlá krystalická látka bez zápachu. Tabulka 7 uvádí hodnoty některých jeho fyzikálně-chemických veličin.

Tabulka 7: Fyzikálně-chemické vlastnosti chloramfenikolu

Veličina	Jednotka	Hodnota	Zdroj
Molární hmotnost	g/mol	323,13	[57]
Bod tání	°C	149 – 153	
Rozpustnost ve vodě 25 °C	g/l	2,5	
Rozpustnost v ethanolu	mg/ml	10	[58]
Rozpustnost v DMF	mg/ml	16	
Log K_{ow}	-	1,14	[57]
pH (20 °C)	-	4,5 – 7,5	[57]

Toxikologická data

V následující tabulce (Tabulka 8) jsou uvedeny toxikologické parametry chloramfenikolu [57; 58].

Tabulka 8: Toxikologická data chloramfenikolu

Parametr	Testovaný organismus, způsob podání	Hodnota [mg/kg]
LD ₅₀	Potkan, orálně	2 500
	Potkan, intraperitoneálně	1 811
	Potkan, subkutánně	5 000
	Myš, orálně	1 500
	Myš, intraperitoneálně	1 100
	Myš, subkutánně	400
LDLO	Lidský organismus (žena)	400

Ekotoxikologická data

Následující Tabulka 9 uvádí ekotoxikologická data chloramfenikolu s příslušnými literárními zdroji.

Tabulka 9: Ekotoxikologická data chloramfenikolu

Parametr	Doba expozice	Testovaný organismus	Hodnota [mg/l]	Zdroj
EC ₅₀	48 h	<i>Daphnia magna</i>	345	[57]
	72 h	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	14	[59]
IC ₅₀	96 h	<i>Tetraselmis suecica</i>	11,16	[60]

1.2.4 Tetracyklin

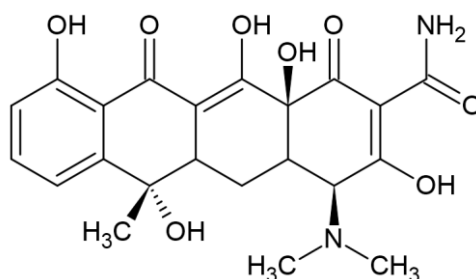
Tetracykliny jsou antimikrobiální látky produkované houbami rodu *Streptomyces*. Chemicky se jedná o deriváty částečně hydrogenovaného naftacenu. Struktura tedy obsahuje čtyři spojené šestičlenné kruhy. Jsou to širokospektrální antibiotika účinkující proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím stejně tak jako proti spirochetám (bakterie; např. původce syfilidy), rickettsiím (patogenní gramnegativní bakterie) a chlamydiím (způsobují různá zánětlivá onemocnění, např. zánět spojivek) [34; 61].

Prvním objeveným zástupcem tetracyklinů byl chlortetracyklin. Tetracyklin patří mezi polosyntetické tetracykliny. Z novějších generací patří mezi tetracykliny např. minocyklin nebo rolitetracyklin [34].

Mechanismem účinku tetracyklinů je inhibice proteosyntézy. Konkrétně blokují vazbu tRNA na komplex mRNA-ribozom. Tetracykliny lehce tvoří komplexy s dvojmocnými kationty, čímž ztrácejí svou účinnost, protože tyto komplexy nejsou biologicky aktivní. Používají se při léčbě infekcí vyvolaných *Mycoplasma pneumoniae* (akutní bronchitidy, pneumonie), chlamydiemi či dalších infekcích nebo při boreliózách. Lze je použít také k profylaxi malárie. Díky svému širokospektrálnímu účinku a dobré snášenlivosti se tetracykliny využívají poměrně často.

Tetracykliny se vylučují žlučí, stolicí a močí v bakteriostatických koncentracích. Většinou bývá 70–90 % podané dávky tetracyklinů vyloučeno [35; 61].

Mezi nežádoucí účinky tetracyklinů patří dráždění sliznic trávicího traktu a narušení ústního i střevního mikrobiomu, což může vést až k superinfekci. Dále může vést k poškození nehtů či deformaci kostí a zubů. Z toho důvodu se nepodávají dětem mladším šesti let nebo těhotným ženám [34; 35]. Obecně se užívání tetracyklinu během těhotenství a kojení nedoporučuje, protože může nepříznivě ovlivnit vývoj plodu nebo kojence [62; 63]. Obrázek 4 znázorňuje strukturu tetracyklinu.



Obrázek 4: Struktura tetracyklinu

Fyzikálně-chemické vlastnosti

Tetracyklin je tmavě žlutá krystalická látka bez zápachu. Tabulka 10 uvádí hodnoty některých fyzikálně-chemických veličin tetracyklinu.

Tabulka 10: Fyzikálně-chemické vlastnosti tetracyklinu

Veličina	Jednotka	Hodnota	Zdroj
Molární hmotnost	g/mol	444,43	[64]
Bod tání	°C	172–174	
Rozpustnost ve vodě 20 °C	mg/ml	0,311	[47]
Rozpustnost v ethanolu 20 °C	mg/ml	54	
Log K_{ow}	-	-1,25	[65]
pK _a	-	3,2	
		7,78 9,6	

Toxikologická a ekotoxikologická data

V následující tabulce (Tabulka 11) jsou uvedeny některé toxikologické parametry tetracyklinu [62; 64]

Tabulka 11: Toxikologická data tetracyklinu

Parametr	Forma antibiotika	Testovaný organismus, způsob podání	Hodnota [mg/kg]
LD ₅₀	hydrochlorid	Potkan, orálně	6 443
	čistá látka	Potkan, orálně	807
	hydrochlorid	Potkan, intravenózně	128
		Myš, orálně	2 759
		Myš intravenózně	157
NOAEL	hydrochlorid	Myš, orálně	3 750
		Potkan, orálně	625
LOAEL	hydrochlorid	Myš, orálně	7 500
		Potkan, orálně	1 250

Ekotoxikologická data

V následující tabulce (Tabulka 12) jsou uvedeny ekotoxikologické parametry tetracyklinu.

Tabulka 12: Ekotoxikologická data tetracyklinu

Parametr	Doba expozice	Forma antibiotika	Testovaný organismus	Hodnota [mg/l]	Zdroj
EC ₅₀	72 h	hydrochlorid	<i>Anabaena flos-aquae</i>	6,2 ± 0,8	[63; 66]
			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	3,31 ± 0,96	[63; 66]
				1	[62]
	24 h	čistá látka	<i>Stentor coeruleus</i>	94,4	[67]
			<i>Stylonychia lemnae</i>	40,1	
	7 d	hydrochlorid	<i>Microcystis aeruginosa</i>	0,09	[63]
96 h	čistá látka	<i>Chlorella vulgaris</i>	7,73	[68]	
48 h		<i>Daphnia magna</i>	8,16	[69]	
IC ₅₀	72 h	čistá látka	<i>Chlorella sp.</i>	4,159	[24]
			<i>Desmodesmus spinosus</i>	34,78	
	96 h		<i>Chlorella sp.</i>	0,035	
	<i>Desmodesmus spinosus</i>		10,79		
NOEC	72 h	hydrochlorid	<i>Anabaena flos-aquae</i>	2,5	[63]
			<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,032	[63]
				0,5	[62]

1.2.5 Negativní důsledky přítomnosti antibiotik v životním prostředí

Jak bylo zmíněno již v předchozím textu, čistírny odpadních vod nejsou dostatečně efektivní v odstranění antibiotik, což vede k jejich neustálému přísunu do vodních toků [70].

Toxicita jednotlivých antibiotik se liší v závislosti na testovaném organismu. Organismy nízké trofické úrovně (např. cyanobakterie, řasy) vykazují vyšší citlivost na antibiotika než organismy na vyšších trofických úrovních (např. korýši, ryby). Studie toxicity u mikrořas běžně zahrnují hodnocení jejich růstu a funkce fotosyntetických a antioxidačních systémů. Mezi sledované parametry patří densita buněk, velikost buněk, biomasa, obsah exopolysacharidů, obsah fotosyntetických pigmentů a biomarkery antioxidačního systému [71].

Je prokázáno, že léčiva včetně antibiotik a jejich degradačních produktů v životním prostředí mají nepříznivý vliv na růst a metabolismus řas i cyanobakterií, mohou narušovat fotosyntézu, genovou expresi a měnit aktivitu antioxidantních enzymů. Taktéž negativně ovlivňují korýše nebo obojživelníky a mohou vyvolat fyziologické změny u ryb a negativně ovlivňovat jejich reprodukční schopnosti [24; 71]. Koncentrace 0,1 µg/ml byly pro říční mikrobiální komunity vždy růst stimulační, avšak při koncentracích 100 µg/ml byl pozorován jasný pokles mikrobiálního růstu, který byl ještě výraznější při koncentracích vyšších než 1000 µg/ml [56].

Antibiotika jsou člověkem obvykle vylučována jako konjugáty glukuronidu a sulfátu, které v životním prostředí mohou snadno hydrolyzovat, čímž dojde ke znovu uvolnění aktivní formy léčiva. Také mohou být vyloučena v nezměněné formě nebo jako metabolit se stále aktivním účinkem [12].

Tetracykliny mají silnou schopnost vázat se na částice v půdě, jelikož tvoří komplexy s dvojmocnými kationty. Jejich přítomnost též narušuje strukturu mikrobiálních společenstev a inhibuje jejich aktivitu, konkrétně inhibuje enzymy ureázu, dehydrogenázu a kyselou fosfatázu [6; 72]. Fosfatázu též inhibují tylosin, sulfametoxazol a sulfamethazin. Sulfonamidy též negativně ovlivňují půdní respiraci [73].

Studie z roku 2019 zabývající se účinky tetracyklinu a jeho degradačních produktů na řasu *Chlorella vulgaris* určila následující hodnoty EC₅₀ (96 h) viz Tabulka 13.

Tabulka 13: Hodnoty EC₅₀ pro řasu *Chlorella vulgaris* (96 h) [68]

Látka	EC ₅₀ (96 h) [mg/l]
Tetracyklin	7,73
Anhydrotetracyklin	5,96
Epitetracyklin hydrochlorid	8,42

Také bylo v této studii zjištěno, že při vyšších koncentracích těchto tří látek byla zvýšena propustnost buněčných membrán řasy a došlo i ke strukturálním změnám, jako ukládání škrobových granulí, deformace tylakoidních lamel v chloroplastech a zvětšení vakuol [68].

Byly studovány i vlivy tetracyklinu a chlortetracyklinu na žížaly druhu *Eisenia fetida*. Obě antibiotika vykazovala genotoxické účinky. Testovány byly koncentrace v rozsahu 0–300 mg/kg_{dw} a tři doby expozice (7, 14 a 28 dní). I při nejnižší koncentraci antibiotik

0,3 mg/kg_{dw} docházelo k významnému poškození DNA buněk imunitního systému žíhal (tzv. coelomocytů). Při delší expozici obě léčiva také způsobovala vznik oxidativního stresu [74].

Přítomnost antibiotik (např. ciprofloxacinu) v půdě může též negativně ovlivňovat klíčení semen a růst rostlin. Jedná se o fytotoxický účinek. Například růst mrkve, salátu či ječmene byl inhibován při koncentraci antibiotika již od 1 mg/kg půdy. To znamená, že přítomnost antibiotik může způsobit snížení úrodnosti půdy [6; 72].

Hlavním celosvětovým problémem spojeným s přítomností antibiotik v životním prostředí je antibiotická rezistence. Přítomnost reziduí antibiotik v životním prostředí umožňuje vznik genů rezistence proti antibiotikům (tzv. antibiotic resistance genes – ARGs) [75]. Antibiotika se v životním prostředí vyskytují i přirozeně, protože jsou to látky přírodního původu, avšak jejich koncentrace jsou výrazně nižší než koncentrace pocházející z lidské činnosti [76]. Antibiotická rezistence může být buď vrozená či získaná od jiných bakterií horizontálním přenosem genů [33]. Například v Číně roku 2017 bylo identifikováno přes 200 různých genů rezistence ve vzorcích sedimentů z míst, kde řeky ústí do moře [11; 75]. Tato rezistence je spojena s rizikem superinfekcí, které pak není možné léčit běžně předepisovanými léčivými. Rezistence může být absolutní (mikrob nemá žádné cílové struktury, které by mohlo dané antibiotikum ovlivnit) či relativní (není dosaženo potřebné koncentrace) [34]. Na příklad míra rezistence bakterie *Escherichia coli* vůči ciprofloxacinu se liší v rozmezí 8,4–92,9 % [25].

Šíření rezistentních bakterií a ARGs v životním prostředí může být důsledkem selekčních tlaků způsobených lidskou činností. Mezi tyto činnosti patří nadměrné užívání antibiotik v klinické medicíně a také používání antibiotik v zemědělství k prevenci onemocnění či podpoře růstu [33].

ARGs se také mohou akumulovat ve vodě, půdě i atmosféře, migrovat napříč prostředím a integrovat se do pohyblivých genetických prvků, jako jsou plazmidy či transpozony, což usnadňuje jejich přenos mezi mikroorganismy. Snadno se šíří také v lékařském prostředí, v chovech hospodářských zvířat a dokonce i v populacích volně žijících živočichů. Antibiotika se mohou dostat i do pitné vody, a přestože jejich koncentrace bývají příliš nízké na to, aby představovaly přímé riziko pro lidské zdraví, mohou narušit mikrobiální společenstva a přispět k šíření ARGs. Tento problém má globální rozměr, jelikož žádný stát ho nemůže efektivně vyřešit samostatně bez spolupráce s okolními zeměmi [25; 71].

Kromě vývoje rezistentních patogenních kmenů patří mezi dopady přítomnosti antibiotik v životním prostředí na člověka také riziko spojené s požitím antibiotik, jejichž rezidua jsou přítomna v živočišné i rostlinné stravě a pitné vodě. Antibiotika se totiž mohou akumulovat v potravinářských plodinách [72].

Dalším problémem jsou ekotoxické nežádoucí účinky na necílové organismy a také ekologické dopady na agroekosystémy při hnojení hnojem. Používání hnoje má své výhody – zvýšení teploty půdy, což zmírňuje chladový stres, poskytování živin a zmírnění sekundárního zasažení půdy vlivem minerálních hnojiv. Avšak je s tím spojena právě vyšší kontaminace plodin antibiotiky. Vyšší koncentrace bývají detekovány na polích chráněného či ekologického zemědělství, jelikož právě tam častěji hnojí pomocí hnoje nebo čistírenského kalu. A bohužel z nutnosti opakovaného hnojení polí pak dochází k akumulaci antibiotik v ekosystému [3; 72].

Problematické je i to, že se různá antibiotika, např. tetracykliny nebo peniciliny, používaly jako stimulatory růstu v krmivech pro hospodářská zvířata či jako profylaxe. V Evropské unii jsou tyto stimulatory růstu od roku 2006 zakázány [12; 77]. USA omezila používání antibiotik jako stimulatorů růstu v roce 2013 [78]. Avšak např. Čína antibiotika nadužívá, a to hlavně v chovu hospodářských zvířat. Uvádí se, že intenzita užívání antibiotik v Číně je až 2,8x vyšší než v USA. Čína až roku 2019 zakázala používání 8 konkrétních antibiotik jako stimulatorů růstu. Jako náhrada antibiotik v těchto směrech by mohly být použity enzymy, probiotika, oligosacharidy atd. Tributyrin, kyselina mravenčí či draselné soli dikarboxylových kyselin přidané do potravy zvířat mohou zlepšit imunitu, podpořit trávení i růst dobytka. *Bacillus subtilis* může mít pozitivní vliv na zdraví střev a podporovat růst brojlerů. Pokud jde o prevenci šíření infekčních chorob v chovu zvířat, je optimální cestou místo používání antibiotik vakcinace [25].

Obecně lze říci, že koncentrace antibiotik, které jsou běžně detekovány ve vodních tocích po celém světě, nepředstavují riziko akutní toxicity. Nicméně dlouhodobá expozice nízkým koncentracím různých antibiotik a jejich směsím s dalšími kontaminanty může vést k nerovnováze v ekosystémech, což nelze považovat za zanedbatelné riziko [56].

1.2.6 Detekovaná množství antibiotik ve vodách

Nemocniční odpadní vody a odpadní vody z farmaceutického průmyslu obsahují koncentrace antibiotik v řádech μg až desítek mg/l , v komunálních odpadních vodách to bývají desetiny či setiny $\mu\text{g/l}$, v povrchové, podzemní či mořské vody spíše ng/l [56]. Čistírny

odpadních vod obecně nedokážou účinně eliminovat antibiotika, což potvrzují studie zaznamenávající jejich vyšší koncentrace ve vodních tocích za ČOV než před ní [71].

Významným zdrojem antibiotik v odpadních vodách jsou nemocnice. Autoři studie z Francie z roku 2017 stanovili výrazně vyšší koncentrace antibiotik (18–12850 ng/l) v odpadní vodě ČOV, která zpracovávala odpadní vodu z nemocnic i domácích, než v ČOV přijímající pouze odpadní vodu z domácností (3–550 ng/l). Také porovnávali koncentraci antibiotik v řece před a za výpustí z čistírny odpadních vod. Před výpustí byly v řece detekovány pouze fluorochinolony, a to v nízkých koncentracích (<10 ng/l). Ihned za výpustí vyčištěné vody z ČOV koncentrace antibiotik v řece prudce vzrostla. Například ofloxacin dosáhl koncentrace až 1210 ng/l. To potvrzuje, že čistírny odpadních vod nejsou v odstraňování antibiotik dostatečně účinné [70].

β -laktamová antibiotika nebývají ve vodách tak často detekována, jelikož β -laktamový kruh je ve vodném prostředí poměrně nestabilní. Snadno hydrolyzuje v kyselém i alkalickém prostředí či reakcí se slabými nukleofily, jako je např. molekula vody, či enzymatickou reakcí [12].

V Polsku bylo v surové odpadní vodě detekováno mimo jiné 22 druhů antibiotik. V nejvyšších koncentracích se tam vyskytoval metronidazol, který dosahoval hodnot až 7400 ng/l. Některá další antibiotika převyšovala koncentrace 1000 ng/l, a to ciprofloxacin, vankomycin či sulfamethoxazol. V řekách byly nalezeny velmi podobné koncentrace antibiotik jako v odpadní vodě. Co se týče vody podzemní, nejvyšších hodnot dosahovaly sulfapyridin a sulfamethoxazol se 177,1 ng/l, respektive 66 ng/l [29].

Ve Švédsku byly analyzovány vzorky přitékající odpadní vody, vyčištěné odtokové vody a digestovaného kalu z 11 čistíren odpadních vod. Z 12 analyzovaných antibiotik jich bylo 9 detekováno alespoň v jednom vzorku. Pět antibiotik bylo detekováno ve vyčištěné vodě (ciprofloxacin, klarithromycin, erythromycin, metronidazol a trimethoprim). V největším počtu vzorků byl detekován trimethoprim a to v rozsahu koncentrací 10–130 ng/l. V kalu byl nejvíce zastoupen ciprofloxacin v rozsahu koncentrací 1600–11000 ng/g_{dw} [79]. Fluorochinolony mají totiž vyšší tendenci k adsorpci a bývají spíše vázané na suspendované částice a sedimenty, než rozpuštěné ve vodním sloupci [70].

Problematické je zavlažování půd regenerovanou odpadní vodou, což může vést k akumulaci léčiv v životním prostředí. Studie z Číny z roku 2011 prokázala vyšší obsah léčiv a endokrinních disruptorů v půdě zavlažované odpadní vodou než v půdě zavlažované

podzemní vodou. Např. pro tetracyklin to byly hodnoty $19,6 \pm 6,1 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{dw}}$ v půdě zavlažované odpadní vodou a $8,9 \pm 3,2 \mu\text{g}/\text{kg}_{\text{dw}}$ v půdě zavlažované podzemní vodou [80].

1.2.7 Degradace a odstraňování antibiotik

Chemické vlastnosti antibiotik samozřejmě ovlivňují jejich perzistenci v životním prostředí a náchylnost k degradačním procesům. Po vstupu antibiotik do půdy dochází k několika vzájemně propojeným procesům. Mohou být degradovány, mohou se hromadit v půdě, být absorbovány plodinami, nebo mohou být snadno dostupné pro přenos do povrchových a podzemních vod vyluhováním [72].

Ve vodném prostředí podléhají různým přeměnám. Např. chloramfenikol, ampicilin a penicilin podléhají hydrolýze, erytromycin a tetracyklin fotolýze, dále pak může docházet k sorpci či biologické degradaci. Tyto procesy jsou též ovlivněny environmentálními faktory jako je sluneční záření, teplota vody, přítomnost mikroorganismů, obsah organické hmoty či vlastnosti sedimentu [56]. Degradaci ARGs v přírodě urychluje zvýšená teplota, silné světlo a anaerobní podmínky [25].

Pro jejich odstranění se využívají procesy jako např. ozonizace a kombinace UV záření s chlorem, H_2O_2 nebo Fe^{2+} . Mezi další techniky čištění patří koagulace, flokulace, adsorpce na aktivní uhlí či jiné sorbenty, fotokatalýza, elektrolyza a membránové technologie [25]. Většina metod má řadu nevýhod jako jsou vysoké náklady na energii a materiál, nebo sekundární kontaminace přidáním dalších chemikálií. Adsorpce je pravděpodobně nejvíce využívaná pro svou vysokou účinnost a jednoduchost [81].

Pro odstranění tetracyklinů, které jsou poměrně špatně biologicky odbouratelné, je velmi výhodné využití právě adsorpce, která je jednoduchou a levnou metodou, či fotokatalytický rozklad, jehož produkty jsou mnohem méně toxické. Jako adsorbent i fotokatalyzátor se osvědčily sloučeniny na bázi uhlíku, které jsou šetrné k životnímu prostředí a poměrně levné a dostupné. Mezi tyto látky patří i grafen, což je nanomateriál s vysokým povrchem a jehož strukturu, a tedy i vlastnosti, lze upravovat dle požadavků, což je výhodné pro využití jako adsorbentu. Má také vynikající elektrickou vodivost, pohyblivost elektronů, což zefektivňuje jejich přenos, a vysokou optickou průhlednost. Tyto vlastnosti jej zase činí skvělým materiálem pro fotokatalýzu [61].

1.2.8 Regulace přítomnosti antibiotik v prostředí v rámci Evropské unie

Regulace antibiotik má celosvětově velký význam. Mezi hlavní přínosy legislativních opatření lze zařadit [25]:

- Omezení nadužívání antibiotik prostřednictvím zavedení norem a limitů pro obsah reziduí antibiotik v zemědělských produktech.
- Omezení nadměrného používání antibiotik může snížit pravděpodobnost vzniku rezistence, tedy prodloužit účinnost stávajících antibiotik a tím i získat čas na vývoj léčiv, která by mohla antibiotika nahradit.
- Ochrana lidského zdraví a snížení nákladů na léčbu díky menší pravděpodobnosti vzniku těžce léčitelných infekcí způsobených rezistentními kmeny.
- Zajištění kvality a bezpečnosti zemědělských produktů.
- Snížení znečištění životního prostředí a s tím spojená ochrana ekosystémů.

Účinky způsobené přítomností antibiotik a jejich interakce s dalšími látkami v životním prostředí nejsou dosud dostatečně prozkoumány. Evropská unie, a tedy i ČR, v současnosti postrádá jednotný a komplexní legislativní rámec, který by reguloval únik farmaceutických látek do životního prostředí a stanovoval závazné limity pro obsah léčiv např. v pitné vodě [19; 56]. Avšak celé této problematice se věnuje stále větší pozornost, což se odráží v přijetí dílčích aktivit jako několika strategických dokumentů a rámcových legislativních opatření zaměřených na omezení negativních dopadů přítomnosti farmaceuticky aktivních látek v životním prostředí.

V roce 2017 byl Evropskou komisí vydán Evropský akční plán „Jedno zdraví“ proti antimikrobiální rezistenci (AMR). Plán je založen na přístupu „Jedno zdraví“, což je celosvětově uznávaný pojem, který propojuje zdraví lidí, zvířat a životního prostředí. Klíčovými cíli akčního plánu je širší sběr dat od členských států o používání antimikrobiálních látek, zlepšení koordinace reakcí členských států na AMR sdílením zkušeností, podpora výzkumu, vývoje a inovací, a zintenzivnění globálního úsilí EU v této oblasti [82].

Roku 2019 byl schválen Akční plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP) pro období 2019–2022. Hlavními pilíři bylo zlepšení informovanosti o stavu antibiotické rezistence a spotřeby antibiotik, kontrola a prevence antibiotické rezistence a podpora vědy a výzkumu [83]. Aktualizovaný plán na další období dosud nebyl zveřejněn, ale na konferenci „Antibiotická rezistence v ČR: Jak společně zastavit nezastavitelné“ pořádané Českou platformou antibiotické rezistence, z.s. (CZEPAR) 14.–15. listopadu 2024 byla zmínka

o tzv. Akčním plánu Národního antibiotického programu ČR na období 2024–2030, do něhož byl nově zařazen sektor životního prostředí [84].

