

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Degradace organických xenobiotik mangan-redukujícími
mikroorganismy**

Diplomová práce

Barbora Černá

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

vedoucí práce: Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.

konzultant: Ing. Adam Sochacki, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Degradace organických xenobiotik mangan-redukujícími mikroorganismy" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Haně Šubrtové Salmonové, Ph.D. za vedení práce. Mé poděkování patří také Ing. Adamovi Sochackému, Ph.D. za pomoc s praktickou částí a velice ochotný přístup. Nakonec bych chtěla poděkovat prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za pomoc s teoretickou částí, odborné konzultace a celkové zaštitění mé diplomové práce.

Degradace organických xenobiotik mangan-redukujícími mikroorganismy

Souhrn

Polutanty antropogenního původu se mohou dostávat do pitných vod a zemědělské půdy, kde se mohou akumulovat a také přecházet do potravin. Jednou z možností, jak určité kontaminující látky z životního prostředí buď úplně odstranit nebo alespoň snížit jejich nebezpečnost, je bioremediace. Podmínkou tohoto procesu je přítomnost vybraných mikroorganismů a dále přítomnost akceptorů a donorů elektronů, které budou základem pro redoxní reakce. Mikroorganismy disponují enzymatickým aparátem, který zprostředkovává výměnu elektronů mezi donory a akceptory a polutanty se tímto způsobem degradují. Vzniklý tok elektronů jsou mikroorganismy schopné využít jako zdroj energie pro metabolické pochody uvnitř svých buněk.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaké by bylo možné využití mangan-redukujících mikroorganismů v procesu bioremediace vybraných organických polutantů. Pro srovnání byly stejné parametry degradace měřeny také v nitrát-, železo- a síran- redukujících podmínkách.

V nádobovém pokusu byly jako akceptory elektronů použity dusičnany, sírany, oxid železa a oxid manganu, tedy alternativní zdroje kyslíku. Oxid železa byl dodán ve formě goethitu a oxid manganu ve formě birnesitu. Jako donory elektronů byly vybrány organické polutanty benzotriazole, sulfamethoxazol, diklofenak a flukonazol. Z výsledků pokusu vyplývá, že benzotriazole byl bioticky nejlépe degradován v prostředí s přidavkem acetátu a dusičnanů. Sulfamethoxazol a diklofenak nejrychleji degradovaly v biotickém prostředí s přidavkem acetátu a oxidu železa. Degradace flukonazolu pomocí mikroorganismů probíhala pouze v případě experimentu bez acetátu a za těchto podmínek nejrychleji degradoval v prostředí s přidavkem oxidu manganu. V případě, že došlo v průběhu experimentu k dostatečnému poklesu koncentrace, byly vyhodnoceny kinetické parametry pro jednotlivé organické polutanty. Nejdelsí poločas rozkladu byl vypočten u flukonazolu v dusičnanovém prostředí bez přidavku acetátu, a naopak nejkratší poločas rozkladu byl patrný u sulfamethoxazolu v prostředí s přidavkem acetátu a goethitu.

Ze získaných výsledků lze tedy závěrem usoudit, že přítomnost acetátu napomáhala k plynulejšímu a rychlejšímu snižování koncentrace vybraných organických polutantů v čase. Mangan-redukující mikroorganismy se ukázaly jako jediné schopné degradovat flukonazol ve zvolených podmínkách.

Klíčová slova: redukce manganu; bioremediace; xenobiotika; bakterie; metabolismus

Degradation of xenobiotic compound by manganese-reducing bacteria

Summary

Pollutants of anthropogenic origin can enter potable water and agricultural soil, from which they can be transferred into food resources. One method for the elimination or at least reducing the risk of certain contaminants in the environment is bioremediation. A condition for this process is the presence of selected microorganisms and the presence of electron acceptors and donors, which will become the basis for redox reactions. Microorganisms have an enzymatic apparatus that mediates the exchange of electrons between donors and acceptors. The degradation of pollutants is dependent on these redox processes. The resulting flow of electrons can be used by microorganisms as a source of energy for their metabolic processes.

The goal of this thesis was to find out the potential use of manganese reducing microorganisms in the process of bioremediation of selected organic pollutants. The same degradation parameters were also measured in the presence of nitrate, iron sulfate as alternative electron acceptors.

Nitrates, sulfates, iron oxide and manganese oxide, i.e. alternative oxygen sources, were used as electron acceptors in the bottle experiment. Iron oxide was supplied in the form of goethite and manganese oxide from a birnessite. Organic pollutants benzotriazole, sulfamethoxazole, diclofenac and fluconazole were selected as electron donors. The results of the experiment show that benzotriazole was best biotically degraded in an environment with the addition of acetate and nitrates. Sulfamethoxazole and diclofenac degraded most rapidly in a biotic environment with the addition of acetate and iron oxide. Degradation of fluconazole by microorganisms only occurred in the case of the acetate-free experiment, and under these conditions, it degraded most rapidly in the environment with the addition of manganese oxide. The kinetic parameters for the organic pollutants were also evaluated in the case of significant degradation. The longest half-life was calculated for fluconazole in nitrate medium without added acetate and, conversely, the shortest half-life was observed for sulfamethoxazole in medium with added acetate and goethite.

From the obtained results, it can be concluded that the presence of acetate conducive to faster decrease in the concentration of selected organic pollutants over time. Manganese reducing microorganisms are the only ones capable of degrading fluconazole under selected conditions.

Keywords: manganese reduction, bioremediation, xenobiotics, bacteria, metabolism

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Bioremediace.....	4
3.2 Xenobiotikum.....	5
3.2.1 Metabolismus a biotransformace xenobiotik v lidském těle	6
3.2.2 Pesticidy.....	7
3.2.2.1 Rozdělení pesticidů a jejich vliv na lidské zdraví	9
3.2.2.2 Legislativa týkající se pesticidů	10
3.2.3 Léčiva	11
3.2.3.1 Legislativa týkající se léčiv.....	12
3.3 Organické polutanty použité v experimentu jako donory elektronů	13
3.3.1 Benzotriazole	13
3.3.2 Diklofenak	14
3.3.3 Flukonazol	14
3.3.4 Sulfamethoxazol.....	15
3.4 Akceptory elektronů použité v experimentu.....	16
3.4.1 Dusík	16
3.4.2 Síra	17
3.4.3 Železo	17
3.4.4 Mangan	17
3.5 Tranzitní zóna	18
3.5.1 Mangan-redukující mikroorganismy	19
4 Metodika	21
4.1 Založení experimentu.....	21
4.1.1 Příprava nádob s biotickým sedimentem.....	23
4.1.2 Příprava nádob s abiotickým sedimentem.....	24
4.2 Měření parametrů.....	24
4.2.1 Měření koncentrace organických xenobiotik.....	25
4.2.2 Měření organického uhlíku (TOC).....	26
4.2.3 Měření přítomných aniontů	26
4.2.4 Měření rozpustných kovů	26
4.2.5 Příprava nádob s biotickým sedimentem bez přídavku acetátu	27

5	Výsledky.....	28
5.1	Koncentrace organických polutantů v jednotlivých prostředích s přidavkem acetátu.....	28
5.1.1	Diklofenak.....	28
5.1.2	Sulfamethoxazol.....	29
5.1.3	Flukonazol.....	30
5.1.4	Benzotriazole	30
5.1.5	Srovnání konečných koncentrací v biotickém a abiotickém prostředí.....	31
5.2	Množství organického uhlíku, naměřené pH	32
5.2.1	Koncentrace organického uhlíku pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu	32
5.2.2	Naměřené pH pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu...	32
5.3	Parametry prostředí jednotlivých akceptorů elektronů	33
5.3.1	Koncentrace dusičnanového aniontu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu	33
5.3.2	Koncentrace síranového aniontu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu	34
5.3.3	Koncentrace železa pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu	34
5.3.4	Koncentrace manganu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu	35
5.4	Vybrané kinetické parametry organických polutantů.....	35
5.4.1	Kinetické parametry organických polutantů v jednotlivých prostředích s přidavkem acetátu	35
5.4.2	Kinetické parametry organických polutantů v jednotlivých prostředích bez přidavku acetátu	37
5.5	Koncentrace organických polutantů v jednotlivých prostředích bez přidavku acetátu.....	38
5.5.1	Diklofenak.....	38
5.5.2	Sulfamethoxazol.....	38
5.5.3	Flukonazol.....	39
5.5.4	Benzotriazole	40
6	Diskuze.....	41
6.1	Vliv akceptoru na rozklad organických polutantů	41
6.1.1	Diklofenak.....	42
6.1.2	Sulfamethoxazol.....	42
6.1.3	Flukonazol.....	42
6.1.4	Benzotriazole	43
6.2	Vliv přidavku acetátu na rozklad organických polutantů.....	43

6.3 Kinetické parametry jednotlivých organických polutantů.....	44
6.3.1 Diklofenak	44
6.3.2 Sulfamethoxazol.....	45
6.3.3 Flukonazol	46
6.3.4 Benzotriazole	46
6.4 Hodnoty koncentrace vybraných aniontů a kovů a hodnoty pH v jednotlivých typech prostředí	47
6.5 Možnosti navazujícího výzkumu a využití při bioremediaci	48
7 Závěr	50
8 Literární zdroje.....	51
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	57

1 Úvod

Biosféra je zatěžována polutanty, které produkují lidé svou činností. Takových látek je v našem okolí nadměrné množství, a to se nepříznivě odráží na kvalitě okolního prostředí. Antropogenní polutanty jsou mimo jiné i zátěží vodních toků a nádrží. Podle povahy škodlivé látky lze odvodit způsob, jakým se daná látka do biosféry dostává. Látky zatěžující vodní systémy jsou do oběhu vnášeny hned několika způsoby. Jedním ze způsobů může být například vyplachování fertilizačních přípravků z polí do okolních vodních toků nebo vypouštění odpadních a šedých vod z domácností mimo kanalizační řád. Nezřídka se do vodních toků dostane také kontaminovaná voda z průmyslových závodů. V určitých případech, závislých na povaze průmyslového závodu, je taková situace pro okolní biosféru naprosto katastrofální. Látky jsou vodním tokem rozváděny do širokého okolí a mohou se dostávat do půdy. To samozřejmě nemá vliv pouze na životní prostředí daného okolí, ale tímto způsobem se mohou látky dostávat i do pěstovaných plodin, které jsou dále potravinářsky zpracovávány. Potraviny na první pohled většinou nejeví žádné známky toho, že obsahují antropogenní polutanty, a ani průběh jejich průmyslového zpracování nemusí být kontaminanty nijak narušen. Škodlivé látky tedy mohou být přítomné jak v surovinách použitých pro výrobu, tak následně i v konečných produktech a mohou způsobovat řadu zdravotních komplikací. Jejich škodlivý vliv na zdraví člověka je nepopiratelný, nicméně i přes to jsou obsaženy v mnoha potravinách. Pro udržení standardů a bezpečnosti potravin jsou nastaveny legislativní limity, které musí být u potravin dodržovány. Tyto hladiny jsou přísně kontrolovány dozorovými orgány. Nicméně stále je možná kumulace podlimitních množství, která může být příčinou dalších problémů jak pro zdraví člověka, tak pro životní prostředí. Ze zřejmých důvodů existuje velké úsilí tyto látky z přírodního prostředí odstranit. Není možné tvrdit, že je šance tyto látky do okolí vůbec nevypouštět. Proto je zde snaha je z okolního prostředí buď úplně odstraňovat, anebo se pokusit o jejich transformaci v látky, které již nejsou takovou zátěží. Jedním ze způsobů je i bioremediace pomocí mikroorganismů.

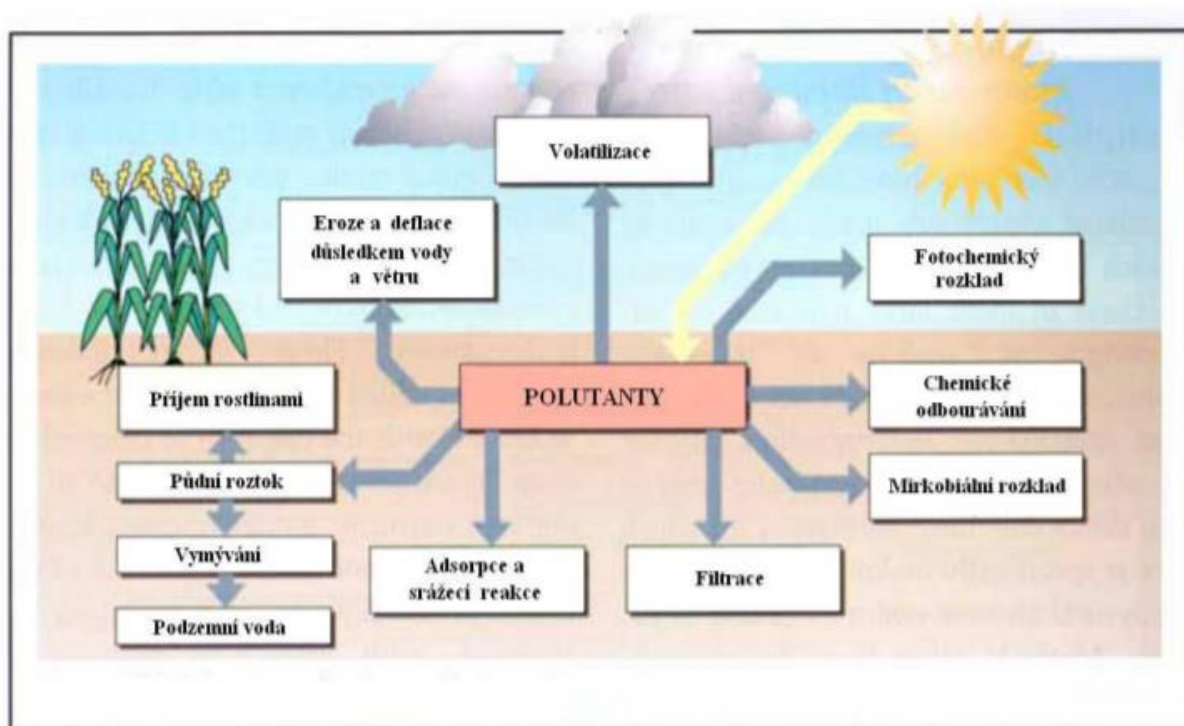
2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíle práce vychází z hypotézy, že mikroorganismy redukující oxidy manganu jsou schopny degradovat různá organická xenobiotika.

Cílem práce je testování schopností mikroorganismů redukujících oxidy manganu degradovat různá organická xenobiotika. K porovnání budou stejné parametry sledovány také v nitrát-, železo- a síran- redukujících podmínkách. V závěrečné fázi bude zhodnoceno možné praktické využití v procesech bioremediace.

3 Literární rešerše

Životní prostředí je významně zatěžováno polutanty přírodního nebo antropogenního původu. Antropogenním polutantem se rozumí plynná, tekutá nebo pevná chemická látka, která má v určitých koncentracích a časovém rozmezí škodlivý vliv na životní prostředí. Podle vzniku se polutanty rozdělují na primární a sekundární. Primární polutanty jsou do životního prostředí vypouštěny z identifikovatelného zdroje. Sekundární polutanty vznikají v životním prostředí v důsledku fyzikálních a chemických dějů z primárních polutantů. V životním prostředí se obě tyto skupiny šíří různými cestami, jak je znázorněno na Obrázku 1. Jednou z možností distribuce je kontaminace vod. Plocha kontaminované půdy je celosvětově velice podstatná a nadále se rozrůstá. Kontaminace škodlivými látkami je ale problém mnohem starší (Uhlík et al. 2013). V době industrializace se začalo životní prostředí plnit škodlivými látkami, které člověk produkoval v rámci rozvoje průmyslu. V těchto dobách nebyl však na enviromentální a zdravotní dopad brán takový zřetel jako dnes. To je jedním z důvodů, proč je nyní tak velká část biosféry zatížena polutanty (Verma & Kuila 2019). Tato práce je zaměřena na degradaci vybraných léčiv a pesticidů pomocí bioremediace. Pro experiment byla vybrána léčiva benzotriazole, diklofenak, flukonazol a sulfamethoxazol. Pro proces biodegradace byly využity mangan-redukující mikroorganismy. K porovnání účinnosti byl stejný postup uskutečněn také v nitrát-, železo- a síran- redukujících podmínkách.



Obrázek 1: Šíření antropogenních polutantů v životním prostředí (Holoubek 2005)

3.1 Bioremediace

Bioremediace je proces odstranění nebo snížení množství škodlivých látek z prostředí pomocí živých organismů nebo enzymů. Nejvýznamnější skupinou organismů, které se podílejí na bioremediaci, jsou mikroorganismy. Jejich použití vyplývá z rychlé reprodukce, velké míry variability a přizpůsobení. Pro proces bioremediace se využívají převážně bakterie. Můžeme ale využít i kvasinky a plísňe (Iwamoto & Nasu 2001). Bioremediace patří do širší skupiny postupů, zabývajících se odstraňováním škodlivých látek z prostředí nejrůznějšími metodami, tedy remediace. Klasické metody jsou založeny na fyzikálních a chemických principech. Tyto postupy jsou neustále zdokonalovány, ale i přes to je jejich použití ekonomicky velice náročné a pro životní prostředí mají spíše negativní následky. Oproti klasickým způsobům remediace je bioremediace aktivně využívána mnohem kratší dobu. Bioremediace je v životním prostředí přirozený děj. Člověk tyto děje a postupy mikroorganismů zkoumá a následně se je snaží napodobit a využít je ve svůj prospěch. Mikroorganismy využívají k transformaci látek svoji přirozenou biologickou aktivitu, nebo je možné mikroorganismy geneticky modifikovat. Modifikovaných organismů se využívá hlavně v případech, kdy by bioremediace přirozenou cestou nemusela proběhnout. Do prostředí jsou v rámci těchto mikroorganismů vnášeny geny stimulující tvorbu enzymů, které jsou nezbytné v kaskádě bioremediačních dějů (Kumar et al. 2018). Geneticky modifikované mikroorganismy jsou využívány pro odstranění nebo transformaci více látek najednou. Ekologická stránka remediace je v případě použití geneticky modifikovaných mikroorganismů zachována. Zdravotní riziko plynoucí z použití modifikovaných mikroorganismů je srovnatelné s rizikem při použití přirozeně se vyskytujících mikroorganismů (Uhlík et al. 2013). Tato metoda transformace polutantů je pro životní prostředí velice příznivá a je ekonomicky výhodnou alternativou klasických postupů. Nevýhodou bioremediace je časová náročnost a v určitých případech je dosažený výsledek nedostačující (Vidali 2001).

Určité chemické látky, například některé chlorné sloučeniny nebo radionuklidy, jsou biologicky nerozložitelné. U jiných látek, které jsou bioremediací rozložitelné, mohou vznikat produkty, které jsou pro okolní prostředí ještě škodlivější. Pro založení úspěšného remediačního programu jsou tedy nutné značné zkušenosti a znalosti. Je nezbytné dodržovat optimální podmínky a daná lokalita musí být pro proces remediace vhodná. Bioremediaci lze provádět v půdách, vodách, kalech ale i kanalizacích (Boopathy 2000). Nejdůležitějšími podmínkami správného fungování je seznámení se s lokalitou a určení přítomných mikroorganismů. Ty se mohou v místě bioremediace přirozeně vyskytovat, nebo mohou být na místo uměle dodány (Watanabe 2001). Společenstvo mikroorganismů funguje komplexně. Na bioremediačním procesu se podílí celá řada mikroorganismů, které vytvářejí substráty pro jiné mikroorganismy. Těmito postupnými reakcemi je dosaženo snížení množství škodlivých látek. Pro snazší průběh bioremediace mohou být do dané lokality kromě mikroorganismů vnášeny také substráty nebo rostliny (Konopka 2009).

V případě, kdy se na procesu bioremediace podílejí rostliny, hovoříme o fytoremediaci. Jejich funkcí je především dodávání zdrojů uhlíku mikroorganismům a akumulace polutantů ve svých nadzemních částech. Tyto části mohou být později odstraněny, a tak je ze systému odstraněn též škodlivý polutant. Kořeny zprostředkovávají výměnu látek mezi okolím a rostlinnou biomasou. Dále jsou pomocí kořenů vylučovány fytostimulanty.

Stimulující látky, které vyvolávají syntézu mikrobiálních degradačních enzymů. Proces bioremediace může probíhat dvojím způsobem. Kontaminované prostředí, jako například půda, je ponecháno na místě a bioremediace probíhá tzv. *in situ*. Druhým způsobem je bioremediace *ex situ*, kdy je kontaminované prostředí odvezeno a proces probíhá mimo původní oblast (Rhodes 2013).

3.2 Xenobiotikum

Pod pojmem xenobiotikum se rozumí lidskému tělu cizí látka, která se v těle za normálních podmínek nevyskytuje (Rieger et al. 2002). Jednou z možných cest, jak se xenobiotika dostávají do lidského těla, je konzumace rostlinné stravy. Není ojedinělé, že v jedné plodině dochází k akumulaci více druhů xenobiotik, která do rostliny pronikají z kontaminované půdy nebo vody (Katayama et al. 2010). S pojmem xenobiotikum souvisí také pojmy kontaminant a reziduum. Kontaminanty jsou látky, které nejsou do potravin přidávány záměrně, ale vstupují do potravin náhodně. Místem vstupu může být zemědělská produkce, ale mnohem častěji je kontaminant do potravin zanesen během skladování a zpracování. Důvodem bývá nedodržení správných hygienických postupů a lhůt (Furst 1996). Jako reziduum je označován zbytek obtížně rozložitelných a často velice toxických chemických látek. Jsou to látky uměle vytvořené a jejich styk s potravinou je zcela záměrný. Takovými látkami bývají například pesticidy nebo léčiva. Skupiny kontaminantů a reziduí bývají velice často zaměnitelné. Například dusičnany mohou být kontaminantem životního prostředí, protože jsou nadužívána v hnojivech. Mohou být ale také reziduem v případě, že se dostane do potravin (Silva et al. 2019). Obecně tedy mezi xenobiotika patří pesticidy, kontaminanty z průmyslové výroby, léčiva, paliva, dezinfekční prostředky, toxiny vytvářené určitými organismy a mnoho dalších. Xenobiotika lze podle Riegera et. al (2000) rozdělit do tří skupin:

Prvními závažnými znečišťujícími látkami jsou sloučeniny pocházející z těžby a průmyslového zpracování uhlí a ropy. Tyto sloučeniny, mezi které patří například polycyklické aromatické sloučeniny, kyanidy nebo fenoly, jsou látky s vysokou akutní i chronickou toxicitou. Proto je zde velká snaha tyto sloučeniny z životního prostředí eliminovat a přetvářet na látky méně toxické nebo úplně neškodné.

Druhou důležitou a nebezpečnou skupinou xenobiotik jsou organické sloučeniny syntetického původu. Ty jsou velice často součástí odpadového hospodářství velkých průmyslových podniků. V ojedinělých případech jsou sloučeniny vypouštěny do okolního prostředí a zamořují tím přilehlou oblast. Zemědělská půda ležící v blízkosti průmyslových podniků je poté prosycena organickými xenobiotiky s vysokou biologickou dostupností a toxicitou.

