

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Odpověď půdního mikrobiálního společenstva na aplikaci
farmak přítomných v zavlažovacích vodách se zaměřením
na irbesartan**

Bakalářská práce

Anna Košinová

Školitel: RNDr. Alica Chroňáková, Ph.D., ÚPB, AV ČR

Školitel – specialista: MSc. Zuzana Frková, Ph.D., ÚPB, AV ČR

České Budějovice, 2019

Košinová A. (2019): Odpověď půdního mikrobiálního společenstva na aplikaci farmak přítomných v zavlažovacích vodách se zaměřením na irbesartan [Response of soil microbial community to the application of pharmaceuticals present in irrigation waters with a focus on irbesartan, Bc. Thesis, in Czech] 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Lidská léčiva se dostávají do prostředí a mohou mít vliv na živé organismy. Mikroorganismy některá léčiva dokáží rozkládat nebo přeměňovat. Tato práce se zabývá bakteriemi ze zemědělské půdy obohacené léčivem irbesartanem a jejich schopností toto farmakum transformovat.

Annotation

Human pharmaceuticals can enter the environment and effect living organisms. Microorganisms have the potential for biodegradation or biotransformation of some of these drugs. This thesis deals with bacteria isolated from agricultural soil amended with pharmaceutical irbesartan and their ability to transform it.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí práce, RNDr. Alici Chroňákové, PhD., a RNDr. Anně Koubové, Ph.D, dále Ing. Martině Petrlíkové a MSc. Zuzaně Frkové, Ph.D. Také bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Romanu Grabicovi, Ph.D. a Ing. Adamu Boříkovi za analytické zpracování vzorků. Práce byla vypracována na BC AV ČR v laboratořích ÚPB. Práce byla financována z projektu: Chování léčiv v systému voda-půda-rostlina GA ČR (2017-2019), No. 17-08937S (hlavní řešitel: prof. Ing. Radka Kodešová, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha, spoluřešitelé: doc. Roman Grabic, PhD., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, RNDr. Alica Chroňáková, PhD., Biologické centrum AV ČR, Ústav půdní biologie, České Budějovice).

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Vstup léčiv do prostředí	2
2.1.1 Odpadní voda	2
2.1.2 Čistírenské kaly	3
2.2 Vliv léčiv na prostředí a živé organismy	4
2.2.1 Mikroorganismy	4
2.2.2 Půdní živočichové	6
2.2.3 Vstup léčiv do rostlin	6
2.3 Mikrobiální přeměna a rozklad léčiv v prostředí	7
2.4 Irbesartan, jiné sartany a jeho využívání	9
2.4.1 Koncentrace irbesartanu a příbuzných látek v prostředí	12
2.4.2 Eliminace irbesartanu v ČOV	13
2.4.3 Sorpce irbesartanu	14
2.4.4 Transformace irbesartanu	14
3 Metodika	16
3.1 Charakteristika půdy	16
3.2 Úprava a inkubace půdy	16
3.3 Složení a příprava kultivačních médií	17
3.3.1 Pevná media	17
3.3.2 M9 tekuté medium	18
3.4 Izolace bakterií	18
3.5 Izolace DNA a PCR	19
3.6 Stanovení sekvence nukleotidů metodou Sangerova sekvenování	21
3.7 Degradace irbesartanu bakteriemi	21
3.8 Statistické zpracování dat	23
4 Výsledky	24

4.1 Izolace bakterií a zařazení do druhů	24
4.2 Transformace irbesartanu.....	28
4.2.1 Vliv přísadků a přítomnosti irbesartanu na růst bakterií.....	31
4.2.2 Vliv bakterií na změnu koncentrace irbesartanu v kultivačním médiu.....	34
5 Diskuze	37
5.1 Izolace bakterií.....	37
5.2 Nárůst bakterií.....	38
5.3 Transformace irbesartanu.....	38
6 Závěr.....	41
7 Použitá literatura.....	42
7.1 Internetové zdroje	50
8 Obrazová příloha	52

Seznam použitých zkratek

ATC skupiny	Anatomicko–terapeuticko–chemické skupiny
BSA	Hovězí sérový albumin
ČOV	Čistička odpadních vod
DDD	Definovaná denní dávka
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PE	Polyethylen
RPM	Rotace za minutu
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TE pufr	Tris/EDTA pufr

1 Úvod

U některých kontaminantů, jako jsou polyaromatické uhlovodíky, ropné uhlovodíky, azbest nebo některé pesticidy, je znám jejich nebezpečný vliv na lidské zdraví a prostředí. Nicméně do prostředí se každoročně během výrobního procesu nebo s průmyslovým odpadem dostává více než 80 000 různých syntetických látek (Naidu a kol., 2016). Nově objevené nebo nově vyvinuté organické kontaminanty, mezi které patří například výrobky osobní péče, lidská a veterinární léčiva nebo pesticidy, mohou být také škodlivé pro lidi nebo prostředí (Li, 2014).