V roce 2019 Evropská unie přijala „Strategický přístup Evropské unie k léčivým přípravkům v životním prostředí“, který doplňuje cíle přístupu „Jedno zdraví“ proti antimikrobiální rezistenci. Jeho cílem je řešit problém znečištění způsobeného léčivými přípravky, s čímž jsou spojena rizika pro životní prostředí i pro lidské zdraví, a to navrhováním opatření k eliminaci negativních dopadů farmaceutických látek na životní prostředí i člověka, podporovat inovace a zajistit, aby tato opatření neohrozila přístup k bezpečným a účinným léčivům v humánní i veterinární medicíně [85].

Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2020/1729, které doplňuje Směrnici evropského parlamentu a rady 2003/99/ES, stanovuje pravidla pro monitorování antibakteriální rezistence. Popisuje sledování rezistence u zoonotických (přenášejících se ze zvířat na člověka, kde mohou vyvolat onemocnění, např. salmonelu) a komenzálních bakterií (žijících uvnitř hostitele či na povrchu jeho těla, neškodící mu) v letech 2021–2027 v chovech hospodářských zvířat (skot, krůty, brojleři, prasata) pro produkci masa. Monitoring zahrnuje bakterie *Salmonella spp.*, *Campylobacter coli* nebo *Escherichia coli* a některé konkrétní enzymy inaktivující určité typy antibiotik. Členské státy musí každoročně hlásit výsledky svého monitorování Komisi. Toto rozhodnutí bylo rozšířeno roku 2023 prováděcím rozhodnutím (EU) 2023/1017 o sledování bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin (MRSA, z angl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) u prasat [86; 87].

Také bylo vydáno Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2024/1229, které doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/4 týkající se výroby a užívání krmiv, kde je uvedeno, že musí být zamezováno křížové kontaminaci krmiv hospodářských zvířat antimikrobiálními látkami. Doplnující nařízení z roku 2024 již uvádí doporučené analytické metodiky a maximální povolené limity. Tyto limity jsou např. pro amoxicilin 150 µg/kg, pro trimethoprim 25 µg/kg a pro tetracyklin 100 µg/kg [88].

S minimalizací rizika rozvoje antimikrobiální rezistence souvisí i Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2024/1159, které doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 a stanovuje pravidla pro účinné a bezpečné používání veterinárních léčivých přípravků podávaných perorálně jinými způsoby než prostřednictvím medikovaného krmiva, např. ve vodě [89].

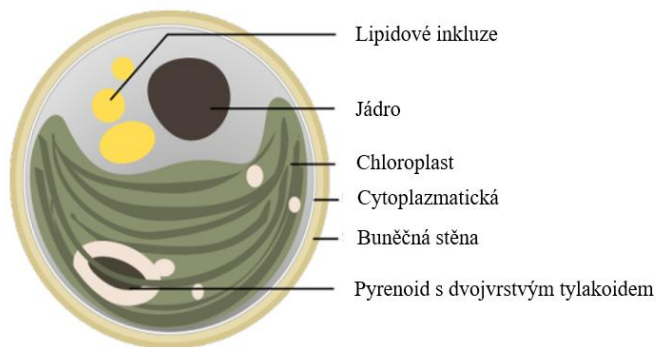
Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2025/439 doplňuje směrnici 2008/105/ES a určuje nový seznam látek, které musí být na území EU monitorovány ve vodních tocích. Na tomto seznamu se nyní vyskytují ofloxacin, abamektin, oktokrylen, propranolol, tetracyklin či oxytetracyklin. Data slouží k hodnocení rizika, které tyto látky představují pro vodní prostředí, což pak slouží k rozhodnutí, zda by látka měla být zařazena na seznam prioritních látek podle směrnice 2000/60/ES. Na tomto seznamu, který byl aktualizován směrnicí 2013/39/EU, jsou zařazeny látky významně rizikové pro vodní prostředí a související ekosystémy, např. benzen, naftalen, polyaromatické uhlovodíky, rtuť a její sloučeniny, diuron, atrazin a další [15; 90; 91].

Problematiku kvality pitné vody v EU upravuje směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184, která stanovuje hygienické požadavky a závazné limitní hodnoty pro vybrané ukazatele kvality vody určené k lidské spotřebě, např. dusičnany, pesticidy, olovo či arsen. V rámci této směrnice byl zaveden také seznam sledovaných látek, jehož konkrétní podobu stanovuje prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2022/679. Má obsahovat látky, které jsou přítomny ve vodě určené k lidské spotřebě a mohly by představovat riziko pro lidské zdraví, např. léčivé přípravky, endokrinní disruptory či mikroplasty. V současnosti jsou na tomto seznamu dvě látky, a to 17- β -estradiol (směrná hodnota 1 ng/l) a nonylfenol (směrná hodnota 300 ng/l). Směrné hodnoty nejsou závazné limity, jejichž překročení by vyžadovalo okamžitý zákaz, slouží spíše pro hodnocení rizika a případné zahájení příslušných opatření k zajištění kvality vody [92; 93].

1.3 Zelené mikrořasy

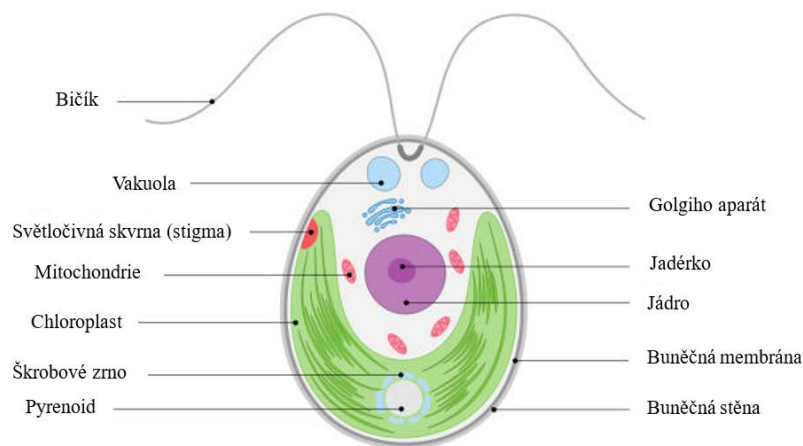
Mikrořasy jsou jednobuněčné eukaryotické organismy, které k získávání energie využívají fotosyntézu podobně jako vyšší rostliny. Jejich buňky obsahují buněčnou stěnu, plazmatickou membránu, cytoplazmu, jádro a základní organely (viz Obrázek 5 a 6). Klíčovou součástí jsou plastidy, zejména chloroplasty, které obsahují chlorofyl – barvivo nezbytné pro fotosyntézu [94].

Chlorella



Obrázek 5: Buněčná struktura řasy rodu *Chlorella* (upraveno a převzato z [95])

Chlamydomonas



Obrázek 6: Buněčná struktura řasy rodu *Chlamydomonas* (upraveno a převzato z [96])

Chlorofyl je hydrofobní zelené barvivo, které se nachází v chloroplastech zelených částí rostlin či řas. Po absorpci záření vhodné vlnové délky se podílí na fotosyntéze. Existuje více typů chlorofylu – *chlorofyl a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*. Hlavními jsou *chlorofyl a* a *chlorofyl b*, které se strukturálně liší pouze v substituentu – methyl nebo formyl. V rostlinách bývají přítomny oba typy a to v přibližném poměru 3:1 ve prospěch *chlorofylu a*. Obsah chlorofylu v mikrořasách bývá mezi 0,5 až 1 % sušiny. *Chlorofyl c* bývá převážně obsažen v mořských řasách, *chlorofyl d* pak v červených řasách a společně s *chlorofylem f* v cyanobakteriích. *Chlorofyl e* je z nich nejméně rozšířený [97; 98; 99].

Charakteristickým znakem mikrořas je oproti vyšším rostlinám absence cévního systému pro transport živin. Tento nedostatek je kompenzován fotoautotrofní povahou každé buňky mikrořasy, která umožňuje přímé vstřebávání živin z okolí bez potřeby složité cévní sítě.

Tato jedinečná vlastnost zjednodušuje proces příjmu živin a odlišuje mikrořasy od vyšších rostlin z hlediska strategie transportu živin [94].

Řasy jsou klíčovou součástí životního prostředí. Produkují přibližně polovinu kyslíku na Zemi a hrají zásadní roli v globálním uhlíkovém cyklu. Mikrořasy obývají téměř všechny ekosystémy na Zemi a dokáží přežít v extrémních podmínkách, včetně vysokých nebo nízkých teplot, extrémních hodnot pH, tlaku a salinity [100]. Vyskytují se hojně ve vodních ekosystémech a tvoří velkou část biomasy. Jsou primárními producenty ve vodním potravním řetězci, kde slouží jako potrava pro larvální stádia ryb, měkkýšů a dalších organismů. Zásadně ovlivňují strukturu i funkci vodních ekosystémů. Také významně přispívají k rozkladu organické hmoty, čímž uzavírají koloběh živin a podílejí se na výměně energie i odbourávání znečišťujících látek. Kvůli své citlivosti na různé kontaminanty jsou též považovány za bioindikátory kvality vody [24; 56; 81].

Některé druhy, převážně sinice, však mohou způsobovat škodlivé vodní květy (tzv. *harmful algal blooms*) a produkují toxiny nebezpečné pro vodní organismy i člověka. Po jejich odumření navíc dochází k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě, což může dále narušit vodní ekosystémy [101].

Mikrořasy obsahují vysoce stravitelné proteiny bohaté na esenciální aminokyseliny, sacharidy, omega-3 mastné kyseliny nebo karotenoidy. Biologicky aktivní látky obsažené v mikrořasách vykazují antimikrobiální, antioxidační, neuroprotektivní a imunitu stimulující účinky. Používají se tedy jako potravinové doplňky, přísady do kosmetiky, potravin či krmiv a mají potenciální využití i v medicíně [97; 100; 102].

1.3.1 Interakce kontaminantů s mikrořasami

Mikrořasy se vyznačují pozoruhodnou schopností vylučovat anorganické látky jako dusičnany, fosforečnany či těžké kovy. Dusík potřebují pro syntézu bílkovin a enzymů, fosfor pro syntézu nukleových kyselin a fosfolipidů a těžké kovy využívají jako mikroživiny pro svůj vývoj. Mohou také absorbovat a odstraňovat některé organické látky, včetně antibiotik. Mezi jimi využívané mechanismy patří biosorpce, bioakumulace či biodegradace. Pomocí fotosyntézy zpracovávají CO₂ a uvolňují O₂, který zase mohou využít aerobní bakterie rozkládající další organické kontaminanty. Mikrořasy, často v kombinaci s bakteriemi, se tedy ukazují jako velice výhodné pro bioremediaci odpadních vod. Využití mikrořas pro remediaci se nazývá fykoremediace. Tento způsob čištění odpadních vod se považuje za udržitelný, jelikož na rozdíl od jiných metod čištění neprodukuje CO₂, ale dokonce je řasy využívají

pro fotosyntézu. Řasy tak vedle eliminace ECs přispívají ke snížení obsahu dusíku, fosforu a také patogenních bakterií. Avšak ne všechny znečišťující látky jsou biodegradabilní a některé mohou být pro mikrořasy i toxické [94].

Mikrořasy mají na svém povrchu různé funkční skupiny, které mohou sloužit jako adsorpční místa. Biosorpce tedy souvisí s přilnavostí kontaminantů k povrchu mikrořas. Existují dva typy biosorpce. Fyzikální, kdy dochází k povrchovým interakcím, a chemická, kdy vznikají chemické vazby mezi řasou a kontaminantem. K bioadsorpci také dochází, když se kontaminanty sorbují na extracelulární polymerní látky (EPS, z angl. *extracellular polymeric substances*). Tyto extracelulární látky lze rozdělit do dvou forem: vázané EPS, které jsou těsně spojené s buněčnými stěnami mikrořas, a rozpustné EPS, jež jsou vylučovány mikrořasami do okolního prostředí. Mezi EPS patří proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a huminové látky, které poskytují různé funkční skupiny, jako jsou karboxylové, aminové a hydroxylové, čímž poskytují dostupná vazebná místa pro adsorpci. Obecně EPS chrání buňky před nepříznivými vlivy prostředí. Mikrořasy mohou v reakci na stres způsobený toxicitou kontaminantů, např. antibiotik, vylučovat více EPS. Buněčné stěny mikrořas a EPS mají převážně záporný náboj díky přítomnosti dominantních funkčních skupin jako např. karboxyl, hydroxyl a fosforyl. Proto mohou být antibiotika s kladným nábojem účinně adsorbována prostřednictvím elektrostatických interakcí [94; 103].

Faktory ovlivňující účinnost biosorpce jsou počáteční hodnota pH, množství rozpuštěného kyslíku, koncentrace znečišťujících látek a doba zdržení v systému. Obecně mají lipofilní sloučeniny vyšší afinitu k mikrořasám v důsledku elektrostatických interakcí, zatímco hydrofilní sloučeniny jsou v růstovém prostředí odolnější a mají nízkou afinitu k bioadsorpci. Lipofilitu látky lze hodnotit pomocí $\log K_{ow}$ (rozdělovací koeficient oktanol–voda), přičemž vyšší hodnota $\log K_{ow}$ znamená vyšší adsorpci sloučenin na povrch mikroorganismů nebo na pevnou fázi. Antibiotika s vysokými hodnotami $\log K_{ow}$ (>5) a vysokou molekulovou hmotností bývají snadněji adsorbovatelná než antibiotika s nízkými hodnotami $\log K_{ow}$ ($<2,5$). Schopnost mikrořas adsorbovat látky do značné míry závisí i na druhu řasy [94; 103].

Vzhledem k tomu, že bioadsorpce je nemetabolický proces, dochází k navázání antibiotik i jiných kontaminantů na povrch mikrořas na živých i neživých buňkách. Biomasa neživých mikrořas se tak ukázala jako vysoce efektivní sorbent pro odstranění antibiotik [103].

Mezi výhody biosorpce patří nízké náklady, jednoduchost procesu a to, že i neživá řasová biomasa může odstranit kontaminanty z vodního prostředí mechanismem biosorpce [94; 104].

Po biosorpci často následuje bioakumulace. Jedná se o transport látky z okolního prostředí do buněčné cytoplazmy, kde se může vázat na intracelulární proteiny. Antibiotika mohou přes buněčnou membránu mikrořas procházet třemi hlavními mechanismy, kterými jsou pasivní difuze, usnadněná difuze (*passive facilitated diffusion*) a aktivní transport. Pasivní difuze nevyžaduje dodání žádné energie. Usnadněná difuze je zprostředkována pomocí specifických transportních struktur, nejčastěji proteinů [103]. Akumulovaná antibiotika uvnitř buněk mikrořas mohou vést k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), např. superoxidových radikálů, hydroxylových radikálů či alkoxy radikálů. Běžně tyto radikály napomáhají metabolismu a buněčné proliferaci, avšak při vystavení antibiotikům je jejich hladina vyšší a může vést k denaturaci DNA a proteinů, buněčnému poškození, mutagenizi či buněčné smrti. Avšak mikrořasy dokážou akumulovaná antibiotika také metabolizovat [103].

Po bioakumulaci mohou řasy kontaminanty degradovat pomocí enzymaticky katalyzovaných reakcí, mezi něž patří hydroxylace, glykosylace, hydrogenace, dehydrogenace a hydrolýza. Biodegradace je neúčinnějším mechanismem odstraňování antibiotik pomocí mikrořas. Výsledkem biodegradace může být vznik degradačních produktů či kompletní mineralizace na CO₂ a vodu. Tato biodegradace probíhá ve třech fázích:

- 1) Za účasti enzymů dochází k přeměně lipofilních molekul na hydrofilní. Hlavními zúčastněnými enzymy jsou cytochrom P450, cytochrom b5 a NADPH-cytochrom P450 reduktáza. Tato fáze zahrnuje hydrolýzu, oxidaci a redukci.
- 2) Molekuly s elektrofilními substituenty tvoří konjugát s glutathionem za katalýzy enzymem glutathion-S-transferáza. Může docházet ke konjugaci i s jinými molekulami, např. sacharidy nebo aminokyselinami.
- 3) Dochází k degradaci pomocí enzymů jako karboxyláza, dekarboxyláza či dehydrogenáza [103; 105].

Kromě bioadsorpce, bioakumulace a biodegradace mohou být některé kontaminanty, včetně antibiotik, odstraněny nepřímo prostřednictvím fotodegradace a volatilizace za přítomnosti mikrořas. K tomu však dochází pouze za speciálních podmínek, které nejsou běžné, a proto většinou tyto mechanismy bývají považovány za zanedbatelné [103].

Řasová biomasa získaná z čištění odpadních vod po biodegradaci může být využita k výrobě biovodíku, biopaliv (v závislosti na složení biodiesel, bioplyn, bioethanol, biobutanol) či uhlovodíků. Kombinace čištění odpadních vod mikrořasami a následného využití jejich biomasy pro výrobu biopaliv či jiných produktů pozitivně přispívá k udržitelnosti a cirkulární ekonomice. Využití mikrořas pro čištění odpadních vod je výhodné, jelikož mikrořasy jsou hojně přítomny v prostředí, netvoří sekundární znečištění, rostou poměrně rychle a mají velký povrch. Oproti ostatním způsobům čištění nejsou mikrořasy tak energeticky ani finančně náročné. Výhodou také je, že během procesu fykoremediace nedochází k tvorbě toxičtějších vedlejších produktů, a tedy ani ke zvýšení toxicity pro životní prostředí [94; 104; 106; 107].

Účinnost fykoremediace je ovlivněna několika faktory jako pH, oxidačně-redukční potenciál, teplota, délka a intenzita světelné expozice a doba zdržení. Účinnost odstraňování kontaminace se také výrazně liší u různých druhů řas. Může se pohybovat od žádného odstranění až po úplné odstranění v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech sloučeniny, druhu řasy, metodě kultivace a provozních podmínkách. Výběr vhodného druhu mikrořasy a optimalizace podmínek pěstování je tedy zásadní pro účinnou bioremediaci antibiotik [106].

Mikrořasy rodu *Chlamydomonas*, *Chlorella* a *Scenedesmus* jsou vzhledem k jejich dostupnosti a velkému potenciálu nejvíce využívané pro antibiotickou bioremediaci odpadních vod [103]. *Chlorella vulgaris* dokáže odstranit např. tetracyklin, enrofloxacin, sulfamethazine, sulfadiazine, levofloxacin, norfloxacin a další [104]. Tabulka 14 uvádí příklady odstranění dvou ze čtyř antibiotik, která byla použita v experimentální části této diplomové práce, použité řasy, dané účinnosti a příslušnou literaturu.

Tabulka 14: Účinnost mikrobiální biodegradace ciprofloxacinu a tetracyklinu

Antibiotikum	Počáteční koncentrace antibiotika [mg/l]	Použitá řasa	Účinnost [%]	Zdroj
Ciprofloxacin	4	<i>Synechocystis sp.</i>	90	[81]
	4	<i>Chlorella vulgaris</i>	90	
	0,025	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	93	[108]
	20	<i>Chlorella sorokiniana</i>	83,3	[109]
	10	<i>Chlamydomonas sp.</i>	100	[110]
	5	<i>Scenedesmus obliquus</i>	87,5 ± 3,5	[111]
	2	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	13	[112]
Tetracyklin	80	<i>Tetraselmis suecica*</i>	55,11 ± 2,5	[107]
	2,5	<i>Scenedesmus quadricauda*</i>	2,00 ± 0,2	
	80	<i>Scenedesmus quadricauda*</i>	62,97 ± 4,9	
	0,5	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	>91 %	[113]
	1	<i>Chlorella sp.</i>	100	[114]

*V tomto případě se jednalo o řasovou biomasu po extrakci lipidů

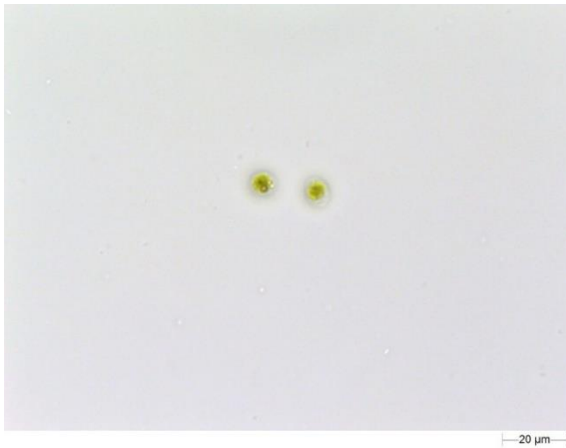
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost využití některých druhů mikrořas k odstraňování antibiotik z modelových odpadních vod. Součástí toho bylo porovnání růstu jednotlivých řas v přítomnosti antibiotik a dále pak vyhodnocení měřených parametrů – turbidity, pH, koncentrace chlorofylu a množství biomasy.

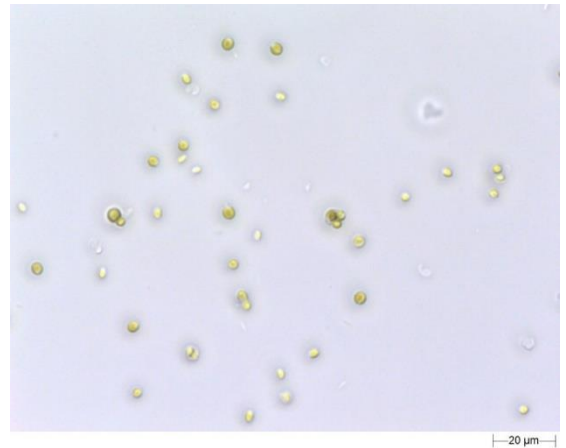
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Byly provedeny kultivace čtyř různých druhů mikrořas v BBM médiu s přidavkem antibiotik a jeden experiment v modelové odpadní vodě taktéž s přidavkem antibiotik. Byla použita čtyři antibiotika z různých skupin, jež byla podrobněji popsána v kapitole 1.2 – ampicilin, ciprofloxacín, chloramfenikol a tetracyklin. V každém experimentu byly testovány dvě výchozí koncentrace všech antibiotik, přibližně 1 µg/l a 10 µg/l (přesná koncentrace byla vždy stanovena experimentálně pomocí HPLC-MS/MS). Každý experiment probíhal po dobu tří týdnů. Lahve byly v průběhu experimentů umístěny na třepačkách pod stálým osvětlením a z důvodu možnosti výměny plynů (zejména kvůli zajištění přísunu CO₂ pro řasy ze vzduchu a odvádění produkovaného O₂) byly přikryty pouze buničinou s gumičkou, nikoliv víčkem. V průběhu experimentu byla vždy průběžně měřena turbidita a pH. Po ukončení experimentu následovala filtrace přes filtry ze sklených vláken (porozita 0,7 µm) za podtlaku, stanovení koncentrací chlorofylu po extrakci v methanolu, stanovení biomasy a stanovení koncentrace antibiotik ve filtrátech. V následujících podkapitolách budou podrobněji popsány jednotlivé fáze experimentů včetně specifik použitého vybavení a chemikálií.

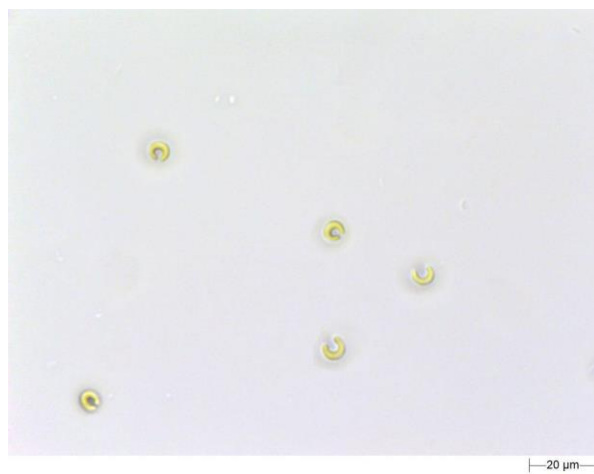
Použitými řasami byly *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Všechny druhy pochází z Botanického ústavu Akademie věd ČR, Třeboň. Na následujících obrázcích jsou mikroskopické snímky jednotlivých druhů (viz Obrázky 7–9), pořízené pomocí přístroje Morphologi 4 od společnosti Malvern Panalytical (UK) při 50násobném zvětšení. Pro oba zástupce rodu *Chlorella* slouží pouze jeden obrázek, jelikož při rozlišení použitého mikroskopu nejsou vzájemně rozpoznatelné.



Obrázek 7: Mikroskopický snímek *Chlamydomonas reinhardtii*



Obrázek 8: Mikroskopický snímek *Chlorella* spp.