Třetí velkou skupinou xenobiotik jsou agrochemikálie antropogenního původu. Často jde o látky, které jsou velmi špatně rozložitelné a mají dlouhý poločas rozkladu. To znamená, že v životním prostředí zůstávají přítomné dlouhou dobu. Biotransformace těchto látek je složitá a u některých typů sloučenin je naprosto vyloučená.

Velké průmyslové společnosti se v dnešní době snaží vyvíjet chemické látky tak, aby v případě, že se stanou xenobiotiky, byl jejich škodlivý dopad na životní prostředí co nejmenší a aby případná biodegradace probíhala snadněji. Mnohdy jsou nově vzniklé látky ekologicky

naprosto neškodné. I přes veškeré snahy je množství těchto látek v biosféře značné a zátěž s nimi spojená, je velkým problémem (Katayama et al. 2010).

3.2.1 Metabolismus a biotransformace xenobiotik v lidském těle

Xenobiotika se mohou do lidského organismu dostat různými způsoby. Častou bránou vstupu je trávicí trakt, kdy jsou škodlivé látky požitý v konzumovaných potravinách. Dále je možné škodlivé látky vdechnout, pak je vstup zajištěn respirační cestou, nebo mohou vstoupit do těla pokožkou, tedy dermální cestou. V závislosti na době expozice se liší toxicita pro lidský organismus. V případě akutní toxicity následuje bezprostřední odezva organismu. Tento druh toxicity je důsledkem přímého kontaktu s danou látkou v relativně vysoké koncentraci. Naopak u chronické toxicity je pro odezvu organismu nutné delší časové období. Toxický účinek je způsoben kumulací, tedy nahromaděním xenobiotika ve tkáních. Organismus je většinou vystaven působení organických polutantů v nízké koncentraci, ale po delší časové období. U některých látek může účinek přetrvávat i po jejím odbourání a vyloučení z organismu.

Xenobiotikum může projít lidským tělem různými způsoby. Může být vyloučeno bez změny chemické struktury, může dále přetrvávat v nezměněné podobě, může být spontánně chemicky přeměněno nebo může dojít k enzymatickému metabolismu daného xenobiotika. Následně dochází k exkreci látky z organismu. Nejčastěji jsou látky vylučovány močí, dále pak pomocí výkalů nebo dýcháním. Spontánní chemická transformace není příliš častý způsob průchodu organismem. Častěji bývají xenobiotika degradována pomocí substrátu. V takovém případě dojde k navázání dané látky na nosič a ta je následně společně s nosičem odstraněna z lidského těla. Dalším postupem je použití enzymatického aparátu těla. Existují enzymy s absolutní specifitou, které katalyzují přeměnu pouze daného xenobiotika. Mnohem častější je ale specifita skupinová, kdy jeden enzym katalyzuje přeměnu látek, které jsou strukturně podobné. V průběhu degradace xenobiotika se může toxicita zvyšovat, ale častější variantou je snížení toxicity a v některých případech též úplné vymizení toxických účinků (Croom 2012).

Degradace xenobiotik pomocí enzymatického aparátu je v lidském těle nejčastějším způsobem degradace. Nejdůležitějším místem pro transformaci xenobiotik jsou játra, ale enzymy schopné přeměny xenobiotik jsou ve všech tkáních těla. Dalšími eliminačními orgány jsou plíce, trávicí trakt, nebo ledviny (Bhatt et al. 2019). Otravy určitým xenobiotikem zvýší koncentrace enzymů, které se účastní jeho degradace, pouze v místě poškození. Tímto způsobem lze určit lokalitu, kterou dané xenobiotikum poškozuje (Croom 2012). V případě trávicího traktu je transformace xenobiotik kromě enzymů spojená také se střevní mikrobiotou, která celý proces zásadně ovlivňuje. Společenství mikroorganismů gastrointestinálního traktu, které je pro každého jedince originální, je samo schopno určité škodlivé látky přetvářet a tyto látky posléze vylučovat stolicí. Poškození střevní mikrobioty může mít fatální vliv na hostitele. Schopnost detoxikace látek, ale i správné fungování trávicího traktu jsou na mikrobiotě zcela závislé (Koppel et al. 2017).

Enzymatickou transformaci dělíme do dvou fází:

První fáze biotransformace je udávána jako přeměna xenobiotika na látku, která má více konjugačních míst. Takového procesu se dosahuje odebíráním nebo připojováním funkčních skupin ke struktuře xenobiotika. Na celém procesu se podílejí enzymy, které jsou zodpovědné

za změnu funkčních skupin. Mezi tyto enzymy patří například monooxygenázy, hydroxylázy, dehydrogenázy, nebo epoxidázy.

V případě, kdy jsou látky po průchodu první fází stále málo polární, jsou převedeny do druhé fáze biotransformace. Zde se látky spojují s kyselinou glukoronovou za vzniku glukosidů nebo s kyselinou octovou, glycinem či glutaminem. Ve chvíli, kdy se látka takto naváže, stává se vysoce polární a může být z těla odvedena. Mezi enzymy druhé fáze patří hlavně transferázy, jako například glutathion S-transferáza, sulfotransferáza nebo methyltransferáza.

Samotné vyloučení je zprostředkováno pasivním nebo aktivním transportem. Je to dáno formou, ve které je xenobiotikum z těla vyloučeno. Eliminace hydrofilních xenobiotik nebo jejich metabolitů probíhá v ledvinách a jsou z těla vyloučena močí. Těkavé látky jsou nejčastěji vylučovány dýchacími cestami a xenobiotika metabolizovaná v trávicím traktu jsou z těla odváděna ve výkalech. Stejný způsob eliminace mají i xenobiotika, která byla pozřena, ale nebyla trávicím traktem vstřebána do krve (Croom 2012).

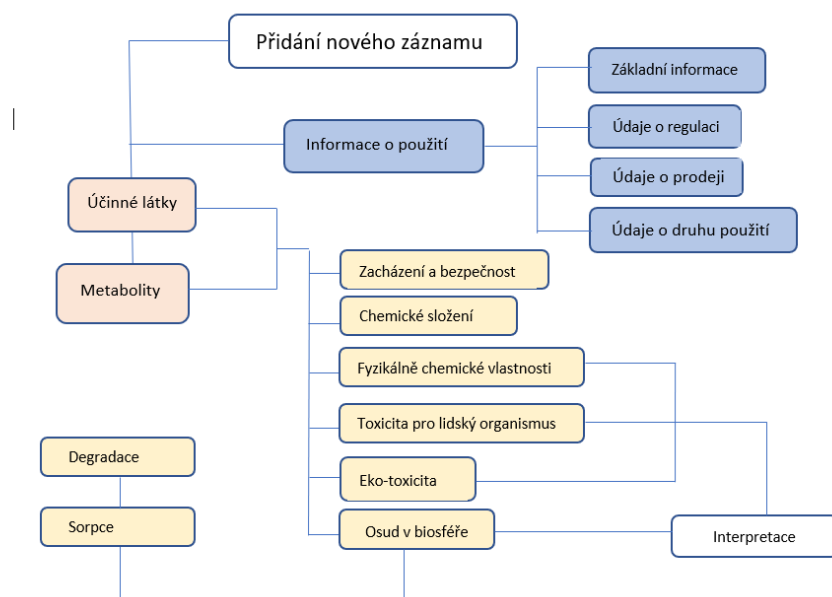
3.2.2 Pesticidy

Podle Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) „Pesticidem se rozumí jakákoliv látka nebo směs látek chemického nebo biologického původu, které jsou určeny k odpuzování, ničení nebo kontrole jakéhokoliv škůdce nebo k regulaci růstu rostlin.“ (“International Code of Conduct on Pesticide Management - Guidance on Pesticide Legislation - Second Edition,” 2020). Role pesticidů v rostlinné produkci je pro zemědělce i spotřebitele nenahraditelná. V zemědělství pomáhají se zvýšením kvality a produkce. Jejich užívání s sebou nicméně nese řadu problémů a rizik. Množství pesticidů použitých v období kolem milénia bylo odhadováno na přibližně 4 miliony tun ročně pro celý svět. Pouze 1% z celkového množství ale splnilo svůj účel (Singh et al. 1999). Celý proces výroby i používání pesticidů je nutné mít pod kontrolou. Pracuje se na vývoji pesticidů, které podléhají rychlé degradaci, nebo jsou v ochraně rostlin vysoce specifické (Harris et al. 2001).

Pesticidy můžeme klasifikovat z hlediska závažnosti dopadů na životní prostředí do několika skupin podle PPDB, tedy The Pesticide Properties DataBase (viz. Obrázek 2). Toto rozdělení je velice flexibilní a okamžitě reaguje na nové poznatky zjištěné v rámci výzkumů hodnocení rizik daných látek. Pro každou látku zahrnutou v této databázi jsou k dispozici také informace o aplikaci, použití, ekotoxikologii, nebo o vlivu na lidské zdraví. Databáze je vhodná pro velkou škálu uživatelů, od zemědělců používajících dané pesticidy, až po konečného spotřebitele, který si zde může vyhledat informace o zdravotních rizicích daného pesticidu. Součástí doprovodných informací je i GUS, tedy Groundwater Ubiquity Score. Tato hodnota je ukazatelem potenciálu vyplavování chemikálie do podzemních vod. Tento parametr je velice důležitý pro určení schopnosti polutantu znečišťovat vodní toky a tím i okolí, kterým podzemní voda protéká (Lewis et al. 2016).

Zemědělství je velice důležitým ekonomickým odvětvím. V rozvojových zemích pracuje v zemědělství stále nezanedbatelná část obyvatelstva. Problémem v těchto lokalitách bývají často špatně nastavené hygienické normy, legislativní limity a postupy práce, které mají za následek vystavení jednotlivců vysokým dávkám pesticidů. Nejvíce zasaženou skupinou jsou pracovníci, kteří s pesticidy manipulují nebo s nimi jinak přichází do styku.

Toxicita těchto látek bývá mnohdy vysoká, a proto se mohou objevit známky akutních i chronický otrav (Tudi et al. 2021).



Obrázek 2: Struktura The Pesticide Properties DataBase (Lewis et al. 2016)

Pro zajištění bezpečnosti spotřebitele jsou stanoveny zákonné limity množství pesticidů, které nesmí být v potravinách překročeny (Zhang 2018). Rezidua pesticidů bývají v rámci legislativních mezí, ale nelze zaručit jejich úplnou absenci. Proto se během procesu zpracování nebo v domácnosti využívá postupů dekontaminace. Příkladem takového postupu je například omytí vodou nebo namáčení do solných roztoků. U všech dekontaminačních technik je hlavním faktorem ovlivňujícím výsledek množství reziduí v době sklizně a typ použitého pesticidu. Ze studií vyplývá, že kontaminaci nelze eliminovat úplně, avšak množství reziduí můžeme výrazně ovlivnit. Na kontaminaci má vliv také druh potravin a environmentální podmínky. Chemicky dochází v průběhu dekontaminace k procesům spojeným s výměnou elektronů jako je oxidace a redukce. Stejně chemické děje jsou využívány i v procesu bioremediace. Může však docházet i k procesům hydrolýzy nebo fotolýzy, tedy štěpným reakcím za přítomnosti vody nebo absorpce světla. Veškeré procesy spojené s degradací pesticidů jsou přísně hlídány a v posklizňových úpravách je vždy postupováno podle standardizovaných pravidel (Bajwa & Sandhu 2014).

Pesticidy jsou levnou a účinnou obranou proti škůdcům, chorobám a plevelům. Existují však i náhradní možnosti, které nezatěžují životního prostředí a lidské zdraví do takové míry. Pozorovatelné výsledky použití alternativních přístupů však budou vyžadovat mnoho let, než pesticidy v zasažených oblastech zcela degradují. Využití alternativních postupů má ale i svá omezení. Tím nejčastějším je sama technologie, která není přizpůsobena globálním podmínkám, a tak je její využívání omezeno na malou oblast, která v celosvětovém měřítku nic nemění. Dalším omezením je velikost zemědělské plochy a klimatické podmínky dané oblasti. Alternativní přístupy jsou spojeny také s reorganizací procesů pěstování. S tím samozřejmě souvisí reorganizace lidských zdrojů. Také financování nových zařízení může být v určitých oblastech velkou překážkou. Reorganizační procesy bývají časově náročné a původní postupy

jsou v mnoha oblastech pevně zakořeněny. I přes výše zmiňované jsou alternativní přístupy k používání pesticidů stále častěji využívány. Takovým postupem je například mechanické hubení plevelu nebo pěstování více plodin na stejné ploše s různými přístupy k hubení škůdců. Tím se stávají jednotlivé plodiny odolnější a celkový výnos z půdy je větší. V opačném případě, kdy je na daném území nepřetržitě pěstována jedna plodina, která je ošetřována jedním druhem pesticidu, se pravděpodobnost rozšíření škůdcem, chorob či plevelů zvyšuje. Rovněž se podporuje vznik rezistence organismů k používaným pesticidům (Meissle et al. 2010).

3.2.2.1 Rozdělení pesticidů a jejich vliv na lidské zdraví

Pesticidy můžeme rozdělit do tří základních skupin. Jsou jimi insekticidy, herbicidy a fungicidy. Dělení je určeno podle druhu cílové skupiny organismů, který daná látka hubí. Insekticidy jsou chemické nebo biologické látky, které hubí hmyz. Herbicidy hubí rostliny, které jsou v místě pěstování nežádoucí, a fungicidy jsou látky zabraňující růstu plísní a jiných houbových chorob (Kumar et al. 2012). Některé druhy pesticidů mohou být pro lidský organismus vysoce toxické a jejich požití, vdechnutí nebo styk s kůží může vyvolat akutní či chronickou toxicitu organismu či alergickou reakci. Míra odpovědi organismu je závislá na době expozice a koncentraci, které je organismus vystaven. Důležitým faktorem je též cesta, kterou se látka do těla dostává. V případě pesticidů jde nejčastěji o orální, inhalační nebo dermální cestu (Sabarwal et al. 2018).

Mezi akutní příznaky otravy pesticidy patří ztráty koordinace, bolest hlavy, závrať, třes, křeče v břiše a s tím související nevolnost, respirační potíže nebo snížená srdeční frekvence. Tyto příznaky se objevují do 24 hodin po jednorázovém styku s pesticidem a dávka, které byl člověk vystaven může být velice vysoká.

Při chronických otravách dlouhodobě dochází k opakovaným expozicím. Koncentrace pesticidu ale nebývá příliš vysoká. Nástup nemoci je pozvolný a může trvat i několik měsíců až let. U chronických otrav může toxicita probíhat dvojnásobem. Pesticid je kumulován v malém množství v organismu, nebo je tkáň poškozována při každém styku s ním. V takovém případě není pesticid v těle zadržován a dochází k jeho okamžité exkreci. Příznaky chronické otravy jsou dezorientace, deprese, zmatenost, bolest hlavy, problémy s řečí nebo nespavost.

Kromě akutních a chronických otrav může pesticid v těle vyvolat také alergickou reakci. Jde o obranný proces, který se projevuje u jedinců senzitivních k dané chemické látce. To je zásadní rozdíl oproti akutním a chronickým otravám, které jsou vyvolány u naprosté většiny exponovaných jedinců. Stejně jako u chronických otrav je pro alergickou reakci nutná opakovaná expozice. Při prvním styku pesticidu s imunitním systémem dochází ke specifické diferenciaci lymfocytů a tvorbě protilátek, které jsou na přítomnost daného pesticidu citlivé. Tomuto procesu se říká senzibilizace. Pouze v případě, kdy se styk s danou látkou opakuje, dochází v těle k uvolnění histaminu a heparinu, který má za následek viditelné projevy alergické reakce. Mezi příznaky při dermální cestě průniku patří podráždění nebo zarudnutí kůže, tvorba puchýřů, a při silných alergických reakcích i otevřených vředů. Při styku s očima a nosem může docházet ke kýchání, svědění nebo výtokům. Mohou se projevit ale i mnohem nebezpečnější alergické reakce jako je astmatický záchvat nebo systémový šok (Kumar et al. 2012).

Prokázáno je také spojení mezi expozicí pesticidům a výskytem rakoviny. Zvýšené riziko a náchylnost je spojována s těhotnými ženami a dětmi. Nelze ale tvrdit, že výskyt rakoviny z pesticidů je výhradně spojen s těmito skupinami obyvatel. Mezi nejčastější typy nádorového onemocnění patří rakovina krve, lymfatických uzlin, mozku nebo prostaty. Dále je neopomenutelným rizikem tvorba chromozomálních aberací, tedy mutací na genové úrovni. Na propuknutí rakovinového bujení má vliv velké množství faktorů. Mezi tyto faktory patří například doba expozice, vlastnosti a koncentrace daného pesticidu, genetická výbava jedince, vliv prostředí nebo rasa (Bassil et al. 2007).

3.2.2.2 Legislativa týkající se pesticidů

V souvislosti s ochranou veřejného zdraví jsou pesticidy jedním z kontrolovaných kritérií potravin a vody určené pro lidskou spotřebu. Legislativa České Republiky je v tomto ohledu plně podřízena legislativě Evropské unie. Ta pro zajištění vysoké úrovně ochrany obyvatelstva stanovila hodnoty maximální hladiny reziduí (MRL) pro pesticidy. Členské státy Evropské unie mají povinnost kontrolovat, zda nebyly tyto limity u výrobků, které se dostávají na jejich trh, překročeny. Dokumentem, který se množstvím pesticidů v potravinách zabývá, je Nařízení č. 396/2005 o maximálních limitech reziduí pesticidů v potravinách a krmivech rostlinného a živočišného původu a na jejich povrchu a o změně směrnice Rady 91/414/EHS. Tento dokument udává základní hodnoty množství pesticidů v potravinách, postupy úředních kontrol a možné sankce. Celkově je MRL udáváno pro více než 1300 pesticidů, které jsou uvedeny v přílohách dokumentu. Základní hodnota MRL je stanovena na 0,01 mg/kg určené potraviny. V případě nového pesticidu, a tedy prvního stanovení MRL se může hodnota lišit. Tato prvotní hodnota je ale pouze dočasná a musí být následně přezkoumána do konkrétní časové lhůty. Za hodnocení MRL pro nové pesticidy a přezkoumání limitů stávajících pesticidů je zodpovědný Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) (European Commission 2005).

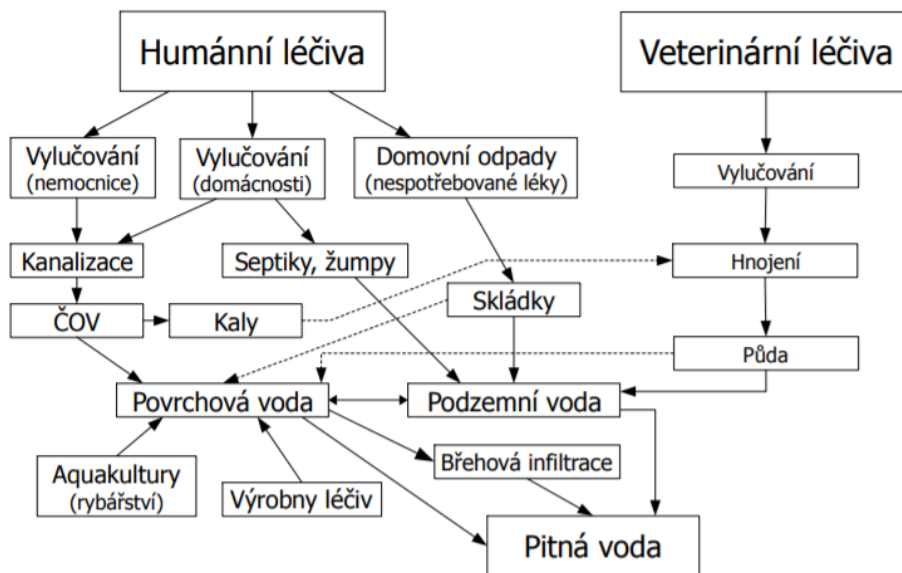
EFSA ze získaných výsledků pak každoročně vytváří zprávu, která udává množství pesticidů v potravinách naměřené v jednotlivých státech. Dále jsou v této zprávě porovnány výsledky jednotlivých členských států a výsledky jednotlivých skupin škodlivých látek. Z těchto výsledků jsou následně vytvořena doporučení a budoucí monitoring, který by měl být členskými státy dodržován, aby byly hladiny pesticidů v potravinách i nadále snižovány (Carrasco Cabrera & Medina Pastor 2021). Pro budoucí monitoring budou v rámci Evropské unie upraveny počty vzorků z jednotlivých členských zemí. Ty by měly být úměrné počtu obyvatel v dané zemi. V této chvíli jsou počty vzorků přidělovány na základě spotřeby potravin a tento údaj je často velice závislý na informacích, které členská země dodá. To může vést ke zkreslení celkových statistik týkajících se dané země (Nutrition 2019).

Pro specifické skupiny obyvatel, jako jsou kojenci a malé děti, jsou hodnoty MRL v potravinách jim určených nastaveny přísněji a jsou pro ně vytvořeny samostatné směrnice. Těmito dokumenty jsou například Směrnice 2006/125/EC o obilných a ostatních příkrmech pro kojení a malé děti a Směrnice 2006/141/EC o počáteční a pokračovací kojenecké výživě a o změně směrnice 1999/21/ES (Carrasco Cabrera & Medina Pastor 2021).

Kromě potravin je v Evropské unii množství pesticidů monitorováno také ve vodě. Tímto problémem se zabývá Směrnice evropského parlamentu a rady 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě. Nejvyšší mezní hodnota množství pesticidů a jejich metabolitů je stanovena na 0,10 µg/l. Samostatně určovány jsou pouze metabolity látek, u kterých se lze domnívat, že jejich vlastnosti a působení na lidský organismus jsou srovnatelné s výchozími látkami. Členské státy Evropské unie musí monitorovat účinné látky v pesticidech, které se ve vodním systému mohou objevit. Každý členský stát má stanoveny své pesticidní látky, které se na jeho území mohou vyskytovat. Kromě stanovení jednotlivých účinných látek a jejich metabolitů je stanovována také hodnota účinných látek celkem. Tato hodnota musí být nižší než 0,50 µg/l. Jedná se o součet hmotností všech účinných látek, reakčních produktů a relevantních metabolitů, které byly zjištěny v předchozím monitoringu separovaně (Owen 2021). Ministerstvo zdravotnictví také pravidelně aktualizuje seznam nerelevantních metabolitů, které se do celkového součtu nezapočítávají. Množství těchto metabolitů tedy může být podle vyhlášky vyšší. Mezní hodnota je pro ně udávána v rozmezí 1 – 6 µg/l (Vyhláška č. 83/2014 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů 2014).