Je známo, že insekticidy mohou zvyšovat úmrtnost larev i dospělců hmyzu (i těch, na něž nejsou cíleny), narušit produkci vajíček, inhibovat růst nebo narušit jejich stravovací návyky. Lidská a veterinární léčiva mohou například ohrozit vývoj a fyziologii hmyzu, vývoj bezobratlých, způsobit hormonální poruchy u ryb a ovlivnit jejich biochemii, steroidy a estrogény mohou narušit rozmnožování ryb a obojživelníků (Naidu a kol., 2016). Mnoho léčiv je tzv. pseudo-persistentních: jsou natolik často používané, že jsou nepřetržitě dodávány do prostředí, a tak se zdá, že v něm přetrvávají. Léčiva jsou navíc na rozdíl od jiných polutantů navrhována tak, aby byla účinná v malých koncentracích. Často také působí na specifické cíle konzervované napříč životními formami (Carraciolo a kol., 2014).

Řada těchto nových kontaminantů je nedostatečně regulovaná a mnoho jich nepodléhá žádným nařízením (Li, 2014). U mnoha kontaminantů chybí informace o toxicitě a jejich osudu v prostředí, což ztěžuje snahu regulačních úřadů o vytvoření předpisů o zacházení s těmito látkami (Naidu a kol., 2016).

Koncentrace léčiv v prostředí závisí na jejich spotřebě, jaká část spotřebovaných léčiv se dostává do prostředí a jak v prostředí přetrvávají. Persistence léčiv v prostředí závisí na mnoha faktorech, zejména na přítomnosti mikroorganismů schopných léčivo rozložit (Carraciolo a kol., 2014). Irbesartan, hojně užívané léčivo na vysoký tlak, na které se zaměříme v praktické části práce, je jedno z nejčastěji se vyskytujících léčiv ve vodách odcházejících z evropských čističek odpadních vod (Loos a kol., 2013).

Cíle:

- Shrnout dosavadní poznatky o léčivech v prostředí a jejich biodegradaci, se zaměřením na půdu.
- Shrnout dosavadní poznatky o léčivu irbesartanu v prostředí.
- Izolovat bakterie z půdy obohacené o irbesartan.
- Testovat tyto kmeny na schopnost transformovat irbesartan.

2 Literární přehled

2.1 Vstup léčiv do prostředí

Léčiva vstupují do prostředí zejména skrze čističky odpadních vod, kde jsou kromě domácností významným zdrojem léčiv nemocnice a také odpadní voda z průmyslové výroby. Léčiva z čističek odcházejí jednak s přečištěnou odpadní vodou, ale také s čistírenskými kaly, které se používají jako hnojiva. Důležitým zdrojem léčiv v prostředí jsou také septiky. Méně významným zdrojem je pak průsak ze skládek komunálního odpadu (Li, 2014).

2.1.1 Odpadní voda

Odpadní voda, která byla zneškodněna v čističce odpadních vod (ČOV), může být vypouštěna do povrchových vod (zákon č. 254/2001 Sb). Zavlažování půdy odpadní vodou a léčivy v ní obsaženými může mít vliv na její mikrobiální společenstvo. Léčiva však nejsou jediným faktorem ovlivňujícím mikroorganismy při použití odpadních vod k zavlažování. Dlouhodobé zavlažování půdy v Mexiku odpadní vodou zvýšilo mikrobiální biomasu díky přísunu živin a snadno degradovatelné organické hmoty z odpadní vody. Nicméně zvyšující se salinita půdy měla negativní vliv na bazální respiraci, denitrifikační aktivitu a způsobila další nežádoucí účinky (Friedel a kol., 2000). Naproti tomu studie zkoumající půdu po 40 letech zavlažování recyklovanou vodou (voda dále čištěná po úpravě v čističce) nezaznamenala žádný významný rozdíl v počtu mikroorganismů a složení mikrobiálního společenstva oproti půdě zavlažované podzemní vodou (Li a kol., 2019a).