Obrázek 9: Mikroskopický snímek *Pseudokirchneriella subcapitata*

3.1 Příprava roztoků antibiotik

Byly připravovány roztoky antibiotik (viz Tabulka 15) o přibližné koncentraci 1 mg/l, případně 2 mg/l. Na analytických vahách (NewClassic MS, Mettler Toledo, Švýcarsko) s přesností na 5 desetinných míst bylo naváženo přibližně 0,5 mg ($0,5 \pm 0,06$ mg), případně 1 mg ($1 \pm 0,05$ mg), antibiotika na navažovací lodičku. Z té byla látka kvantitativně převedena do 500ml odměrné baňky a doplněna ultra čistou vodou (zařízení Ultra Clear TP UV UF TM, Evoqua Water Technologies, Německo). Z těchto roztoků bylo poté pipetováno do experimentu příslušné množství tak, aby koncentrace v experimentálních lahvích byla 1 μ g/l a 10 μ g/l.

Tabulka 15: Specifikace použitých antibiotik

Antibiotikum	Čistota	Dodavatel
Ampicilin	≥ 96 % (HPLC)	Sigma-Aldrich, Co.
Ciprofloxacin	≥ 98 % (HPLC)	
Chloramfenikol	≥ 98 % (HPLC)	
Tetracyklin	≥ 98 % (HPLC)	

3.2 Příprava živného média

Pro kultivaci řas bylo použito BBM médium (z angl. *bold basal medium*). Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých složek BBM média. V následující tabulce (Tabulka 16) jsou tyto roztoky označeny čísly 1–10 a je zde uvedena jejich koncentrace a také koncentrace jednotlivých složek ve výsledném BBM médiu. Následně bylo pro přípravu jednoho litru média pipetováno 10 ml roztoků č. 1–6 a 1 ml roztoků č. 7–10. Médium poté bylo doplněno ultra čistou vodou a sterilizováno v autoklávu (SYSTEC VX40, Systec, Německo).

Tabulka 16: Složení BBM média

č.	Složky	c (zásobní roztok) [g/l]	c (BBM médium) [mg/l]
1	NaNO ₃	25	250
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5	50
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5	75
4	NaCl	2,5	25
5	K ₂ HPO ₄	7,5	75
6	KH ₂ PO ₄	17,5	175
7	EDTA	50 g	50
	KOH	31 g	31
8	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98	4,98
	H ₂ SO ₄	1,757	1,757
9	H ₃ BO ₃	11,42 g	11,42
10	Stopové prvky		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82	8,82
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44	1,44
	MoO ₃	0,71	0,71
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57	1,57
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49	0,49

3.3 Kultivace řas

V rámci experimentálních pokusů byly řasy kultivovány v 250ml lahvích přikrytých buničinou s gumičkou, aby mohlo docházet k transportu plynů. Do těchto lahví bylo předloženo 170 ml roztoku léčiva v BBM o požadované koncentraci (vždy přibližně 1 a 10 µg/l) a 10 ml řasové suspenze v exponenciální fázi růstu. Lahve byly umístěny na třepačce (Rotamax 120, Heidolph, Německo) při 150 otáčkách za minutu a pod stálým osvětlením (8 µmol/m²·s) po dobu tří týdnů. Teplota v laboratoři byla 24 ± 2 °C. Roztok léčiva v BBM byl současně předložen do plastové zkumavky, která byla také přikryta pouze buničinou a ponechána vedle třepačky po celou dobu experimentu. To bylo za účelem stanovení případné degradace léčiv jinými mechanismy než působením mikrořas. Taktéž byly připraveny dvě lahve, obsahující pouze 170 ml BBM média a 10 ml řasové suspenze, jako kontrola. Pro stanovení odparu kapaliny a pro následný přepočítání koncentrace léčiva na konci experimentu byla dále připravena jedna lahev se 180 ml BBM a jedna zkumavka s 40 ml BBM. Tyto nádoby byly též přikryty buničinou a byly umístěny na třepačce, respektive vedle ní, po celou dobu experimentu. Na počátku experimentu a v jeho průběhu byla měřena turbidita (přístroj Densitometer DEN-1B, 565 ± 15 nm, BioSan, Lotyšsko) a pH (pH metr HI 9124, Hanna Instruments, USA) všech suspenzí.

Jednotlivé vzorky byly vždy označeny písmenem (A–D) a číslicí (1–2). Písmeno značí dané antibiotikum a číslice koncentraci antibiotika v roztoku. V posledním experimentu s modelovou odpadní vodou na bázi digestátu byla testována i směs všech antibiotik – ta byla označena písmenem E. Následující Tabulka 17 vysvětluje význam jednotlivých symbolů. Fotografie zachycující průběh kultivace je vložena do příloh (viz Příloha A).

Tabulka 17: Vysvětlení symbolů použitých pro značení jednotlivých vzorků

Symbol	Význam
A	Ampicilin
B	Ciprofloxacin
C	Chloramfenikol
D	Tetracyklin
E	Směs všech 4 antibiotik
1	Nižší koncentrace ~ 1 µg/l
2	Vyšší koncentrace ~ 10 µg/l

3.4 Stanovení chlorofylu a biomasy

Po ukončení experimentu bylo vždy z každé lahve odebráno dvakrát 50 ml řasové suspenze a zfiltrováno přes filtrační zařízení (PSF 250 ml, Thermo Scientific – Nalgene, USA) s filtrem ze skelných vláken (F261, průměr 47 mm, porozita 0,7 μm , Fisher Scientific, USA). V případě experimentu s modelovou odpadní vodou na bázi digestátu bylo filtrováno pouze 20 ml řasové suspenze přes filtr s vyšší porozitou (1,6 μm), a to až po odstředění pomocí centrifugy (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Německo). Pro stanovení chlorofylu byl filtr s odfiltrovanou řasou vložen do 50ml plastové centrifugační zkumavky a bylo přidáno 20 ml methanolu (p.a., Penta, ČR) a obsah byl intenzivně protřepán. Takto byla fotosyntetická barviva z řas extrahována v lednici po dobu dvou dnů. Poté byla extrakce ukončena, vzorky byly opět intenzivně protřepány a zfiltrovány přes filtrační papír ze skelných vláken, aby se odstranily drobné útržky filtračního papíru z první filtrace. Následně byla změřena absorbance filtrátu při vlnových délkách 666, 653, 663, 646, 470 nm na spektrofotometru (DR6000, Hach, USA). K výpočtu koncentrace chlorofylu byly použity dva postupy. První postup k výpočtu využívá hodnoty absorbance při vlnových délkách 666 a 653 nm (viz rovnice 1–3) [115].

$$c_{Chl\ a} = 15,65 \cdot A_{666} - 7,34 \cdot A_{653} \quad (1)$$

$$c_{Chl\ b} = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666} \quad (2)$$

$$c_{Chl\ celk} = c_{Chl\ a} + c_{Chl\ b} \quad (3)$$

kde A je absorbance, $c_{Chl\ a}$ je koncentrace *chlorofylu a*, $c_{Chl\ b}$ je koncentrace *chlorofylu b* a $c_{Chl\ celk}$ je celková koncentrace chlorofylu, vše v $\mu\text{g/ml}$.

Druhý postup k výpočtu koncentrace chlorofylu využívá zbývající hodnoty absorbancí při 663, 646 a 470 m. Součástí tohoto postupu je také výpočet koncentrace karotenoidů (viz rovnice 4–6) [116].

$$c_{Chl\ a} = 12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{646} \quad (4)$$

$$c_{Chl\ b} = 21,5 \cdot A_{646} - 5,1 \cdot A_{663} \quad (5)$$

$$c_{kar} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot c_{Chl\ a} - 85,02 \cdot c_{Chl\ b}}{198} \quad (6)$$

kde c_{kar} je koncentrace karotenoidů, též v $\mu\text{g/ml}$.

Pro určení množství biomasy (sušiny) byl filtr před filtrací zvážen na analytických vahách (ABJ 220-4M, Kern, Německo). Po filtraci byl filtr se zachycenou řasou umístěn na Petriho misku a usušen v horkovzdušné sušárně (UM 400, Memmert, Německo) do konstantní hmotnosti při 105 °C. Z rozdílů hmotností samotného filtru a filtru s vysušenou biomasou bylo vypočteno množství biomasy, které bylo následně přepočteno na hmotnost odpovídající 1 l suspenze.

3.5 Stanovení koncentrace antibiotik

Koncentrace antibiotik byla stanovena pomocí HPLC-MS/MS formou servisního měření na pracovišti Katedry analytické chemie níže uvedeným postupem.

Analýza byla uskutečněna s využitím HPLC systému Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) jehož součástí bylo binární čerpadlo mobilní fáze, chlazený autosampler a termostat kolony. Pro detekci sloučenin byl HPLC systém spojen s tandemovým hmotnostním spektrometrem QTrap 4500 od firmy AB Sciex LLC (Framingham, MA, USA). Pro separaci sloučenin byla použita kolona ACE 3 C18-PFP, přičemž mobilní fázi tvořila směs deionizované vody (mobilní fáze A) a acetonitrilu (mobilní fáze B). Obě složky mobilní fáze byly okyseleny přídavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové.

Separace probíhaly při teplotě 30 °C, použitý dávkovaný objem byl 10 µl a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min.

Byla provedena optimalizace parametrů MS/MS detekce metodou přímého nástřiku při koncentraci každého antibiotika 100 µg/l. Látky byly při vstupu do MS systému ionizovány elektrosprejem. Detekce antibiotik probíhala v režimu MRM při záznamu pozitivně nabitých iontů v případě ciprofloxacinu a tetracyklinu, resp. negativně nabitých iontů v případě ampicilinu a chloramfenikolu.

3.6 Vyhodnocení účinnosti degradace léčiv

Účinnost degradace léčiv byla vyhodnocena na základě znalosti jejich koncentrace na počátku a na konci experimentu jak v experimentálních nádobách, tak v kontrolních vzorcích. Dále byl ve výpočtu zohledněn odpar kapaliny. Příklad výpočtu je demonstrován pro léčivo ciprofloxacin (c~1 µg/l) v experimentu s řasou *Chlamydomonas reinhardtii* v BBM médiu. Následující Tabulka 18 uvádí vstupní data využitá k výpočtu.

Tabulka 18: Vstupní data pro příklad vyhodnocení degradace ciprofloxacinu

Vzorek	Experiment		Kontrola	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec
c [$\mu\text{g/l}$]	1,155	0,788	1,155	1,749
V [l]	0,18	0,1477	0,04	0,0212

- Výpočet počátečního množství léčiva v experimentu

$$c = \frac{m}{V} \rightarrow m_1 = c \cdot V = 1,155 \cdot 0,18 = 0,2079 \mu\text{g}$$

- Výpočet konečného množství léčiva v experimentu

$$c = \frac{m}{V} \rightarrow m_2 = c \cdot V = 0,788 \cdot 0,1477 = 0,1164 \mu\text{g}$$

- Výpočet počátečního množství léčiva v kontrole

$$c = \frac{m}{V} \rightarrow m_3 = c \cdot V = 1,155 \cdot 0,04 = 0,0462 \mu\text{g}$$

- Výpočet konečného množství léčiva v kontrole

$$c = \frac{m}{V} \rightarrow m_4 = c \cdot V = 1,749 \cdot 0,0212 = 0,03706 \mu\text{g}$$

- Přepočtení konečného množství léčiva v kontrole, pokud by počáteční množství bylo stejné jako v experimentu

$$\begin{array}{r} 0,0462 \mu\text{g} \quad \dots\dots\dots \quad 0,03706 \mu\text{g} \\ 0,2079 \mu\text{g} \quad \dots\dots\dots \quad m_5 \\ \hline m_5 = 0,1668 \mu\text{g} \end{array}$$

- Výpočet celkového množství a podílu léčiva, které bylo degradováno v experimentu, tedy pomocí řasy i vedlejších vlivů

$$m_{EXP} = m_1 - m_2 = 0,2079 - 0,1164 = 0,0915 \mu\text{g}$$

$$\%_{EXP} = \frac{m_{EXP} \cdot 100}{m_1} = \frac{0,0915 \cdot 100}{0,2079} = 44,01 \%$$

- Výpočet degradovaného množství a podílu léčiva v kontrole, tedy vedlejšími vlivy

$$m_{KONTR} = m_3 - m_5 = 0,0462 - 0,1668 = 0,0411 \mu\text{g}$$

$$\%_{KONTR} = \frac{m_{KONTR} \cdot 100}{m_1} = \frac{0,0411 \cdot 100}{0,2079} = 19,77 \%$$

- Výpočet degradovaného množství a podílu léčiva působením řasy

$$m_{\check{R}ASA} = m_{EXP} - m_{KONTR} = 0,0915 - 0,0411 = 0,0504 \mu\text{g}$$

$$\begin{array}{r} m_1 \dots\dots\dots 100 \% \\ m_{\check{R}ASA} \dots\dots\dots \times \%_{\check{R}ASA} \\ \hline \%_{\check{R}ASA} = \frac{m_{\check{R}ASA} \cdot 100}{m_1} = \frac{0,0504 \cdot 100}{0,2079} = 24,2 \% \end{array}$$

- Výpočet podílu řasy na celkové degradaci

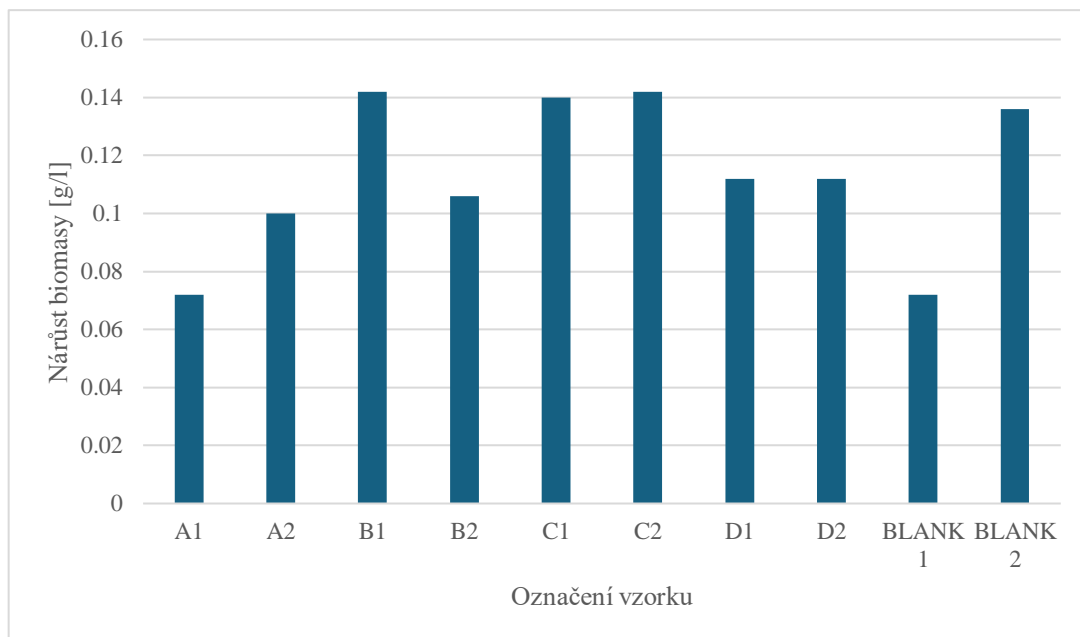
$$\begin{array}{r} m_{EXP} \dots\dots\dots 100 \% \\ m_{\check{R}ASA} \dots\dots\dots \times \%_{\check{R}ASA} \\ \hline \%_{\check{R}ASA} = \frac{m_{\check{R}ASA} \cdot 100}{m_{EXP}} = \frac{0,0504 \cdot 100}{0,0915} = 55 \% \end{array}$$

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V následující části práce jsou uvedeny a diskutovány výsledky provedených experimentů, včetně grafického znázornění degradace léčiv, množství stanoveného chlorofylu, biomasy a změny turbidity. Jak již bylo v textu uvedeno dříve, turbidita byla měřena průběžně, avšak pro větší přehlednost znázorňují grafy jen porovnání hodnot na počátku a konci experimentů. Pro ukázkou je průběh turbidity z experimentu s řasou *Chlamydomonas reinhardtii* v BBM médiu vložen do příloh (viz Příloha B). Průběžně bylo měřeno také pH. V experimentech v prostředí BBM pH rostlo od hodnoty přibližně 6,8 k průměrné hodnotě 7,8. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s prací, která popisuje laboratorní kultivaci *Chlorella vulgaris* v různých koncentracích odpadní vody z cukrovaru, přičemž jako kontrola bylo použito BBM médium. V této práci pH rostlo v rozmezí 6,86–8,3 [117]. Trend rostoucího pH v průběhu kultivace potvrzuje i studie kultivující řasu *Chlorella vulgaris* ve venkovních nádržích, kde bylo stanoveno pH v BBM médiu v rozsahu 8,1–9,2. To jsou sice vyšší hodnoty, ale konkrétní rozmezí a rychlost nárůstu se může lišit v závislosti na specifických experimentálních podmínkách [118]. U experimentu v modelové odpadní vodě na bázi digestátu pH klesalo od hodnoty 8,6 k 8,05. Obsah chlorofylu je zpracován vždy ve dvou grafech, jelikož byly použity dva postupy pro jeho stanovení.

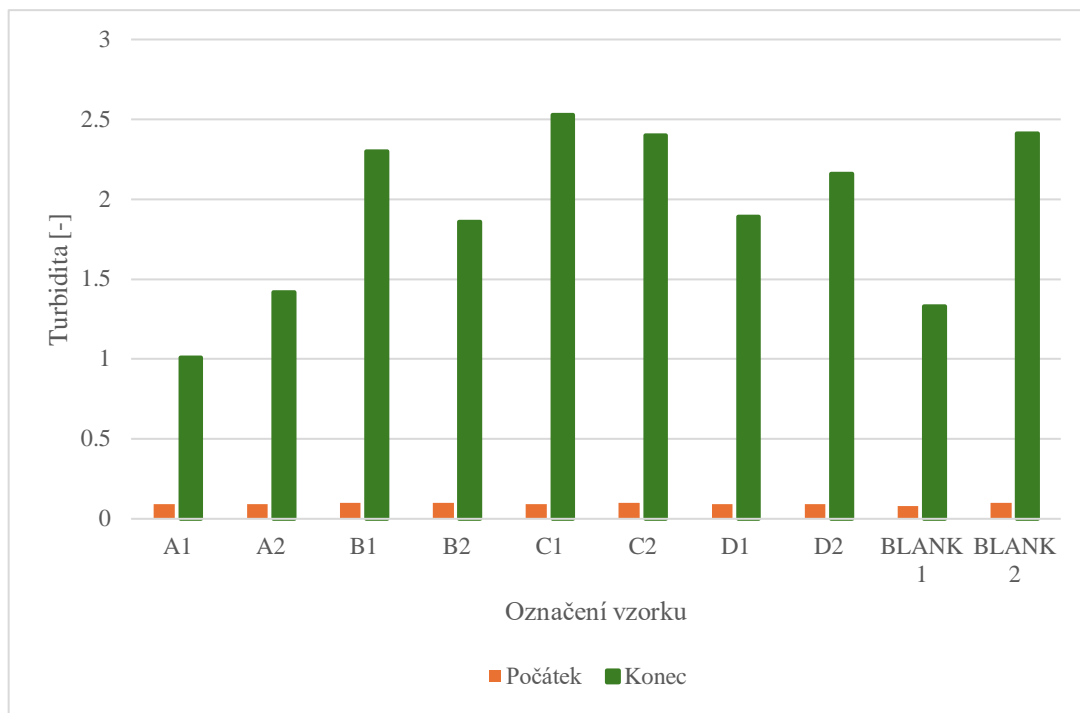
4.1 Degradace pomocí řasy *Chlamydomonas reinhardtii*

Postupem uvedeným v kapitole 3.3 byl proveden experiment trvající tři týdny s řasou *Chlamydomonas reinhardtii*. Byl stanovován nárůst biomasy, změna turbidity a obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů. Přehled výsledků je znázorněn graficky (Grafy 1–4). Výsledky degradace jsou zpracovány graficky (Graf 5) a pro znázornění uvedeny v tabulce v přílohách (Příloha C).



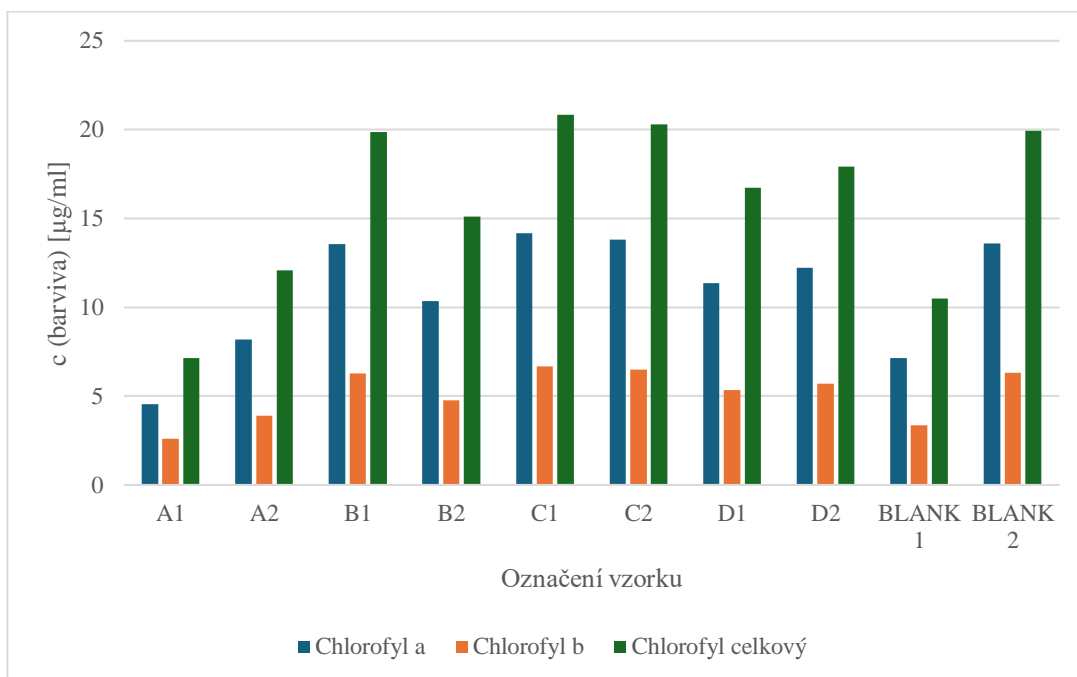
Graf 1: Nárůst biomasy – *Chlamydomonas reinhardtii*

Na Grafu 1 je vidět, že narostlá biomasa ve vzorcích bez léčiv (BLANK 1 a 2) se významně liší. Řasa je živý organismus a ovlivňuje ji mnoho faktorů, tudíž se nechová stále stejně. To komplikuje vyhodnocení experimentů, jelikož výsledky jsou zatíženy i touto chybou. I tak lze vidět a konstatovat, že nejlépe se řase dařilo ve vzorcích B1, C1 a C2, a to srovnatelně s kontrolním vzorkem BLANK 2. V případě ampicilinu (vzorky A) byl nárůst biomasy u nižší koncentrace léčiva horší, než u koncentrace vyšší. Možné příčiny jsou rozebrány v následující kapitole 4.2, kde ke stejnému jevu došlo u ciprofloxacinu a tetracyklinu. U léčiva ciprofloxacin (vzorky B) je tomu v tomto experimentu naopak. V případě zbylých dvou léčiv neměla rozdílná koncentrace léčiva na množství narostlé biomasy vliv. Na základě posouzení narostlého množství biomasy lze tedy konstatovat, že v rámci testovaných koncentrací nepůsobilo ani jedno antibiotikum na řasu *Chlamydomonas reinhardtii* inhibičně a výsledky nárůstu jsou srovnatelné se srovnávacími vzorky. Dle růstové křivky uvedené v práci z roku 2017 dosahuje nárůst biomasy u *Chlamydomonas reinhardtii* maxima v devadesáté hodině kultivace, což jsou necelé čtyři dny, kde množství biomasy odpovídá 0,74 g/l. Poté se růst dostává do stacionární fáze a po 125. hodině, což odpovídá pátému dni, dochází k odumírání buněk [119]. V další práci z roku 2014 byl nárůst biomasy po 10 dnech kultivace 0,346 g/l [120]. Biomasa stanovená v tomto experimentu ve srovnávacích vzorcích byla po 21 dnech 0,072 a 0,136 g/l, což při zohlednění skutečnosti, že většinu času tedy byla řasa ve stacionární fázi, odpovídá výše uvedeným závěrům jiných autorů.