3.2.3 Léčiva

Léčiva jsou v posledních letech velice častým tématem v souvislosti s kontaminací životního prostředí. Vědecká obec mluví o léčivech a nelegálních drogách jako o nové skupině kontaminantů antropogenního původu. Pozitivní vliv léčiv na zdraví člověka je neoddiskutovatelným faktem. Jejich vylučování do okolní biosféry ale vytváří velkou zátěž. Organismy žijící v kontaminovaných oblastech přijímají z tohoto důvodu léčiva ve chvíli, kdy to není medicínsky podloženo a nutné. To vede k nechtěnému působení v daném organismu, a následkem mohou být až zdravotní problémy. Léčiva se mohou do biosféry dostávat v nezměněné formě nebo jako metabolity, které byly vyloučeny z lidského těla. Obě tyto skupiny jsou pro biosféru velkou zátěží. Nacházejí se v povrchových i podzemních vodách a mohou tak kontaminovat široké okolí. Nejčastější cestou, jak se léčiva do vody dostávají bývá jejich přítomnost v komunálních vodách. Při čištění odpadních vod může docházet k odstranění některých léčiv, velká část však ve vodě zůstává. Faktory, které tento proces ovlivňují, bývají fyzikálně-chemické vlastnosti rozpuštěných látek, použitá technologie přečištění, nebo klimatické podmínky jako teplota a množství srážek v oblasti, kde se čistička odpadních vod nachází (Kasprzyk-Hordern et al. 2009). Léčiva při setrvání v biosféře ovlivňují vodní organismy, ale mohou se dostávat zpátky do oběhu i jako součást pitné vody. V důsledku nedokonalého přečištění mají tedy sekundární škodlivý účinek také na člověka (Pal et al. 2013). Některé z možných cest, jak se léčiva dostávají do pitné vody, jsou znázorněny na Obrázku 3. Zde je jasně patrné, že kontaminace vodních systémů léčivy je komplexní problém, ke kterému tak musí být také přistupováno.



Obrázek 3: Možné cesty průchodu léčiv do pitné vody (Heberer 2002)

3.2.3.1 Legislativa týkající se léčiv

Stejně jako pesticidy jsou i léčiva sledovaným kritériem v potravinách. Pro mnoho léčiv zatím žádná legislativa stanovena není, protože se tento problém začal intenzivněji řešit až v poměrně nedávné době. Evropská unie pro tuto oblast vytvořila Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 470/2009 kterým se stanoví postupy Společenství pro vymezení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu, kterým se ruší nařízení Rady (EHS) č. 2377/90 a kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/82/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004. V dokumentu je popsán postup schválení nového léčiva, určení jeho referenční hodnoty MRL, postupy stanovení, provádění kontrol a případné vymáhání sankcí. Každé nové léčivo je zařazeno do skupiny podle farmakologického účinku dané látky. Pro nové léčivo je zjištěn prozatímní maximální limit rezidua, který musí být následně v určené časové lhůtě přezkoumán. V případě, že léčivo bylo úspěšně přezkoumáno, mu je určena trvalá referenční hodnota. Trvalá hodnota MRL není stanovena v případě, že léčivo není pro životní prostředí nebezpečné nebo v případě, že bylo zakázáno léčivo nadále používat. Limitní hodnoty léčiv se na rozdíl od pesticidů mohou zásadně lišit. Je to dáno mechanismem účinku daného léčiva, druhem zvířete a surovinou, ve které jsou rezidua léčiv prokazována. Hodnoty se mohou pohybovat v rozmezí desetin až tisíců mg/kg. Celý proces schvalování a monitoringu léčiv má na starosti Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) (Barroso 2010).

Ve Směrnici evropského parlamentu a rady 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě se uvádí, že by členské země měly kromě pesticidů nově monitorovat také množství relevantních léčiv a jejich metabolitů. Léčiva jsou podle této směrnice novou hrozbou znečištění vod určených k lidské spotřebě. Součástí směrnice je postup, podle kterého by měl každý členský stát posoudit riziko spojené s výskytem daného léčiva, a v případě zvýšeného rizika přijmout nápravná opatření. Místa pro odběry a postupy stanovení jsou jasně definovány. Dále by podle směrnice měl každý členský stát pracovat na zavedení preventivních kroků, aby se omezilo vstřebávání léčiv do vodního prostředí (Owen 2021).

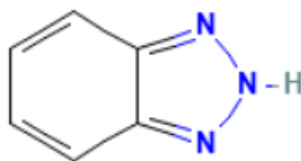
3.3 Organické polutanty použité v experimentu jako donory elektronů

Organické polutanty použité v experimentu mohou sloužit jako donory elektronů pro mikroorganismy během procesu bioremediace. K tomuto ději dochází za přístupu kyslíku, ale může probíhat také ve zcela anoxickém prostředí. Pro některé mikroorganismy je oxidace xenobiotik spojená se vznikem energie a uvolňováním uhlíku. V průběhu zvyšování oxidačního čísla dochází k přenosu elektronů na akceptory. Právě tento přenos vytváří dostupnou energii. Energie vzniklá tokem elektronů, je využívána buňkami mikroorganismů k metabolickým pochodům (Sutherland & Ralph 2019). Široká substrátová specifita některých mikroorganismů umožňuje navázání xenobiotika na enzym. Přítomné xenobiotikum takzvaně „soutěží“ s primárním substrátem o napojení na volné vazebné místo enzymu. Po tomto spojení dochází k oxidaci a transformaci daného xenobiotika (Becker & Seagren 2010). Níže jsou podrobněji popsána jednotlivá xenobiotika, která byla v experimentu použita jako donory elektronů. Mikroorganismy tyto donory využívají během transformačních procesů v rámci bioremediace. V životním prostředí jsou tyto látky přítomny v mikrogramových koncentracích. Pro náš experiment ale budou koncentrace navýšeny, aby byla následně možná detekce.

3.3.1 Benzotriazole

Benzotriazole je heterocyklická dusíkatá sloučenina se sumárním vzorcem $C_6H_5N_3$ a chemickou strukturou vyobrazenou na Obrázku 4. V medicínské praxi je léčivem s antimikrobiální aktivitou. Je využíván hlavně při léčbě plísňových a bakteriálních chorob. Antibakteriální účinek je prokázán pro grampozitivní i pro gramnegativní bakterie. Dále má benzotriazole protizánětlivé a analgetické účinky (Briguglio et al. 2015). Ve vodě je látka dobře rozpustná a velmi nebezpečná. Pro vodní organismy je vysoce toxická. Při dlouhodobém styku může způsobovat podráždění kůže nebo sliznice dýchacích cest (Suma et al. 2011). V zemědělství se benzotriazolové sloučeniny využívají jako aktivátory růstu rostlin. V přípravcích slouží jako doplňková látka, která se podílí na vývoji a růstu rostliny. Ve vysokých koncentracích ale růst naopak inhibuje. Benzotriazole vykazuje také vysokou účinnost v ochraně rostlin proti velké škále bakteriálních a houbových onemocněních (Chang et al. 2017).

V důsledku své chemické struktury je benzotriazole velice dobře degradován v prostředí s přísávkem dusičnanů nebo železa. Během degradace může docházet nejdříve k odstěpení vodíku z triazolové skupiny a následné metylaci nebo dimethylaci zbytku sloučeniny. V prostředí s dusičnany může u benzotriazolu docházet také k polymeraci jednotlivých molekul (Liu et al. 2011).

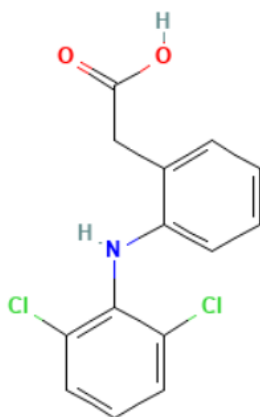


Obrázek 4: Chemická struktura benzotriazolu (National Center for Biotechnology Information 2022)

3.3.2 Diklofenak

Diklofenak je derivátem kyseliny benzoové se sumárním vzorcem $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$. Jeho struktura je znázorněna na Obrázku 5. Patří mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID) a má též analgetický a antipyretický účinek. Během užívání se může objevit nežádoucí vliv na gastrointestinální trakt. Ten může vznikat i při dodržení dávkování (Salem-Milani et al. 2013). Množství v životním prostředí je velmi vysoké, což je dáno častým užíváním a velmi dobrou rozpustností ve vodě. Diklofenak je častým léčivem i ve veterinární péči. Živočišné produkty z léčených zvířat mohou být konzumovány až po uplynutí ochranné lhůty. V případě otravy diklofenakem dochází k akutnímu selhání ledvin a následně ke smrti jedince (Bonfille et al. 2018).

Degradace diklofenaku bez přístupu kyslíku by měla podle dostupné literatury dobře probíhat v prostředí s obsahem síranů a železa. Diklofenak bude nejdříve degradován na nitronový radikál a poté na chinonimin. Následná degradace zahrnuje kaskádu dalších chemických procesů, mezi které patří dekarboxylace, hydroxylace a mineralizace. Diklofenak na začátku své degradace odštěpuje jeden elektron a vzniká výše zmíněný radikál. Tento elektron je poskytnut prostředí obsahující sírany a toto prostředí je jeho akceptorem (Mahdi et al. 2012).

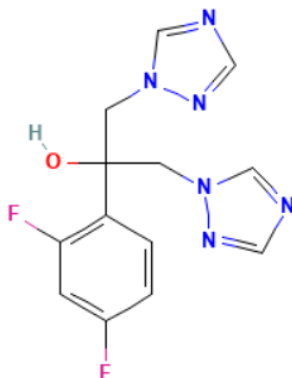


Obrázek 5: Chemická struktura diklofenaku (National Center for Biotechnology Information 2022)

3.3.3 Flukonazol

Flukonazol patří mezi azolová antimykotická léčiva. Jeho sumární vzorec je $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ a jeho struktura je znázorněna na Obrázku 6. V praxi je využíván pro léčbu kandidóz, tedy kvasinkových infekcí, které jsou způsobené rodem *Candida* (Reboli et al. 2007). Flukonazol působí jako inhibitor syntézy ergosterolu. Ergosterol je součástí buněčné membrány a inhibice jeho syntézy je pro mikroorganismy smrtelná. Flukonazol má fungistatický účinek. Existuje zde však možnost získané rezistence na toto léčivo (Berkow & Lockhart 2017). Flukonazol je kromě lékařství využíván i v zemědělství, kde je součástí fungicidů. Také v zemědělství je ale velice běžná rezistence, takže je většinou používán ve směsi s dalšími pesticidy, jejichž účinek je založen na jiném principu (Doke et al. 2014).

Podle dostupné literatury je flukonazol modelová látka, která by měla dobře degradovat v prostředí obsahující oxidy kovů, tedy také oxidy železa a manganu. V přítomnosti těchto akceptorů elektronu budou nejprve odštěpeny dvě triazolové skupiny a v následných krocích degradace také vznikající difluorbenzen. Kromě železa a manganu je možné, jako vhodný akceptor elektronů při biodegradaci, použít také měď (Zhang et al. 2021)

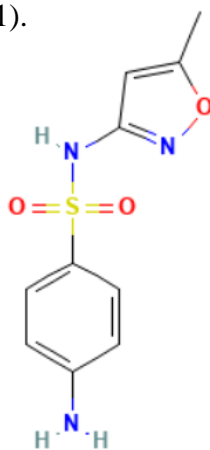


Obrázek 6: Chemická struktura flukonazolu (National Center for Biotechnology Information 2022)

3.3.4 Sulfamethoxazol

Sulfametoxazol je léčivo patřící mezi sulfonamidová antibiotika se sumárním vzorcem $C_{10}H_{11}N_3O_3S$. Účinek tohoto léku je založen na inhibici syntézy kyseliny listové u patogenních bakterií. Zásadní účinek má při léčbě infekcí vyvolaných aerobními bakteriemi. Rezistence mikroorganismů je však pro toto antibiotikum vysoká, proto je často podáváno ve dvojici s antibiotikem s jiným mechanismem účinku. Nežádoucí vlivy bývají pozorovány zřídka (Masters et al. 2003). Sulfamethoxazolem jsou léčeny převážně infekce močových a dýchacích cest. Jeho účinek je využíván i při infekcích trávicího traktu. Antibiotikum je předepisováno i ve veterinárním lékařství proti stejným zdravotním obtížím u zvířat (Dantas et al. 2008).

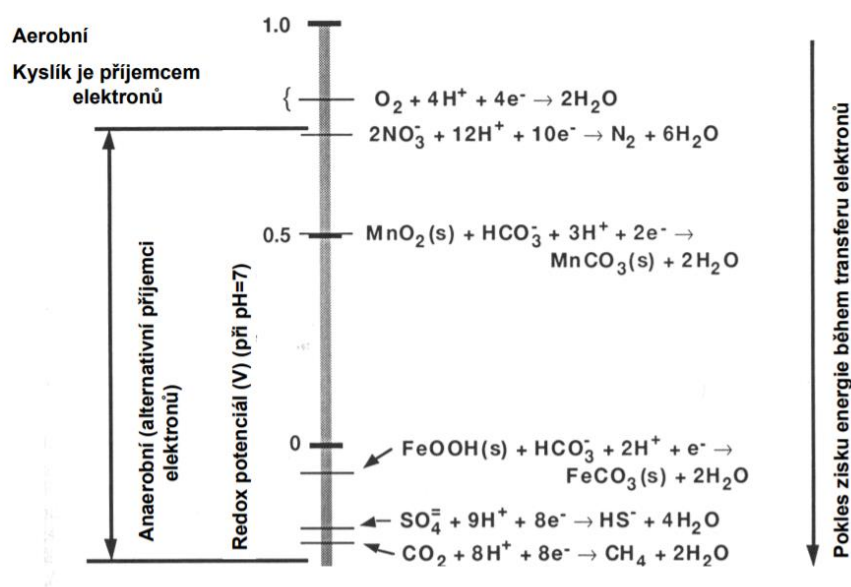
Podle předpokladů a literárních zdrojů by k nejrychlejší degradaci této modelové látky mělo docházet v prostředí s přísadkou goethitu. Tento minerál bude vytvářet prostředí s železitými ionty, které budou vhodnými akceptory. Sulfamethoxazole obsahuje ve své molekule izoxazolový kruh jehož součástí je skupina NO, jak je znázorněno na Obrázku 7. Jako celek sloučenina velice ochotně degraduje v souvislosti se změnou oxidačního čísla železa v okolním prostředí (Mohatt et al. 2011).



Obrázek 7: Chemická struktura sulfamethoxazolu (National Center for Biotechnology Information 2022)

3.4 Akceptory elektronů použité v experimentu

V experimentu byly použity jako akceptory elektronů anorganické látky, které jsou nejčastěji využívány mikroorganismy v případě, kdy biodegradace probíhá bez přístupu kyslíku. Tyto látky jsou schopné přijmou volný elektron z okolí a stávají se tak terminálním akceptorem uvolněného elektronu. Po přijetí elektronu u těchto látek dochází k redukci, a tedy ke snižování oxidačního čísla. Přijetím volného elektronu dochází ke katabolickému ději, který se nazývá disimilace. Při tomto ději mimo jiné vzniká energie, která je nutná pro metabolické a další procesy uvnitř buněk mikroorganismů. V anaerobním prostředí je energetická výtěžnost méně výhodná než v případě, že k redoxním reakcím dochází za přístupu kyslíku. Vzniklá energie je dostačující pro správné fungování buněk mikroorganismů, které tento princip vzniku energie využívají. Za určitých okolností ale vzniklá energie nestačí na růst a rozvoj kolonií a v takovém případě dochází při vyčerpání daných organismů k úhynu (Schmidt et al. 2017). Na schématu níže jsou znázorněny oxidačně redukční reakce jednotlivých alternativních akceptorů elektronů ku kyslíku. Dále je z Obrázku 8 jasně patné, jaké akceptory elektronů jsou během transferu elektronů výhodnější pro získání většího množství energie, která může být mikroorganismy využita.



Obrázek 8: Schéma znázorňující oblasti účinnosti alternativní akceptory elektronů a jejich porovnání z hlediska zisku energie (Norris et al. 2017)

3.4.1 Dusík

Určité druhy mikroorganismů využívají dusík jako terminální akceptor elektronů. Nejčastěji bývá ze sloučenin dusíku využívány dusičnany. Na membránách těchto organismů je navázán enzym nitrátreduktasa, která umožňuje příjem energie a následný růst organismu v přítomnosti dusičnanů v anaerobním prostředí (Nishimura et al. 2007). Jako navazující proces k redukci dusičnanů může být připojena přeměna dusičnanů na dusitany. Jsou popsány dvě skupiny mikroorganismů, které dusičnany a dusitany využívají jako terminální akceptory elektronů. První skupina mikroorganismů dokáže pro vznik energie použít obě tyto látky.

Ta druhá je vázaná pouze na přítomnost dusitanů. Případné dusičnany v prostředí nejsou schopné tyto mikroorganismy nijak využít (Guisasola et al. 2009). Proces, kdy je terminálním akceptorem elektronu dusičnan, se nazývá denitrifikace. Dochází k přeměně dusičnanů na elementární dusík. Tato přeměna velice často probíhá přes meziprodukty, kterými bývají dusitany, oxid dusnatý a oxid dusný (Algar & Vallino 2014).

3.4.2 Síra

Síra je dalším prvkem, který může být využit jako akceptor elektronu v případě, že se mikroorganismy nacházejí v prostředí bez kyslíku. Mikroorganismy využívající k získání energie síru jsou striktně anaerobní. Nejčastěji bývá sloučeninou využitou jako akceptor síran, siřičitan, thiosíran nebo elementární síra. Tyto sloučeniny jsou redukovány na sulfan nebo sulfidy (Tebo & Obratsova 1998). Jedním z membránových enzymů, který tento proces redukce zajišťuje je sulfitreduktáza. Enzymů, které se na desulfurikaci podílejí je ale celá řada. Je to dáno velkým množstvím sloučenin s různými oxidačními čísly, ve kterých se síra může v prostředí objevovat (Steuber & Kroneck 1998). Během procesu desulfurikace vzniká energie, která je mikroorganismy dále využívána. Alternativně jsou schopné mikroorganismy redukovat síru využít jako zdroj energie také oxid uhličitý, tato reakce je ale z pohledu termodynamiky nevýhodná (Venkata Mohan et al. 2013).

3.4.3 Železo

Železo je jedním z kovových prvků, které se stejně jako síra nebo dusík mohou účastnit biodegradačních procesů jako akceptor elektronů. Nejčastěji se železo, schopné pohltit elektron, nachází v oxidačním stavu +3, tedy jako železitý kation ve sloučenině s oxidem. Po redukci, při které vzniká energie dostupná mikroorganismům, je železitý kation přeměněn na železnatý kation. V tomto oxidačním stavu se může akumulovat a vzniká magnetit nebo siderit. V anaerobním prostředí jsou mikroorganismy redukovat železo často také ty, které redukovat síru v anaerobním prostředí. Existuje tedy úzká vazba mezi mikrobiálními metabolizmy a přítomností těchto dvou prvků (Lovley et al. 1993). Kromě síry je redukci železa možné spojit s vyšším výskytem dusíku. U některých druhů hub je pomocným enzymem, který se účastní redukce železa, nitrátoreduktasa. Stejný enzym, který je hlavním redukčním enzymem dusičnanů na dusitany a další dusíkaté sloučeniny (Ottow & von Klopotek 1969).

Sloučeninou železa použitou v experimentu jako akceptor elektronu byl goethit. Jedná se o půdní minerál, který bývá velice častou složkou rud a sedimentu. Chemicky je goethit alfa oxid-hydroxid železitý, tedy látka se sumárním vzorcem $\alpha\text{-FeOOH}$ (Liu et al. 2014).

3.4.4 Mangan

Dalším příkladem kovového prvku, který je vhodný jako akceptor elektronů v anaerobním prostředí je mangan. Vhodnou formou jsou sloučeniny s kyslíkem, kde se mangan nachází ve čtyřmocném oxidačním stavu. Případnou redukci se jeho oxidační stav mění na dvojmocnou nebo trojmocnou formu. Redukce manganu může probíhat jak za anaerobních, tak aerobních podmínek. Není ale snadné jednotlivé mikroorganismy redukovat mangan striktně rozdělit na základě těchto dvou skupin. Stejně jako u železa je i u manganu jeho přeměna spojena s přeměnou organické hmoty a tudíž uhlíku. Mechanismy redukce jsou u obou

druhů mikroorganismů velice podobné. Určité druhy dokonce dokáží využít jako akceptor elektronu oba prvky, tedy mangan i železo (Myers & Nealson 1988). Redukce manganu často končí jeho vysrážením a následnou tvorbou rodochrozitu, tedy uhličitanu manganatého. Snížení oxidačního čísla může probíhat dvěma způsoby. Může docházet ke dvěma jedoelektronovým přenosům, nebo k jednomu dvouelektronovému přenosu. Tento jev je závislý na použitém redukčním činidle a na meziproduktech vzniklých redukcí (Luther 2005).

Pro experiment byl jako akceptor elektronu využit birnesit. Chemicky se jedná o hydratovaný oxid manganičitý, tedy látku se sumárním vzorcem $MnO_2 \cdot nH_2O$. V půdách, horninách a sedimentech je tato krystalická látka hlavním manganovým minerálem (Post & Veblen 1990).

3.5 Tranzitní zóna

Tranzitní zóna je místem, kde může probíhat bioremediace polutantů jako jsou pesticidy nebo léčiva. Tento pojem má mnoho významů, v souvislosti s bioremediací je ale stěžejní vysvětlení jako přechodová oblast uvnitř vodního ekosystému, kde se nachází rozhraní mezi vodním sloupcem a sedimentem. V tomto místě dochází ke střetu oxického a anoxického prostředí. Jako prostředí obsahující kyslík je zde brána voda, sediment je pak vnímán jako prostředí bez obsahu kyslíku, i když svrchní vrstva sedimentu je ještě prosycena kyslíkem. Sedimentové rozhraní není striktně odděleno a hloubka této prosycené okysličené vrstvy závisí mimo jiné na složení sedimentu a jeho hrubosti. Zvláště pak hrubost sedimentu je podmíněna přítomností proudění vody a činností živočichů. V případě, že jsou tyto faktory přítomny, se hrubost sedimentu snižuje a tím je ovlivněn průchod kyslíku do jeho spodnějších vrstev. Dalším faktorem, který ovlivňuje okysličení sedimentu je hloubka, ve které se sediment nachází. Kyslík se do povrchových vrstev sedimentu dostává molekulární difuzí. V případě sedimentu, který je ve velkých hloubkách, je průchod kyslíku větší a okysličení proniká i několik centimetrů do vrstvy sedimentu. Naopak u sedimentu jezer nebo vodních ploch s malým vodním sloupce kyslík prochází pouze do milimetrových vrstev. Je to dáno počtem mikroorganismů, které se ve svrchních vrstvách sedimentu množí a spotřebovávají kyslík ke svým životním funkcím. Mikroorganismy v místech, kde je vodní sloupec menší, mají mimo kyslíku také lepší přístup ke slunečnímu záření. Aktivita mikroorganismů je tedy větší než u těch, které přístup ke zdroji záření nemají.

Množství kyslíku ovlivňuje rozmanitost přítomných mikroorganismů. Podle nasycení vrstev sedimentu kyslíkem jsou tyto vrstvy osidlovány různými druhy mikroorganismů, u kterých je závislost na kyslíku rozdílná. Tranzitní zóna je neustále se rozvíjejícím dynamickým ekosystémem, kde není nikdy ustálena rovnováha, a množství a pestrost mikroorganismů se neustále mění. Mikroorganismy se ve vrstvách pohybují, zanikají a mohou se zrodit i nové druhy. Studie ukazují, že na okrajích tranzitní zóny mohou být v případě rozhraní vody a sedimentu přítomny i anaerobní mikroorganismy. Jejich počty jsou však pochopitelně nižší než u aerobních mikroorganismů. Stejně druhy mikroorganismů odebrané z tranzitních zón v malých a velkých hloubkách jsou též rozdílné. U anaerobních mikroorganismů z menších hloubek je adaptace na kyslík výrazně lepší, než u stejných mikroorganismů odebraných ve větších hloubkách (Brune et al. 2000).