Odpadní voda obsahuje léčiva vyloučená lidmi ve formě reziduí původních látek či jejich metabolitů. Léčiva se totiž v lidském těle metabolizují jen z části (různě velké, podle druhu léčiva) a zbytek je vyloučen. Tyto látky pak putují do ČOV, kde jsou, opět podle druhu farmaka, různou mírou z vody odstraněna nebo přeměněna na jinou sloučeninu (Oosterhuis a kol., 2013, Fick a kol., 2011). Některá léčiva jsou odstraněna téměř kompletně, u jiných, jako například karbamazepinu, může být jejich koncentrace po úpravě vody naopak vyšší než při vstupu do čističky (Gao a kol., 2016, Fick a kol., 2011). U některých léčiv je míra odstranění zhruba stejná ve všech vzorcích odebraných z různých ČOV, u jiných se velmi liší. Například haloperidol je v některých ČOV odstraněn z více než 90 %, ale v jiných je jeho koncentrace vyšší na výstupu z ČOV než při vstupu. (Fick a kol., 2011).

V monitoringu prováděném ve Švédsku byla pouze 3 léčiva ze 101 sledovaných (paracetamol, tetracyklin a dipyramidol) v ČOV odstraněna z více než 95 %. Dále 5 léčiv bylo odstraněno z 80–94 %, 18 léčiv z 50–79 %, 42 léčiv z 10–49 %, 7 léčiv z 0–9 %. U 17 (např. klindamycin, fentanyl, tramadol, risperidon, glimeridin) byla naměřena vyšší koncentrace při výstupu

z čističky než při vstupu (Fick a kol., 2011). U některých léčiv může být tato zdánlivá produkce farmaka způsobena uvolněním z konjugované formy, ale abychom tomuto procesu mohli porozumět, bylo by třeba dalších studií o transformaci léčiv v ČOV (Gao a kol., 2016). Ostatní sledovaná léčiva nebyla detekována ani při vstupu do ČOV. Ve vodě vstupující do ČOV měl v průměru nejvyšší koncentraci paracetamol, kdežto ve vodě opouštějící ČOV diklofenak. Léčiva ve vodě opouštějící ČOV vstupují dále z prostředí do živých organismů. Ze 101 sledovaných léčiv bylo 66 detekováno v povrchové vodě, 26 i ve vodě pitné. Dvacet tři druhů farmak bylo detekováno i v okounech, nejvíc v rybě odchycené v okolí ČOV, přičemž koncentrace léčiv v okounech korelovala s koncentracemi léčiv ve vodě (Fick a kol., 2011). Léčiva se do půdy mohou dostat i zavlažováním recyklovanou vodou (tedy odpadní vodou, která prošla ČOV a poté byla dále čištěna), například v USA byly nejčastěji detekovány erythromycin, karbamazepin, fluoxetin, a difenhydramin. Koncentrace léčiv se pohybovala mezi 0.02–15 µg/kg suché půdy (Kinney a kol., 2019).

Ve studii, která monitorovala léčiva a výrobky osobní péče (opalovací přípravky, desinfekce, konzervanty) ve dvou velšských řekách (Velká Británie), se jejich celkové množství vstupující do těchto řek odhaduje na 6 kg za den (Kasprzyk-Hordern a kol., 2008).

2.1.2 Čistírenské kaly

Čistírenský kal je odpadní produkt čištění odpadních vod, který může svým vysokým obsahem organické hmoty a živin zlepšit kvalitu půdy, a proto se v některých zemích používá jako hnojivo (Li, 2014). Kaly mohou obsahovat léčiva z odpadní vody. Nejvyšší naměřená koncentrace léčiva ve vysušeném čistírenském kalu ze 73 detekovaných farmak celkem z čističek ve Švédsku, byla naměřena u antimykotika ketokonazolu, a to 1,8 mg/kg vysušeného kalu. Koncentrace telmisartanu v kalech (celkem 4 vzorky) se pohybovala mezi 0,13–1,4 mg/kg a koncentrace irbesartanu od 37–280 µg/kg (Fick a kol., 2011).