Graf 2: Změna turbidity – *Chlamydomonas reinhardtii*

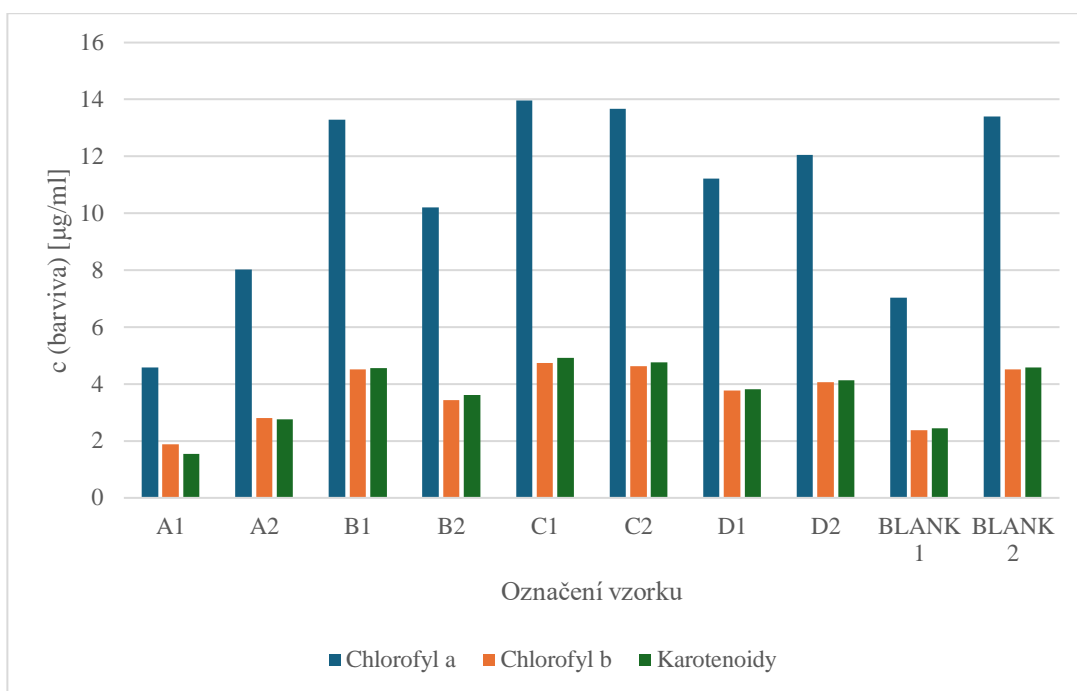
Z Grafu 2 lze vidět, že zvýšení hodnot turbidity odpovídá nárůstu biomasy a prakticky dokonale kopíruje trend pozorovaný u jejího stanovení. Nejvyšší turbidita byla na konci experimentu naměřena ve vzorcích B1, C1, C2 a BLANK 2.



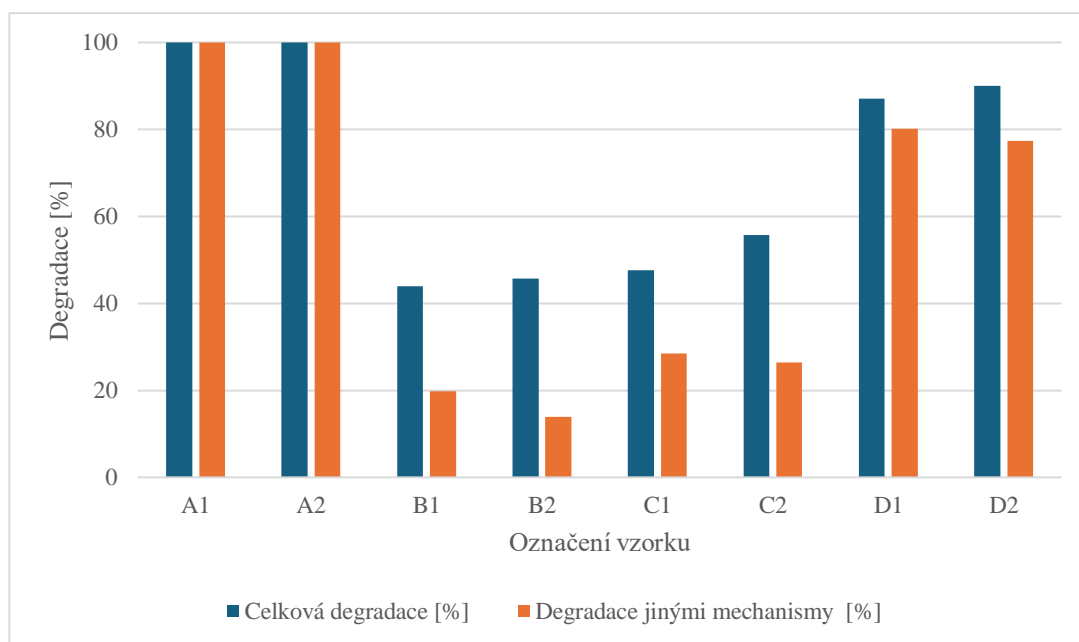
Graf 3: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, *Chlamydomonas reinhardtii*

Koncentrace celkového chlorofylu taktéž koreluje s nárůstem biomasy a zvýšením turbidity. Je vidět, že vyhodnocené koncentrace *chlorofylu a* se v obou postupech výpočtu téměř

shodují, zatímco koncentrace *chlorofylu b* se poměrně liší. Tato skutečnost je pozorována u všech provedených experimentů a potvrzuje obecně známý požadavek, že je nutné vždy uvádět způsob vyhodnocení, aby bylo možné výsledky porovnávat. V souladu s údaji z literatury byla ve všech případech stanovena vyšší hodnota *chlorofylu a* než *chlorofylu b*, většinou v uváděném poměru přibližně 3:1 ve prospěch právě *chlorofylu a* [98]. Je však potřeba zmínit, že tento poměr platí pro stanovení chlorofylu postupem a výpočtem dle rovnic 4–6 (viz Graf 4). Použitím prvního postupu a výpočtových rovnic 1–3 je poměr *chlorofylu a* ku *chlorofylu b* menší, cca 2:1 (viz Graf 3). Toto bylo pozorováno u všech použitých řas.



Graf 4: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, *Chlamydomonas reinhardtii*



Graf 5: Degradace antibiotik v BBM – *Chlamydomonas reinhardtii*

Na Grafu 5 lze vidět v procentech vynesenu účinnost odstranění antibiotik v jednotlivých vzorcích. Přesněji řečeno je v grafu uvedena hodnota celkové degradace a degradace způsobené jinými vlivy než řasou, tedy degradace v kontrolních vzorcích. Rozdíl mezi těmito sloupci představuje degradaci vlivem přítomnosti řasy.

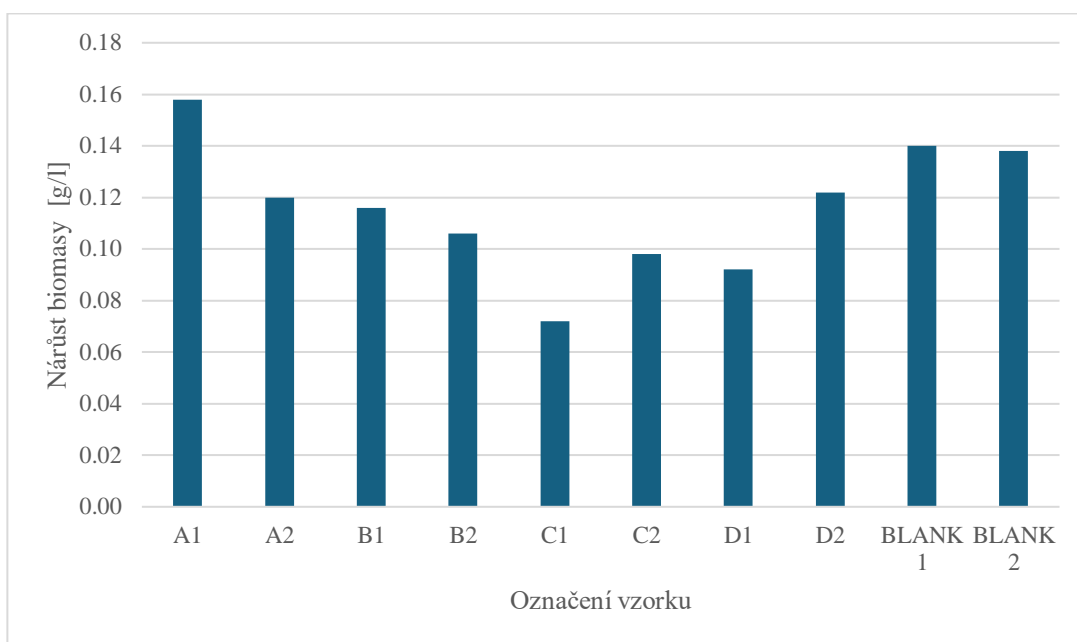
Ampicilin byl degradován jak v kontrolním vzorku, tak v experimentu s řasou ze 100 %, nelze tedy rozlišit příspěvek řasy k jeho odstranění. Toto bylo pozorováno u všech provedených experimentů. Ampicilin je totiž náchylný k degradaci vlivem záření, zejména z důvodu nízké stability β -laktamového kruhu. To potvrzuje např. studie z roku 2019, v rámci které byl zkoumán vliv simulovaného slunečního záření na čtyři β -laktamová antibiotika. U ampicilinu byla zaznamenána rychlá degradace a zároveň ztráta antimikrobiální aktivity jeho degradačních produktů [121].

Po ampicilinu byl dále nejlépe odstraňován tetracyklin, avšak i zde mělo zásadní roli světlo a další faktory. Podíl řasy na celkové degradaci byl 7,9 % pro vzorek D1 (viz Příloha C) a 14,1 % pro vzorek D2. Celková degradace ciprofloxacinu (B) a chloramfenikolu (C) byla v rozmezí 44–56 %. Podíl řasy na celkovém odstranění byl nejvyšší u vzorku B2, a to 31,87 %, což odpovídalo 70 % z celkových 45,72 % odstraněného léčiva. Jinak řečeno z celkového odstraněného množství léčiva v experimentu B2 byly cca $\frac{3}{4}$ odstraněny řasou. Pro porovnání ve studii z roku 2022 dosáhli autoři pomocí řasy *Chlamydomonas reinhardtii* odstranění 76 % ciprofloxacinu, jehož počáteční koncentrace byla 100 $\mu\text{g/l}$, po 14 dnech kultivace. Avšak uvádí, že hlavní podíl měla fotodegradace [122]. Další studie z roku 2020 sledovala pomocí této

mikrořasy odstraňování chlortetracyklinu, kde po 24 hodinách dosáhli účinnosti vyšší než 99 %, avšak z velké části došlo pouze k tvorbě isomerů [123].

4.2 Degradace pomocí řasy *Chlorella vulgaris*

Postupem uvedeným v kapitole 3.3 byl proveden také experiment s řasou *Chlorella vulgaris*. Byl stanovován nárůst biomasy, změna turbidity a obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů. Přehled výsledků je znázorněn graficky (Grafy 6–9). Výsledky degradace jsou též znázorněny graficky (Graf 10).



Graf 6: Nárůst biomasy – *Chlorella vulgaris*

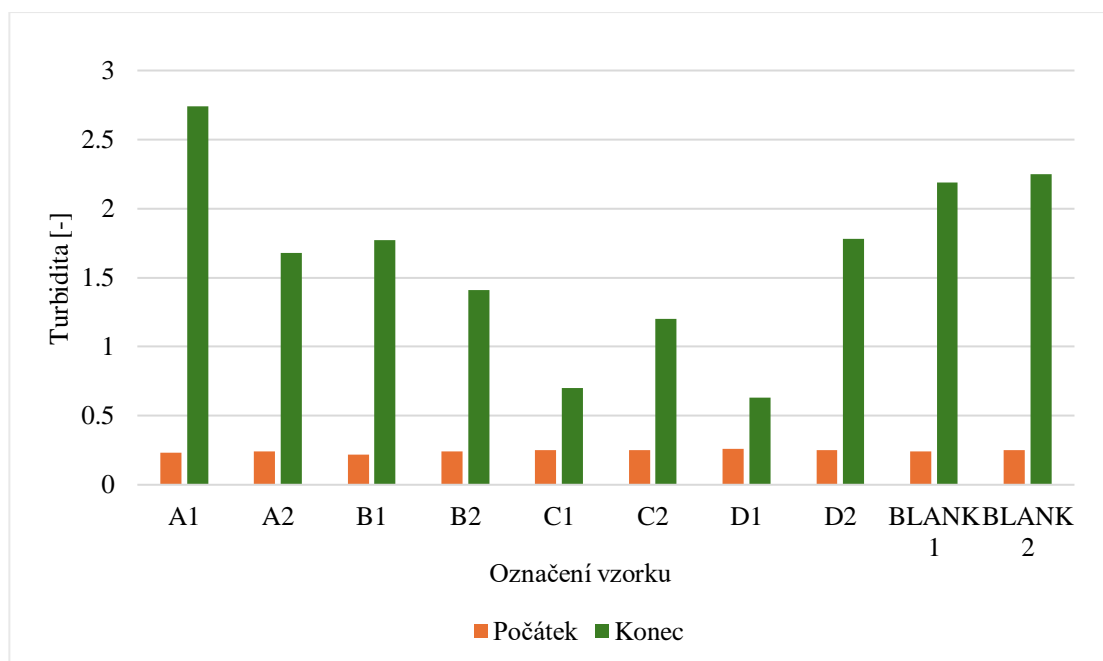
V tomto experimentu je růst řasy ve srovnávacích vzorcích (BLANK 1 a 2) prakticky shodný a nárůst biomasy dosáhl průměrné hodnoty 0,139 g/l. To přibližně odpovídá nárůstu této řasy v kultivačním médiu BG11 zmíněnému v práci z roku 2015, kde hodnota biomasy dosahovala po 15 dnech hodnoty přes 0,2 g/l [124]. V jiné publikaci z roku 2015 byl zaznamenán nárůst biomasy řasy *Chlorella vulgaris* po 14 dnech ve výši 0,4 g/l, přičemž suspenze byla probublávána směsí vzduchu a CO₂, což může být jedním z důvodů patrně vyšší hodnoty získané biomasy [125]. Ve studii z roku 2020 bylo dosaženo hodnoty 0,6 g/l biomasy již po 8 dnech kultivace, a to za použití světla o intenzitě 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, kterou autoři označili za optimální [126]. Nedostatečná intenzita světla použitého v této práci je tedy pravděpodobně dalším důvodem nižšího výtěžku biomasy u všech testovaných druhů mikrořas.

Nejhůře se řase dařilo ve vzorcích C1 a D1, u čehož je zajímavé, že se jedná o nižší koncentraci daného léčiva. Obecně se tento jev dá vysvětlit vlivem několika faktorů. Jedním

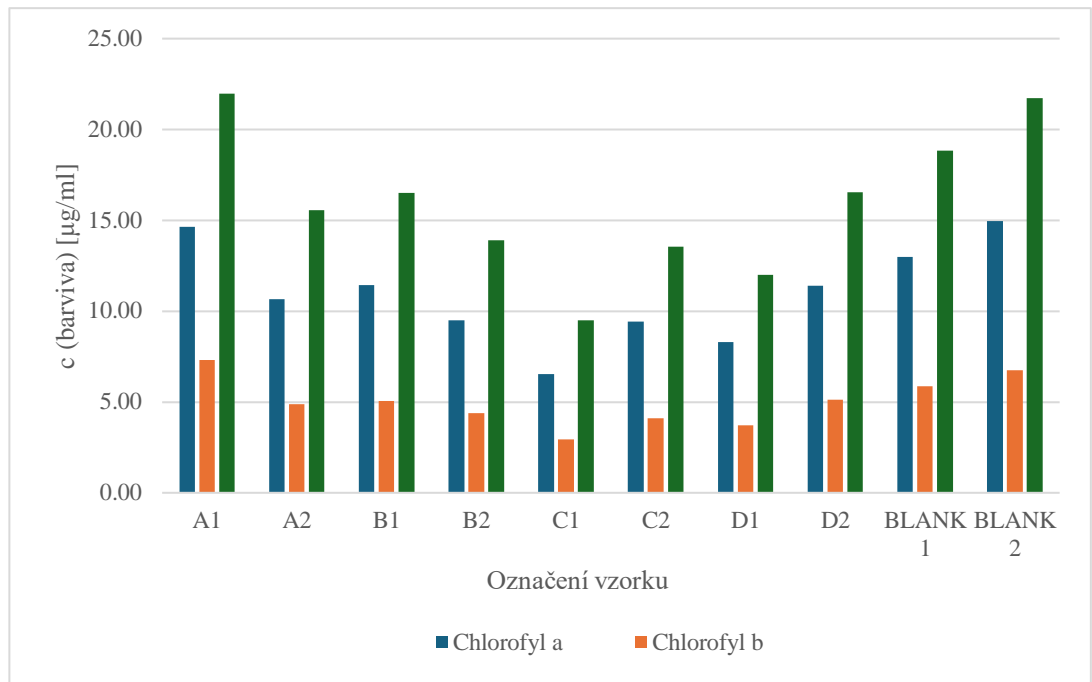
z nich je tzv. hormetický efekt, kdy nízká dávka jinak toxicky působící látky působí na růst a metabolismus organismu stimulačně. Ve studii z roku 2024 bylo popsáno, že *Chlorella vulgaris* vykazovala vyšší denní produkci i fotosyntetickou aktivitu při koncentraci tetracyklinových antibiotik 0,25 mg/l než při koncentraci 0,1 mg/l. Avšak vyšší koncentrace (0,5 a 1 mg/l) už opět působily inhibičně. Autoři tuto skutečnost, že 0,25 mg/l antibiotika vedlo k významně vyšší denní produkci než 0,1 mg/l, vysvětlují tím, že koncentrace 0,25 mg/l navodila optimální úroveň stresu, která spustila maximální adaptační reakci a úpravu buněčného metabolismu [127]. Tedy v případě této diplomové práce, kdy byl růst při nižší koncentraci více inhibován, by také mohlo jít o variantu hormetické odpovědi.

Dalším faktorem by mohla být propustnost buněčné stěny, případně rozdílná aktivace ochranných mechanismů při různých koncentracích. Přesný důvod však zjištěn nebyl a bylo by vhodné provést sérii dalších experimentů, které by tento jev buď vyvrátily, nebo potvrdily a bylo by potřeba daný efekt a mechanismus vysvětlit. To je však nad časové možnosti této diplomové práce.

Výše popsané zjištění vlivu koncentrace u léčiv označených jako B a C potvrzují i následující grafy znázorňující zvýšení turbidity a stanovení chlorofylu (Grafy 7–9). Nejlépe se v tomto případě řase dařilo ve vzorku A1, kdy nárůst biomasy byl vyšší než v kontrolních vzorcích bez léčiva.



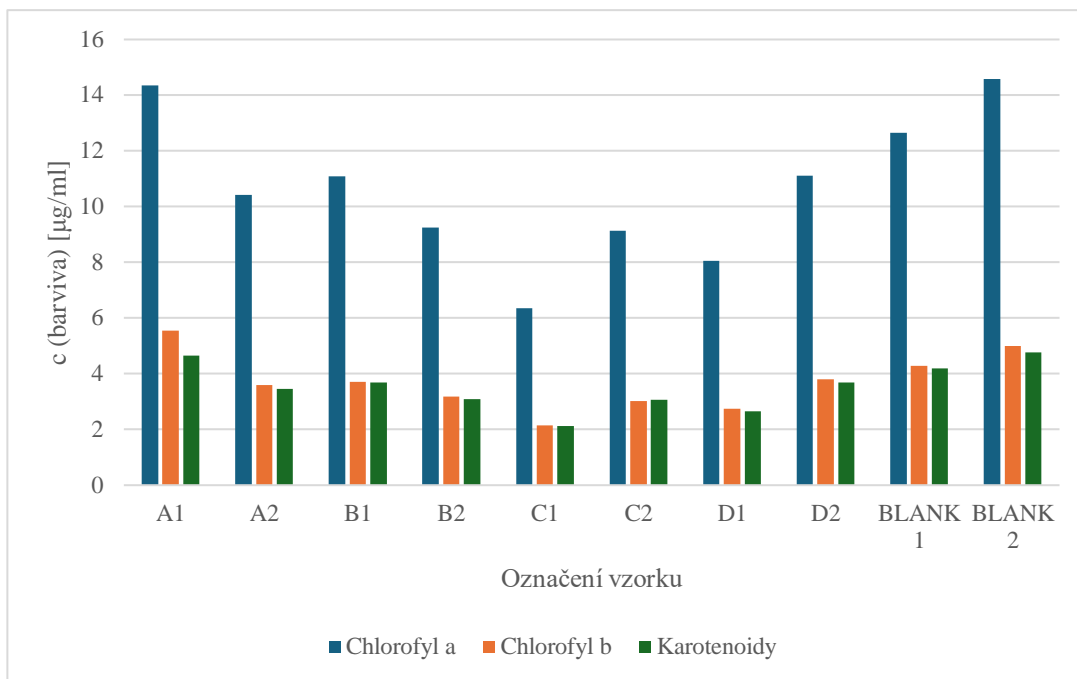
Graf 7: Změna turbidity – *Chlorella vulgaris*



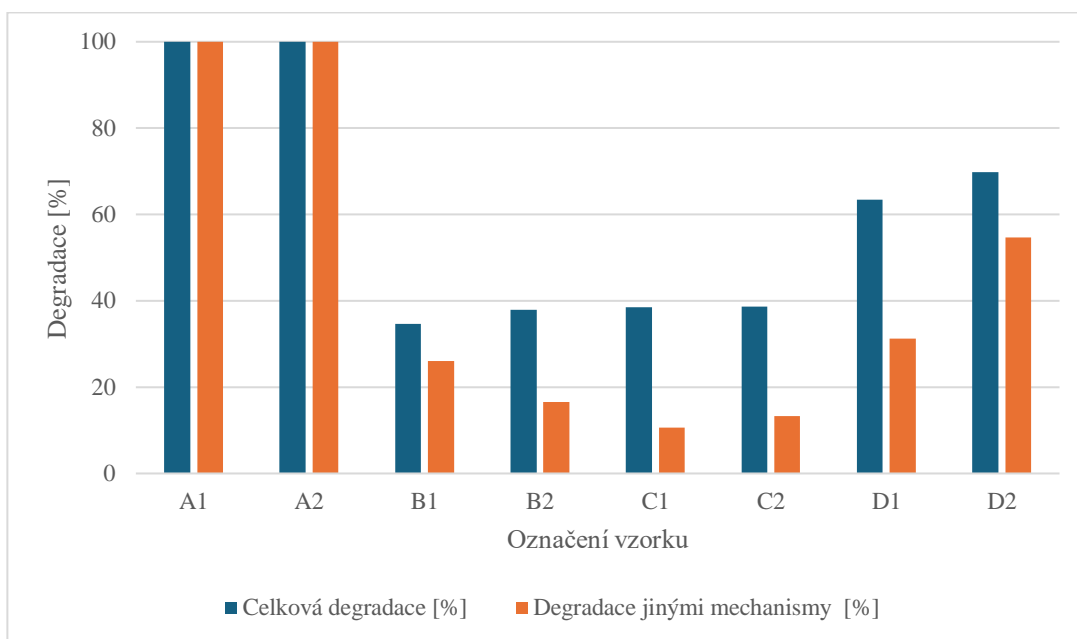
Graf 8: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, *Chlorella vulgaris*

V tomto experimentu bylo v kontrolních vzorcích dosaženo průměrné hodnoty celkového chlorofylu 20,3 µg/ml (viz Graf 8), což je srovnatelné se studií z roku 2018, kde autoři získali 17,15 µg/ml chlorofylu po extrakci z mořského druhu *Chlorella spp.* V této studii k extrakci využívali ultrazvuk za pomoci methanolu a hexanu v poměru 2:1 a tohoto výtěžku docílili při teplotě 30 °C po 120 min [128].

Stejně jako v předešlém případě u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* koncentrace celkového chlorofylu koreluje s nárůstem biomasy a zvýšením turbidity (viz Grafy 6–8). Dobrá shoda je patrná také v tom, že vyhodnocené koncentrace *chlorofylu a* se v obou postupech výpočtu téměř shodují, zatímco koncentrace *chlorofylu b* se liší (viz Grafy 8–9). Dále pak v souladu s literaturou a výsledky s předešlou řasou *Chlamydomonas reinhardtii* byla ve všech případech stanovena vyšší hodnota *chlorofylu a* než *chlorofylu b*, většinou opět v uváděném poměru přibližně 3:1 ve prospěch právě *chlorofylu a* za použití postupu a výpočtu dle rovnic 4–6.