3.5.1 Mangan-redukující mikroorganismy

Mangan je esenciální stopový prvek, který se účastní mnoha enzymatických reakcí. Často je spojován s reakcemi, kterých se účastní i kyslík, jako je například fotosyntéza. Mikroorganismy jsou schopné tento prvek v redoxních reakcích oxidovat a také redukovat. Jsou tedy nedílnou součástí jeho cirkulace v biosféře. Mangan se v přírodě nejčastěji objevuje ve formě oxidů manganu jako oxid manganičitý (Gounot 1994).

Využití manganu jako akceptoru elektronů je součástí disimilačních procesů v mikroorganismech. Jedná se o vícestupňový proces, při kterém je makromolekulární organická látka přeměněna na jednodušší nízkomolekulární organickou nebo anorganickou látku. Při tomto kaskádovém ději dochází k uvolňování energie, která je následně dostupná pro mikroorganismy. Metabolickou redukcí manganu jsou schopné provádět dvě skupiny mikroorganismů. První skupinou jsou fermentační bakterie, které metabolizují oxidovaný mangan. Tato skupina se však na celkové redukcí manganu podílí maximálně z 5 %. Zbytek redukce je zajištěn pomocí respiračních organismů, které částečně nebo úplně oxidují mangan jako akceptor elektronů. Mezi fermentující bakterie, které dokáží redukovat mangan, řadíme například některé druhy rodu *Bacillus*. U určitých druhů tohoto rodu bylo zjištěno, že mohou mangan v redoxních reakcích jak redukovat, tak oxidovat (Cerrato et al. 2010). Skupina respiračních organismů využívajících mangan jako akceptor elektronů zahrnuje například bakterie *Shewanella putrefaciens* a *Geobacter metallireducens* (Thamdrup 2000).

Mezi mangan-redukující organismy patří převážně bakterie, avšak tuto schopnost mohou mít také houby nebo plísně. Organismy účastnící se na redoxních reakcích manganu mohou být ve vztahu ke kyslíku vysoce aerobní, ale i striktně anaerobní. Mangan-redukující mikroorganismy jsou v přírodě mnohem častější než mikroorganismy, které mangan oxidují. Dále je u těchto organismů často spojená redukce manganu s redukcí železa. Mechanismy redoxních reakcí mohou být pro mangan a pro železo stejné, ale mohou se také významně lišit. Redukce manganu je spojena s poklesem pH (Gounot 1994).

Mikroorganismy schopné redukovat mangan musí být na tuto redukcí vhodně vybaveny. V sedimentu se nacházejí většinou ve spodnějších částech tranzitní zóny a lze tedy předpokládat, že většinou půjde o redukcí bez přístupu kyslíku. Mikroorganismy redukující mangan musí být vybaveny specifickým extracelulárním aparátem, který jim umožní kontakt a následnou manipulaci se sloučeninou manganu. Těchto dějů je většinou dosahováno za pomoci enzymů (Nealson & Myers 1992). Organismus má k dispozici specializované enzymatické dráhy, které jsou indukované. Množství enzymů tedy závisí na fyziologických podmínkách uvnitř buňky. V případě, že jsou extracelulární i intracelulární podmínky pro organismus příznivé, jsou enzymy produkovány a mikroorganismus je schopný redukce manganu. Podmínkami ovlivňujícími produkci enzymu mohou být faktory jako dostatek živin, energie, nebo příznivé teplotní a světelné podmínky. Kromě enzymů se na redukcí manganu uvnitř buňky podílejí také metaloproteiny nebo flavoproteiny. Vně buněk je proces redukce podpořen cytochromem C (Ehrlich 1987). Extracelulární cytochrom C funguje jako zprostředkovatel přenosu elektronů mezi buňkou a manganem. Může být buď pevně navázán na vnější membránu buňky, nebo může být buňkou vylučován a fungovat jako nosič i na delší vzdálenosti. V prostředí buňky cytochrom C vychytá volné elektrony vzniklé oxidací xenobiotika a následně je odevzdá manganu. Redukcí a změnou oxidačního čísla na manganu

vzniká energie, která je následně buňkou přijata. Tato energie je nejčastěji využita k růstu a dýchacím procesům uvnitř buňky (Thamdrup 2000).

Důležitou roli v disimilačních procesech hraje glukóza, která je uvnitř buněk využívána jako zdroj energie potřebný pro uskutečnění redoxních reakcí. Její spotřeba při redukci manganu je 1,5x větší než v období, kdy organismus mangan neredukuje. Glykolýzou v průběhu redukce manganu pak vzniká 4x více pyruvátu a 1,5x více laktátu než v období, kdy k redukci nedochází. Co se týče potřebné energie, je redukce manganu vysoce energeticky náročný děj (Ehrlich 1987).

Mangan-redukující mikroorganismy mohou být velice užitečné při biodegradacích antropogenních xenobiotik. V naprosté většině případů je ale nutné zajistit anaerobní prostředí, jinak k rozkladům za pomoci redukce manganu nedochází. V ojedinělých případech, kdy k degradaci v aerobním prostředí dochází, je výtěžnost těchto reakcí prakticky zanedbatelná. Naopak biodegradace bez přístupu kyslíku se již využívá v experimentálních čistíčkách odpadních vod. Globálně však tato metoda využívaná není a pro odstranění xenobiotik jsou používány membránové filtrace nebo adsorpce na aktivní uhlí. Důvodem jsou stále ještě nedostatečně prozkoumané metabolické procesy a vliv vzniklých metabolitů. U určitých xenobiotik mohou být produkty biotransformace toxicitější než látka, která do vodního prostředí pronikla. Tato problematika byla již detailně popsána výše. Určité toxické metabolity mohou díky své chemické struktuře nebo vysokým koncentracím dokonce usmrtit mikroorganismy podílející se na biodegradaci. Některé metabolity nejsou pro mikroorganismy toxické, ale pro člověka již ano. Rozklad na tyto látky je tedy ze zřejmých důvodů neakceptovatelný (Chander et al. 2015).

4 Metodika

Nádobový experiment je využívanou metodou v případě, že chceme stanovovat vliv látek na určitý organismus. Touto metodou je možné odhalit například metabolické produkty organismů, nebo látky vznikající degradací. V případě našeho experimentu byla pozorovaná degradace spojena s přítomností mangan-redukujících mikroorganismů. Zdrojem energie byly čtyři vybrané organické polutanty benzotriazole, diklofenak, fluconazol a sulfamethoxazol.

Celý experiment byl prováděn v prostředích s obsahem sloučenin manganu, železa, dusíku a síry. Pro navození prostředí obsahující mangan byl použit goethit. Pro porovnání účinku byly stejné organické polutanty degradovány také v prostředí s obsahem železa. Tohoto prostředí bylo dosaženo přidávkem birnesitu. Dále pak prostředí obsahující dusičnany s přidávkem dusičnanu draselného. Pro prostředí s obsahem síranů byl použit heptahydrát síranu hořečnatého.

Během celého pokusu byly ve všech prostředích měřeno pH, úbytek organických polutantů, celkový uhlík, množství aniontů a množství rozpustných kovů.

4.1 Založení experimentu

Celý experiment byl rozdělen do pěti nezávislých skupin, podle daného akceptoru elektronu. V každé skupině bylo zahrnuto 15 nádob, jak je zobrazeno v Tabulce 3. V jedné skupině akceptorů bylo pak rozdělení následující - šest dvojic pro měření pH, celkového uhlíku, množství aniontů a rozpustných kovů. Měření těchto parametrů bylo tedy možné provést v šesti časových intervalech. Dále byla součástí jedné sady nádoba na měření organických polutantů. Ta byla měřena nezávisle na ostatních parametrech. Poslední byly dvě nádoby s abiotickým sedimentem, které sloužily jako kontrola celého experimentu. Toto uspořádání je znázorněno na Obrázku 9.

Biotický sediment, modelová povrchová voda a abiotický sediment obohacený o azid sodný byly před začátkem experimentu naterperovány na teplotu 20 °C. Jako modelová povrchová voda byla použita voda z mokřadu. Tento mokřad slouží jako zdroj pro čištění dešťové vody. Abiotický sediment byl obohacen o azid sodný, který v tomto případě sloužil jako chemický inhibitor růstu mikroorganismů.

Do odměrných baněk bylo naváženo 50 mg každého polutantu, které bylo následně důkladně rozmícháno v 500 ml modelové povrchové vody. Poté byly všechny organické polutanty v roztoku převedena do odměrné baňky s objemem 5 l. Bylo přidáno 13,6 g octanu sodného a odměrná baňka byla dolita na požadovaný objem. Octan sodný v počáteční fázi experimentu napomáhal mikroorganismům s revitalizací a slouží jako zdroj uhlíku. Pomocí pH- metru bylo změřeno pH, které bylo v našem případě stanoveno na hodnotu 7,2. Toto pH bylo ideální pro další postup práce a zásobní roztok tedy již nemusel být dále upravován.

Zásobní roztok byl rozlít do 5 odměrných baněk o objemu 1 l, kdy každá byl zástupcem jednoho akceptoru elektronu (dle Tabulky 2).

Tabulka 2: Navážené množství sloučenin pro jednotlivé akceptory elektronů

Roztoky akceptorů elektronu	Množství přidávaných sloučenin v 1 l zásobního roztoku
1. bez akceptorů	/ - pouze roztok octanu sodného
2. NO ₃ ⁻	0,8 g KNO ₃
3. Goethit (FeOx)	/ - pouze roztok octanu sodného
4. Birnesit (MnOx)	/ - pouze roztok octanu sodného
5. SO ₄ ²⁻	4,93g MgSO ₄ . 7H ₂ O

Tabulka 3: Celkové schéma experimentu

Obsahovaný akceptor	Typ sedimentu		Funkce dané nádoby
1. skupina bez akceptoru	<i>Biotický sediment</i>		
	1.1 A	1.1 B	Dvě opakování šesti odběrových intervalů
	1.2 A	1.2 B	
	1.3 A	1.3 B	
	1.4 A	1.4 B	
	1.5 A	1.5 B	
	1.6 A	1.6 B	
	1 int		Nádoba pro určení intervalu odběru
	<i>Abiotický sediment</i>		
1 CTRL A	1 CTRL B	Abiotická kontrola	
2. skupina NO ₃ ⁻	<i>Biotický sediment</i>		
	2.1 A	2.1 B	Dvě opakování šesti odběrových intervalů
	2.2 A	2.2 B	
	2.3 A	2.3 B	
	2.4 A	2.4 B	
	2.5 A	2.5 B	
	2.6 A	2.6 B	
	2 int		Nádoba pro určení intervalu odběru
	<i>Abiotický sediment</i>		
2 CTRL A	2 CTRL B	Abiotická kontrola	
3. skupina FeOx	<i>Biotický sediment</i>		
	3.1 A	3.1 B	Dvě opakování šesti odběrových intervalů
	3.2 A	3.2 B	
	3.3 A	3.3 B	
	3.4 A	3.4 B	
	3.5 A	3.5 B	
	3.6 A	3.6 B	
	3 int		Nádoba pro určení intervalu odběru
	<i>Abiotický sediment</i>		
3 CTRL A	3 CTRL B	Abiotická kontrola	

Tabulka 3: Pokračování celkového schématu experimentu

4. skupina MnOx	<i>Biotický sediment</i>		Dvě opakování šesti odběrových intervalů
	4.1 A	4.1 B	
	4.2 A	4.2 B	
	4.3 A	4.3 B	
	4.4 A	4.4 B	
	4.5 A	4.5 B	
	4.6 A	4.6 B	
	4 int		Nádoba pro určení intervalu odběru
	<i>Abiotický sediment</i>		
4 CTRL A	4 CTRL B	Abiotická kontrola	
5. skupina SO ₄ ²⁻	<i>Biotický sediment</i>		Dvě opakování šesti odběrových intervalů
	5.1 A	5.1 B	
	5.2 A	5.2 B	
	5.3 A	5.3 B	
	5.4 A	5.4 B	
	5.5 A	5.5 B	
	5.6 A	5.6 B	
	5 int		Nádoba pro určení intervalu odběru
	<i>Abiotický sediment</i>		
5 CTRL A	5 CTRL B	Abiotická kontrola	



Abiotická kontrola

Dvě opakování šesti odběrových intervalů biotické kontroly

Nádoba pro měření množství polutantů

Obrázek 9: Schéma rozložení nádob ve skupině (vlastní foto)

4.1.1 Příprava nádob s biotickým sedimentem

Biotický sediment byl zbaven vody pomocí filtru. Následně bylo odměřeno vždy 20 ml sedimentu a ten byl kvantitativně převeden do uzavíratelné nádoby. Takto bylo připraveno celkem 13 uzavíratelných nádob s pryžovou zátkou z jedné sady experimentu.

V případě skupiny s goethitem byl k sedimentu navážen na analytických vahách 0,1 g této látky. Ten byl poté kvantitativně převeden do nádoby pomocí 10ml roztoku octanu sodného v automatické pipetě. Stejným postupem byla připravena také skupina s birnesitem.

Všechny nádoby byly následně dolity na celkový objem 60 ml. V případě 1., 2. a 5. skupiny byl do nádob k sedimentu přidáván pomocí odměrného válce objem 60ml příslušného roztoku akceptoru. V případě 3. a 4. skupiny bylo přidáváno pouze 50 ml, protože 10 ml bylo použito na kvantitativní převedení pevných látek do nádob.

Po uzavření byly nádoby prosyceny argonem. Ten vytvořil uvnitř anoxické prostředí pro navození požadovaných podmínek pro degradaci.

4.1.2 Příprava nádob s abiotickým sedimentem

Abiotický sediment byl přefiltrován a zbaven přebytečné vody. Z důvodu přítomnosti azidu sodného jako inhibitoru bylo při přípravě sedimentu nutné vyvarovat se použití kovových nástrojů. Ty mohly inhibiční účinek snížit. Navážený sediment byl kvantitativně převeden do 2 uzavíratelných nádob. Stejně jako v případě biotického sedimentu byl do nádob pro skupinu 3 a 4 naváženo 0,1 g goethitu nebo birnesitu.

Do zbylého objemu zásobních roztoků s octanem sodným a v případě skupin 2 a 4 také s akceptory elektronů bylo přidáno 100 mg azidu sodného. Roztok byl pečlivě promíchán a následně bylo pomocí odměrného válce odměřeno 60 ml tohoto roztoku a přidáno do nádob.

Po uzavření byly nádoby stejným způsobem prosyceny argonem, aby byly podmínky degradace v biotickém i abiotickém prostředí stejné.

4.2 Měření parametrů

Z otevřených nádob označených daným intervalem bylo pomocí injekční stříkačky odebráno 2,5 ml vzorku modelové povrchové vody. Následně byl na injekční stříkačku nasazen stříkačkový filtr PVDF 0,2 μ m a 1 ml z celkového odsátého objemu byl přes tento filtr přefiltrován do vialky. Tento objem byl určen pro měření koncentrace organických polutantů. Zbylý objem, tedy 1,5 ml byl přefiltrován přes tentýž filtr do Eppendorf zkumavky a byl ponechán v termostatu pro případ, že by bylo nutné analýzu zopakovat.

Dále bylo z nádoby odebráno 45 ml vzorku modelové vody z mokřadu do injekční stříkačky. Tento objem byl přefiltrován přes filtr Millipore Millex-GP PES 0,22 μ m do kónické zkumavky Falcon o objemu 50 ml. Z tohoto objemu byly připraveny a nařaděny vzorky pro měření celkového uhlíku, pro měření přítomnosti aniontů a rozpustných kovů. Pro jeden měřený interval bylo připraveno 12 odměrných baněk o objemu 50 ml. A podle kalibračních křivek, jejichž rozsahy jsou znázorněny v Tabulce 4, byly namíchány roztoky pro jednotlivá měření.

Tabulka 4: Tabulka rozsahu kalibračních křivek pro tvorbu roztoků

Akceptor elektronu	Rozsah (mg/l)	TOC = TC-TI
TC	1-100	
IC	1-100	
NO ₃ ⁻	0,1-50	
SO ₄ ²⁻	01-50	

Pro ředění 1:10 bylo do odměrné baňky o objemu 50 ml napipetováno 5 ml vzorku z kónické zkumavky Falcon a objem byl dolit deionizovanou vodou po risku. Pro ředění 1:50 byl do odměrné baňky stejného objemu napipetován 1 ml vzorku a opět byl objem dolit po risku deionizovanou vodou.

Dále bylo připraveno 10 skleněných zkumavek pro měření celkového uhlíku (TC), 10 plastových zkumavek pro měření aniontů a 10 kónických plastových zkumavek o objemu 15 ml s víčkem.

Z připravených roztoků byl odebrán do skleněných zkumavek objem, který sahal cca 1 cm pod okraj zkumavky. Stejný postup byl zopakován u plastových zkumavek pro analýzu aniontů. Do zkumavek pro měření rozpustných kovů bylo přesně napipetováno 10 ml roztoku a následně 0,25 ml kyseliny dusičné. Kyselina dusičná v tomto případě měla zabránit srážení kovů. Zbylých 10 ml vzorku bylo ponecháno v nádobě a pomocí pH metru bylo změřeno pH.

4.2.1 Měření koncentrace organických xenobiotik

Koncentrace degradujících polutantů byla měřena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na analyzátoru Ultimate 3000. Autosamplerem bylo odebráno 20 µl vzorku přefiltrované modelové povrchové vody do duté jehly. Pomocí hydraulických pump byl vzorek smísen s mobilní fází a nastříknut na předkolonu, která je kompatibilní s hlavní kolonou. Hlavní kapalinová separační kolona Hypersil™ Gold obsahuje reverzní stacionární fází C18. Jde o kolonu s rozměry 250 mm × 4,6 mm a velikostí pórů 5 µm. Během separace byla kolonová komora udržována na teplotě 30°C. Mobilní fáze byla tvořena octanem amonným ve vodě o koncentraci 10mM s upraveným pH na 5,6 kyselinou octovou (fáze A) a acetonitrilem (fáze B). Po průchodu kolonou byl separovaný vzorek pouštěn na UV detektor, kde byl zaznamenán retenční čas jednotlivých organických xenobiotik. Příslušné retenční časy, vlnové délky a meze detekce a stanovitelnosti jsou zaznamenány v Tabulce 5.

Pro celou separaci byl zvolen gradientový program:

0-1 min.	2% fáze B a 98% fáze A
33-35 min.	98% fáze B a 2% fáze A
40-45 min.	2% fáze B a 98% fáze A
Průtoková rychlost	1ml/min

Tabulka 5: Tabulka parametrů jednotlivých organických xenobiotik pro HPLC analýzu

Název organického xenobiotika	Retenční čas (min)	Vlnová délka (nm)	Mez detekce/stanovitelnosti
benzotriazol	12,4	260	0,01/0,05
flukonazol	13,7	260	0,1/0,5
sulfamethoxazol	14,2	275	0,01/0,05
diklofenak	19,7	275	0,005/0,01

4.2.2 Měření organického uhlíku (TOC)

Množství organického uhlíku bylo v našem případě měřeno pomocí analyzátoru Formacs HT. Analýza byla založena na termickém spalování organického uhlíku na oxid uhličitý. Byly měřeny organická a anorganická frakce a celkové množství uhlíku ve vzorku. Autosamplerem byl ze skleněné zkumavky odebrán objem 100 µl. Termické spalování probíhalo za regulovaného přístupu kyslíku při teplotě 950 °C ve skleněné trubici. Takto získaný uhlík byl poté smíchán s nosným plynem, kterým bylo v našem případě helium. Následně byl trubičkou převeden na nedisperzní detektor infračerveného záření (NDIR). Tato technologie využívá k detekci širokopásmový vysílač, který je schopný vysílat vlnové délky v infračervené oblasti. Uhlík je schopný konkrétní část této energie pohltit. Infračervený senzor poté dokáže tyto vlnové délky zachytit a vydat signál, který je přímo úměrný množství plynem pohlcené energie.

4.2.3 Měření přítomných aniontů

Přítomnost a množství aniontů vznikajících z jednotlivých akceptorů při degradaci bylo možné stanovovat pomocí iontové chromatografie Metrohm 863 Basic IC plus. Princip separace byl založen na silných elektrostatických silách mezi ionty v roztoku a ionexem. Z plastových zkumavek byl pro analýzu použit objem 20 µl. Stacionární fázi byla v našem případě anexová kolona Metrosep A Supp 5 – 150/4.0. Před tuto kolonu byla nainstalována ještě předkolona Metrosep A Supp 5 Guard zabraňující případnému poškození hlavní kolony. Jako mobilní fáze byl použit roztok uhličitanu sodného a hydrogenuhličitanu sodného. Roztokem pufru byl v našem případě 0,1M kyselina fosforečná. Přítomnost a množství byly po separaci detekovány pomocí detektoru elektrické vodivosti. Ten měří elektrickou vodivost odseparovaných látek v roztoku mezi dvěma elektrodami, na které je přivedeno střídavé napětí.

4.2.4 Měření rozpustných kovů

Koncentrace jednotlivých prvků v roztoku byla měřena pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou na přístroji Agilent 730. Autosamplerem byl z plastové zkumavky odebrán objem 10 ml, který byl následně zmlžen pomocí argonu a společně s ním převeden do hořáku. Zde je udržována plazma o teplotě 9 726.85 °C. Nosný plyn je okamžitě odpařen a ve vzorku dojde k excitaci elektronů na vyšší energetickou hladinu. Zde jsou atomy nestabilní, takže se opět vracejí na původní energetickou hladinu a společně s tím je emitováno světlo o předem známé vlnové délce. Toto světlo následně dopadá na

monochromátor, kde je rozděleno podle vlnové délky a po rozdělení je pouštěno na CCD snímač. Ten převádí intenzitu dopadajícího světla na elektrický signál.

4.2.5 Příprava nádob s biotickým sedimentem bez přídavku acetátu

Pro srovnání výsledků biodegradace v biotickém sedimentu byl vytvořen nádobový pokus také pro jednotlivé skupiny akceptorů bez přidaného acetátu, který by byl využit jako zdroj uhlíku pro přítomné mikroorganismy. Příprava nádob byla totožná, jako u přípravy biotického sedimentu.

Pro každý akceptor byla vytvořena dvě opakování, ze kterých byl injekční stříkačkou a dlouhou jehlou odebírán bez přístupu kyslíku opakovaně 1 ml vzorkupřítomné modelové povrchové vody. Ten byl následně přefiltrován přes stříkačkový filtr PVDF 0,2 μ m do vialky. Takto připravený vzorek byl následně podroben analýze pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na analyzátoru Ultimate 3000, kde byla měřena koncentrace organických polutantů. Postup a parametry měření byly analogické jako u vzorků s acetátem.