Po aplikaci kalů se z něj do půdy uvolňují léčiva, která mohou dále kontaminovat spodní vody. Léčiva se liší v tom, jak moc se z kalů uvolňují. Ve velkém množství se uvolňuje například ibuprofen. Dále se může uvolňovat paracetamol, diklofenak nebo kyselina salicylová. Naproti tomu například karbamazepin nebo sulfametaxazol se z kalů uvolňují minimálně (Lachassagne a kol., 2015). Některá léčiva se uvolňují rychleji pod povrchem než na povrchu půdy (Al-Rajab a kol., 2015). V České republice se podle zákona kaly musí zapravit do půdy. Pokud půda podle výsledků agrochemických rozborů potřebuje dodat živiny, může se hnojit 5 tunami sušiny kalů na hektar, pokud je v kalu koncentrace všech sledovaných látek (např. polychlorovaných bifenyly, polycyklických aromatických uhlovodíků, kadmia nebo olova)

pod polovinou limitu, pak i 10 tunami na hektar (Vyhláška č. 437/2016 Sb.). Pokud tedy použijeme nejvyšší koncentrace farmak v kalech podle Fick a kol. (2011), pak při použití 5 tun čistírenských kalů může do půdy vstoupit až 9 g/ha ketokonazolu, 7 g/ha telmisartanu a 1,4 g/ha irbesartanu. Sečteme-li koncentrace všech léčiv např. z čističky v Uppsale (Fick a kol., 2011), do půdy by se dostalo 37 g/ha léčiv celkem.

2.2 Vliv léčiv na prostředí a živé organismy

2.2.1 Mikroorganismy

V biogeochemických cyklech a degradaci organických kontaminantů mají důležitou roli půdní mikroorganismy. Léčiva v půdách mohou ovlivňovat množství (biomasy), složení a funkčnost mikrobiálního společenstva a snížit tak kvalitu půdy. Osud léčiva v půdě závisí na mnoha faktorech jako jeho rozpustnost, lipofilnost, teplota, pH, na povrchu půdy pak i dopadající sluneční záření. Jedním z nejdůležitějších faktorů je ale přítomnost mikroorganismů schopných léčivo degradovat (Caracciolo a kol., 2015). Velmi důležitá je také sorpce léčiva na půdní částice (Wu a kol., 2015). Lepší sorpce léčiva na půdní částice má za následek jeho menší dostupnost pro živé organismy. Větší podíl organické hmoty obvykle znamená lepší sorpci farmak v půdě, protože většina léčiv je spíše hydrofobních. Sorpci také ovlivňuje pH a zda je léčivo ve formě aniontu, kationtu nebo zwitterionu (molekula s pozitivním i negativním nábojem) (Pan a kol., 2008). Nicméně určit přesné koncentrace léčiv, na které bakterie reagují je složité, jednak kvůli různé dostupnosti farmak pro živé organismy a také proto, že léčiva i mikroorganismy nejsou v půdě rozmístěny stejnoměrně (Jechalke a kol., 2014).

Léčiva mohou inhibovat některé skupiny mikroorganismů a prospět jiným. V přítomnosti diklofenaku, nesteroidního protizánětlivého léčiva, dochází k obohacení mikrobiálního společenstva zemědělské půdy o bakterie z kmenů *Proteobacteria*, *Aktinobacteria* a bakterie z řádu *Gemmatimonadales* (Thelusmond a kol., 2018). Ve vysokých koncentracích diklofenak u bakterií inhibuje syntézu DNA (Caracciolo a kol., 2015). V přítomnosti antiepileptika karbamazepinu dochází k obohacení společenstva o bakterie kmenů *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Aktinobacteria*, *Proteobacteria* (Thelusmond a kol., 2018). Ibuprofen může mít antifungální a inhibiční účinky proti gram-pozitivním bakteriím (Caracciolo a kol., 2015).

Nesteroidní protizánětlivá léčiva (diklofenak, naproxen, ibuprofen a ketoprofen) ve studii Cycoń a kol. (2016) stimulovali mikrobiální aktivitu v půdě (substrátem indukovanou respiraci a enzymatickou aktivitu), přičemž efekt vzrůstal s vyšší koncentrací léčiv. Nicméně během prvních 15 dnů po aplikaci naproxenu, ibuprofenu a ketoprofenu dočasně poklesly počty kultivovatelných bakterií a hub, poklesla substrátem indukovaná respirace a aktivita enzymů

alkalické fosfatázy PHOS–H a PHOS–OH. Dále bylo zjištěno, že v dalších fázích experimentu (celkem 90 dnů) vzrůstaly počty heterotrofních bakterií a hub, to by podle autorů studie mohl být důsledek obohacení půdy mikroorganismy schopnými využívat léčiva jako zdroj uhlíku a energie.