Graf 9: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, *Chlorella vulgaris*



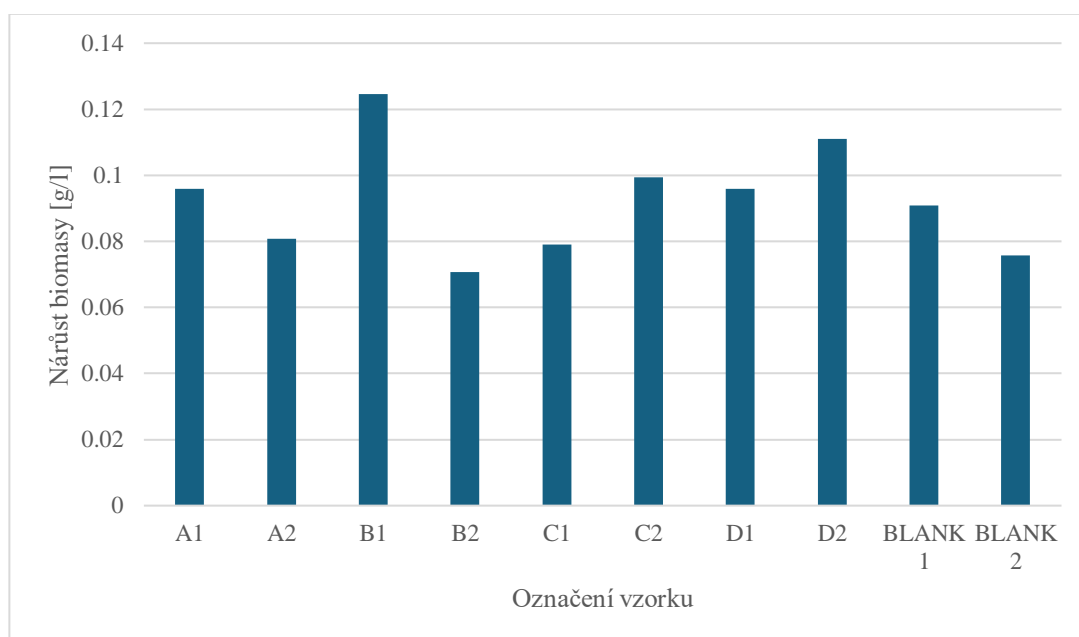
Graf 10: Degradace antibiotik – *Chlorella vulgaris*

Z Grafu 10 je patrné, že v tomto experimentu se také po ampicilinu nejlépe odstraňoval tetracyklin, jako u řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Ve vzorku D1 byl dokonce podíl řasy na celkové degradaci 51 %. Avšak nejvyšší podíl řasy na degradaci byl ve vzorku C1, a to 72 %. Celkové odstranění ciprofloxacinu a chloramfenikolu dosahovalo necelých 40 %. Odstranění ciprofloxacinu pomocí řasy *Chlorella vulgaris* je srovnatelné se studií autorů z roku 2022, kde dosáhli odstranění 37 % po 7 dnech kultivace. Jejich délka experimentu sice byla třetinová pro dosažení srovnatelné účinnosti, avšak autoři pro experiment použili osvětlení o intenzitě

50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ a odlišnou fotoperiodu, 12:12 (světlo:tma). Počáteční koncentrace antibiotika v této studii byla 5 mg/l [129]. Pomocí této řasy bylo také ve studii z roku 2018 odstraněno 100 % penicilinu o průměrné počáteční koncentraci 45 $\mu\text{g}/\text{l}$ po 6 dnech. Byť se nejednalo přímo o ampicilin, lze výsledky této studie pro srovnání použít, jelikož ampicilin patří mezi penicilinové deriváty.

4.3 Degradace pomocí řasy *Chlorella kessleri*

Další testovanou mikrořasou byla *Chlorella kessleri*. Podmínky experimentů byly stejné jako v předešlých případech a opět byl stanovován nárůst biomasy, změna turbidity a obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů. Přehled výsledků je znázorněn graficky (Grafy 11–15).

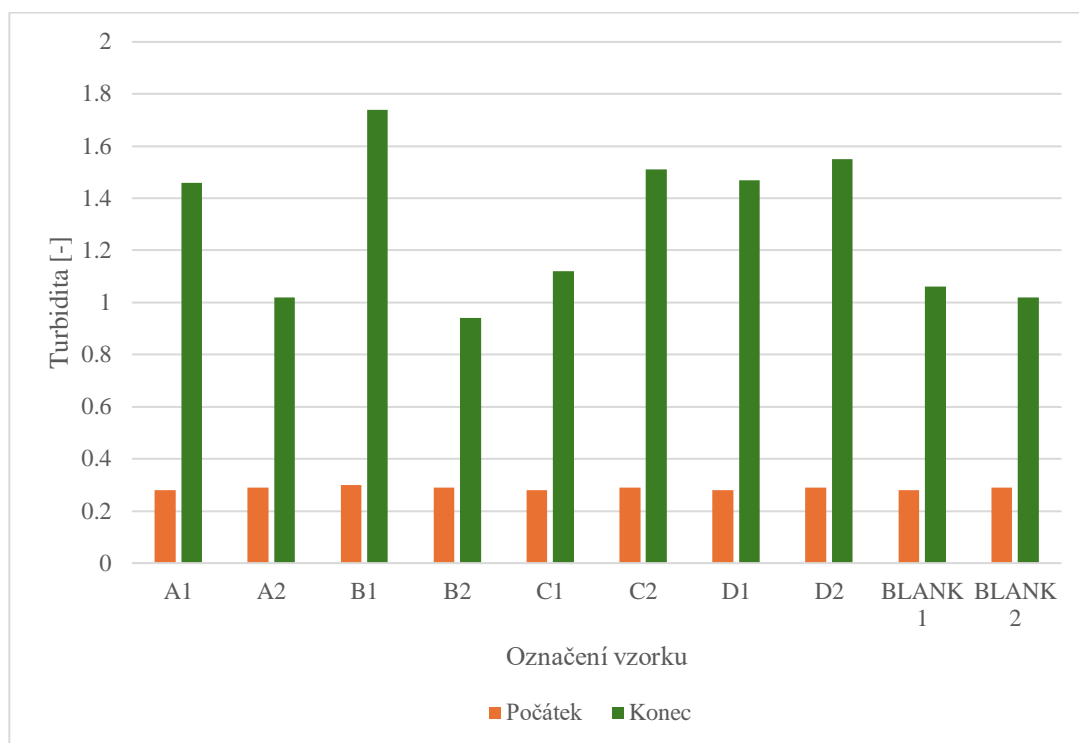


Graf 11: Nárůst biomasy – *Chlorella kessleri*

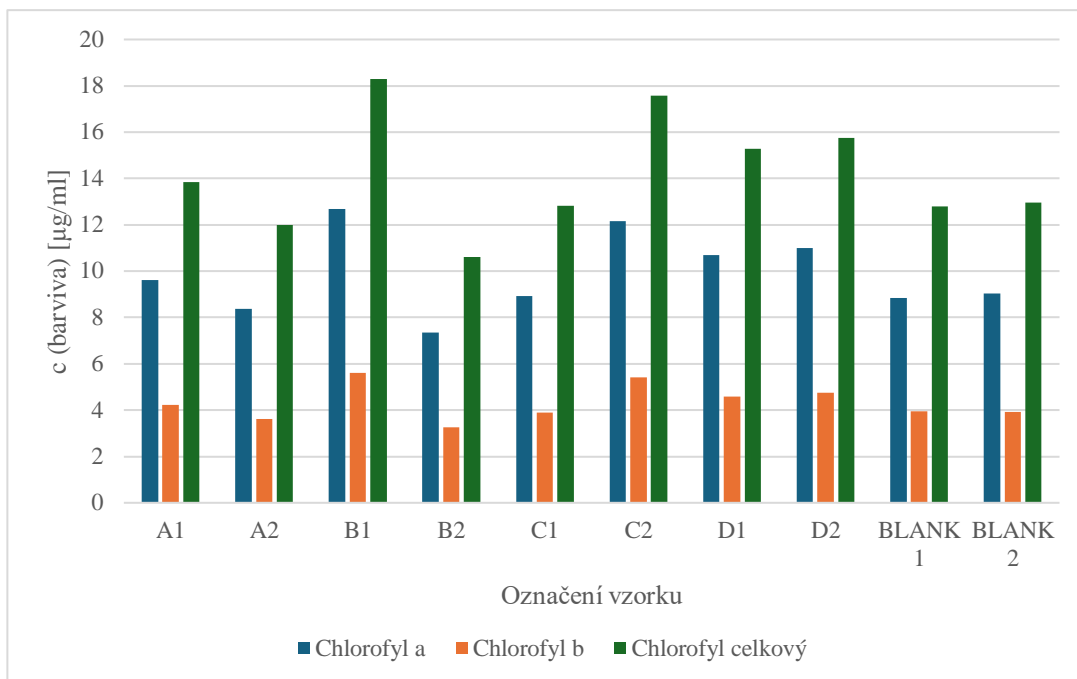
V rámci tohoto experimentu byl nárůst biomasy řasy ve srovnávacích vzorcích bez léčiva za 3 týdny v průměru 0,083 g/l, což je velmi nízká hodnota. Na základě studií zabývajících se vlivem světla na produkované množství biomasy při řasové kultivaci je pravděpodobně hlavním důvodem velmi nízká intenzita světelného zdroje, což mělo zcela jistě nezanedbatelný vliv na všechny prováděné experimenty. Dle studie z roku 2012 je pro růst *Chlorella kessleri* optimální intenzita světla 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ [130]. Studie z roku 2022 z ČR uvádí, že k saturaci růstu u této řasy dochází při intenzitě 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. U *Chlamydomonas reinhardtii* dokonce při více než 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ [131]. To jsou v porovnání s intenzitou světla využitou v této práci (8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) nesrovnatelně vyšší hodnoty. Pro případné další experimenty je tedy potřeba zajistit výkonnější zdroj osvětlení.

Porovnáním výsledků nárůstu biomasy mikrořasy *Chlorella kessleri* s ostatními testovanými řasami je patrné, že prakticky všechny vzorky s touto řasou, ať již s přidavkem léčiva nebo srovnávací vzorky (BLANK 1 a 2), měly nižší nárůst biomasy. Toto koresponduje i s hodnotami naměřené turbidity a chlorofylu. Pravděpodobně je to způsobeno právě nedostatečnou intenzitou použitého osvětlení a zdá se, že z testovaných řas je tedy na tento faktor *Chlorella kessleri* nejvíce náchylná.

Z Grafu 11 je patrné, že nejvíce se řasa rozrostla ve vzorcích B1, C2 a D2, což potvrzují i stanovené hodnoty turbidity a chlorofylu (viz Grafy 12–14).

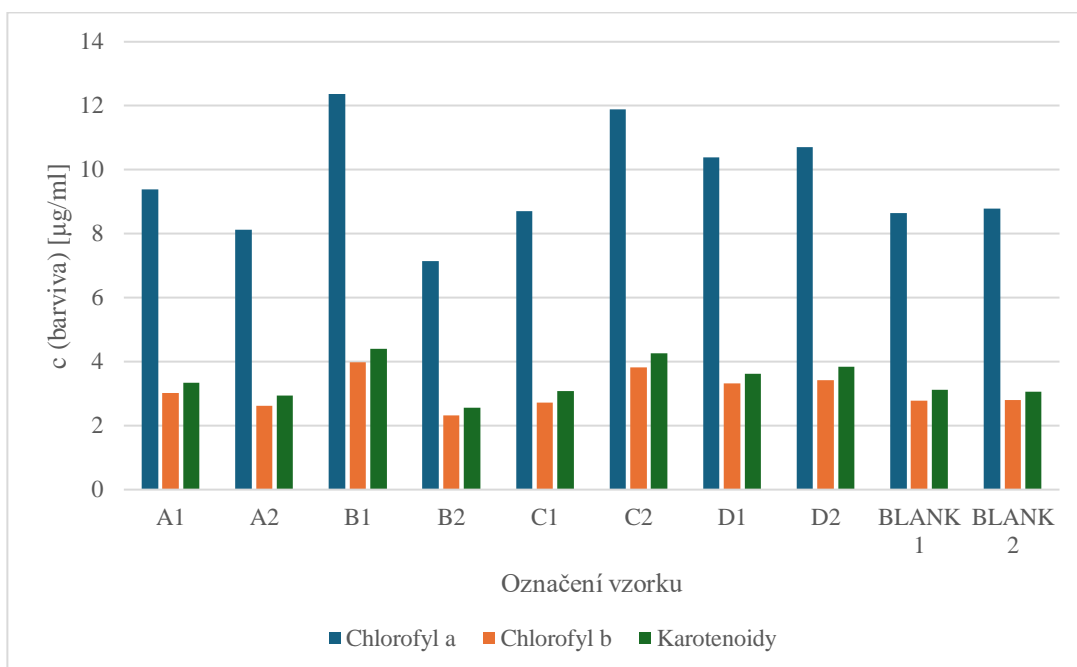


Graf 12: Změna turbidity – *Chlorella kessleri*

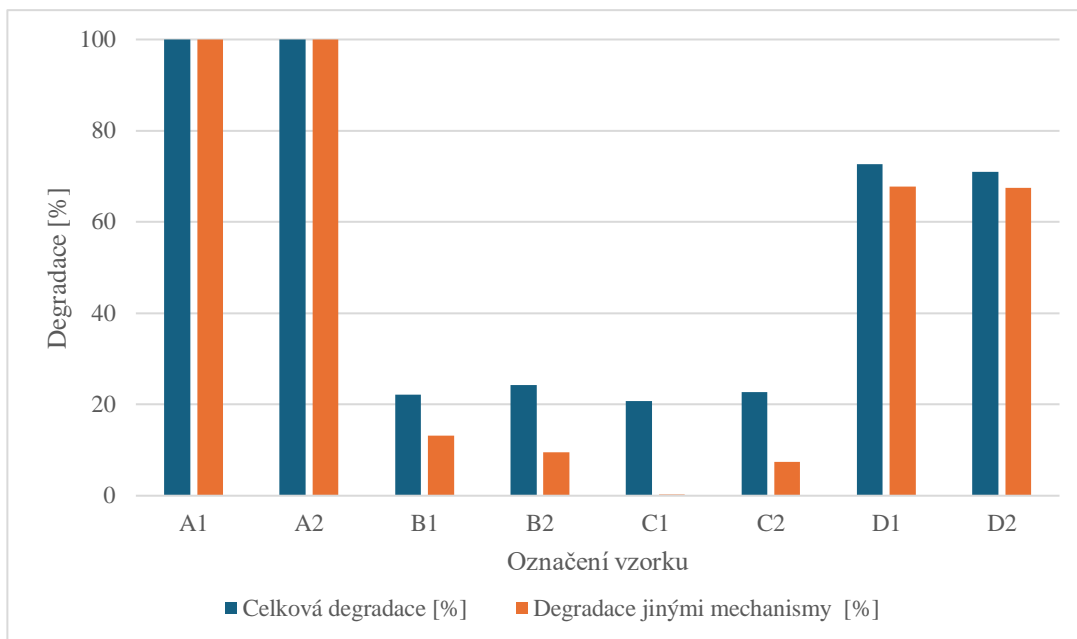


Graf 13: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, *Chlorella kessleri*

Jak již bylo zmíněno, stanovené hodnoty obsahu chlorofylu potvrzují, že se řasa nejvíce rozrostla ve vzorcích B1, C2 a D2. Avšak ve vzorku C2 bylo stanovené více chlorofylu než v D2, zatímco D2 vykazoval vyšší hodnotu turbidity i stanovené biomasy.



Graf 14: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, *Chlorella kessleri*

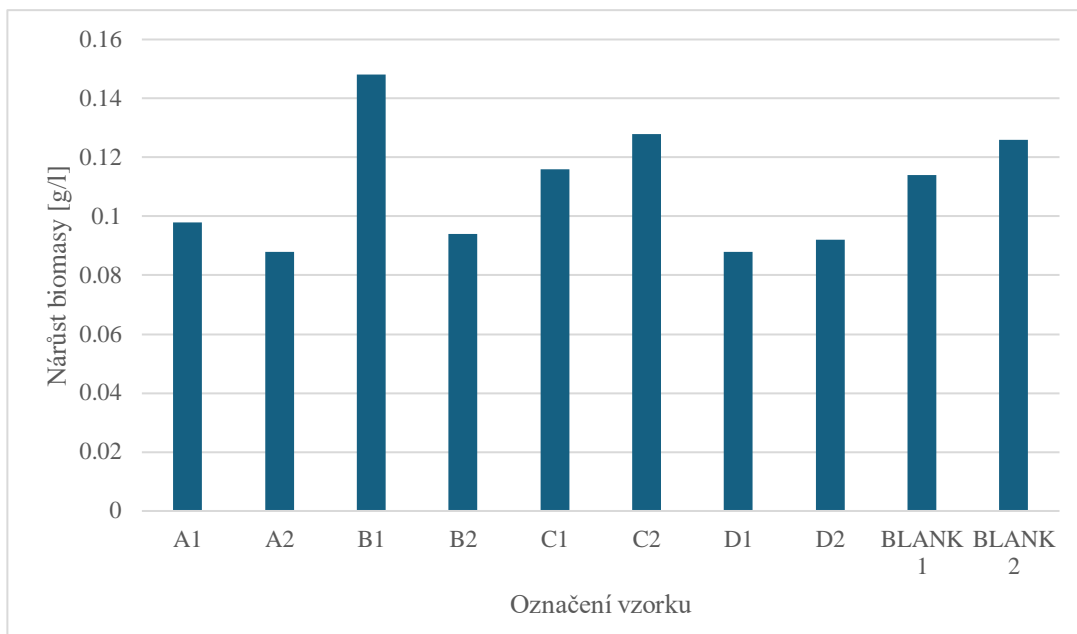


Graf 15: Degradace antibiotik – *Chlorella kessleri*

I v tomto experimentu se potvrdilo, že po ampicilinu se nejlépe odstraňoval tetracyklin a hlavní vliv měla fotodegradace s dalšími faktory, jak je patrné z Grafu 15. Ciprofloxacin a chloramfenikol se v tomto případě odstranily z 21–24 %, přičemž vliv řasy, kromě vzorku B1, dominoval. Na rozdíl od všech ostatních experimentů nedošlo ve vzorku C1 téměř k degradaci antibiotika v kontrolním vzorku a podíl řasy tedy na celkovém odstranění činil 98,7 %. Zde je patrně na vině buď špatné analytické stanovení nebo zkreslení výsledku zbytkovou kontaminací nádoby po předchozích experimentech (špatné vymytí).

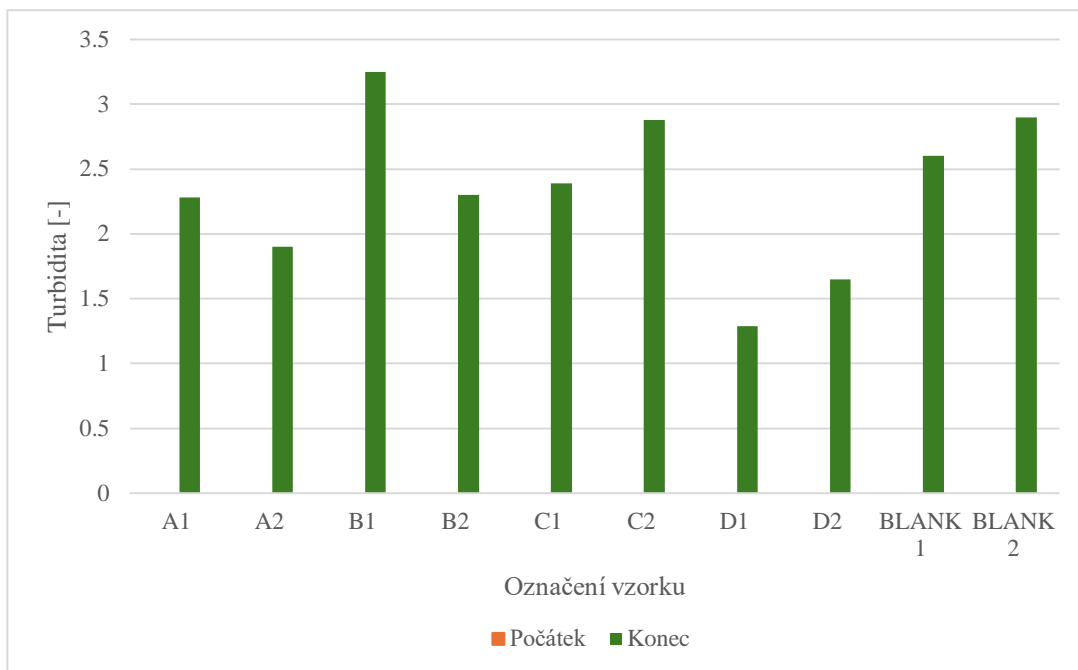
4.4 Degradace pomocí řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*

Postupem uvedeným v kapitole 3.3 byl proveden taktéž experiment s řasou *Pseudokirchneriella subcapitata*. Byl opět stanovován nárůst biomasy, změna turbidity, obsah chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů a degradace antibiotik. Výsledky jsou znázorněny graficky (Grafy 16–20).

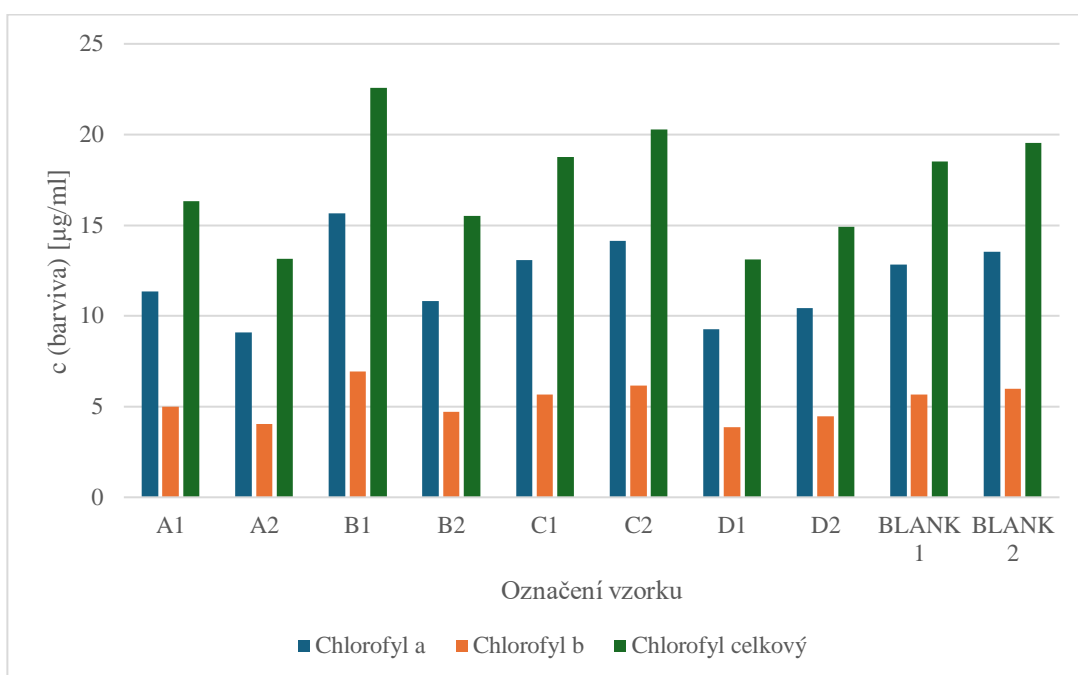


Graf 16: Nárůst biomasy – *Pseudokirchneriella subcapitata*

Řasa *Pseudokirchneriella subcapitata* v kontrolních vzorcích dosáhla průměrné hodnoty koncentrace biomasy 0,12 g/l. Ve studii z roku 2013 bylo kultivací v OECD médiu při intenzitě osvětlení $96 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ a fotoperiodě 10:14 (světlo:tma) dosaženo výtěžku biomasy 0,8 g/l [132]. Opět by tedy důvodem nižších výtěžků v tomto experimentu mohla být nízká intenzita použitého světla a také odlišný světelný režim. V jiné studii z roku 2020 bylo kultivací v simulované odpadní vodě po 10 dnech získáno 0,7 g/l biomasy [133]. V průběhu experimentu nejvíce biomasy přibýlo ve vzorcích B1 a C2. V B1 dokonce hodnota opět převyšovala srovnávací vzorky bez obsahu léčiv. Toto potvrzují i hodnoty turbidity na konci experimentu a odpovídají tomu i stanovená množství chlorofylu.