5 Výsledky

Během nádobového experimentu byly v modelové povrchové vodě měřeny parametry pro jednotlivé akceptory elektronů a organické polutanty využitě jako donory elektronů. Těmito parametry byla koncentrace organických polutantů, množství organického uhlíku a pH, množství přítomných aniontů a přítomnost rozpustných kovů. Dále byly pomocí počítačového softwaru ModelMaker vypočítány charakteristické kinetické veličiny pro jednotlivé organické polutanty. Těmito parametry jsou rychlostní konstanta K a poločas rozpadu v půdě DT_{50} . Dále byl určen koeficient determinace R^2 udávající přesnost modelu. Všechny tyto parametry by měly být nápomocné při zjištění, jak jsou jednotlivá organická xenobiotika degradována v prostředích s přidavkem různých akceptorů elektronů a jakým způsobem by tedy v praxi mohla probíhat bioremediace těchto látek.

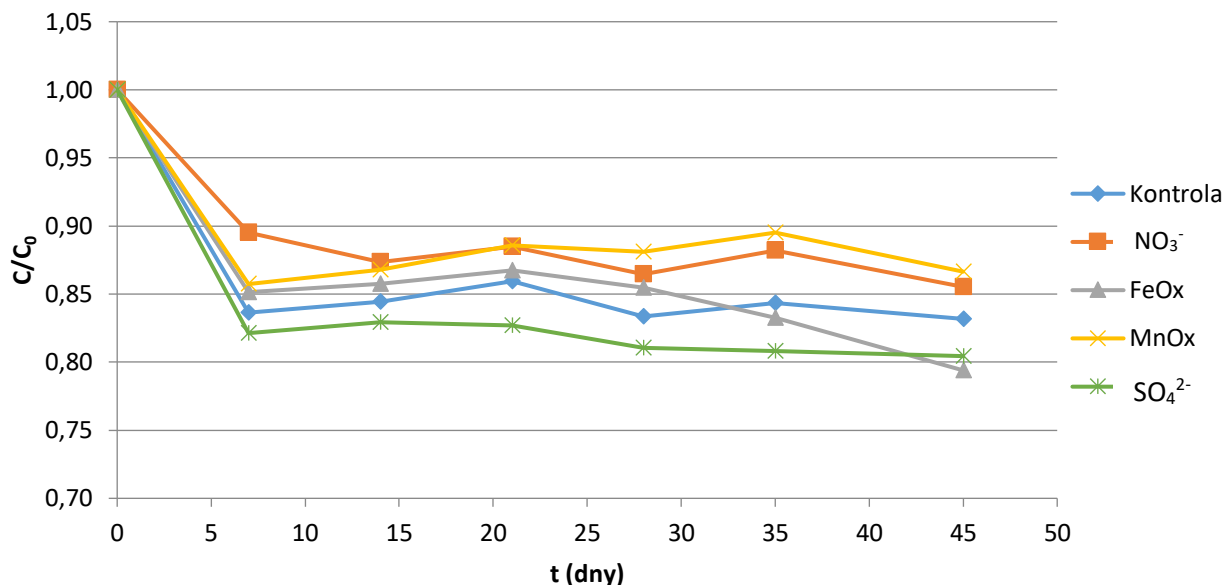
5.1 Koncentrace organických polutantů v jednotlivých prostředích s přidavkem acetátu

Nejdůležitějším měřeným parametrem nádobového experimentu byla koncentrace vybraných organických polutantů přítomných v modelové povrchové vodě z mokřadu za určené časové období (7, 14, 21, 28, 35 a 45 dní). Během pokusu probíhala v nádobách degradace, která byla zprostředkována přítomnými mikroorganismy. Za pomoci mikroorganismů docházelo u xenobiotik k jejich oxidaci a tím také k jejich degradaci. Proces degradace se tedy odráží v koncentraci jednotlivých organických xenobiotik přítomných ve vzorcích modelové vody, které byly odebírány. Schopnost degradovat organická xenobiotika, a tedy snižovat jejich koncentraci v prostředí je hlavní důvod využití mikroorganismů při bioremediačních postupech. Právě pokles koncentrace jednotlivých organických xenobiotik poukazuje na biodegradační schopnost přítomných mikroorganismů. Naměřené koncentrace jednotlivých polutantů jsou uvedeny v grafické podobě vždy pro všechna prostředí s acetátem a určitým akceptorem elektronu. Dále je součástí této kapitoly také srovnání konečných koncentrací v biotickém a abiotickém prostředí. Pomocí těchto hodnot se dá zjistit, jaké prostředí mělo největší vliv na biodegradaci daného organického polutantu.

5.1.1 Diklofenak

Na grafu č. 1 je znázorněna koncentrace diklofenaku v závislosti na čase v prostředí s acetátem a s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu je patrné, že došlo v prvních 5 dnech k poklesu koncentrace u všech typů prostředí. Následně se již hodnoty koncentrace drželi stabilně. Nejvyšší pokles zaznamenal diklofenak v prostředí s přidavkem síranu, a naopak nejnižší pokles koncentrace byl zaznamenán u prostředí s přidavkem manganu.

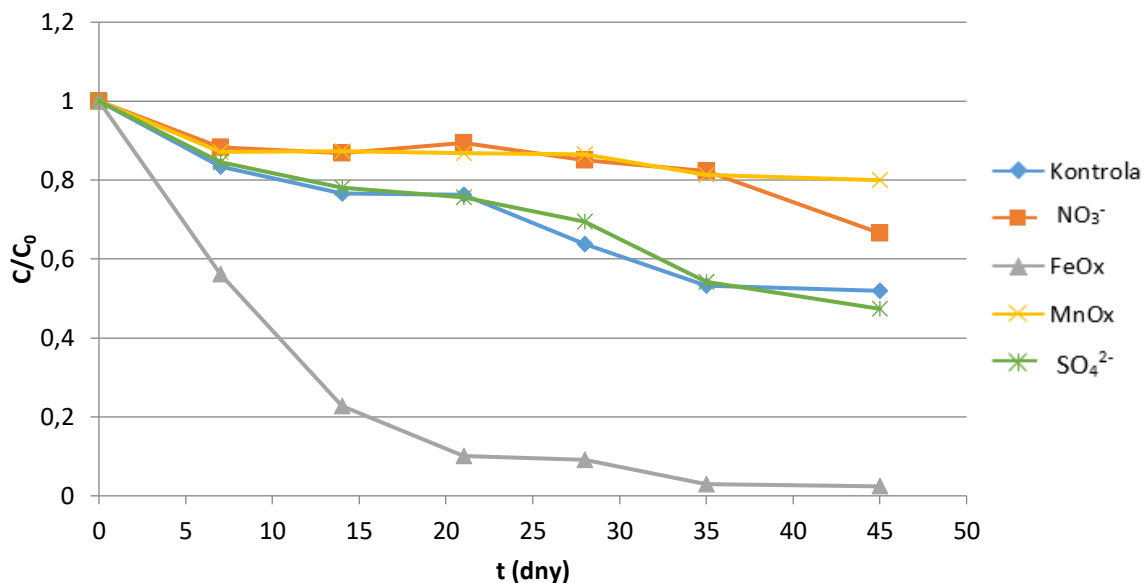
Graf 1: Koncentrace diklofenaku v závislosti na čase



5.1.2 Sulfamethoxazol

Graf č. 2 znázorňuje koncentraci sulfamethoxazolu v závislosti na čase v prostředí s acetátem a s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu jasně vyplývá, že nejrychlejší pokles koncentrace sulfamethoxazolu probíhal v prostředí s přidavkem železa. Průběh této křivky je oproti ostatním výrazně rozdílný. Naopak nejnižší pokles koncentrace byl pozorován v prostředí s manganem. Odbourávání sulfamethoxazolu bylo prakticky stejné v síranovém prostředí a v prostředí bez přidavku akceptoru elektronu.

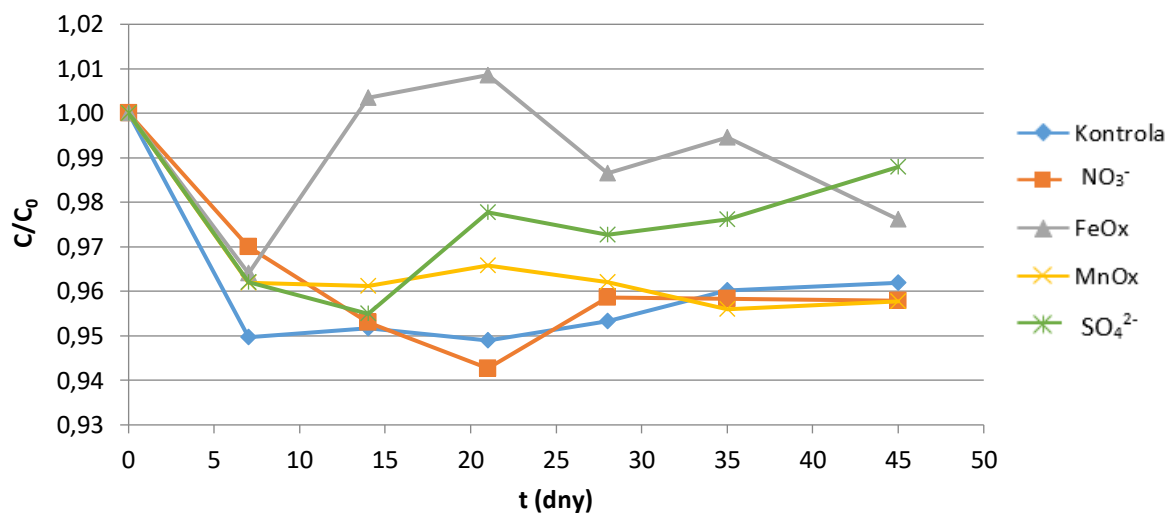
Graf 2: Koncentrace sulfamethoxazolu v závislosti na čase



5.1.3 Flukonazol

Na grafu č. 3 jsou vyobrazeny koncentrace flukonazolu v závislosti na čase v prostředí s acetátem a s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu je patrné, že největší pokles koncentrace flukonazolu nastal v prvních 5 dnech. V prostředí se železem a síranem došlo následně opět ke zvýšení koncentrace. V ostatních třech prostředích měla křivka koncentrace dále velice podobný charakter.

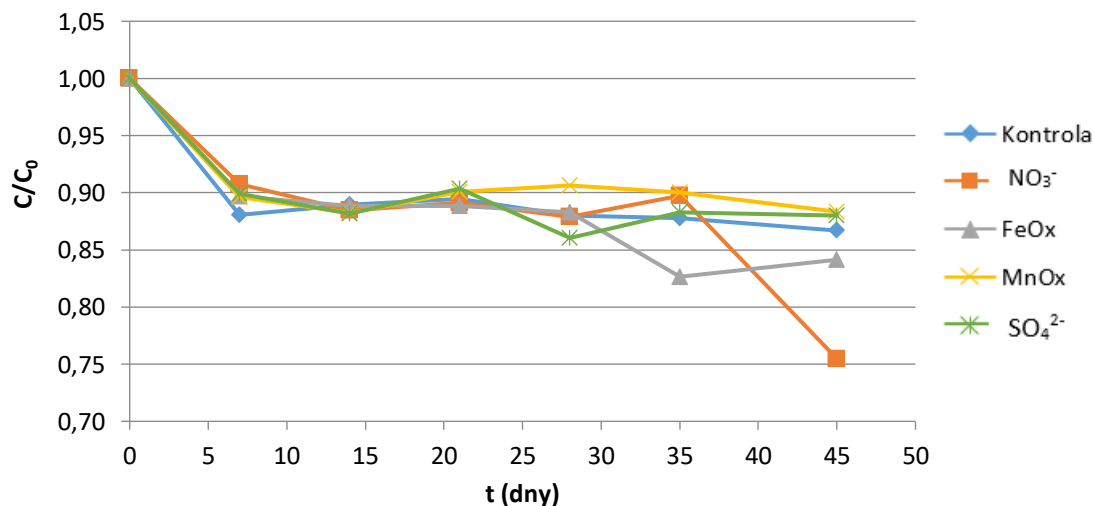
Graf 3: Koncentrace flukonazolu v závislosti na čase



5.1.4 Benzotriazole

Graf č. 4 znázorňuje koncentraci benzotriazolu v závislosti na čase v prostředí s acetátem a s jednotlivými akceptory elektronů. Stejně jako u ostatních organických polutantů byl největší pokles koncentrace benzotriazolu zaznamenán v prvních 5 dnech. Následně byla koncentrace ve všech prostředích vyrovnaná. Až ve 27 dni experimentu došlo k úbytku v prostředí se železem a ve 35 dni došlo k výraznému úbytku v prostředí s dusičnany. Prostředí s dusičnany je zároveň prostředí vykazující nejnižší koncentraci benzotriazolu na konci experimentu.

Graf 4: Koncentrace benzotriazolu v závislosti na čase



5.1.5 Srovnání konečných koncentrací v biotickém a abiotickém prostředí

Tabulka č. 6 zobrazuje konečné koncentrace jednotlivých organických xenobiotik v biotickém prostředí, dále koncentraci organických xenobiotik naměřenou v abiotickém prostředí a poslední sloupec vyjadřuje poměr těchto dvou čísel. Toto srovnání poskytuje informace o účinnosti jednotlivých akceptorů elektronů při biotické degradaci vybraných organických xenobiotik. V případě, kdy je nižší konečná koncentrace u biotického prostředí, je také nižší poměr čísel ve srovnání a daný akceptor elektronu bude vhodný pro biodegradaci daného organického polutantu. V takovém prostředí bude biotická degradace probíhat snáze než degradace abiotické, tedy ta, při které nejsou zapojeny mikroorganismy. Z tabulky je patrné, že diklofenak byl nejlépe degradován v prostředí s přidavkem železa. Stejně prostředí je vhodné také pro biodegradaci sulfamethoxazolu. Flukonazol byl nejlépe degradován v prostředí s přidavkem manganu a benzotriazol v prostředí s přidavkem dusičnanů.

Tabulka 6: Srovnání konečných koncentrací jednotlivých xenobiotik v biotickém a abiotickém prostředí

	Akceptor elektornů	Konečná koncentrace v biotickém prostředí (mg/l)	Koncentrace v abiotickém prostředí (mg/l)	Srovnání (Cbio/Cabio)
diklofenak	Kontrola	0,83	0,85	0,98
	NO ₃ ⁻	0,86	0,83	1,03
	FeOx	0,79	0,83	0,96
	MnOx	0,87	0,87	1,00
	SO ₄ ²⁻	0,80	0,82	0,98
sulfamethoxazol	Kontrola	0,52	0,88	0,59
	NO ₃ ⁻	0,67	0,86	0,77
	FeOx	0,02	0,87	0,03
	MnOx	0,80	0,89	0,90
	SO ₄ ²⁻	0,47	0,88	0,54
flukonazol	Kontrola	0,94	0,95	1,00
	NO ₃ ⁻	0,96	0,92	1,04
	FeOx	0,98	0,94	1,04
	MnOx	0,96	0,97	0,99
	SO ₄ ²⁻	0,99	0,95	1,04
benzotriazole	Kontrola	0,87	0,90	0,96
	NO ₃ ⁻	0,75	0,88	0,85
	FeOx	0,84	0,90	0,93
	MnOx	0,88	0,92	0,96
	SO ₄ ²⁻	0,88	0,90	0,98

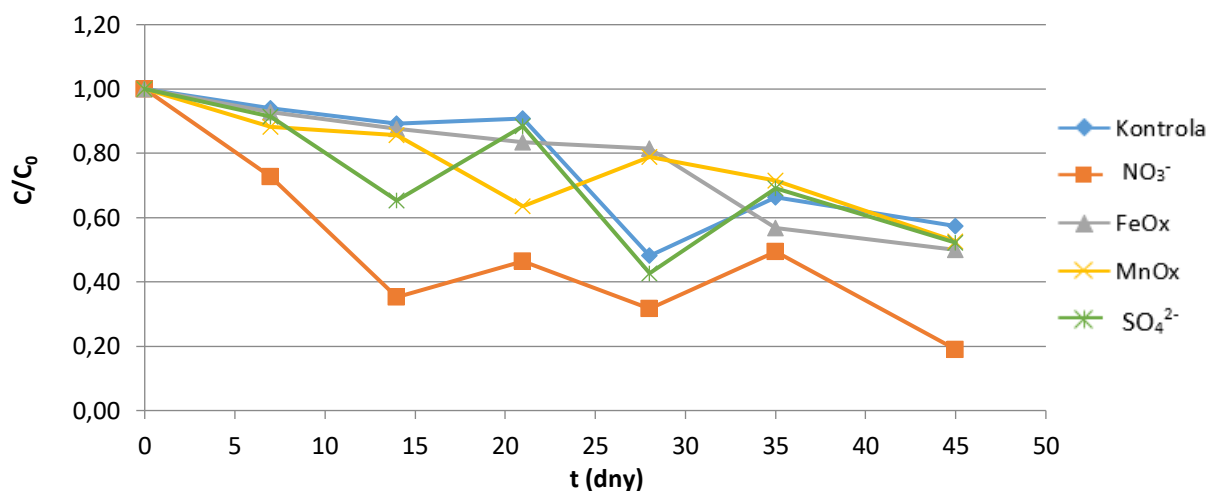
5.2 Množství organického uhlíku, naměřené pH

Změny množství organického uhlíku v modelové vodě za jednotlivá časová období byl parametr, který mohl odrážet změny mikrobiální biomasy. Dále bylo v tomto případě pomocí organického uhlíku sledováno odbourávání acetátu. Hodnoty pH naměřené během odběrů mohly rovněž indikovat změny uvnitř mikrobiálního společenstva. Oba tyto parametry jsou graficky znázorněny pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu.

5.2.1 Koncentrace organického uhlíku pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Graf č. 5 zobrazuje koncentraci organického uhlíku v závislosti na čase v jednotlivých prostředích s přidavkem acetátu a jednotlivých akceptorů elektronů. Grafické znázornění ukazuje již v prvních dnech odchýlení křivky a výrazné snížení koncentrace organického uhlíku v prostředí s dusičnanem oproti ostatním typům prostředí. Koncentrace ve zbylých prostředích se v prvních dnech experimentu držela blízko sebe a příliš se neměnila. Následně ale došlo v průběhu dnů k výrazným výkyvům v jednotlivých prostředích. Koncentrace organického uhlíku se při ukončení experimentu významně lišila pouze v prostředí s přidavkem dusičnanů.

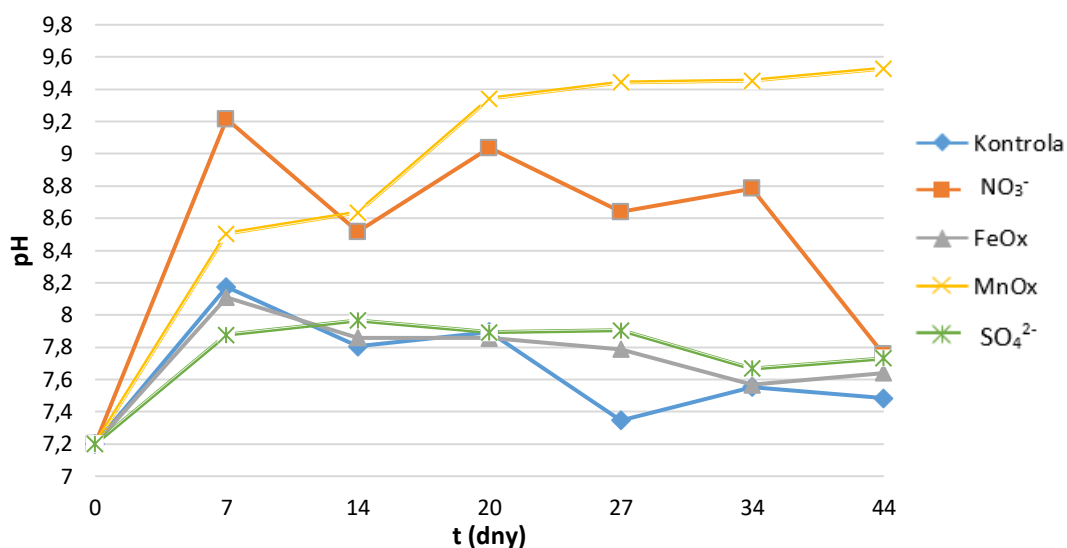
Graf 5: Koncentrace organického uhlíku v závislosti na čase



5.2.2 Naměřené pH pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Na grafu č. 6 jsou vyobrazeny hodnoty naměřeného pH v jednotlivých prostředích s přidavkem akceptoru elektronů závislý na čase. V začátečních fázích experimentu došlo u všech typů prostředí ke zvýšení pH. Pouze prostředí s přidavkem manganu mělo ale neustále stoupající tendenci. V prostředí s přidavkem železa a síranu po prvotním nárůstu již k žádnému většímu vychýlení nedošlo. V prostředí bez přidavku akceptoru elektronů došlo k jednomu mírnému poklesu kolem 27 dne, jinak byla hodnota pH relativně konstantní. V prostředí s přidavkem dusičnanů byl prvotní nárůst největší, ale zároveň došlo u tohoto prostředí v poslední fázi experimentu k největšímu poklesu pH.

Graf 6: Hodnoty pH v závislosti na čase



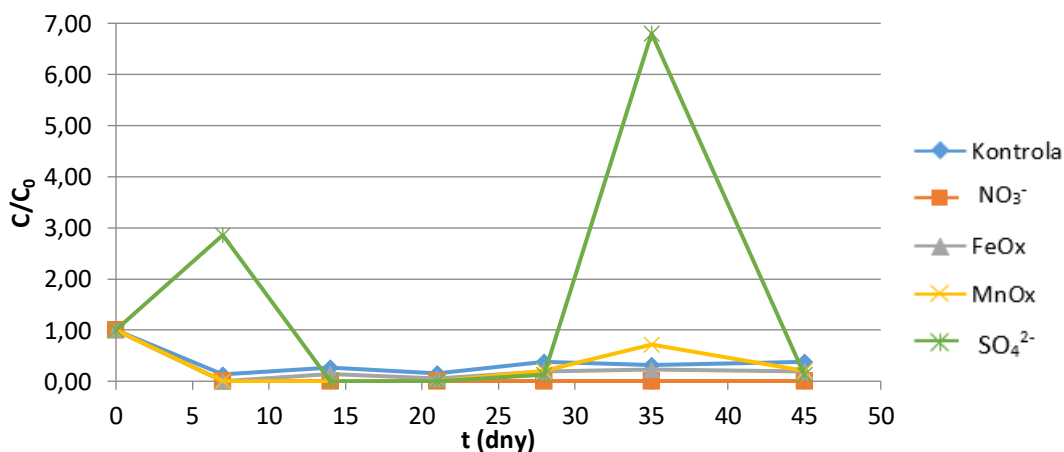
5.3 Parametry prostředí jednotlivých akceptorů elektronů

Doplňkovými parametrem měření bylo určení množství relevantních kovů a relevantních aniontů pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu. Tato měření poukazyvalo na změny uvnitř prostředí během biodegradace. Významné anionty nebo kovy pro jednotlivá prostředí jsou graficky znázorněny.

5.3.1 Koncentrace dusičnanového aniontu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Graf č. 7 znázorňuje koncentraci dusičnanových aniontů v závislosti na čase v prostředích s acetátem a jednotlivými akceptory elektronů. Pouze v případě prostředí s přidavkem síranů došlo k významnému vychýlení křivky koncentrace NO₃⁻. K prvnímu vychýlení došlo v počáteční fázi experimentu a druhé výrazné zvýšení koncentrace bylo zaznamenáno 35 den experimentu. U všech ostatních prostředí došlo pouze k poklesu koncentrace NO₃⁻ na téměř nulové hodnoty, a to již v počáteční fázi experimentu.