V další studii sledovali Yan a kol. (2018) odpověď mikrobiálního společenstva z rhizosféry na karbamazepin a několik antibiotik v uměle vybudovaném mokřadu. Změny ve složení mikrobiálního společenstva sledovali po jednom roce pomocí analýzy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) a měřením enzymatické aktivity. Nejvyšší obsah PLFA byl zjištěn při nízkých koncentracích léčiv (10–30 µg/l) a v kontrole bez léčiv oproti vyšším koncentracím (100–500 µg/l). Při aplikaci vyšších koncentrací (100–500 µg/l) zjistili pokles u gramnegativních a aerobních bakterií a jednonenasycených mastných kyselin. Na enzymatickou aktivitu (kataláza, ureáza, dehydrogenáza) neměly vliv ani koncentrace 500 µg/l (Yan a kol., 2018). V jiné studii Zhang a kol., (2016) s umělým mokřadem byla pozorována změna v mikrobiálním společenstvu a snížení jeho celkové diverzity v přítomnosti ibuprofenu. V mokřadním sedimentu s přidávkem ibuprofenu byl po 7 měsících větší podíl aktinobakterií a tříd *Bacilli* a *γ-Proteobacteria*. V přítomnosti rostlin došlo v mikrobiálním společenstvu vlivem ibuprofenu k menším změnám v taxonomickém složení než v kontrole bez rostlin.

Speciální kategorií léčiv jsou antibiotika. Jejich dopad na mikroorganismy je více prozkoumaný než u jiných léčiv. Předpokládá se, že antibiotika a jiné antimikrobiální látky (např. antifungální, antiparazitická léčiva) přímo ovlivňují složení půdního společenstva tím, že negativně ovlivňují některou jeho složku a tím upřednostňují jinou. Takové příklady popsali např. Jechalke a kol. (2014), a Thiele Bruhn a Beck (2015). Antibiotika v půdě mohou, stejně jako ostatní farmaka, potlačit některé druhy bakterií a způsobit navýšení počtu jiných druhů. Například přítomnost sulfadiazinu a ofloxacinu navyšuje podíl gram-pozitivních bakterií. (Jechalke a kol., 2014). Antibiotika mohou také snížit počet bakterií v půdě a navýšit podíl hub i v koncentracích vyskytujících se v prostředí (Thiele-Bruhn a Beck, 2005).

Množství antibiotik snižující mikrobiální aktivitu o 10 % se, v závislosti na druhu antibiotika a míře sorpce na půdní částice, pohybovalo od 0,003 mg/kg do 7,35 mg/kg půdy (Thiele-Bruhn a Beck, 2005). Antimikrobiální látka triklosan, používaná v mýdlech a šamponech, snížila mikrobiální respiraci v jílové půdě, ale ne v písčité. Nitrifikaci ale triklosan ovlivnil v obou půdách: v písčité půdě už při koncentraci 5 mg/kg, v jílové až v koncentraci 50 mg/kg (Waller a Kookana, 2008). Efekt antibiotika na mikroorganismy ovlivňují vlastnosti půdy, hlavně jeho sorpce na organické částice v půdě. Půdní pH může zvýšit inhibici

mikroorganismů amfoterními antibiotiky (mohou reagovat s kyselinami i zásadami) (Thiele-Bruhn, 2004).

Antibiotika vyskytující se v prostředí, v koncentracích menších, než jsou dávky inhibující bakterie, mohou urychlit vytvoření rezistence (Jechalke a kol., 2014). Přítomnost rezistentních i multi-rezistentních patogenních bakterií byla zjištěna v odpadních vodách a v ČOV (Picó a Andreu, 2006). Koncentrace antibiotik v půdě pravděpodobně úzce koreluje s výskytem transpozonů a genů nesoucích rezistenci vůči antibiotikům. Výskyt rezistencí vůči antibiotikům může zvyšovat také přítomnost těžkých kovů v hnoji. Stejný efekt mohou mít i dezinfekce používané na farmách. Hnojení také může zvyšovat ochotu bakterií přijímat cizí plasmidy. Hnůj může zvyšovat výskyt rezistencí i pokud se v něm antibiotikum nenalézá (Jechalke a kol., 2014).