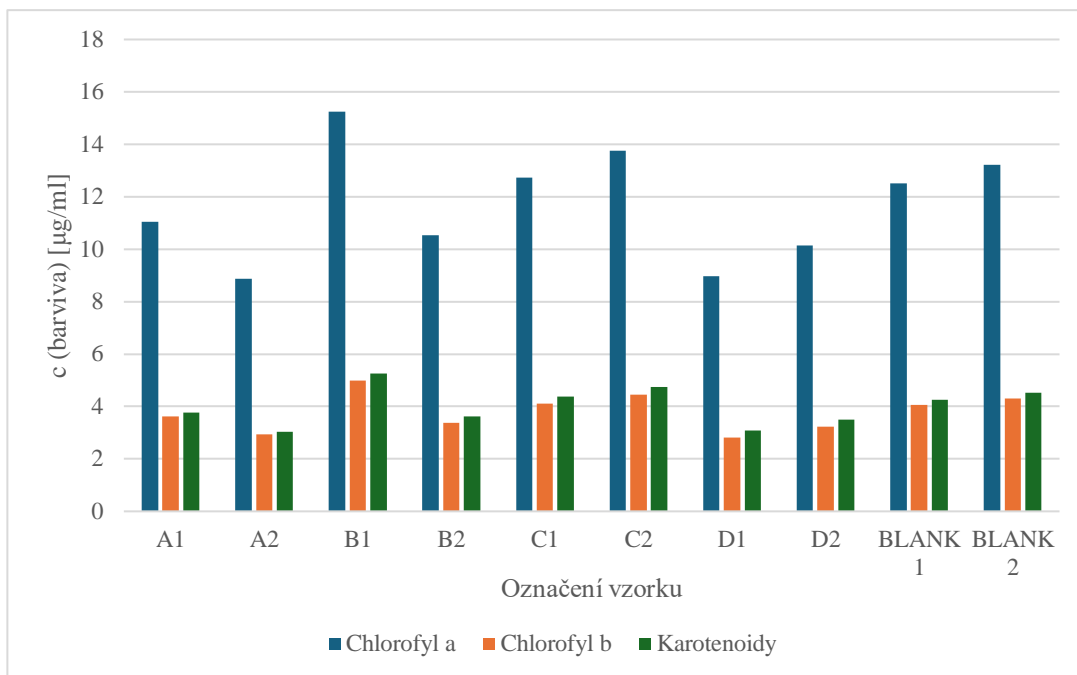


Graf 17: Změna turbidity – *Pseudokirchneriella subcapitata*

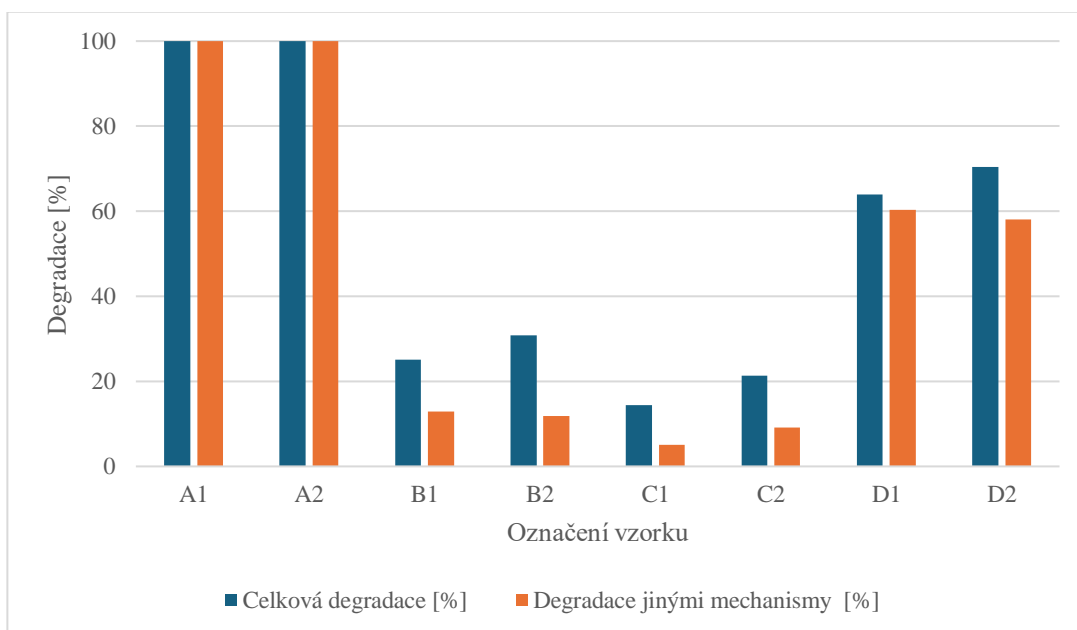


Graf 18: Stanovení chlorofylu dle rovnic 1–3, *Pseudokirchneriella subcapitata*

Z Grafů 18 a 19 lze vidět, že obsah *chlorofylu a* ve všech vzorcích opět převyšoval obsah *chlorofylu b* a také byl poměr mezi nimi přibližně 3:1.



Graf 19: Stanovení chlorofylu a karotenoidů dle rovnic 4–6, *Pseudokirchneriella subcapitata*



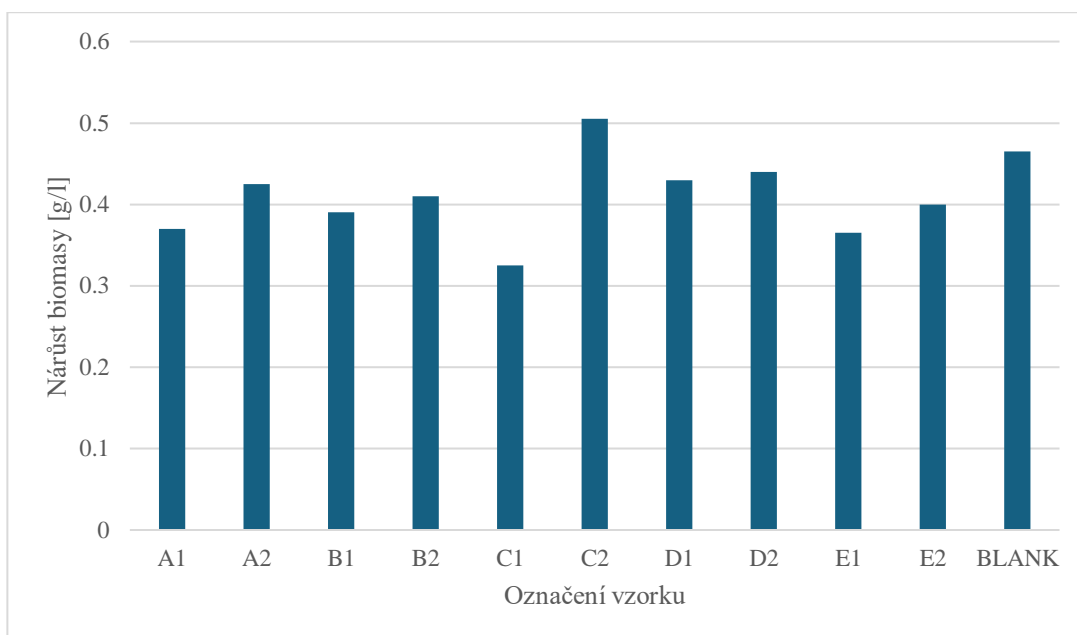
Graf 20: Degradace antibiotik – *Pseudokirchneriella subcapitata*

Stejně jako ve všech předešlých experimentech se taktéž zde ampicilin odstranil ze 100 % i v kontrolních vzorcích a nelze proto určit vliv řasy na degradaci. To jen potvrzuje již zmíněnou skutečnost, že ampicilin je velmi dobře degradovatelný vlivem fotolýzy a dalších mechanismů, tudíž stejně jako další β -laktamová antibiotika nebývá ve vodách často detekován, jelikož β -laktamový kruh je ve vodném prostředí nestabilní [12].

K odstranění tetracyklinu došlo z 64–70 % a dominantním mechanismem byla opět fotodegradace. Ciprofloxacin a chloramfenikol byly v tomto případě odstraněny v průměru z 23 % a podíl řasy na tomto odstranění se pohyboval v rozmezí 49–65 %.

4.5 Degradace pomocí řasy *Chlamydomonas reinhardtii* v modelové odpadní vodě na bázi digestátu

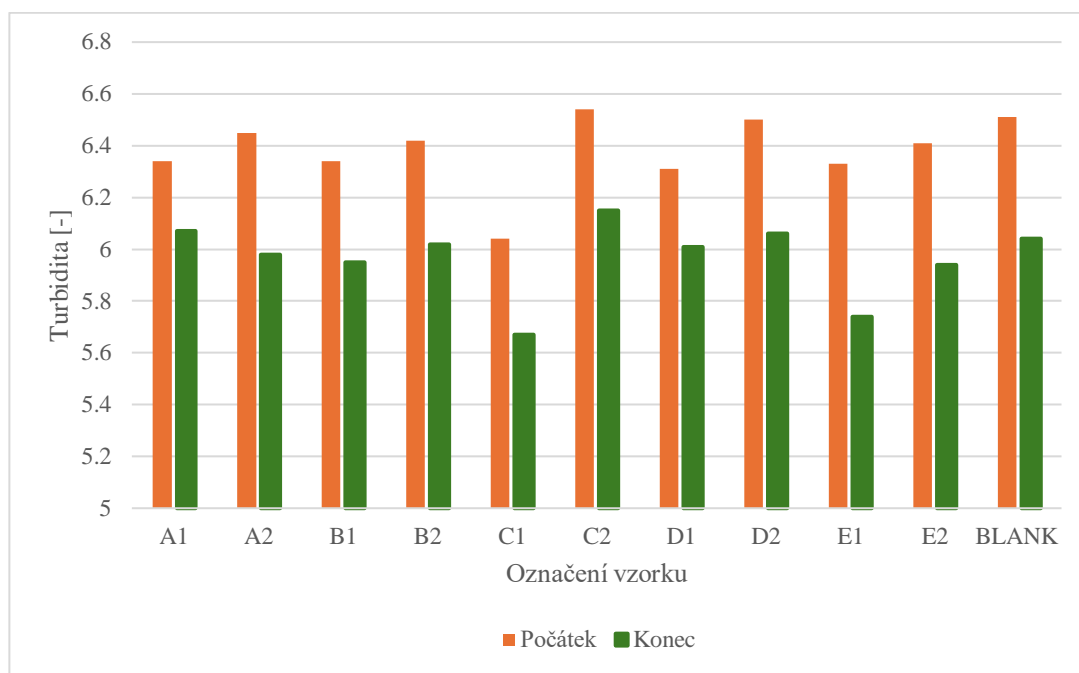
Dle postupu uvedeného v kapitole 3.3 byl proveden experiment s řasou *Chlamydomonas reinhardtii* v modelové odpadní vodě na bázi digestátu. Jako kultivační médium byl místo BBM použit kohoutkovou vodou 50× zředěný digestát ze zemědělské bioplynové stanice (místo odběru není uvedeno na žádost dané bioplynové stanice). Podmínky experimentu, způsob jeho provedení i ukončení byly totožné s předchozími experimenty, s tím rozdílem, že v tomto experimentu byla navíc testována směs všech čtyř antibiotik (označeno písmenem E) a postup filtrace byl mírně odlišný, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.4. Přehled výsledků týkajících se růstu řas je graficky znázorněn (viz Grafy 21–24). Výsledky degradace jsou znázorněny graficky (viz Grafy 25–27) a pro ukázkou uvedeny tabelární formou v přílohách (viz Příloha D).



Graf 21: Nárůst biomasy v odpadní vodě na bázi digestátu – *Chlamydomonas reinhardtii*

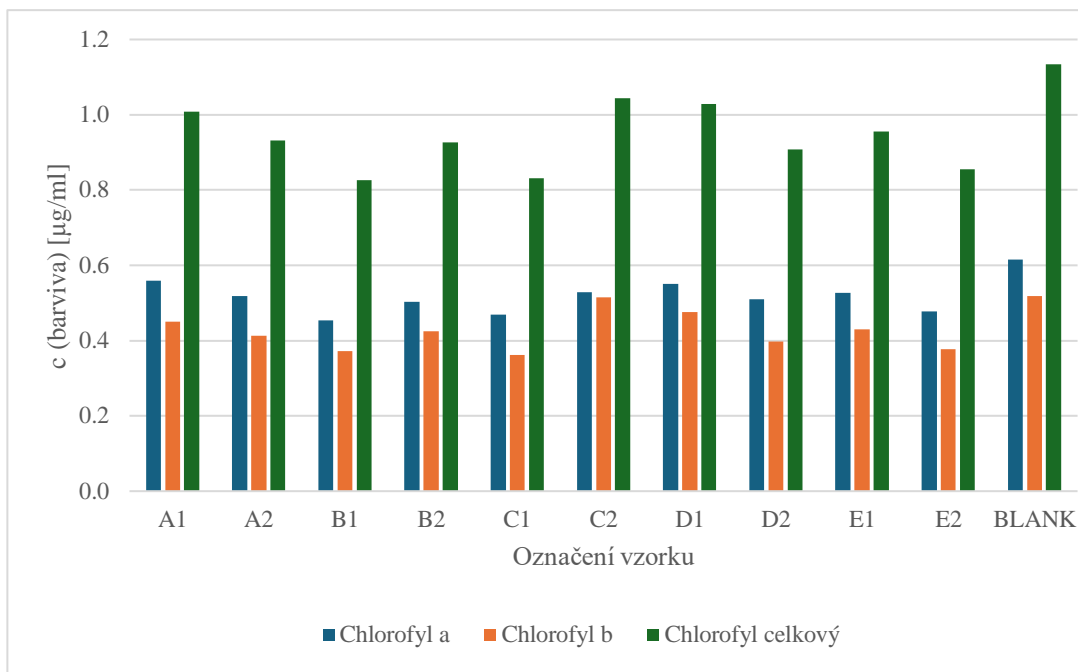
Na rozdíl od předchozích experimentů v modelových vodách na bázi BBM média, obsahuje hodnota nárůstu biomasy v tomto případě nejen samotnou biomasu řas, ale také zbytky pevného podílu digestátu. Bohužel není snadné tento zbytkový podíl od množství narostlé biomasy řasy jednoduše odlišit a odečíst. Metoda odečtu slepého vzorku by zde byla

také zatížena chybou, neboť příspěvek tuhé fáze k celkovému množství nebude v čase konstantní a bude se měnit vlivem působení řas. Ty částečně tento tuhý podíl digestátu využívají pro svůj růst a degradují ho, část produktů pak může být vlivem volatilizace v plynné fázi. V Grafu 21 je proto uvedena celková hodnota biomasy a zbytkového pevného podílu na konci experimentu a slouží jen pro orientační a pomocné porovnání změn v jednotlivých testovaných vzorcích.

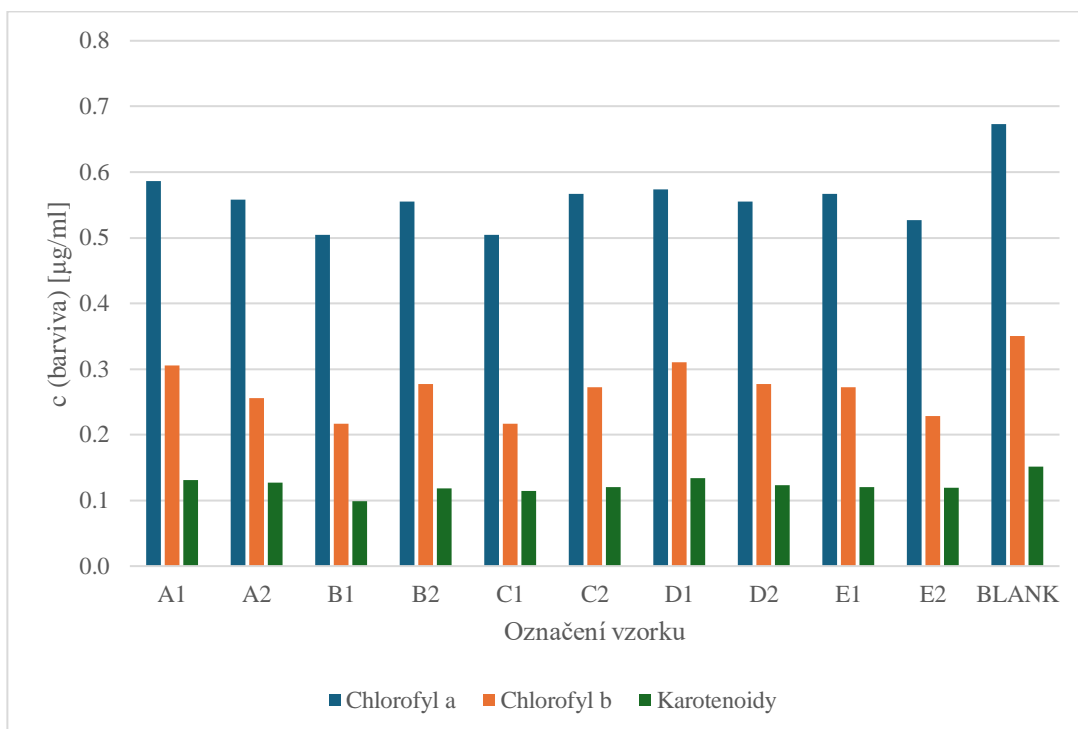


Graf 22: Změna turbidity v odpadní vodě na bázi digestátu – *Chlamydomonas reinhardtii*

Obdobný problém jako u stanovení nárůstu biomasy je v odpadní vodě na bázi digestátu u stanovení turbidity. Zatímco v předešlých případech byla turbidita prakticky výhradně spjata s množstvím řasy ve vzorku a korelovala tedy s množstvím biomasy a chlorofylu, v případě digestátu je turbidita závislá nejen na řasách, ale také na dalších látkách přítomných v digestátu. Jak je patrné z Grafu 22, turbidita je na počátku experimentu vždy vyšší než na konci. To je dáno právě příspěvkem zákalu původního digestátu. Během experimentu a růstu řas pak dochází ke snížení hodnoty turbidity v důsledku spotřebování těchto látek řasami. Výsledná turbidita je tak dána příspěvkem zbytkových látek z digestátu a narostlou biomasou řasy, přičemž tato hodnota turbidity je však nižší, než byla na počátku. Opět je zde problém stanovit příspěvek samotné řasy k hodnotě turbidity, neboť se nepovedlo najít způsob, jak ji od digestátu oddělit.

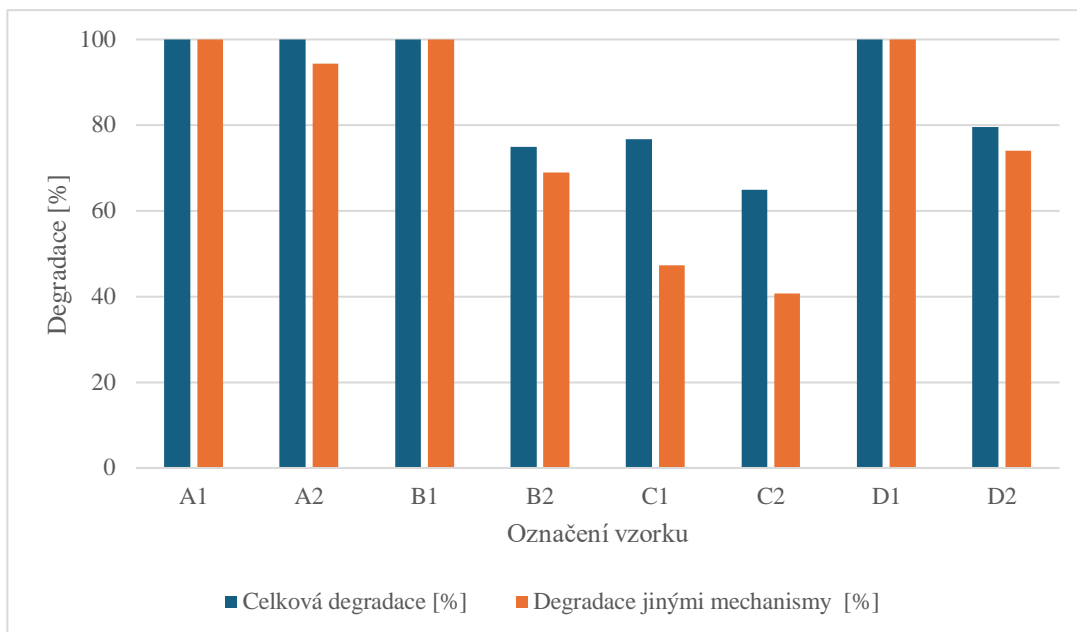


Graf 23: Stanovení chlorofylu v odpadní vodě na bázi digestátu dle rovnic 1–3, *Chlamydomonas reinhardtii*



Graf 24: Stanovení chlorofylu a karotenoidů v odpadní vodě na bázi digestátu dle rovnic 4–6, *Chlamydomonas reinhardtii*

Také stanovení chlorofylu je v odpadní vodě na bázi digestátu zatíženo chybou, neboť i v samotném digestátu se mohou vyskytovat látky, které absorbují při stejných vlnových délkách, při jakých byl stanovován chlorofyl. Bohužel opět nebylo možné přesně stanovit, jak se množství těchto látek a jejich vliv na hodnoty chlorofylu v čase mění. Stanovení chlorofylu tedy opět může vést jen k posouzení trendů a odhadu průběhu růstu mikrořas.

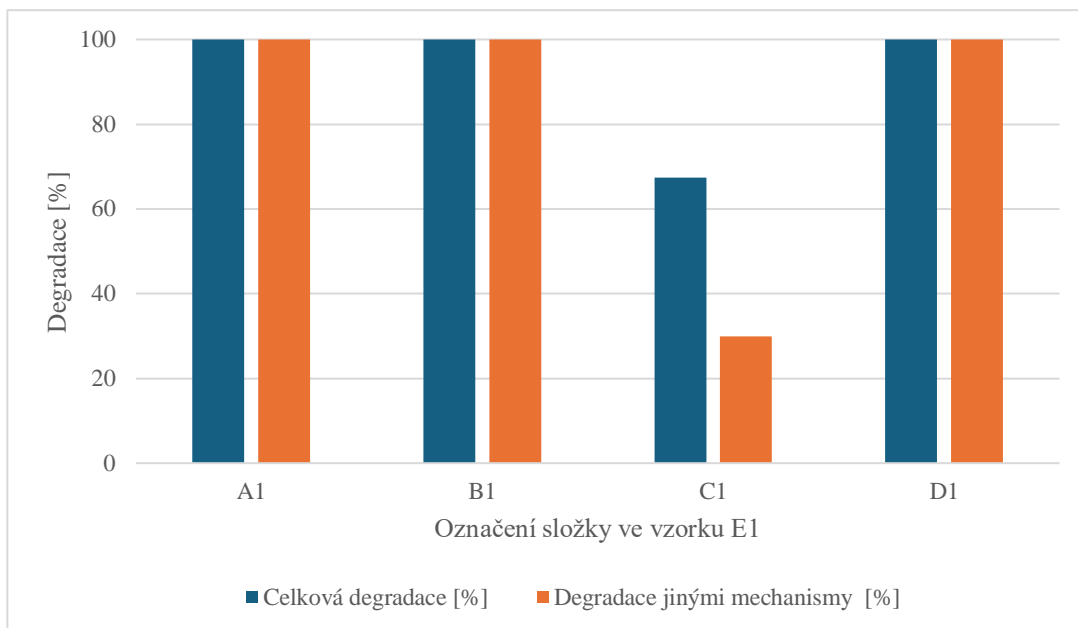


Graf 25: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – *Chlamydomonas reinhardtii*

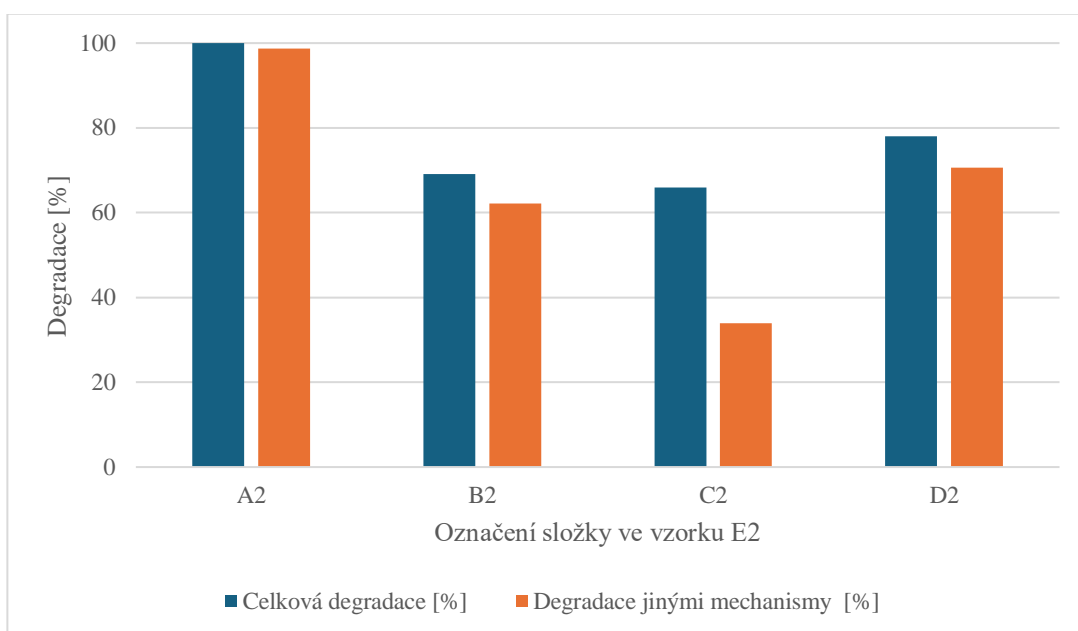
Z Grafu 25 je vidět, že u ampicilinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu došlo u vzorků o nižší koncentraci k úplné eliminaci antibiotika jak v experimentální vzorcích, tak ve vzorcích kontrolních. Nelze zde tedy rozlišit příspěvek řasy k jejich odstranění. To je velmi pravděpodobně způsobeno i dalšími mechanismy jako např. sorpce léčiva na drobné pevné částice obsažené v digestátu, díky čemuž pak nebyla léčiva v kapalném podílu detekována (vzorky bylo před analýzou na HPLC -MS/MS potřeba filtrovat, čímž došlo k odstranění suspendovaných částic). Totéž platí pro směsný vzorek E1 (viz Graf 26).