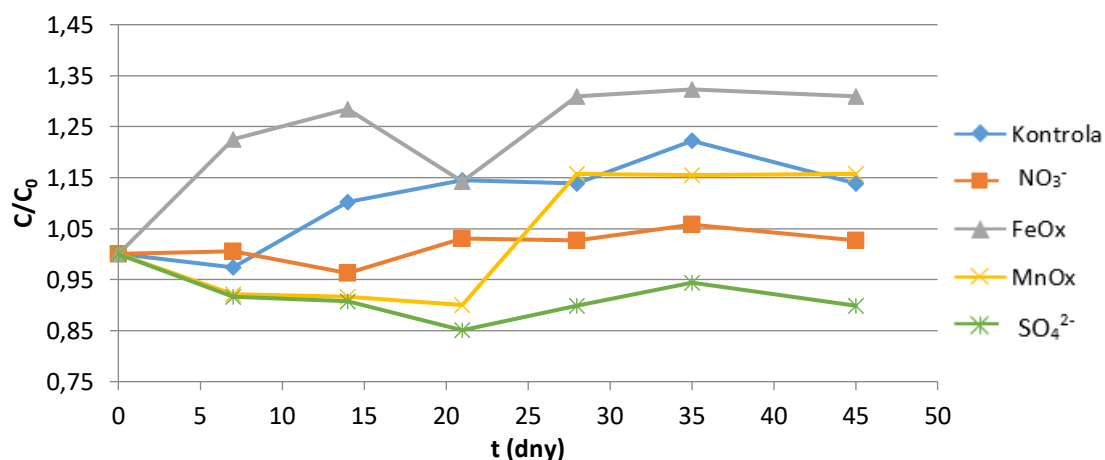
Graf 7: Koncentrace dusičnanových aniontů v závislosti na čase



5.3.2 Koncentrace síranového aniontu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Graf č. 8 znázorňuje koncentraci SO_4^{2-} v závislosti na čase v prostředích s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu je patrné, že koncentrace síranových aniontů byla nejvyšší v prostředí s přidavkem železa. Stoupající tendenci měla koncentrace i v případě prostředí bez přidavku akceptoru elektronů. V prostředí s přidavkem dusičnanů se koncentrace po dobu celého experimentu prakticky nezměnila. V prostředí s přidavkem manganu byla koncentrace stabilní do 20 dne a následně došlo k významnému zvýšení koncentrace síranového aniontu. Po tomto zvýšení se ale koncentrace opět stabilizovala. Pouze v prostředí s přidavkem síranů došlo ke snížení počáteční koncentrace síranových aniontů.

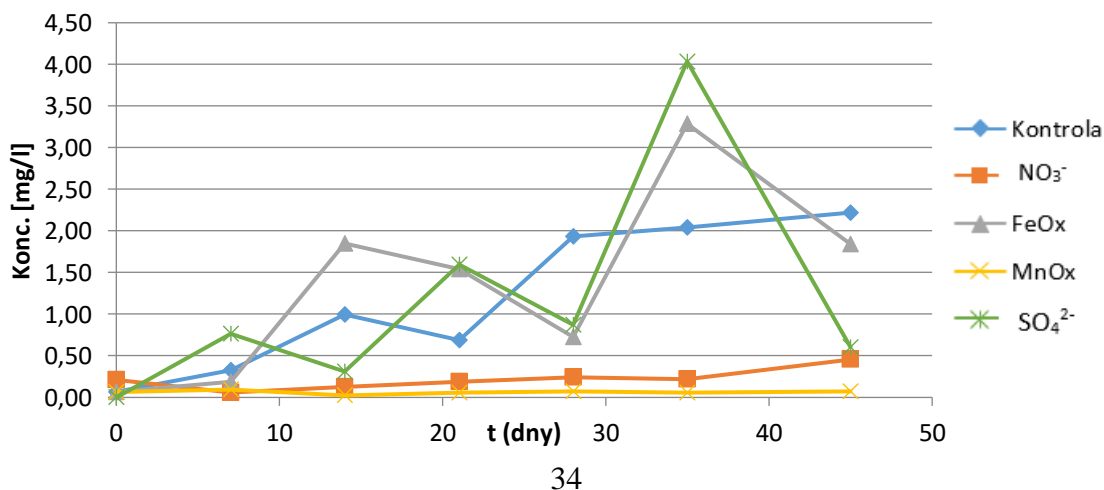
Graf 8: Koncentrace síranových aniontů v závislosti na čase



5.3.3 Koncentrace železa pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Graf č. 9 znázorňuje koncentraci železa v závislosti na čase v prostředích s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu je patrné, že koncentrace železa se zvyšovala u prostředí s přidavkem železa, síranu a v prostředí bez přidavku akceptoru elektronů. V průběhu experimentu ale u všech těchto případů docházelo k výrazným výkyvům koncentrace v čase. Naopak u prostředí s přidavkem dusičnan a manganu byla koncentrace železa po dobu celého experimentu prakticky nezměněna.

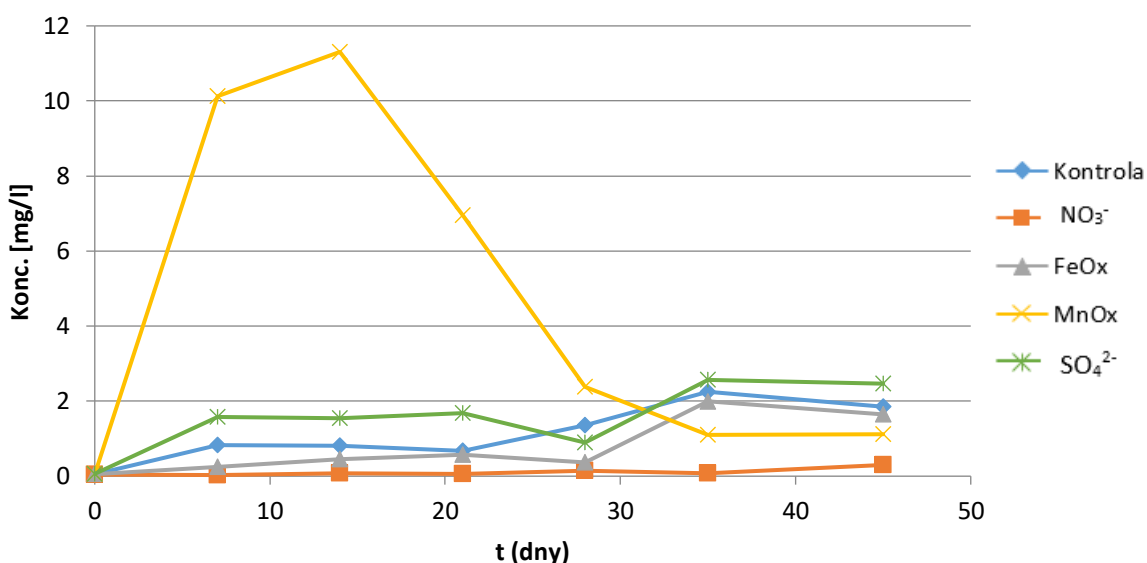
Graf 9: Koncentrace železa v závislosti na čase



5.3.4 Koncentrace manganu pro jednotlivá prostředí s určitým akceptorem elektronu

Graf č. 10 znázorňuje koncentraci manganu v závislosti na čase v prostředích s jednotlivými akceptory elektronů. Pouze v prostředí s přidavkem manganu došlo v počáteční fázi experimentu k výraznému zvýšení koncentrace manganu. Kolem 15 dne byla koncentrace manganu nevyšší a následně došlo opět ke jejímu postupnému snížení. U ostatních prostředí, kromě prostředí s dusičnany, došlo ke zvýšení koncentrace ve 28 dni experimentu a po tomto zvýšení již byl koncentrace stabilní.

Graf 10: Koncentrace manganu v závislosti na čase



5.4 Vybrané kinetické parametry organických polutantů

Jako veličiny charakterizující chování organických xenobiotik byla vybrána rychlostní konstanta a poločas rozpadu. Rychlostní konstanta vypovídá o rychlosti, s jakou probíhala degradace vybraných organických xenobiotik. Poločas rozkladu v půdě zase ukazuje, jaká je odhadovaná doba odbourání daného xenobiotika v přítomnosti jednotlivých akceptorů elektronů. Jedná se o exponenciální pokles koncentrace v čase na základě prvního kinetického řádu. Pro porovnání byly veličiny vypočítány jak pro prostředí s přidavkem acetátu, tak pro prostředí bez přidaného acetátu. V případě, kdy koncentrace organického polutantu neklesala a nešlo tedy aplikovat model kinetiky prvního řádu, jsou buňky tabulek označeny symbolem X.

5.4.1 Kinetické parametry organických polutantů v jednotlivých prostředích s přidavkem acetátu

Tabulka č. 7 zobrazuje vypočítaný poločas rozkladu pro jednotlivá xenobiotika ve všech prostředích s přidavkem akceptoru a acetátu. Z hodnot je patrné, že nejdelší poločas rozkladu má benzotriazol, dále pak diklofenak a nejkratší dobu zůstává v životní prostředí přítomný sulfamethoxazol. U flukonazolu nedošlo v žádném prostředí k takové změně koncentrace, aby mohl být použit kinetický model prvního řádu. U rychlostní konstanty je situace stejná.

Nejpomaleji budou chemické reakce vedoucí k degradaci xenobiotika probíhat u benzotriazolu, dále pak u diklofenaku a nejrychleji bude degradován sulfamethoxazol. U obou kinetických parametrů lze pozorovat velké rozdíly také v rámci jednotlivých prostředí s různými akceptory elektronů. Z dostupných dat má vodné prostředí s přidavkem dusičnanů nejdelší poločasy rozkladu daných organických xenobiotik.

Tabulka 7: Kinetické parametry organických xenobiotik v prostředích s přidavkem acetátu

	Prostředí	s přidavkem acetátu			
		Rychlostní konstanta K, d ⁻¹	Směrodatná chyba	Koeficient determinace R ²	DT50 (dny)
diklofenak	Kontrola	x		x	x
	NO ₃ ⁻	0,004502	0,000791	0,31	153,98
	FeOx	0,005964	0,000959	0,55	116,23
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	x	x	x	x
sulfamethoxazol	Kontrola	0,016056	0,001005	0,97	43,17
	NO ₃ ⁻	0,007270	0,000889	0,88	95,35
	FeOx	0,095647	0,004770	1,00	7,25
	MnOx	0,005882	0,005882	0,74	117,84
	SO ₄ ²⁻	0,015868	0,000942	0,98	43,68
flukonazol	Kontrola	x	x	x	x
	NO ₃ ⁻	x	x	x	x
	FeOx	x	x	x	x
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	x	x	x	x
benzotriazole	Kontrola	x	x	x	x
	NO ₃ ⁻	0,005250	0,000746	0,80	132,03
	FeOx	0,004929	0,000671	0,72	140,61
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	x	x	x	x

5.4.2 Kinetické parametry organických polutantů v jednotlivých prostředích bez přidavku acetátu

Pro srovnání byly kinetické parametry vypočteny také pro všechna organická xenobiotika ve všech typech prostředí bez přidavku acetátu. Z hodnot uvedených v Tabulce č. 8 je patrné, že nejdelší poločas rozkladu bude u flukonazolu, následovat bude benzotriazol, dále sulfamethoxazol a nejkratší dobu bude v prostředí zůstat diklofenak. Co se týče hodnot rychlostní konstanty bude nejrychleji probíhat reakce u flukonazolu, dále pak u benzotriazolu, diklofenaku a nejdéle bude reagovat sulfamethoxazol.

Tabulka 8: Kinetické parametry organických xenobiotik v prostředích bez přidavku acetátu

	Prostředí	bez přidavku acetátu			
		Rychlostní konstanta K, d ⁻¹	Směrodatná chyba	Koeficient determinace R ²	DT50 (dny)
diklofenak	Kontrola	0,00490	0,00174	0,33	141,44
	NO ₃ ⁻	0,00403	0,00122	0,70	171,98
	FeOx	0,00536	0,00122	0,62	129,33
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	0,00293	0,00142	0,52	236,57
sulfamethoxazol	Kontrola	0,00661	0,00118	0,91	104,79
	NO ₃ ⁻	0,00161	0,00073	0,43	429,33
	FeOx	0,03323	0,00141	0,99	20,86
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	0,00800	0,00082	0,95	86,63
flukonazol	Kontrola	x	x	x	x
	NO ₃ ⁻	0,00124	0,00071	0,12	558,93
	FeOx	0,00150	0,00072	0,49	462,18
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	x	x	x	x
benzotriazole	Kontrola	0,00348	0,00040	0,92	199,12
	NO ₃ ⁻	0,00219	0,00006	1,00	316,47
	FeOx	0,00240	0,00030	0,88	288,68
	MnOx	x	x	x	x
	SO ₄ ²⁻	0,00131	0,00019	0,84	528,28

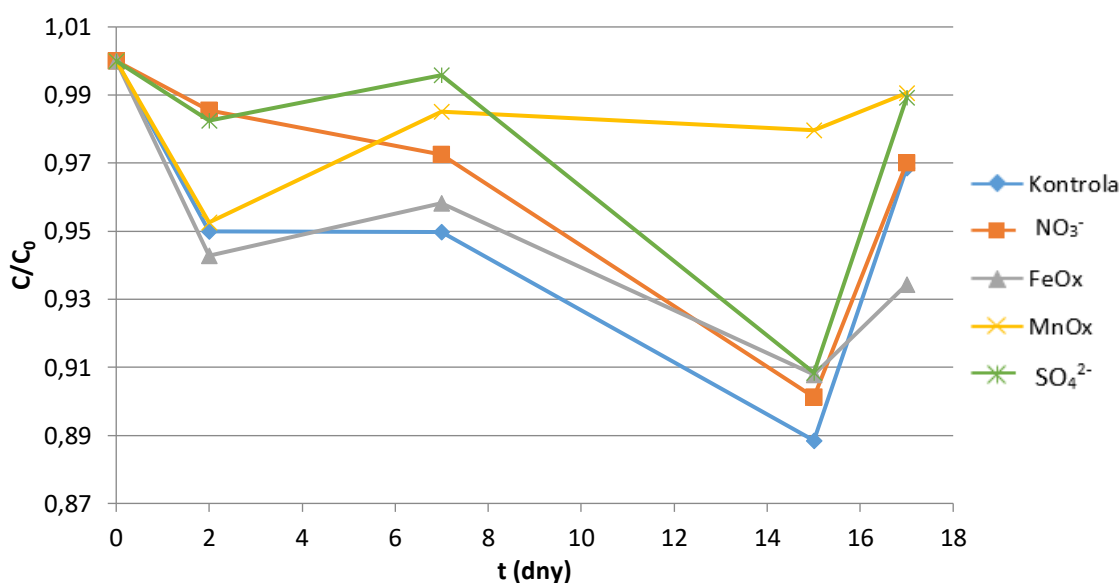
5.5 Koncentrace organických polutantů v jednotlivých prostředích bez přídavku acetátu

Pro porovnání biodegradace organických xenobiotik za různých vstupních podmínek byla jejich koncentrace měřena také v prostředí s jednotlivými akceptory elektronu, ale bez přídavku acetátu jako zdroje uhlíku. Naměřené koncentrace jednotlivých polutantů jsou uvedeny v grafické podobě vždy pro všechna prostředí s určitým akceptorem elektronu, ale bez acetátu.

5.5.1 Diklofenak

Na grafu č. 11 jsou vyobrazeny koncentrace diklofenaku v závislosti na čase v prostředí pouze s jednotlivými akceptory elektronů. Z grafu je patrné, že nejnižší koncentrace při ukončení experimentu byla v prostředí s přídavkem železa. Po 1 dni poklesla koncentrace ve všech prostředích, 15 den experimentu ale u prostředí bez akceptoru elektronů a v prostředí s přídavkem dusičnanů, síranů a železa došlo k opětovnému nárůstu koncentrace daného organického polutantu.

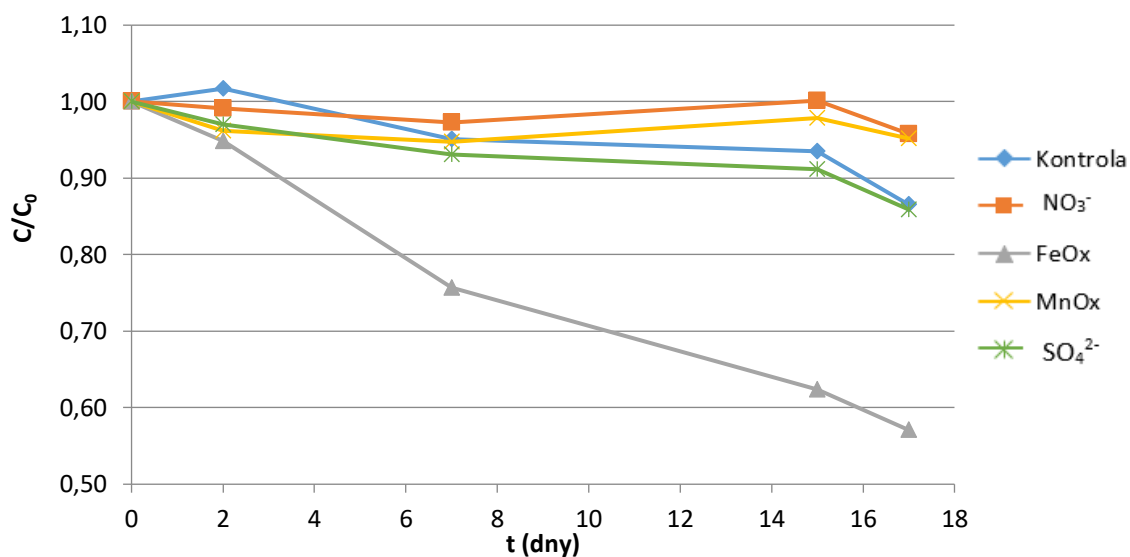
Graf 11: Koncentrace diklofenaku v závislosti na čase



5.5.2 Sulfamethoxazol

Graf č. 12 znázorňuje koncentraci sulfamethoxazolu v závislosti na čase v prostředí pouze s jednotlivými akceptory elektronů. Grafické znázornění ukazuje výrazný pokles koncentrace sulfamethoxazolu pouze v prostředí s přídavkem železa. Ve všech ostatních případech je pozvolné snižování koncentrace patrné až v konečné fázi experimentu.

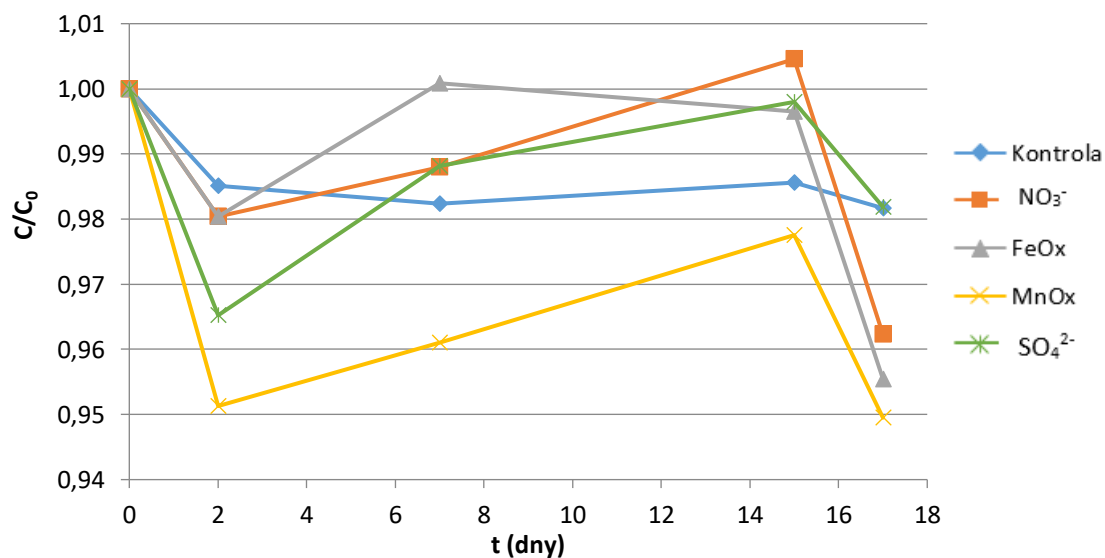
Graf 12: Koncentrace sulfamethoxazolu v závislosti na čase



5.5.3 Flukonazol

Na grafu č. 13 jsou znázorněny koncentrace flukonazolu v závislosti na čase v prostředí pouze s jednotlivými akceptory elektronů. Koncentrace flukonazolu se v počáteční fázi experimentu snížila u všech typů prostředí. Následně docházelo k pozvolnému zvyšování koncentrace a 15 den došlo k opětovnému prudkému snížení koncentrace. Na konci experimentu byla nejnižší koncentrace flukonazolu naměřena v prostředí s přidavkem manganu.

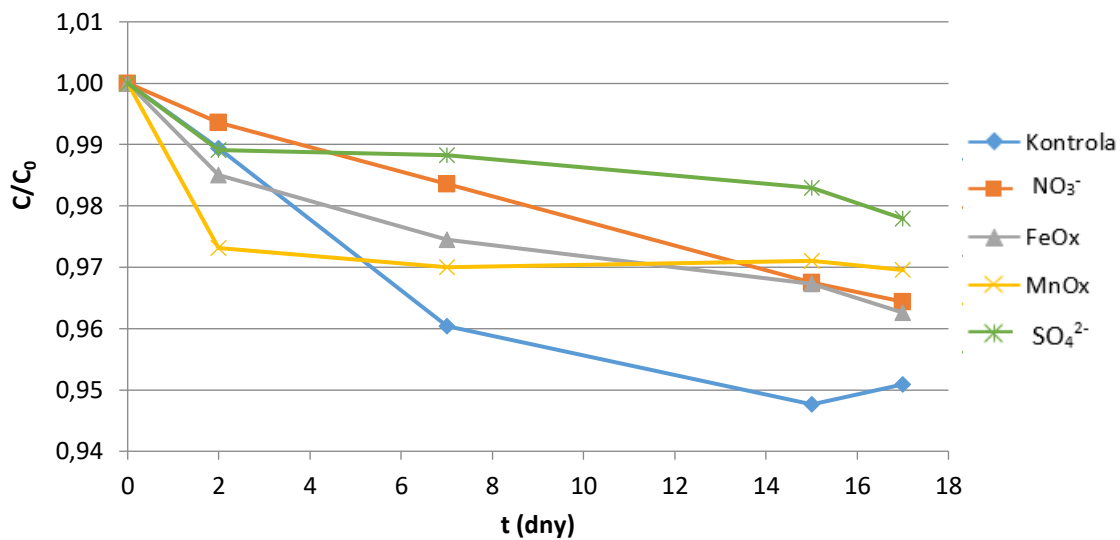
Graf 13: Koncentrace flukonazolu v závislosti na čase



5.5.4 Benzotriazole

Graf č. 14 znázorňuje koncentraci benzotriazolu v závislosti na čase v prostředí pouze s jednotlivými akceptory elektronů. V případě benzotriazolu docházelo od začátku experimentu k poklesu koncentrace u všech typů prostředí. Na konci experimentu byla nevyšší koncentrace naměřena v prostředí s přidavkem síranů. Naopak nejnižší koncentrace byla zaznamenána v prostředí bez přidavku akceptoru elektronů.

Graf 14: Koncentrace benzotriazolu v závislosti na čase



6 Diskuze

V diplomové práci byla hodnocena schopnost mangan redukujících mikroorganismů degradovat organické polutanty přítomné v biosféře. Polutanty antropogenního původu jsou v dnešní době celosvětový problém. Do této velké skupiny patří mimo jiné také pesticidy a léčiva. Rezidua těchto látek se mohou vyskytovat jak v pitné vodě, tak i v půdě, která přichází do styku s potravinami. Takto kontaminované potraviny následně mohou u člověka způsobit řadu zdravotních problémů. Existují samozřejmě zákonem dané limity, které mají spotřebitele chránit před přijímáním nadměrného množství těchto látek v potravinách. V životním prostředí je ale xenobiotik mnohdy velké množství a v důsledku toho je nadměrně zatěžováno. Řada organických polutantů přechází do biosféry velice ochotně a dokáží zde přetrvat velice dlouhou dobu. Jednou z možností, jak přetrvávající polutanty z prostředí odstranit, je proces bioremediace. Ten využívá živé organismy k odstranění nebo snížení množství škodlivých látek v prostředí.

Jednou ze skupin organismů, které tuto schopnost mají, jsou mangan redukující mikroorganismy. Ty využívají oxidačně redukčních reakcí a svého enzymatického aparátu pro tvorbu energie potřebné k přežití. Organické polutanty v těchto reakcích figurují jako donory elektronů, kdy oxidací těchto látek vzniká tok volných elektronů. Ten je následně za pomoci mikroorganismu navázán na akceptory. Jako alternativní příjemci elektronu mohou být v anaerobním prostředí místo kyslíku využity například sloučeniny manganu. Ty se v prostředí nejčastěji nachází ve formě oxidu manganičitého. Jeho redukci na dvoj- nebo trojmocnou formu následně vzniká pro mikroorganismy využitelná energie.

Schopnost aplikovat enzymatický aparát k přeměně organických polutantů je pro některé mikroorganismy naprosto přirozená. Člověk se snaží tyto kaskády dějů při bioremediaci pochopit a následně je využít ve svůj prospěch. Bioremediace je velice citlivý a náročný proces, do kterého vstupuje mnoho faktorů. Je tedy nutné mít před začátkem dobré informace o přítomných mikroorganismech, prostředí a možném průběhu. V tomto případě byla účinnost degradace organických xenobiotik porovnávána v prostředí s dusičnany, sírany a oxidy manganu a železa za redukujících podmínek. Bylo tak možné posoudit aktivitu mangan redukujících mikroorganismů s mikroorganismy z jiných prostředí.

6.1 Vliv akceptoru na rozklad organických polutantů

Organické polutanty degradují v prostředích s různými akceptory elektronů různým způsobem. Rychlost rozkladu je mimo jiné dána přítomností vhodných mikroorganismů, které se podílejí na bioremediaci. S tím souvisí také přítomnost akceptorů elektronů, které mohou mikroorganismy využívat při degradaci těchto látek pro získání energie. V případě tohoto experimentu byly koncentrace xenobiotik v jednotlivých prostředích mnohdy rozdílné. To je dáno vhodností daného akceptoru elektronu pro degradaci určitého donoru, tedy v našem případě organického polutantu. Právě koncentrace organických polutantů v průběhu času je jedním z hlavních ukazatelů, které vypovídají o vhodnosti mangan redukujících mikroorganismů, jako vhodného nástroje bioremediace daných xenobiotik.

6.1.1 Diklofenak

Diklofenak patří mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva a v životním prostředí je jeho množství velice vysoké. To je dáno nadužíváním a také nízkou hodnotou rozdělovacího koeficientu, a tedy dobrou rozpustností ve vodě. Podle dostupné literatury uvedené v literární rešerši by diklofenak měl ochotně degradovat v prostředí, ve kterém je jako akceptor elektronu přítomná síra ve formě síranu a nebo železo ve formě oxidu (Mahdi et al. 2012). To bylo potvrzeno také v našem případě. Graf č. 1 ukazuje, že v prostředí se sírou a se železem byla koncentrace tohoto polutantu během celého experimentu nejnižší. Potvrzuje to také srovnání s abiotickou kontrolou, kde vyšla skupina se sírany jenom o 0,02 než skupina se železem. Pro prostředí s manganem se pro degradaci diklofenaku nezdá jako vhodné. Jeho koncentrace je po dobu celého experimentu v tomto prostředí nejvyšší. Je možné, že mangan redukující mikroorganismy nejsou schopné odštěpit ze struktury elektron a vytvořit tak nitronový radikál, který je základem pro další kaskádu dějů při degradaci diklofenaku.

6.1.2 Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol je antibiotikum inhibující syntézu kyseliny listové, které patří do skupiny sulfonamidových antibiotik. Podle literatury je v anaerobně nejlépe degradován v prostředí s přidavkem železa. Rozštěpení vazby NO uvnitř izoxazolového kruhu, který je součástí struktury sulfamethoxazolu, je nejefektivněji vyvoláno přítomností železnatých kationtů. Ty vznikají redukcí ze sloučenin železa jako je goethit (Mohatt et al. 2011). Toto tvrzení bylo potvrzeno i v našem případě. Z grafu č. 2 lze vyčíst, že k významné degradaci tohoto polutantu docházelo pouze v prostředí s přidavkem železa. Stejný závěr vychází také z Tabulky srovnání biotické a abiotické kontroly, kde je jasně patrné, že sulfamethoxazol byl prakticky zcela degradován. Mangan redukující mikroorganismy zřejmě nemají dostatečný enzymový aparát, který by rozštěpil vazbu uvnitř izoxazolového kruhu. Právě toto rozštěpení, při kterém vzniká volný elektron, který je využit akceptorem, je primárním krokem celé biodegradace.

6.1.3 Flukonazol

Flukonazol je azolové antimykotikum inhibující syntézu ergosterolu. Kromě lékařství se využívá také v zemědělství jako fungicid. Podle literárních zdrojů k jeho rychlé biodegradaci přispívá prostředí obsahující oxidy kovů. V našem případě bylo vybráno prostředí obsahující železa a manganu, kterých bylo dosaženo přidavkem goethitu a birnesitu (Zhang et al. 2021). Z grafu č. 3 vyplývá, že degradace flukonazolu v prostředí s přidavkem birnesitu probíhala lépe než v prostředí s přidavkem goethitu. V prostředí s manganem došlo v prvních dnech ke snížení koncentrace, ale po zbytek experimentu již koncentrace výrazně neklesla. U prostředí s přidavkem goethitu v prvních dnech experimentu koncentrace také klesla, následně však došlo ke zvýšení. Při porovnání konečných koncentrací v obou prostředí jsou ale rozdíly malé. Nasvědčuje tomu také srovnání s abiotickou kontrolou. V prostředí s přidavkem manganu je koncentrace nejnižší, tento rozdíl ale činí pouze 0,05. Mangan redukující mikroorganismy jsou zřejmě pro degradaci flukonazolu vhodnější než mikroorganismy redukující železo.

Princip fungování redukce u těchto mikroorganismů je však velice podobný a také výsledky tomu odpovídají.

6.1.4 Benzotriazole

Benzotriazole patří mezi léčiva s protizánětlivý a analgetickým účinkem. Jeho nízká hodnota rozdělovacího koeficientu ale ukazuje na dobrou rozpustnost ve vodě, kde je však pro organismy toxický. Podle literárních zdrojů by měla degradace probíhat nejlépe v prostředí s přidavkem dusičnanů nebo železa (Liu et al. 2011). Z grafu č. 4 je patrné, že se literární předpoklad shoduje s dosaženými výsledky. Koncentrace benzotriazolu v prostředí s dusičnanem klesla v počátku experimentu, následně byla konstantní a k dalšímu prudkému snížení došlo ke konci experimentu. Stejný závěr potvrzuje také srovnání biotické a abiotické kontroly. Ve stejnou chvíli došlo ke snížení koncentrace také v prostředí s přidavkem železa. V prostředí s přidavkem manganu poté ve stejnou dobu došlo pouze k neznatelnému snížení koncentrace. Je možné, že v prostředí s manganem by bylo nutné experiment prodloužit a ke snížení koncentrace by došlo také.

6.2 Vliv přidavku acetátu na rozklad organických polutantů

Acetát byl v případě tohoto experimentu látkou, kterou mikroorganismy využívají jako zdroj uhlíku a energie. Přítomnost acetátu měla napomáhat správnému fungování buněk mikroorganismů, a to mělo zrychlovat degradaci přítomných mikroorganismů. Pro srovnání vlivu acetátu na bioremediaci jednotlivých organických polutantů byl vytvořen stejný pokus také bez přidavku acetátu. U jednotlivých xenobiotik by tedy měla být teoreticky pozorována rychlejší a snazší degradace v prostředích, kde je acetát přítomen než v prostředích, kam acetát přidán nebyl. Z grafu koncentrace organického uhlíku (Graf č. 5) je patrné, že v prostředích, kam byl acetát přidán, jeho koncentrace u všech prostředí klesá. Byl tedy mikroorganismy využíván jako zdroj uhlíku a napomáhal vytvářet lepší podmínky pro bioremediaci. Při srovnání grafů jednotlivých organických polutantů je také možné tvrdit, že přidavek acetátu napomáhá vitalitě přítomné mikrobiální biomasy a podporuje začáteční fáze degradace. V porovnání s kinetickými parametry ale v mnoha případech acetát významnou roli při urychlení degradace nehrál. V případě tohoto experimentu by ale bylo vhodné prodloužit dobu sledování koncentrace jednotlivých organických polutantů. Je možné, že v případě delšího časového úseku by v degradaci mohly nastat ještě určité změny.

Studie, při které bylo degradováno 26 léčiv za přítomnosti acetátu ukazuje, že kvalita degradace je závislá na typu degradované látky a také na přítomném množství. U určitých druhů léčiv byla přidavkem acetátu zvýšena rychlostní konstanta a degradace tak byla významně podpořena. U druhé skupiny léčiv byla naopak přidavkem acetátu degradace zpomalena. V určitých případech i o více než 50 %. Třetí a největší skupina testovaných léčiv byla na přidavku acetátu zcela nezávislá (Liang et al. 2019). I v našem případě je pozorováno větší množství výsledků v tabulce č. 8, tedy v tabulce, kde jsou kinetické parametry sledovány v prostředí bez přidavku acetátu. Tabulka č. 7 ale naopak dokazuje, že v případě, že k degradaci došlo, byly poločasy rozkladu významně nižší u prostředí, kde byl přítomen acetát.

Diklofenak byl ve všech typech prostředí hůře degradován v případě, kdy nebyl přidán acetát. Koncentrace v prvních dnech experimentu není tak výrazná, jako v případě pokusu s acetátem. V konečné fázi experimentu naopak dochází k výraznému vzestupu koncentrace diklofenaku. I přes tyto podmínky nejlépe degradace probíhá stále v prostředí s přidavkem železa. Z průběhu křivek je ale patrné, že degradace neprobíhala plynule, jako v případě jednotlivých prostředí s přidavkem acetátu.

Sulfamethoxazol byl stejně jako diklofenak v prostředí s přidavkem acetátu degradován podstatně rychleji. Průběh všech křivek vypadá na grafem s přidavkem a bez přidavku acetátu podobně. Z osy koncentrace je ale patrné, že v prostředí bez přidavku acetátu probíhá degradace pomaleji. Co se týče nejvhodnějšího prostředí, tak degradace nejlépe probíhala pro oba pokusy v prostředí s přidavkem železa.

Flukonazol lépe degradován v prostředí s přidavkem acetátu, a to v prostředí, kam nebyl přidán žádný akceptor. To je rozdíl oproti prostředí bez acetátu, protože tam byl flukonazol nejlépe degradován v prostředí s přidavkem manganu. Konečné koncentrace polutantu jsou v obou prostředích velice podobné. A konečná koncentrace není nijak zásadně nižší. Nelze tedy jistě potvrdit, že by přidavek acetátu měl zásadní vliv na rychlost a průběh degradace. V prostředí bez přidavku acetátu došlo nejprve k rychlému poklesu koncentrace, následně k mírnému vzestupu a v konečné fázi experimentu koncentrace flukonazolu opět prudce klesla. Průběh degradace je tedy znatelně rozdílný oproti degradaci v prostředí s přidavkem acetátu.

Benzotriazol byl stejně jako všechny ostatní organické polutanty mnohem lépe degradován v prostředí s přidavkem acetátu. Zde se jako nejvhodnější akceptor ukázal dusičnan, což je rozdíl oproti prostředí bez acetátu, kde byl nejlépe vyhodnoceno prostředí bez přidavku akceptoru. Podle průběhu křivek je patrná pozvolná degradace benzotriazolu, což je také rozdíl ve srovnání s prostředím s přidavkem acetátu. V tomto grafu je patrný výrazný počáteční pokles a následná stagnace křivek.

6.3 Kinetické parametry jednotlivých organických polutantů

Kinetické parametry jednotlivých organických polutantů udávají dlouhodobý obraz biodegradace v prostředích s jednotlivými akceptory elektronů. Statistické zhodnocení v podobě koeficientu determinace určuje, zda degradace proběhla v dostatečné míře, aby mohla být považována za validní. V případě, že tomu tak je, jsou vypočítány hodnoty rychlostní konstanty a poločasu rozkladu pro jednotlivá prostředí.

6.3.1 Diklofenak

Degradace diklofenaku v prostředí s acetátem se dala relevantně pozorovat podle kinetiky prvního řádu pouze v prostředí s přidavkem dusičnanů a oxidů železa. V ostatních prostředích ke změnám koncentrace nedocházelo a nebo k nim docházelo v tak malé míře, že koeficient determinace byl vyhodnocen jako nulový a nemohly tak být spočítány další kinetické parametry. V prostředí s oxidy železa probíhala biodegradace rychleji a poločas rozkladu diklofenaku je nižší než v případě prostředí s dusičnany. Zde bude podle rychlostní konstanty degradace probíhat pomaleji a poločas rozkladu je tím pádem vyšší. V obou prostředích jsou si ale kinetické parametry podobné. Také graf č. 1 potvrzuje, že v prostředí s přidavkem železa byla koncentrace diklofenaku na konci měření nejnižší. V prostředí bez přidavku acetátu je

diklofenak nejrychleji degradován ve stejném prostředí, jak v případě pokusu s acetátem, tedy v prostředí s přidavkem oxidů železa. Nasvědčuje tomu také rychlostní konstanta, která je nejvyšší. Rozdíl je ale v prostředí s nejpomalejší degradací. V případě prostředí bez acetátu bude diklofenak nejpomaleji degradovat v prostředí s přidavkem síran, kde je poločas rozkladu 2x delší než u prostředí s přidavkem oxidů železa. Také v případě tohoto experimentu byla v konečné fázi nejnižší koncentrace diklofenaku bez přidavku acetátu v prostředí s oxidem železa a nejvyšší koncentrace byla naměřena v prostředí s přidavkem síranů, jak je patrné z grafu č. 11.

Podle výsledků studie zabývající se degradací protizánětlivých nesteroidních léčiv pomocí říčního sedimentu vykazuje diklofenak obecně nízkou rychlost odstraňování v anaerobních podmínkách. Odstraňování je v tomto případě připisováno spíše abiotickým procesům a mikroorganismy se na degradaci prakticky nepodílí (Koumaki et al. 2017). Z tabulky č. 6 lze vyčíst, že i v našem případě se koncentrace diklofenaku v biotickém a abiotickém prostředí příliš nelišily a byly velice blízko hodnoty 1. Tedy že v biotickém a abiotickém prostředí dochází k degradaci stejnou měrou. To potvrzuje také závěry studie, že v biotickém prostředí degradace diklofenaku probíhat může, ale i v tomto prostředí půjde zřejmě o abiotický proces.

6.3.2 Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol byl degradován ve všech prostředích do takové míry, že bylo možné na základě koeficientu determinace určit kinetické parametry pro všechna prostředí s přidavkem acetátu. Nejdelsí poločas rozkladu má sulfamethoxazol v prostředí s přidavkem oxidu manganu. Nejrychleji bude naopak docházet k rozkladu v prostředí s přidavkem oxidů železa. Rychlostní konstanta tyto výsledky potvrzuje. Ve stejném pořadí nám vyšla vhodnost prostředí také v našem případě, jak je patrné z grafu č. 2. Nejrychleji docházelo ke snižování koncentrace v prostředí s přidavkem železa a nejmenší změna koncentrace byla zaznamenána v prostředí s přidavkem oxidů manganu. V pokusu bez přidavku acetátu vyšlo prostředí s přidavkem železa také jako nejvhodnější. Nejdelsí poločas rozkladu má sulfamethoxazol v prostředí s přidavkem dusičnanů, což je rozdíl oproti prostředí s přidavkem acetátu, kde k degradaci docházelo nejpomaleji v prostředí s oxidy manganu. Poločas rozkladu v prostředí bez acetátu a s dusičnany je přibližně 20x pomalejší než v prostředí se železem. Stejně závěry potvrzuje i náš experiment. Z grafu č. 12 je patrné, že koncentrace klesá nejrychleji v prostředí se železem a nejpomaleji v prostředí s dusičnany.

Podle studie zabývající se degradací sulfamethoxazolu ve vodním sedimentu za anaerobních podmínek je degradace tohoto léčiva ovlivněna převážně biotickými faktory. Byly naměřeny poločasy rozkladu mezi 8 až 17 dny. U prostředí, kde dochází k degradaci tohoto léčiva hrají také roli změny teploty a pH. Z výsledků lze usoudit, že u sulfamethoxazolu nedochází k významnému hromadění v životním prostředí a je bioticky dobře degradován (Radke et al., 2009). Z tabulky č. 6 lze v případě našeho experimentu vyčíst, že v biotickém prostředí je degradace podstatně rychlejší než v prostředí abiotickém. Zejména v prostředí s přidavkem oxidů železa je biotická degradace nedostižná. V prostředí s přidavkem železa je také poločas rozkladu na spodní hranici, kterou udává popisovaná studie, jak je patrné z tabulky č. 7. V pokusu s přidavkem acetátu je rozklad významně kratší než v pokusu bez přidaného

acetátu. V případě prostředí s dusičnany je poločas rozkladu vypočten na více než rok a v případě prostředí s manganem ke snižování koncentrace vůbec nedocházelo. V určitých oblastech tedy k hromadění v životním prostředí jistě dochází.

6.3.3 Flukonazol

V případě flukonazolu nebyla v prostředí s přídavkem acetátu naměřena žádná relevantní změna koncentrace, která by v závislosti na koeficientu determinace mohla ukazovat na vhodnost určitého prostředí pro degradaci tohoto organického xenobiotika v dlouhodobém měřítku. V krátkodobém měřítku je z grafu č. 3 patrné, že nejlépe degradace probíhá v prostředí s přídavkem manganu a dusičnanů, a naopak nejnižší rozdíl koncentrací na začátku a na konci byl naměřen v prostředí s přídavkem síranů. V případě pokusu bez acetátu byl flukonazol významně degradován pouze v prostředí s přídavkem dusičnanů a oxidů železa. Vhodnější se pro degradaci zdá prostředí s oxidy železa, i přesto je ale poločas rozkladu delší než rok. V případě prostředí s dusičnany je pak poločas rozkladu kolem roku a půl. Grafu č. 13 ukazuje jako nejvhodnější prostředí bez přídavku acetátu oxidy manganu. Tento rozdílný výsledek je s největší pravděpodobností způsoben krátkou dobou, po kterou byla degradace v našem případě pozorována. Stejně je to i u nejméně vhodného prostředí, kdy v našem případě koncentrace neméně klesla v prostředí s přídavkem síranů.

Studie zkoumající environmentální osud léčiv a jejich transformačních produktů ve vodních proudech naznačuje, že flukonazol patří mezi těžko odbouratelné organické polutanty. Dále studie poukazuje na vysokou míru akumulace tohoto léčiva ve vodním prostředí (Li et al. 2015). Špatná degradace je patrná také z našich výsledků, jak je patrné z tabulky č. 7 a 8. V prostředí s acetátem nebyl zaznamenán dostatečně validní pokles koncentrace ani v jednom ze studovaných typů prostředí. V případě pokusu bez acetátu byl pokles znatelný pouze ve dvou prostředí. Poločasy rozkladu byly v obou případech ale delší než 1 rok. To tedy naznačuje, že se léčivo v kontaminovaném prostředí dokáže dlouhodobě udržet a může se zde také akumulovat. Podle tabulky č. 6 nelze ani jednoznačně určit, zda degradace probíhá spíše za pomoci biotických nebo abiotických reakcí. Naše výsledky tedy potvrzují výše uvedenou studii.

6.3.4 Benzotriazole

Degradace benzotriazolu byla podle koeficientu determinace významná s přídavkem acetátu pouze v prostředí s dusičnany a oxidy železa. Z těchto dvou bylo vhodnější prostředí s dusičnany. Nasvědčuje tomu jako poločas rozkladu, tak také rychlostní konstanta dané chemické reakce. Obě prostředí jsou si ale výslednými kinetickými parametry velice podobná. Dlouhodobé pozorování potvrzuje naše výsledky, jejichž grafické znázornění je možné pozorovat v grafu č. 4. I v našem případě byla koncentrace v závěrečné fázi experimentu nejnižší v případě prostředí s přídavkem dusičnanů. V případě pokusu bez acetátu je úbytek koncentrace statisticky platný ve všech prostředích kromě prostředí s přídavkem oxidů manganu. Zde z degradaci benzotriazolu ze statistického hlediska nedošlo. Jako nejvhodnější se pro degradaci zdá prostředí bez přídavku akceptorů. Je tedy možné, že degradace probíhá jiným způsobem než za přítomnosti mikroorganismů. Poločas rozkladu je u benzotriazolu nejvyšší ze všech organických polutantů a v případě nejméně vhodného prostředí, tedy prostředí s přídavkem síranů, je poločas rozkladu odhadován až na rok a půl.

Jako nejhodnější bylo prostředí bez akceptorů zvoleno i v našem experimentu. Degradace v něm probíhala výrazně rychleji než v ostatních typech prostředí, jak je patrné z grafu č. 14.

Případová studie hodnotící perzistenci fenolických benzotriazolů v životním prostředí popisuje tuto látku jako vysoce perzistentní. To je podloženo také hodnotou poločasu rozkladu, který je udáván v rozmezí 151 až 218 dny. Takto dlouhá doba je zdůvodněna náročností biologického rozkladu fragmentů, které se v průběhu degradace z benzotriazolu oddělují (Brandt et al. 2016). Z kinetických parametrů uvedených v tabulce č. 7 a 8 je jasně patrné, že i v našem případě probíhala degradace pouze v některých typech prostředí. A v případě, že probíhala, jsou hodnoty poločasu rozkladu hodně vysoké. V případě pokusu s přidavkem acetátu se naše hodnoty blíží spodní hranici udávané ve studii. V případě pokusu bez acetátu některé naše hodnoty naopak vysoce převyšují horní hranici studie. Lze ale potvrdit, že benzotriazole je vysoce perzistentní látka.