U chloramfenikolu došlo k průměrnému odstranění o 70,8 %, přičemž podíl řasy na celkovém odstranění činil 37–38 %. Ve vzorku B2 došlo k odstranění 75 % antibiotika, ciprofloxacinu, avšak řasa se podílela pouze z 8 %. Ve vzorku D2 je to velmi podobné – celkově bylo odstraněno 80 % tetracyklinu, podíl řasy byl však pouze 7 %.

Jak již bylo řečeno výše, ve směsném vzorku E1 také došlo ke 100% odstranění ampicilinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu v experimentu i kontrolních vzorcích (viz Graf 26). Z toho důvodu nelze posoudit míru účasti řasy na odstranění. Chloramfenikol byl v tomto případě odstraněn z 67 %, přičemž řasa se na tom podílela z 56 %.



Graf 26: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – *Chlamydomonas reinhardtii*, směsný vzorek E1



Graf 27: Degradace antibiotik v odpadní vodě na bázi digestátu – *Chlamydomonas reinhardtii*, směsný vzorek E2

Ve směsném vzorku E2 (viz Graf 27) byl nejvíce odstraněn ampicilin, kde opět převládal vliv světla a dalších mechanismů, řasa přispěla pouze z 1,3 %. Řasa měla největší podíl na odstranění v případě chloramfenikolu, a to 48,5 %. V porovnání s experimentem v médiu BBM v tomto případě neměla řasa *Chlamydomonas reinhardtii* velký vliv na odstranění ciprofloxacinu, zatímco u experimentu v BBM médiu měla u tohoto antibiotika vliv nadpoloviční.

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá možnostmi využití sladkovodních mikrořas k odstraňování antibiotik z vod. Hlavním cílem bylo zjistit, jak efektivně mohou mikrořasy *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri* a *Pseudokirchneriella subcapitata* degradovat vybraná antibiotika ampicilin, ciprofloxacin, chloramfenikol a tetracyklin. Experimenty se všemi druhy mikrořas byly prováděny v prostředí tzv. BBM média a řasa *Chlamydomonas reinhardtii* byla testována také v odpadní vodě na bázi digestátu. Hlavními sledovanými parametry byly turbidita, pH, koncentrace chlorofylu, množství narostlé biomasy a koncentrace léčiva, resp. jeho úbytek.

Experimentálně získané výsledky potvrdily, že mikrořasy mají schopnost snižovat množství antibiotik ve vodách. Nejlépe se ve všech případech odstraňoval ampicilin a tetracyklin. U ampicilinu však nebylo v rámci testovaných koncentrací možné zcela posoudit, jakou měrou se na jeho degradaci podílela řasa a do jaké míry byla jeho degradace způsobena jinými faktory. Jedná se totiž o látku ve vodném prostředí poměrně nestabilní a snadno podléhající fotolýze, hydrolyze atd. U tetracyklinu, který byl z testovaných léčiv degradován o něco méně než ampicilin, byly hlavní mechanismy degradace také převážně jiné, než vliv mikrořas a opět se jednalo zejména o fotodegradaci. U zbylých dvou testovaných antibiotik, ciprofloxacinu a chloramfenikolu, bylo vždy celkově odstraněno méně léčiva než u předešlých dvou, avšak podíl řasy byl vyšší. U ciprofloxacinu se podíl řasy na celkovém odstranění pohyboval mezi 25–62 %, u chloramfenikolu mezi 40–99 %.

Jako jeden z klíčových a zároveň limitujících parametrů se projevovalo osvětlení mikrořas během experimentů, které bohužel nedosahovalo potřebné intenzity. Naměřená hodnota intenzity osvětlení byla $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, což je dokonce řádově méně, než je běžně doporučovaná hodnota pro většinu mikrořas. Pro případné další navazující práce a experimenty je tedy potřeba zajistit výkonnější zdroj osvětlení.

Použití odpadní vody na bázi digestátu jako kapalného média prokázalo schopnost mikrořas odstraňovat antibiotika také z takto složité matrice. Experimenty však také odhalily řadu problémů a výzev, které sebou použití reálných odpadních vod nese. V případě digestátu se totiž projevily vliv dalších faktorů jako je adsorpce léčiva na částice dispergované v digestátu, což u nižších koncentrací léčiv prakticky znemožnilo zhodnotit míru příspěvku řasy *Chlamydomonas reinhardtii* na jejich degradaci. Další problémy byly spojeny s ovlivněním stanovení množství biomasy, turbidity a chlorofylu matricí digestátu, která se v čase měnila.

Závěrem lze konstatovat, že cíl práce byl splněn a tato diplomová práce přispěla k hlubšímu porozumění v oblasti využití sladkovodních mikrořas k odstraňování antibiotik z vod. Získané výsledky mají přínos zejména jako podklady pro další výzkum na Ústavu environmentálního a chemického inženýrství a mohou napomoci k rozšíření využití těchto aplikací v oblasti čištění vod.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TONG, Xuneng, Sanjeeb MOHAPATRA, Jingjie ZHANG, Ngoc Han TRAN, Luhua YOU, Yiliang HE a Karina Yew-Hoong GIN. Source, fate, transport and modelling of selected emerging contaminants in the aquatic environment: Current status and future perspectives. *Water Research*. 2022, **217**. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2022.118418
- [2] WANG, Ruiqi, Huanchen TANG, Ruitao YANG a Jingduo ZHANG. Emerging contaminants in water environments: progress, evolution, and prospects. *Water Science & Technology*. 2024, 2024-05-15, **89**(10), 2763-2782. ISSN 0273-1223. Dostupné z: doi:10.2166/wst.2024.151
- [3] BAYABIL, Haimanote K., Fitsum T. TESHOME a Yuncong C. LI. Emerging Contaminants in Soil and Water. *Frontiers in Environmental Science*. 2022, 2022-3-25, **10**. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2022.873499
- [4] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Reyna Berenice, Elda A. FLORES-CONTRERAS, Roberto PARRA-SALDÍVAR a Hafız M.N. IQBAL. Bio-removal of emerging pollutants by advanced bioremediation techniques. *Environmental Research*. 2022, **214**. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2022.113936
- [5] BARCELÓ, Damià a Mira PETROVIC, ed. *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste: Occurrence, Analysis and Effects*. Springer, 2008. ISBN 978-3-540-74793-2.
- [6] GOMES, Ana R., Celine JUSTINO, Teresa ROCHA-SANTOS, Ana C. FREITAS, Armando C. DUARTE a Ruth PEREIRA. Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants on soil biota. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 2017, **52**(10), 992–1007. Dostupné z: doi:10.1080/10934529.2017.1328946
- [7] LUO, Yunlong, Wenshan GUOA, Huu Hao NGO, Long Duc NGHIEMB, Faisal Ibney HAI, Jian ZHANG, Shuang LIANG a Xiaochang C. WANG. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*. 2014, **473–474**, 619–641. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- [8] BAUMANN, Lisa, Susanne KNÖRR, Susanne KEITER, et al. Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014, **278**(3), 230–237. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2014.04.025
- [9] WILKINSON, John, Peter S. HOODA, James BARKER, Stephen BARTON a Julian SWINDEN. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*. 2017, **231**, 954–970. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.08.032

- [10] SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N., M.J. LÓPEZ DE ALDA, S. MUNIATEGUI-LORENZO, D. PRADA-RODRÍGUEZ a Damià BARCELÓ. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **66**, 45–52. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.11.006
- [11] SULTAN, Maisha Binte, Amit Hasan ANIK a Md. Mostafizur RAHMAN. Emerging contaminants and their potential impacts on estuarine ecosystems: Are we aware of it? *Marine Pollution Bulletin*. 2024, **199**. Dostupné z: doi:10.1016/j.marpolbul.2023.115982
- [12] MILIĆ, Nataša, Maja MILANOVIĆ, Nevena GRUJIĆ LETIĆ, Maja TURK SEKULIĆ, Jelena RADONIĆ, Ivana MIHAJLOVIĆ a Mirjana VOJINOVIĆ MILORADOV. Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment. *International Journal of Environmental Health Research*. 2013, **23**(4), 296–310. Dostupné z: doi:10.1080/09603123.2012.733934
- [13] JJEMBA, Patrick K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2006, **63**(1), 113–130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.011
- [14] TOPAZ, Tom, Roey EGOZI, Yair SUARI, Julius BEN-ARI, Tal SADE, Benny CHEFETZ a Gitai YAHIEL. Environmental risk dynamics of pesticides toxicity in a Mediterranean micro-estuary. *Environmental Pollution*. 2020, **265**, Part B. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2020.114941
- [15] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EU. *Směrnice Evropského parlamentu a rady 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013, kterou se mění směrnice 2000/60/ES a 2008/105/ES, pokud jde o prioritní látky v oblasti vodní politiky*. Brusel, 2013. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039>
- [16] KOLAR, Lucija, Nevenka KOŽUH ERŽEN, Lenny HOGERWERF a Cornelis A. M. VAN GESTEL. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*. 2008, **151**(1), 182–189. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2007.02.011
- [17] PAROLINI, Marco, Alessandra PEDRIALI a Andrea BINELLI. Application of a biomarker response index for ranking the toxicity of five pharmaceutical and personal care products (PPCPs) to the bivalve *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2013, **64**(3), 439–447. Dostupné z: doi:10.1007/s00244-012-9847-3
- [18] HRKAL, Zbyněk, Pavel ECKHARDT, Anna HRABÁNKOVÁ, Eva NOVOTNÁ a David ROZMAN. PPCP Monitoring in Drinking Water Supply Systems: The Example of Káraný Waterworks in Central Bohemia. *Water*. 2018, **10**(12). ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w10121852

- [19] DATEL, Josef V. a Anna HRABANKOVA. Pharmaceuticals Load in the Svihov Water Reservoir (Czech Republic) and Impacts on Quality of Treated Drinking Water. *Water*. 2020, **12**(5). ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w12051387
- [20] GÓMEZ-REGALADO, María del Carmen, Julia MARTÍN, Juan Luis SANTOS, Irene APARICIO, Esteban ALONSO a Alberto ZAFRA-GÓMEZ. Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database. *Science of The Total Environment*. 2023, **861**. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.160638
- [21] SALGADO COSTA, C., F. BAHL, G.S. NATALE, T.M. MAC LOUGHLIN, D.J.G. MARINO, A. VENTURINO, S. RODRIGUEZ-MOZAZ a L.H.M.L.M. SANTOS. First evidence of environmental bioaccumulation of pharmaceuticals on adult native anurans (*Rhinella arenarum*) from Argentina. *Environmental Pollution*. 2023, **334**. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2023.122231
- [22] CERVENY, Daniel, Roman GRABIC, Kateřina GRABICOVÁ, et al. Neuroactive drugs and other pharmaceuticals found in blood plasma of wild European fish. *Environment International*. 2021, **146**. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2020.106188
- [23] VASQUEZA, M.I., A. LAMBRIANIDESB, M. SCHNEIDERC, K. KÜMMERERC a D. FATTA-KASSINOS. Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*. 2014, **279**, 169–189. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2014.06.069
- [24] GOMAA, Mohamed, Ayat ZIEN-ELABDEEN, Awatief F. HIFNEY a Mahmoud S. ADAM. Phycotoxicity of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs to green algae *Chlorella* sp. and *Desmodesmus spinosus*: Assessment of combined toxicity by Box–Behnken experimental design. *Environmental Technology & Innovation*. 2021, **23**. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2021.101586
- [25] SHAO, Yitian, Yiping WANG, Yiwen YUAN a Yujing XIE. A systematic review on antibiotics misuse in livestock and aquaculture and regulation implications in China. *Science of the Total Environment*. 2021, **798**. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149205
- [26] GALINDO-MIRANDA, J. Manuel, Cecilia GUÍZAR-GONZÁLEZ, Elías J. BECERRIL-BRAVO, Gabriela MOELLER-CHÁVEZ, Elizabeth LEÓN-BECERRIL a Ramiro VALLEJO-RODRÍGUEZ. Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters and their analytical methodology – a review. *Water Supply*. 2019, 2019-11-01, **19**(7), 1871-1884. ISSN 1606-9749. Dostupné z: doi:10.2166/ws.2019.087
- [27] MITRA, Suchitra, R.K. SARAN, Sudhakar SRIVASTAVA a Christopher RENSING. Pesticides in the environment: Degradation routes, pesticide transformation products and ecotoxicological considerations. *Science of The Total Environment*. 2024, **935**. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2024.173026

- [28] DĄBROWSKA, D., A. KOT-WASIK a J. NAMIEŚNIK. The Importance of Degradation in the Fate of Selected Organic Compounds in the Environment. Part II. Photodegradation and Biodegradation. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2004, **13**(6), 617–626. Dostupné také z: <https://www.pjoes.com/The-Importance-of-Degradation-in-the-Fate-of-Selected-Organic-Compounds-in-the-Environment%2C87706%2C0%2C2.html?utm>
- [29] ŚLÓSARCZYK, Kinga, Sabina JAKÓBCZYK-KARPIERZ, Jacek RÓŻKOWSKI a Andrzej J. WITKOWSKI. Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Water Environment of Poland: A Review. *Water*. 2021, **13**(16). ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w13162283
- [30] WU, Jingming, Lifeng ZHANG a Zhaoguang YANG. A Review on the Analysis of Emerging Contaminants in Aquatic Environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2010, **40**(4), 234–245. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2010.515467
- [31] TADEO, José L., Consuelo SÁNCHEZ-BRUNETE, Beatriz ALBERO, Ana I. GARCÍA-VALCÁRCEL a Rosa A. PÉREZ. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Open Chemistry*. 2012, 2012-6-1, **10**(3), 480-520. Dostupné z: doi:10.2478/s11532-011-0157-9
- [32] WALSH, Gary. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. Second Edition. Wiley, 2003. ISBN 978-0-470-84327-7.
- [33] ZHUANG, Mei, Yigal ACHMON, Yuping CAO, Xiaomin LIANG, Liang CHEN, Hui WANG, Bupe A. SIAME a Ka Yin LEUNG. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*. 2021, **285**. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.117402
- [34] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 3. upravené a rozšířené vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [35] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a Toxikologie*. Překlad 15. zcela přepracovaného vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [36] FU, L. M. a C. S. FU-LIU. Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens? *Tuberculosis*. 2002, **82**(2/3), 85-90.
- [37] OVUNG, Aben a Jhimli BHATTACHARYYA. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*. 2021, **13**(2), 259-272. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-021-00795-9
- [38] WALSH, Christopher T. a Timothy A. WENCEWICZ. *Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities*. Washington, DC: ASM Press, 2016. ISBN 978-1-555-81930-9.

- [39] YI, Ke-Xin, Qing-Yi XIE, Qing-Yun MA, Li YANG, Hao-Fu DAI, You-Xing ZHAO a Yu-E HAO. Diverse ansamycin derivatives from the marine-derived *Streptomyces* sp. ZYX-F-97 and their antibacterial activities. *Fitoterapia*. 2024, **173**. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2023.105814
- [40] *Sigma-Aldrich. Bezpečnostní list: Ampicillin [online] [online]*. Verze 9.3. 2023 [cit. 2025-02-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/sds/sigma/a9393?userType=anonymous>
- [41] *Thermo Fisher SCIENTIFIC. Safety Data Sheet: Ampicillin, sodium salt [online] [online]*. Revision number 5. 2010 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=BP17605&productDescription=AMPICILLIN+SOD+CRYSTALLN+5GR&vendorId=VN00033897&countryCode=US&language=en>
- [42] MITCHELL, Shannon M., Jeffrey L. ULLMAN, Amy L. TEEL a Richard J. WATTS. PH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Science of The Total Environment*. 2014, **466-467**, 547-555. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2013.06.027
- [43] *CAYMAN Chemical. Safety data sheet: Ampicilin (sodium salt) [online] [online]*. 2024 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: <https://cdn.caymanchem.com/cdn/msds/14417m.pdf>
- [44] MAGDALENO, A., M.E. SAENZ, A.B. JUÁREZ a J. MORETTON. Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015, **113**, 72-78. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2014.11.021
- [45] SINGH, Ashish, Seema KURKURE a Sonali ANARDI. Formulation and evaluation of in-situ gelling system for sustained release ophthalmic drug delivery of ciprofloxacin. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2020, **9**(8), 2120–2154. ISSN 2277– 7105. Dostupné z: doi:10.20959/wjpr20208-18075
- [46] *Sigma-Aldrich. Bezpečnostní list: Ciprofloxacin [online] [online]*. Verze 6.3. 2022 [cit. 2025-02-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/sds/sial/17850?userType=anonymous>
- [47] CAÇO, Ana I., Fátima VARANDA, Maria J. PRATAS DE MELO, Ana M. A. DIAS, Ralf DOHRN a Isabel M. MARRUCHO. Solubility of Antibiotics in Different Solvents. Part II. Non-Hydrochloride Forms of Tetracycline and Ciprofloxacin. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2008, 2008-11-05, **47**(21), 8083-8089. ISSN 0888-5885. Dostupné z: doi:10.1021/ie8003495
- [48] ROSS, Danna L., Steven K. ELKINTON a Christopher M. RILEY. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. 1-Octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *International Journal of*

- Pharmaceutics*. 1992, **88**(1-3), 379-389. ISSN 03785173. Dostupné z:
doi:10.1016/0378-5173(92)90336-Z
- [49] *PFIZER INC. Safety Data Sheet: Ciprofloxacin Injection, USP. [online] [online]*.
Version 2.0. 2018 [cit. 2025-02-12]. Dostupné z:
https://cdn.pfizer.com/pfizercom/products/material_safety_data/ciprofloxacin_inj_hospira_17-may-2018.pdf
- [50] HAGENBUCH, Isaac M. a James L. PINCKNEY. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research*. 2012, **46**(16), 5028-5036. ISSN 00431354. Dostupné z:
doi:10.1016/j.watres.2012.06.040
- [51] GEIGER, Elisabeth, Romana HORNEK-GAUSTERER a Melek Türker SAÇAN. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016, **129**, 189-198. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.032
- [52] DAI, Jing, Sang-Jin SUH, Morgan HAMON a Jong Wook HONG. Determination of antibiotic EC 50 using a zero-flow microfluidic chip based growth phenotype assay. *Biotechnology Journal*. 2015, **10**(11), 1783-1791. ISSN 1860-6768. Dostupné z:
doi:10.1002/biot.201500037
- [53] DIONÍSIO, Ricardo, David DANIEL, Gilberto Dias de ALKIMIN a Bruno NUNES. Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short- and long-term effects on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2020, **74**. ISSN 13826689. Dostupné z:
doi:10.1016/j.etap.2019.103295
- [54] CARNEIRO, Rodrigo B., Eloisa POZZI, Juliano J. CORBI a Marcelo ZAIAT. Ecotoxicity and Antimicrobial Inhibition Assessment of Effluent from an Anaerobic Bioreactor Applied to the Removal of Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin Antibiotics from Domestic Sewage. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2021, **232**(4). ISSN 0049-6979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-021-05097-0
- [55] EBERT, Ina, Jean BACHMANN, Ute KÜHNEN, Anette KÜSTER, Carola KUSSATZ, Dirk MALETZKI a Christoph SCHLÜTER. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2011, 2011-12-01, **30**(12), 2786-2792. ISSN 0730-7268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.678
- [56] PINO-OTÍN, María Rosa, Guillermo LORCA, Elisa LANGA, Francisco ROIG, Eva M. TERRADO a Diego BALLESTERO. Assessing the Ecotoxicity of Eight Widely Used Antibiotics on River Microbial Communities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, **24**(23). ISSN 1422-0067. Dostupné z:
doi:10.3390/ijms242316960

- [57] *Sigma-Aldrich. Safety Data Sheet: Chloramphenicol [online]* [online]. Version 7.4. 2024 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/pt/sds/sigma/c0378?userType=undefined>
- [58] *CAYMAN Chemical. SafetyData Sheet: Chloramphenicol [online]* [online]. 2020 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: <https://cdn.caymanchem.com/cdn/msds/14334m.pdf>
- [59] LAI, Hong-Thih, Jung-Hsin HOU, Chyong-Ing SU a Chun-Lang CHEN. Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009, **72**(2), 329-334. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2008.03.005
- [60] SEOANE, Marta, Carmen RIOBOO, Concepción HERRERO a Ángeles CID. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine Environmental Research*. 2014, **101**, 1-7. ISSN 01411136. Dostupné z: doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.011
- [61] MINALE, Mengist, Zaoli GU, Awoke GUADIE, Daniel Manaye KABTAMU, Yuan LI a Xuejiang WANG. Application of graphene-based materials for removal of tetracyclines using adsorption and photocatalytic-degradation: A review. *Journal of Environmental Management*. 2020, **276**. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2020.111310
- [62] *Sigma-Aldrich. Safety Data Sheet: Tetracycline Hydrochloride [online]* [online]. Version 8.3. 2023 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/de/sds/SIGMA/T7660?userType=undefined>
- [63] *MERCK. Safety Data Sheet: Tetracycline Hydrochloride [online]* [online]. Version 2.1. 2023 [cit. 2025-02-08]. Dostupné z: https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/ah-sds/Tetracycline%20Hydrochloride_AH_CA_EN.pdf
- [64] *Sigma-Aldrich. Bezpečnostní list: Tetracycline [online]* [online]. Verze 7.0. 2022 [cit. 2025-02-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/sds/sigma/t3258?userType=anonymous>
- [65] DAGHRIR, R. a P. DROGUI. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2013, **11**(3), 209-227. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-013-0404-8
- [66] GONZÁLEZ-PLEITER, Miguel, Soledad GONZALO, Ismael RODEA-PALOMARES, Francisco LEGANÉS, Roberto ROSAL, Karina BOLTES, Eduardo MARCO a Francisca FERNÁNDEZ-PIÑAS. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. 2013, **47**(6), 2050-2064. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2013.01.020
- [67] WANG, Li, Ying CHEN, Ye ZHAO, Minglei DU, Ying WANG, Jingfeng FAN, Nanqi REN a Duu-Jong LEE. Toxicity of two tetracycline antibiotics on *Stentor coeruleus*

- and *Stylonychia lemnae*: Potential use as toxicity indicator. *Chemosphere*. 2020, **255**. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127011
- [68] XU, Dongmei, Yingping XIAO, Hua PAN a Yu MEI. Toxic effects of tetracycline and its degradation products on freshwater green algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, **174**, 43-47. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2019.02.063
- [69] HAVELKOVA, Barbora, Miroslava BEKLOVA, Veronika KOVACOVA, Daniela HLAVKOVA a Jiri PIKULA. Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. *Neuroendocrinology Letters*. 2016, **37 (Suppl. 1)**, 38–44.
- [70] DINH, Quoc Tuc, Elodie MOREAU-GUIGON, Pierre LABADIE, Fabrice ALLIOT, Marie-Jeanne TEIL, Martine BLANCHARD a Marc CHEVREUIL. Occurrence of antibiotics in rural catchments. *Chemosphere*. 2017, **168**, 483-490. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.106
- [71] YANG, Qiulian, Yuan GAO, Jian KE, Pau Loke SHOW, Yuhui GE, Yanhua LIU, Ruixin GUO a Jianqiu CHEN. Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered*. 2021, **12(1)**, 7376-7416. ISSN 2165-5979. Dostupné z: doi:10.1080/21655979.2021.1974657
- [72] LIU, Wenke a Lianfeng DU. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2012, **32(2)**, 309–327. Dostupné z: doi:10.1007/s13593-011-0062-9
- [73] LIU, Feng, Guang-Guo YING, Ran TAO, Jian-Liang ZHAO, Ji-Feng YANG a Lan-Feng ZHAO. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*. 2009, **157(5)**, 1636–1642. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2008.12.021
- [74] DONG, Luxi, Jie GAO, Xiujie XIE a Qixing ZHOU. DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. 2012, **89(1)**, 44–51. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2012.04.010
- [75] ZHU, Yong-Guan, Yi ZHAO, Bing LI, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology*. 2017, **2(4)**. Dostupné z: doi:10.1038/nmicrobiol.2016.270
- [76] BUELOW, Elena, Marie-Cecile PLOY a Christophe DAGOT. Role of pollution on the selection of antibiotic resistance and bacterial pathogens in the environment. *Current Opinion in Microbiology*. 2021, **64**, 117–124. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2021.10.005
- [77] *EVROPSKÁ UNIE. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. In: . Úřední věstník Evropské unie, 18.10.2003, L 268/29, s. 29–43.*