6.4 Hodnoty koncentrace vybraných aniontů a kovů a hodnoty pH v jednotlivých typech prostředí

Koncentrace vybraných aniontů a kovů může napomoci k pochopení, do jaké míry jsou jednotlivé akceptory elektronů využívány při procesu bioremediace organických xenobiotik. Dále je možné sledovat, na jaké látky se akceptory přeměňují. To je velice nápomocné pro určení optimálního mikrobiálního společenstva, které chceme pro bioremediaci využít. Různé produkty látkové přeměny mohou napomáhat aktivaci dalších skupin mikrobiálního společenstva, které nebyly schopné aktivity v primárních podmínkách. Parametrem, který může ovlivňovat proces degradace je také pH. Mikroorganismy mají své optimum, při kterém jsou neaktivnější, a to ovlivňuje také rychlost degradace.

Podle studie zabývající se faktory, které ovlivňují bioremediaci těžkých kovů a pesticidů v půdě je optimální pH velice důležité pro správné fungování mikroorganismů. Proto se každé mikrobiální společenstvo snaží o úpravu pH v okolním prostředí. Dále je na hodnotě pH závislá biologická dostupnost daného kontaminantu pro přítomné mikroorganismy. Nevhodnými hodnotami pH tedy můžeme zastavit proces degradace a bioremediace dané lokality nebude úspěšná (Zhang et al. 2020). Jak je možné vidět na grafu č. 6 i v našem případě se mikroorganismy snažili změnit hodnoty pH na takové, které budou pro jejich další přežití optimální. Stejně jako je uváděno ve studii je možné sledovat velké rozpětí hodnot pH, které je pro danou biomasu vhodné. Je také možné, že změnou pH se mikroorganismy snažili docílit toho, aby se zvýšila biologická dostupnost jednotlivých organických polutantů, které byly využity jako donory elektronů.

Významná změna koncentrace dusičnanů byla pozorována pouze v prostředí, ve kterém byla jako akceptor elektronu použita síra. Dále byla mírně zvýšení koncentrace NO_3^- pozorována také v prostředí s přidavkem oxidu manganu. V tomto případě ale bylo zvýšení koncentrace nepatrné v porovnání se síranovým prostředím. Vzestup koncentrace v těchto prostředích napovídá, že nitrifikace je pro mikroorganismy využívající sírany a oxidy manganu spřaženým dějem. V prostředí s dusičnany je koncentrace téměř nulová. Dalo by se tedy usuzovat, že dusičnany byly spotřebovány při degradaci xenobiotik a rozloženy na jiné látky.

Hodnota pH byla v prostředí s dusičnany v prvních dnech experimentu nejvyšší ze všech sledovaných prostředí. Následně hodnota kolísala a v konečné fázi opět výrazně klesla. Nedostala se však na původní hodnotu.

Přítomnost síranových aniontů byla naměřena ve všech prostředích. Koncentrace v průběhu celého experimentu se výrazně lišila jak v rámci jednoho sledovaného akceptoru, tak také mezi všemi sledovanými typy prostředí. Nejvyšší koncentrace při ukončení experimentu byla naměřena v prostředí s přidavkem oxidu železa. Naopak nejnižší koncentrace byla naměřena v prostředí s přidavkem síry. Dá se tedy tvrdit, že síranové anionty jsou využívány v procesech biodegradace a tím pádem se jejich koncentrace v průběhu experimentu snižuje. V ostatních prostředích pak sírany mohou být vylučovány mikroorganismy jako odpadní látky, a proto se jejich koncentrace v průběhu analýzy zvyšuje. V případě síranového prostředí hodnota pH stoupla v prvních dnech experimentu a následně k žádnému většímu výkyvu nedošlo. Jedná se o nejstabilnější hodnoty pH v rámci celého experimentu.

Mangan jako samostatný prvek byl ve zvýšených koncentracích pozorován pouze v prostředí s přidavkem oxidu manganu. Při biodegradaci jsou oxidy manganu využívány jako akceptory a zvýšené množství tohoto kovu je tedy patřičné. V pozdější fázi experimentu ale již koncentrace manganu klesá. Je možné, že se začleňuje do přítomných sloučenin a tím pádem již není měřitelný. Dále byla zvýšená koncentrace manganu naměřena také v prostředí s přidavkem síranů a železa. K tomuto zvýšení došlo při konci experimentu. Je patrné, že jak v prostředí se sírany, tak v prostředí s manganem jsou tyto dvě skupiny vždy zvýšeny. Je tedy možné, že při biodegradaci spolu množství manganu a síry souvisí. V případě pH je prostředí s manganem jediné, které v průběhu celého experimentu stoupalo. V první polovině experimentu došlo k významnému vzestupu hodnot pH, v druhé polovině se ale vzestup zastavil a hodnoty pH zůstávají vcelku konstantní.

V případě železa jako přítomného kovu je největší koncentrace pozorována v prostředí bez přidavku akceptoru. Naopak nejnižší koncentrace byla naměřena ve skupině s přidavkem oxidu manganu. V prostředí s přidavkem oxidu železa šla kolem 5 dne koncentrace strmě vzhůru, ale následně začala klesat. Železo je v mikroorganismech často využívaným prvkem. Je možné, že mikroorganismy jej uvnitř těla využijí a následně ho odbourají. To může být důvod, proč se koncentrace železa v okolí mikrobiálního společenstva neustále mění. Hodnoty pH jsou v prostředí se železem velice podobné hodnotám s přidavkem síranů. V prvních dnech došlo ke zvýšení hodnot a následně se již hodnoty stabilně drží poblíž hodnot pH v síranovém prostředí.

6.5 Možnosti navazujícího výzkumu a využití při bioremediaci

V případě tohoto experimentu by jistě bylo vhodné prodloužit sledovanou dobu koncentrace a ostatních parametrů jednotlivých organických polutantů. Jak je patrné z tabulek pro kinetické parametry, jsou doby poločasu rozpadu ve většině případů delší než půl roku a v některých případech dokonce výrazně přesahují rok. Námi vybrané organické polutanty jsou velice úzkou skupinou, je tedy možné do následujících pokusů zařadit větší spektrum xenobiotik, u kterých budou sledovány obdobné parametry. Další možností, jak přiblížit experiment reálnému prostředí bioremediace, je degradace polutantů v prostředí, kde bude přítomno větší množství potenciálních akceptorů elektronů. V případě tohoto experimentu byla

koncentrace xenobiotik sledována v jednotlivých prostředích s různými akceptory elektronu odděleně. V kontaminovaných oblastech ale bioremediace probíhá současně v různých prostředích s různými akceptory. V takovém případě je ale velice složité následné posouzení výsledků, oddělení jednotlivých procesů a správné určení přítomných organismů a jejich mechanismy, kterými k bioremediaci přispívají. Literární zdroje také udávají spojitost mezi degradací organických xenobiotik a fermentací laktátu. Toto spojení může ukazovat na přítomnost dalších druhů mikroorganismů, jejichž metabolismus není striktně navázán na oxidačně redukční reakce, ale v procesech bioremediace mohou hrát svou roli.

Při zpracování výsledků nebyla potvrzena hypotéza, že degradace organických xenobiotik probíhá podobným způsobem v prostředí s přídavkem železa a manganu. Případná bioremediace by tedy měla být koncipována tak, aby organické polutanty, které dobře reagují s manganem byly degradovány pomocí mangan redukujících mikroorganismů a nebylo spoléháno na mikroorganismy které využívají jako akceptor elektronu železo. Výsledkem experimentu je doporučení použití mikroorganismů redukujících mangan pro degradaci flukonazolu. Pouze tyto mikroorganismy měly vliv na snížení koncentrace daného xenobiotika. Dalším navazujícím výzkumem může být tedy posouzení, jak mangan redukující mikroorganismy reagují při biodegradaci jiných azolových léčiv a jak jsou pro ně vhodná.

Pro tento experiment je již naplánována průkazná identifikace přítomných mikroorganismů redukujících mangan. K tomu bude použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) a následná detekce specifických částí genetické informace přítomných mikroorganismů pro přesné zařazení jednotlivých druhů.

7 Závěr

- Biodegradace za pomoci mangan-redukujících mikroorganismů byla v rámci tohoto experimentu u vybraných organických xenobiotik prokazatelně účinná v případě flukonazolu.
- Bioremediace probíhala plynuleji a rychleji v případech, kdy byl jako zdroj uhlíku na počátku přidán acetát. Také poločasy rozkladů a rychlostní konstanty byly významně nižší v případě, kdy byl do prostředí přidán acetát.
- Vybrané organické polutanty můžeme z důvodu dlouhého poločasu rozkladu v přítomnosti vybraných akceptorů elektronů zařadit mezi látky perzistentní, které dlouhodobě přetrvávají v životním prostředí. Výjimkou je sulfamethoxazol v prostředí s přísadkem oxidů železa, jako akceptorů elektronů.

8 Literární zdroje

- Algar, C. K., & Vallino, J. J. (2014). Predicting microbial nitrate reduction pathways in coastal sediments. *Aquatic Microbial Ecology*, 71(3). <https://doi.org/10.3354/ame01678>
- Bajwa, U., & Sandhu, K. S. (2014). Effect of handling and processing on pesticide residues in food- A review. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 51, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0499-5>
- Barroso, J. M. (2010). COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 1(15).
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides: Systematic review. In *Canadian Family Physician* (Vol. 53, Issue 10).
- Becker, J. G., & Seagren, E. A. (2010). Bioremediation of Hazardous Organics. In *Environmental Microbiology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780470495117.ch8>
- Berkow, E. L., & Lockhart, S. R. (2017). Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 10). <https://doi.org/10.2147/IDR.S118892>
- Bhatt, P., Pathak, V. M., Joshi, S., Bisht, T. S., Singh, K., & Chandra, D. (2019). Major metabolites after degradation of xenobiotics and enzymes involved in these pathways. In *Smart Bioremediation Technologies: Microbial Enzymes*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00012-3>
- Bonnefille, B., Gomez, E., Courant, F., Escande, A., & Fenet, H. (2018). Diclofenac in the marine environment: A review of its occurrence and effects. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 131). <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.053>
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1). [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
- Brandt, M., Becker, E., Jöhncke, U., Sättler, D., & Schulte, C. (2016). A weight-of-evidence approach to assess chemicals: case study on the assessment of persistence of 4,6-substituted phenolic benzotriazoles in the environment. *Environmental Sciences Europe*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0072-y>
- Briguglio, I., Piras, S., Corona, P., Gavini, E., Nieddu, M., Boatto, G., & Carta, A. (2015). Benzotriazole: An overview on its versatile biological behavior. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.089>
- Brune, A., Frenzel, P., & Cypionka, H. (2000). Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 24, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(00\)00054-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(00)00054-1)
- Carrasco Cabrera, L., & Medina Pastor, P. (2021). The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, 19(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491>
- Chander, A., Chen, X.-L., Naidu, D. G., Gulati, S., Liu, Y., Munkacsi, A. B., Wilcox, L., Sturley, S. L., Gerelsaikh, T., Chen, X.-L., Chander, A., Triggiani, M., Giannattasio, G., Calabrese, C., Loffredo, S., Granata, F., Fiorello, A., Santini, M., Gelb, M. H., ... Nasr-El-Din, H. A. (2015). Subject index. *Minerals Engineering*, 10(2).

- Chang, K., Chen, J. Q., Shi, Y. X., Sun, M. J., Li, P. F., Zhao, Z. J., Zhu, W. P., Li, H. L., Xu, Y. F., Li, B. J., & Qian, X. H. (2017). The discovery of new scaffold of plant activators: From salicylic acid to benzotriazole. *Chinese Chemical Letters*, 28(4). <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.02.004>
- Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 112). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>
- Dantas, R. F., Contreras, S., Sans, C., & Esplugas, S. (2008). Sulfamethoxazole abatement by means of ozonation. *Journal of Hazardous Materials*, 150(3). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.034>
- Doke, S. K., Raut, J. S., Dhawale, S., & Karuppayil, S. M. (2014). Sensitization of candida albicans biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. *Journal of General and Applied Microbiology*, 60(5). <https://doi.org/10.2323/jgam.60.163>
- Ehrlich, H. L. (1987). Manganese oxide reduction as a form of anaerobic respiration. *Geomicrobiology Journal*, 5(3–4). <https://doi.org/10.1080/01490458709385977>
- European Commission. (2005). Regulation (EU) No 396/2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, L70(48).
- Furst, A. (1996). Introduction to Toxicology. *Journal of the American College of Toxicology*, 15(3). <https://doi.org/10.1177/109158189601500308>
- Gounot, A. (1994). Microbial oxidation and reduction of manganese: Consequences in groundwater and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(4). [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0168-6445(94)90052-3)
- Guisasola, A., Curie, M., Vargas, M. del M., Casas, C., & Baeza, J. A. (2009). Failure of an enriched nitrite-DPAO population to use nitrate as an electron acceptor. *Process Biochemistry*, 44(7). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.017>
- Harris, C. A., Renfrew, M. J., & Woolridge, M. W. (2001). Assessing the risks of pesticide residues to consumers: Recent and future developments. *Food Additives and Contaminants*, 18(12). <https://doi.org/10.1080/02652030110050122>
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3)
- Holoubek Ivan. (2005). *Chemie životního prostředí II - Znečištění složek prostředí*.
- International Code of Conduct on Pesticide Management - Guidance on Pesticide Legislation - Second edition. (2020). In *International Code of Conduct on Pesticide Management - Guidance on Pesticide Legislation - Second edition*. <https://doi.org/10.4060/cb0916en>
- Iwamoto, T., & Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. In *Journal of Bioscience and Bioengineering* (Vol. 92, Issue 1). <https://doi.org/10.1263/jbb.92.1>

- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*, 43(2). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.047>
- Katayama, A., Bhula, R., Burns, G. R., Carazo, E., Felsot, A., Hamilton, D., Harris, C., Kim, Y. H., Kleter, G., Koedel, W., Linders, J., Peijnenburg, J. G. M. W., Sabljic, A., Stephenson, R. G., Racke, D. K., Rubin, B., Tanaka, K., Unsworth, J., & Wauchope, R. D. (2010). Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 203. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1352-4_1
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology. *ISME Journal*, 3(11). <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88>
- Koppel, N., Rekdal, V. M., & Balskus, E. P. (2017). Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. In *Science* (Vol. 356, Issue 6344). <https://doi.org/10.1126/science.aag2770>
- Koumaki, E., Mamais, D., & Noutsopoulos, C. (2017). Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. *Journal of Hazardous Materials*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.03.026>
- Kumar, N. M., Muthukumar, C., Sharmila, G., & Gurunathan, B. (2018). Genetically Modified Organisms and Its Impact on the Enhancement of Bioremediation. In *Energy, Environment, and Sustainability*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7485-1_4
- Kumar, N., Pathera, A. K., Saini, P., & Kumar, M. (2012). Harmful effects of pesticides on human health. *Annals of Agri Bio Research*, 17(2).
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment*, 22(4). <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, Z., Sobek, A., & Radke, M. (2015). Flume experiments to investigate the environmental fate of pharmaceuticals and their transformation products in streams. *Environmental Science and Technology*, 49(10). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00273>
- Liang, C., Zhang, L., Nord, N. B., Carvalho, P. N., & Bester, K. (2019). Dose-dependent effects of acetate on the biodegradation of pharmaceuticals in moving bed biofilm reactors. *Water Research*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.026>
- Liu, H., Chen, T., & Frost, R. L. (2014). An overview of the role of goethite surfaces in the environment. In *Chemosphere* (Vol. 103). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.065>
- Liu, Y. S., Ying, G. G., Shareef, A., & Kookana, R. S. (2011). Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Research*, 45(16). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.001>
- Lovley, D. R., Roden, E. E., Phillips, E. J. P., & Woodward, J. C. (1993). Enzymatic iron and uranium reduction by sulfate-reducing bacteria. *Marine Geology*, 113(1–2). [https://doi.org/10.1016/0025-3227\(93\)90148-O](https://doi.org/10.1016/0025-3227(93)90148-O)
- Luther, G. W. (2005). Manganese(II) oxidation and Mn(IV) reduction in the environment - Two one-electron transfer steps versus a single two-electron step. *Geomicrobiology Journal*, 22(3–4). <https://doi.org/10.1080/01490450590946022>

- Mahdi Ahmed, M., Barbati, S., Doumenq, P., & Chiron, S. (2012). Sulfate radical anion oxidation of diclofenac and sulfamethoxazole for water decontamination. *Chemical Engineering Journal*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.040>
- Masters, P. A., O'Bryan, T. A., Zurlo, J., Miller, D. Q., & Joshi, N. (2003). Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. In *Archives of Internal Medicine* (Vol. 163, Issue 4). <https://doi.org/10.1001/archinte.163.4.402>
- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., Vasileiadis, V. P., Otto, S., Antichi, D., Kiss, J., Pálincás, Z., Dorner, Z., van der Weide, R., Groten, J., Czembor, E., Adamczyk, J., Thibord, J. B., Melander, B., Nielsen, G. C., Poulsen, R. T., ... Oldenburg, E. (2010). Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: Current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology*, 134(5). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01491.x>
- Mohatt, J. L., Hu, L., Finneran, K. T., & Strathmann, T. J. (2011). Microbially mediated abiotic transformation of the antimicrobial agent sulfamethoxazole under iron-reducing soil conditions. *Environmental Science and Technology*, 45(11). <https://doi.org/10.1021/es200413g>
- Myers, C. R., & Nealson, K. H. (1988). Bacterial manganese reduction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, 240(4857). <https://doi.org/10.1126/science.240.4857.1319>
- Nealson, K. H., & Myers, C. R. (1992). Microbial reduction of manganese and iron: New approaches to carbon cycling. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 58, Issue 2). <https://doi.org/10.1128/aem.58.2.439-443.1992>
- Nishimura, T., Vertès, A. A., Shinoda, Y., Inui, M., & Yukawa, H. (2007). Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4). <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0879-y>
- Norris, R. D., Hinchee, R. E., Brown, R., McCarty, P. L., Semprini, L., Wilson, J. T., Kampbell, D. H., Reinhard, M., Bouwer, E. J., Borden, R. C., Vogel, T. M., Thomas, J. M., & Ward, C. H. (2017). Handbook of bioremediation. In *Handbook of Bioremediation*. <https://doi.org/10.1201/9780203712764>
- Nutrition, C. for F. S. and A. (2019). Pesticides - Pesticide Residue Monitoring Program Questions and Answers. *U.S. Food and Drug Administration*.
- Ottow, J. C. G., & von Klopotek, A. (1969). Enzymatic Reduction of Iron Oxide by Fungi. *Applied Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1128/am.18.1.41-43.1969>
- Owen. (2021). Legislative Acts. In *Essential European Community Law*. <https://doi.org/10.4324/9781843141198-4>
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K. P., & Naidu, R. (2013). Illicit drugs and the environment - A review. In *Science of the Total Environment* (Vols. 463–464). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.086>
- Post, J. E., & Veblen, D. R. (1990). Crystal structure determinations of synthetic sodium, magnesium, and potassium birnessite using TEM and the Rietveld method. *American Mineralogist*, 75(5–6).

- Radke, M., Lauwigi, C., Heinkele, G., Mürdter, T. E., & Letzel, M. (2009). Fate of the antibiotic sulfamethoxazole and its two major human metabolites in a water sediment test. *Environmental Science and Technology*, 43(9). <https://doi.org/10.1021/es900300u>
- Reboli, A. C., Rotstein, C., Pappas, P. G., Chapman, S. W., Kett, D. H., Kumar, D., Betts, R., Wible, M., Goldstein, B. P., Schranz, J., Krause, D. S., & Walsh, T. J. (2007). Anidulafungin versus Fluconazole for Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 356(24). <https://doi.org/10.1056/nejmoa066906>
- Rhodes, C. J. (2013). Applications of bioremediation and phytoremediation. In *Science Progress* (Vol. 96, Issue 4). <https://doi.org/10.3184/003685013X13818570960538>
- Rieger, P. G., Meier, H. M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., & Knackmuss, H. J. (2002). Xenobiotics in the environment: Present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal of Biotechnology*, 94(1). [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00422-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00422-9)
- Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Salem-Milani, A., Balaei-Gajan, E., Rahimi, S., Moosavi, Z., Abdollahi, A., Zakeri-Milani, P., & Bolourian, M. (2013). Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 10(1).
- Schmidt, N., Page, D., & Tiehm, A. (2017). Biodegradation of pharmaceuticals and endocrine disruptors with oxygen, nitrate, manganese (IV), iron (III) and sulfate as electron acceptors. *Journal of Contaminant Hydrology*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2017.06.007>
- Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of the Total Environment*, 653. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Singh, B. K., Kuhad, R. C., Singh, A., Lal, R., & Tripathi, K. K. (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 19, Issue 3). <https://doi.org/10.1080/0738-859991229242>
- Steuber, J., & Kroneck, P. M. H. (1998). Desulfovibrio desulfuricans (Essex): New structural and functional aspects of the membranous enzyme. *Inorganica Chimica Acta*, 275–276. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(97\)06143-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(97)06143-4)
- Suma, B. v., Natesh, N. N., & Madhavan, V. (2011). Benzotriazole in medicinal chemistry: An overview. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(6).
- Sutherland, D. L., & Ralph, P. J. (2019). Microalgal bioremediation of emerging contaminants - Opportunities and challenges. In *Water Research* (Vol. 164). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114921>
- Tebo, B. M., & Obraztsova, A. Y. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, 162(1). [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00122-0)
- Thamdrup, B. (2000). Bacterial manganese and iron reduction in aquatic sediments. *Advances in Microbial Ecology*, 16(1). https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4187-5_2

- Tudi, M., Ruan, H. D., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
- Uhlík, O., Strejček, M., Hroudová, M., Demnerová, K., & Maceka, T. (2013). Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem - Od kultivace k metagenomice. *Chemické Listy*, 107(8).
- Venkata Mohan, S., Srikanth, S., Velvizhi, G., & Lenin Babu, M. (2013). Microbial fuel cells for sustainable bioenergy generation: Principles and perspective applications. In *Biofuel Technologies: Recent Developments* (Vol. 9783642345197). https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7_14
- Verma, S., & Kuila, A. (2019). Bioremediation of heavy metals by microbial process. In *Environmental Technology and Innovation* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100369>
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7). <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Vyhláška č. 83/2014 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů, Sbíрка zákonů (2014).
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 12, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6)
- Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., & Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 398). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125657>
- Zhang, N., Tsang, E. P., Wang, K., Fang, J., Li, Y., Zhou, G., & Fang, Z. (2021). Iron-nitrogen co-doped carbon nanotubes decorated with Cu₂O possess enhanced electronic properties for effective peroxydisulfate activation. *Science of the Total Environment*, 764. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142813>
- Zhang, W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1).

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

DT50 – poločas rozkladu

EEA - European Environment Agency

EFSA - European Food Safety Authority

EMA - Evropská agentura pro léčivé přípravky

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

GUS - Groundwater Ubiquity Score

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

K – rychlostní konstanta

MRL - maximální hladiny reziduí

MZd - ministerstvo zdravotnictví

NDIR – nedisperzní detektor infračerveného záření

NSAID - nesteroidní protizánětlivá léčiva

PPDB - The Pesticide Properties DataBase

R^2 – koeficient determinace

SCF - Scientific Committee on Food

TOC – celkový organický uhlík