- [78] U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry #213: New Animal Drugs and New Animal Drug Combination Products Administered in or on Medicated Feed or Drinking Water for Food-Producing Animals. FDA Guidance for Industry #213*. In: . Silver Spring, MD: U.S. Department of Health and Human Services, 2013. Dostupné také z: <https://www.fda.gov/media/83488/download>
- [79] ÖSTMAN, Marcus, Richard H. LINDBERG, Jerker FICK, Erik BJÖRN a Mats TYSKLIND. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Research*. 2017, **115**, 318-328. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.03.011
- [80] CHEN, Feng, Guang-Guo YING, Ling-Xiao KONG, Jian-Liang ZHAO, Li-Jun ZHOU a Li-Juan ZHANG. Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environmental Pollution*. 2011, **159**(6), 1490–1498. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2011.03.016
- [81] SALAH, Heba, Nabila SHEHATA, Noha KHEDR a Khaled N. M. ELSAYED. Management of a ciprofloxacin as a contaminant of emerging concern in water using microalgaebioremediation: mechanism, modeling, and kinetic studies. *Microbial Cell Factories*. 2024, **23**(1). ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-024-02591-y
- [82] EVROPSKÁ KOMISE. *Evropský akční plán „Jedno zdraví“ proti antimikrobiální rezistenci (AMR)*. Brusel, 2017. COM(2017) 339 final. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017DC0339>
- [83] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Akční plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP) na období 2019–2022*. Praha, 2019. Dostupné také z: https://szu.gov.cz/wp-content/uploads/2023/06/AP_NAP_2019_2022_textova_cast.pdf
- [84] ČESKÁ PLATFORMA ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE (CZEPAR). CZEPAR Konference 2024 - program. In: *LabRulez* [online]. 2024 [cit. 2025-04-25]. Dostupné z: <https://lcms.cz/article/4694?utm>
- [85] EVROPSKÁ KOMISE. *Strategický přístup Evropské unie k léčivým přípravkům v životním prostředí*. Brusel, 2019. COM(2019) 128 final. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:52019DC0128>
- [86] EVROPSKÁ KOMISE. *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2020/1729 ze dne 17. listopadu 2020 o sledování a ohlašování antimikrobiální rezistence zoonotických a komezálních bakterií, kterým se zrušuje prováděcí rozhodnutí 2013/652/EU*. Brusel, 2020. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020D1729>
- [87] EVROPSKÁ KOMISE. *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2023/1017 ze dne 23. května 2023, kterým se mění prováděcí rozhodnutí (EU) 2020/1729, pokud jde o sledování bakterie *Staphylococcus aureus* rezistentní na methicilin (MRSA) u prasat*

na výkrm. Brusel, 2023. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32023D1017>

- [88] EVROPSKÁ KOMISE. *Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) 2024/1229 ze dne 20. února 2024, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/4 stanovením specifických maximálních hodnot křížové kontaminace necílového krmiva antimikrobními léčivými látkami a metod analýzy pro tyto látky v krmivu*. Brusel, 2024. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202401229
- [89] EVROPSKÁ KOMISE. *Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) 2024/1159 ze dne 7. února 2024, kterým se doplňuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 stanovením pravidel o vhodných opatřeních k zajištění účinného a bezpečného používání veterinárních léčivých přípravků povolených a předepsaných pro perorální podávání jinými způsoby než prostřednictvím medikovaného krmiva a podávaných chovatelem zvířatům určeným k produkci potravin*. Brusel, 2024. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202401159
- [90] EVROPSKÁ KOMISE. *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2025/439 ze dne 28. února 2025, kterým se stanoví seznam sledovaných látek pro monitorování v rámci celé Unie v oblasti vodní politiky podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES*. Brusel, 2025. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202500439
- [91] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EU. *Směrnice Evropského parlamentu a rady 2008/105/ES ze dne 16. prosince 2008 o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky, změně a následném zrušení směrnic Rady 82/176/EHS, 83/513/EHS, 84/156/EHS, 84/491/EHS a 86/280/EHS a změně směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES*. Brusel, 2008. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105>
- [92] EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EU. *Směrnice Evropského parlamentu a rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepracované znění)*. Brusel, 2020. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184>
- [93] EVROPSKÁ KOMISE. *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2022/679 ze dne 19. ledna 2022, kterým se podle směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 stanoví seznam sledovaných ukazatelů týkající se látek nebo sloučenin, které u vody určené k lidské spotřebě vzbuzují obavy*. Brusel, 2022. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022D0679>
- [94] KUNDU, Pritha, Nalok DUTTA a Sayan BHATTACHARYA. Application of microalgae in wastewater treatment with special reference to emerging contaminants: a step towards sustainability. *Frontiers in Analytical Science*. 2024, 2024-12-23, **4**. ISSN 2673-9283. Dostupné z: doi:10.3389/frans.2024.1513153

- [95] BAUDELET, Paul-Hubert, Guillaume RICOCHON, Michel LINDER a Lionel MUNIGLIA. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*. 2017, **25**, 333-371. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2017.04.008
- [96] STEPURA, Marina. Chlamydia diagram. *IStock* [online]. [cit. 2025-04-16]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/vektor/chlamydia-diagram-gm1980170389-558973848>
- [97] DOLGANYUK, Vyacheslav, Daria BELOVA, Olga BABICH, Alexander PROSEKOV, Svetlana IVANOVA, Dmitry KATSEROV, Nikolai PATYUKOV a Stanislav SUKHIKH. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*. 2020, **10**(8). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10081153
- [98] KWARTININGSIH, Endang, Aida Nur RAMADHANI, Nadia Gusti Ami PUTRI a Vicky Clarissa Jennie DAMARA. Chlorophyll Extraction Methods Review and Chlorophyll Stability of Katuk Leaves (*Sauropus androgynous*). *Journal of Physics: Conference Series*. 2021, 2021-04-01, **1858**(1). ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1858/1/012015
- [99] KEYKHA, Fatemeh, Masoud FAKHRFESHANI, Hadi ALIPOUR a Maryam AMERI. Micro Algal pigments: An introduction to their biosynthesis, applications and genetic engineering. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 2021, **9**(1), 42–61. Dostupné také z: 10.22058/jpmb.2021.140046.1218
- [100] FERREIRA DE OLIVEIRA, Ana Paula a Adriana Pavesi Ariseto BRAGOTTO. Microalgae-based products: Food and public health. *Future Foods*. 2022, **6**. ISSN 26668335. Dostupné z: doi:10.1016/j.fufo.2022.100157
- [101] GUO, Jiahua, Alistair BOXALL a Katherine SELBY. Do Pharmaceuticals Pose a Threat to Primary Producers? *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2015, 2015-12-02, **45**(23), 2565-2610. ISSN 1064-3389. Dostupné z: doi:10.1080/10643389.2015.1061873
- [102] SU, Min, Leen BASTIAENS, Joran VERSPREET a Maria HAYES. Applications of Microalgae in Foods, Pharma and Feeds and Their Use as Fertilizers and Biostimulants: Legislation and Regulatory Aspects for Consideration. *Foods*. 2023, **12**(20). ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12203878
- [103] XIONG, Qian, Li-Xin HU, You-Sheng LIU, Jian-Liang ZHAO, Liang-Ying HE a Guang-Guo YING. Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. *Environment International*. 2021, **155**. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2021.106594
- [104] GHOSH, Dr. Indrani. Removal of Antibiotics by Algae: Elucidating the Removal Mechanisms, Treatment Systems and Post-Treatment Antibiotic Resistance. *African*

Journal of Biomedical Research. 2024, 2024-10-12, **27**, 790-804. Dostupné z:
doi:10.53555/AJBR.v27i3.2936

- [105] KIKI, Claude, Azhar RASHID, Yuwen WANG, Yan LI, Qiaoting ZENG, Chang-Ping YU a Qian SUN. Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways. *Journal of Hazardous Materials*. 2020, **387**. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2019.121985
- [106] GOJKOVIC, Zivan, Richard H. LINDBERG, Mats TYSKLIND a Christiane FUNK. Northern green algae have the capacity to remove active pharmaceutical ingredients. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, **170**, 644-656. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.032
- [107] DANESHVAR, Ehsan, Mohammad Javad ZARRINMEHR, Atefeh Malekzadeh HASHTJIN, Omidvar FARHADIAN a Amit BHATNAGAR. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. *Bioresource Technology*. 2018, **268**, 523-530. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.08.032
- [108] GRIMES, Kassandra L., Laura J. DUNPHY, Erica M. LOUDERMILK, A. Jasmin MELARA, Glynis L. KOLLING, Jason A. PAPIN a Lisa M. COLOSI. Evaluating the efficacy of an algae-based treatment to mitigate elicitation of antibiotic resistance. *Chemosphere*. 2019, **237**. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.124421
- [109] LI, Zhuo, Shuangxi LI, Tianrui LI, Xinxin GAO a Liandong ZHU. Physiological and transcriptomic responses of *Chlorella sorokiniana* to ciprofloxacin reveal molecular mechanisms for antibiotic removal. *IScience*. 2022, **25**(7). ISSN 25890042. Dostupné z: doi:10.1016/j.isci.2022.104638
- [110] XIE, Peng, Chuan CHEN, Chaofan ZHANG, Guanyong SU, Nanqi REN a Shih-Hsin HO. Revealing the role of adsorption in ciprofloxacin and sulfadiazine elimination routes in microalgae. *Water Research*. 2020, **172**. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2020.115475
- [111] WANG, Yue, Weihao NING, Meina HAN, Changfei GAO, Wanqian GUO, Jo-Shu CHANG a Shih-Hsin HO. Algae-mediated bioremediation of ciprofloxacin through a symbiotic microalgae-bacteria consortium. *Algal Research*. 2023, **71**. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2023.103062
- [112] XIONG, Jiu-Qiang, Mayur B. KURADE, Jung Rae KIM, Hyun-Seog ROH a Byong-Hun JEON. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of Hazardous Materials*. 2017, **323**, 212-219. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2016.04.073
- [113] TANG, Jun, Jun YANG, Sirui ZHAO, Xiaoyu WANG a Zhengxin XIE. Toxic Effects of Tetracycline and Its Removal by the Freshwater Microalga *Chlorella pyrenoidosa*.

Agronomy. 2022, **12**(10). ISSN 2073-4395. Dostupné z:
doi:10.3390/agronomy12102497

- [114] MICHELON, William, Alexandre MATTHIENSEN, Aline VIANCELLI, Gislaine FONGARO, Vanessa GRESSLER a Hugo Moreira SOARES. Removal of veterinary antibiotics in swine wastewater using microalgae-based process. *Environmental Research*. 2022, **207**. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2021.112192
- [115] BENCOVÁ, Petra. *Testování ekotoxicity vybraných mikropolutantů*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Jiří Palarčík.
- [116] *Spektrofotometrické stanovení obsahu chlorofylu a karotenoidů v listech* [Online]. České Budějovice: Jihočeská univerzita – Přírodovědecká fakulta, 2009. Dostupné také z: https://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KEBR220/old/KFR220_U04-Pigmenty-2009.pdf
- [117] KHANA, A. N. M. A. I., M. A. B. HABIB, M. R. ISLAM, M. I. a M. I. MIAH. Culture of the Microalga *Chlorella vulgaris* on Different Proportions of Sugar Mill Effluents. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 2006, **49**(3), 196–202. Dostupné také z:
https://www.researchgate.net/publication/286187130_Culture_of_the_microalga_Chlorella_vulgaris_on_different_proportions_of_sugar_mill_effluents
- [118] MATOS, Â. P., W. B. FERREIRA, L. R. I. MORIOKA, E. H. S. MOECKE, K. B. FRANÇA a E. S. SANT'ANNA. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in medium supplemented with desalination concentrate grown in a pilot-scale open raceway. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2018, **35**(4), 1183-1192. ISSN 1678-4383. Dostupné z: doi:10.1590/0104-6632.20180354s20170338
- [119] KOUŘILOVÁ, Xenie. *Srovnání růstu a produktivity autotrofních řas a karotenogenních kvasinek*. Brno, 2017. Dostupné také z:
<https://dspace.vut.cz/server/api/core/bitstreams/e6e3fdf4-c930-4119-91cf-06180714ec79/content>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [120] SEHNAL, Luděk. *Vliv fyzikálních faktorů na fotosyntézu extremofilních organismů*. Brno, 2014. Dostupné také z:
https://is.muni.cz/th/urqzr/Final_DP_Sehnal_asrjnuij.pdf. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Miloš Barták.
- [121] TIMM, Alexander, Ewa BOROWSKA, Marius MAJEWSKY, Sylvain MEREL, Christian ZWIENER, Stefan BRÄSE a Harald HORN. Photolysis of four β -lactam antibiotics under simulated environmental conditions: Degradation, transformation products and antibacterial activity. *Science of The Total Environment*. 2019, **651**, 1605-1612. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.248
- [122] HOM-DIAZ, Andrea, Adrián JAÉN-GIL, Sara RODRÍGUEZ-MOZAZ, Damià BARCELÓ, Teresa VICENT a Paqui BLÁNQUEZ. Insights into removal of

antibiotics by selected microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana*, *Dunaliella tertiolecta* and *Pseudokirchneriella subcapitata*). *Algal Research*. 2022, **61**. ISSN 22119264. Dostupné z: doi:10.1016/j.algal.2021.102560

- [123] ZHAO, Feng, Di ZHANG, Chenye XU, Jianshe LIU a Chensi SHEN. The enhanced degradation and detoxification of chlortetracycline by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020, **196**. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110552
- [124] KRAJČKOVÁ, Eva. *Heterotrofní kultivace řas Chlorella v bioreaktoru*. Zlín, 2015. Dostupné také z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/33533/kraj%20ad%208dkov%20a1_2015_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Roman Slavík.
- [125] MATOS, Ângelo Paggi, Weruska Brasileiro FERREIRA, Regina Coeli DE OLIVEIRA TORRES, et al. Optimization of biomass production of *Chlorella vulgaris* grown in desalination concentrate. *Journal of Applied Phycology*. 2015, **27**(4), 1473-1483. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/s10811-014-0451-y
- [126] NZAYISENGA, Jean Claude, Xavier FARGE, Sophia Leticia GROLL a Anita SELSTEDT. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnology for Biofuels*. 2020, **13**(1). ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-019-1646-x
- [127] HUANG, Jing, Zhengfang WANG, Chunzhi ZHAO, Huayun YANG a Lei NIU. Performance of four different microalgae-based technologies in antibiotics removal under multiple concentrations of antibiotics and strigolactone analogue GR24 administration. *Scientific Reports*. 2024, **14**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-024-67156-w
- [128] AMIN, M, P CHETPATTANANONNDH, M N KHAN, F MUSHTAQ a S K SAMI. Extraction and Quantification of Chlorophyll from Microalgae *Chlorella* sp. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2018, 2018-09-13, **414**. ISSN 1757-899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/414/1/012025
- [129] RICKY, Rajamanickam, Fulvia CHIAMPO a Subramaniam SHANTHAKUMAR. Efficacy of Ciprofloxacin and Amoxicillin Removal and the Effect on the Biochemical Composition of *Chlorella vulgaris*. *Bioengineering*. 2022, **9**(4). ISSN 2306-5354. Dostupné z: doi:10.3390/bioengineering9040134
- [130] LI, Yecong, Wenguang ZHOU, Bing HU, Min MIN, Paul CHEN a Roger R. RUAN. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, **109**(9), 2222-2229. ISSN 0006-3592. Dostupné z: doi:10.1002/bit.24491

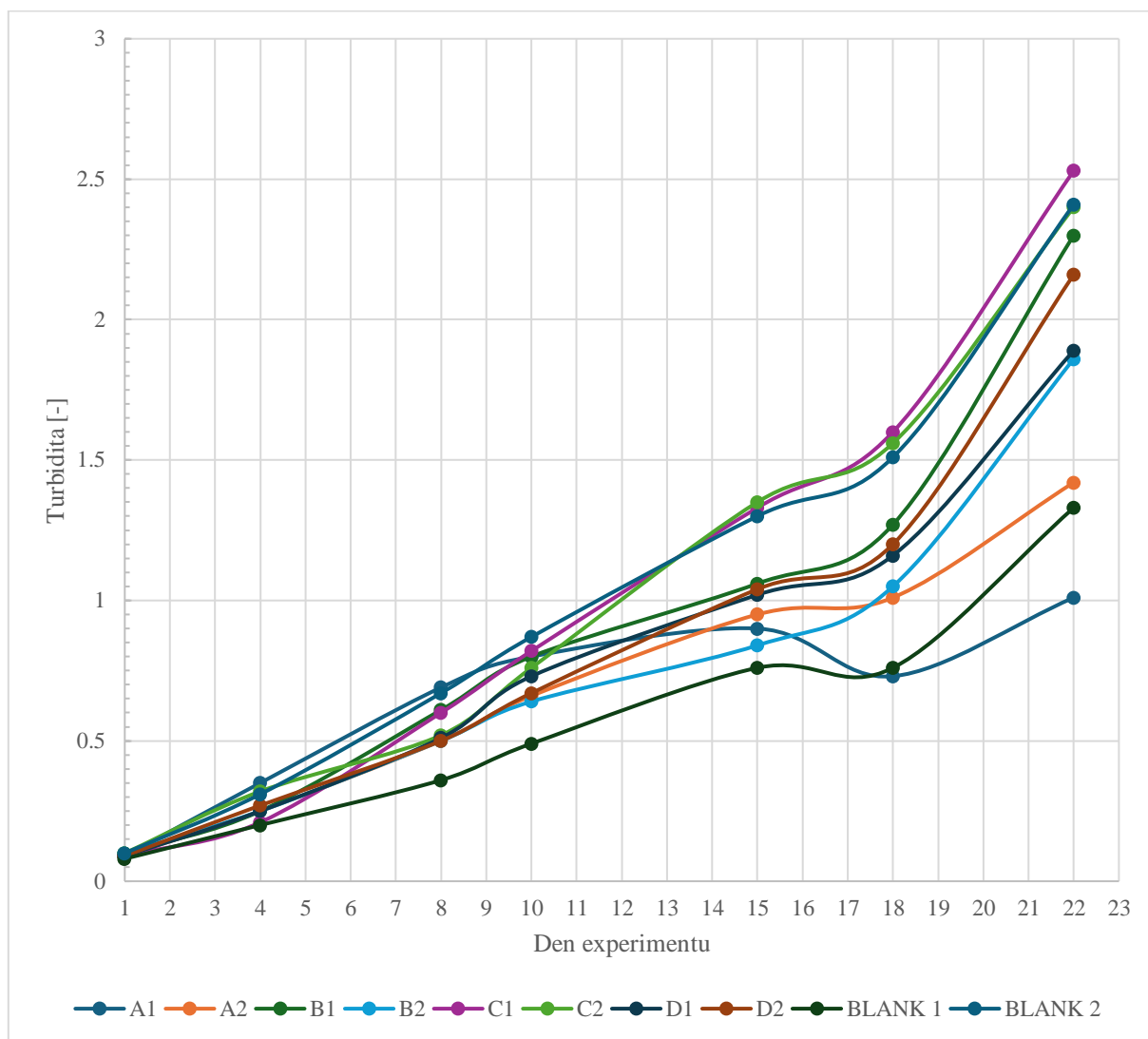
- [131] BIALEVICH, Vitali, Vilém ZACHLEDER a Kateřina BIŠOVÁ. The Effect of Variable Light Source and Light Intensity on the Growth of Three Algal Species. *Cells*. 2022, **11**(8). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells11081293
- [132] GONÇALVES, Ana L, José CM PIRES a Manuel SIMÕES. Lipid production of *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. 2013, **4**(1). ISSN 2008-9163. Dostupné z: doi:10.1186/2251-6832-4-14
- [133] PRIYANKA, Priyanka, Gemma K. KINSELLA, Gary T. HENEHAN a Barry J. RYAN. Enzymatic in-situ transesterification of neutral lipids from simulated wastewater cultured *Chlorella emersonii* and *Pseudokirchneriella subcapitata* to sustainably produce fatty acid methyl esters. *Bioresource Technology Reports*. 2020, **11**. ISSN 2589014X. Dostupné z: doi:10.1016/j.biteb.2020.100489

7 PŘÍLOHY

Příloha A: Kultivace v průběhu experimentu – *Chlamydomonas reinhardtii* v modelové odpadní vodě na bázi digestátu



Příloha B: Průběh turbidity u jednotlivých vzorků v čase – *Chlamydomonas reinhardtii* v BBM



Příloha C: Vyhodnocení degradace antibiotik pomocí řasy *Chlamydomonas reinhardtii* v BBM médiu

Léčivo (c-1 µg/l)	Ampicilin (A)		Ciprofloxacin (B)		Chloramfenikol (C)		Tetracyklin (D)	
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
Experiment								
V [l]	0,180	0,148	0,180	0,148	0,180	0,148	0,180	0,148
c [µg/l]	1,256	0	1,155	0,788	0,997	0,636	0,967	0,152
m [µg]	0,226	0	0,208	0,116	0,179	0,094	0,174	0,022
Kontrola								
V [l]	0,040	0,021	0,040	0,021	0,040	0,021	0,040	0,021
c [µg/l]	1,256	0	1,155	1,749	0,997	1,347	0,967	0,361
m [µg]	0,050	0	0,046	0,037	0,040	0,029	0,039	0,008
Přepočtené konečné m kontroly na experiment [µg]		0		0,167		0,128		0,034
Úbytek léčiva								
celkově [µg]		0,226		0,091		0,085		0,151
celkově [%]		100		43,999		47,632		87,076
degradace jinými mechanismy [µg]		0,226		0,041		0,051		0,140
degradace jinými mechanismy [%]		100		19,782		28,423		80,233
degradace řasou [µg]		0		0,050		0,034		0,012
degradace řasou [%]		0		24,217		19,210		6,844
Podíl řasy na celkové degradaci [%]		0		55,041		40,329		7,859

Příloha D: Vyhodnocení degradace antibiotik pomocí řasy *Chlamydomonas reinhardtii* v odpadní vodě na bázi digestátu

Léčivo (c-1 µg/l)	Ampicilin (A)		Ciprofloxacín (B)		Chloramfenikol (C)		Tetracyklin (D)		Směs (E)							
	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Ampicilin		Ciprofloxacín		Chloramfenikol		Tetracyklin	
									Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec	Počátek	Konec
Experiment																
V [l]	0,180	0,153	0,180	0,153	0,180	0,154	0,180	0,155	0,180	0,153	0,180	0,153	0,180	0,153	0,180	0,153
c [µg/l]	0,451	0	0,394	0	0,514	0,140	0,511	0	0,415	0	0,427	0	0,449	0,173	0,569	0
m [µg]	0,081	0	0,071	0	0,092	0,022	0,092	0	0,075	0	0,077	0	0,081	0,026	0,102	0
Kontrola																
V [l]	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029	0,040	0,029
c [µg/l]	0,451	0	0,394	0	0,514	0,372	0,511	0	0,415	0	0,427	0	0,449	0,433	0,569	0
m [µg]	0,018	0	0,016	0	0,021	0,011	0,020	0	0,017	0	0,017	0	0,018	0,013	0,023	0
Přepočet konečné m kontroly na experiment [µg]		0		0		0,049		0		0		0		0,057		0
Úbytek léčiva																
celkově [µg]	0,081		0,071		0,071		0,092		0,075		0,077		0,055		0,102	
celkově [%]	100		100		76,733		100		100		100		67,435		100	
degradace jinými mechanismy [µg]	0,081		0,071		0,044		0,092		0,075		0,077		0,024		0,102	
degradace jinými mechanismy [%]	100		100		47,243		100		100		100		29,905		100	
degradace řasou [µg]	0		0		0,027		0		0		0		0,030		0	
degradace řasou [%]	0		0		29,490		0		0		0		37,531		0	
Podíl řasy na celkové degradaci [%]	0		0		38,432		0		0		0		55,654		0	