2.2.2 Půdní živočichové

Na půdní živočichy mohou mít vliv zejména antiparazitická léčiva. Toxické je pro půdní bezobratlé například kokcidiostatikum monensin, které má vliv na reprodukci chvostoskoka *Folsomia fimetaria* a roupice *Enchytraeus crypticus* (Jensen a kol., 2009). Antiparazitikum ivermektin má vliv na mortalitu a reprodukci chvostostoka *Folsomia candida*. V druhé a třetí generaci vystavené ivermektinu bylo méně chvostostoků než v první generaci, ale byli větší (Guimarães a kol., 2019). Dále bylo zjištěno, že diklofenak ovlivňuje růst a vývoj *F. candida* (Chen a kol., 2015). Zvyšování dávek diklofenaku mělo za následek vyšší mortalitu *F. candida*. Byla také pozorována větší aktivace genů asociovaných s imunitou proti bakteriím a houbám. Ve vysokých koncentracích diklofenaku byl pozorován i vliv na nervovou soustavu. Léčiva, která se z půdy dostanou do žížal, mohou ovlivňovat jejich vnitřní pH. Příjem a akumulace léčiv v žížalách jsou závislé na typu půdy (Carter a kol., 2016).

2.2.3 Vstup léčiv do rostlin

Léčiva z půdy do rostlin vstupují kořeny. Poté se transpirací nebo difuzí přemísťují do různých tkání, včetně těch, které dále konzumujeme, a mohou mít vliv na zdraví a výnos rostliny. Akumulace farmak v rostlinách může inhibovat jejich růst nebo snižovat množství fotosyntetických pigmentů (Madikizela a kol., 2018). Různé druhy rostlin mají různý potenciál akumulovat farmaka. Nejvíce polutanty, včetně farmak, akumuluje listová zelenina, po nich kořenová zelenina, dále obiloviny a píce, nejméně zelenina tvořící plody (např. okurky, rajčata) (Christou a kol., 2019).

Léčiva jsou rostlinami přijímána více ve formě aniontů než ve formě kationtů nebo neutrální podobě. Méně jsou rostlinami také přijímána léčiva s velkou molekulovou hmotností (Li a

kol., 2019b). Dále má vliv na příjem léčiva rostlinou hydrofobnost a rozdělovací koeficient oktanol/voda a rozdělovací koeficient oktanol/vzduch. Sloučeniny s molekulovou hmotností pod 1000 g/mol a vysokým rozdělovacím koeficientem oktanol/voda, jako např. lék proti epilepsii dilantin, jsou dobře přijímány rostlinami (Madikizela a kol., 2018).

Příjem léčiv atenololu, sulfametaxazolu a karbamazepinu rostlinami byl testován na polníčku (*Valeriana locusta* L.), špenátu (*Spinacea oleracea* L.), rukole (*Eruca sativa* L.) a ředkvi (*Raphanus sativus* L.) ve 13 půdách. Léčiva ani při koncentraci 2 µg/g suché půdy, což je výrazně vyšší koncentrace, než se v prostředí vyskytuje, neovlivnila růst rostlin. Všechna sledovaná léčiva se v rostlinách akumulovala, zejména pak karbamazepin. Ten byl metabolizován v listech rostlin, výrazně nejlépe v listech polníčku. (Kodešová a kol., 2019). V další studii byl zkoumán příjem 13 kontaminantů (10 farmak včetně valsartanu, 2 transformačních produktů, včetně kyseliny valsartanové, a kokainu) hlávkovým salátem. Hlávkový salát obsahoval všechna testovaná farmaka v listech. Nejvyšší koncentrace v listech měl karbamazepin (1 500 ng/g sušiny) (Montemurro a kol., 2017). Valsartanová kyselina detekovaná v listech je produktem transformace valsartanu, ale i irbesartanu (kterým se zabýváme v praktické části), kandesartanu a olmesartanu (Letzel a kol., 2015).

2.3 Mikrobiální přeměna a rozklad léčiv v prostředí

Mikroorganismy rozkládají organické látky včetně xenobiotik a poskytují tak živiny jiným organismům. Biodegradace je považována za hlavní proces odstraňující léčiva z prostředí (Caracciolo a kol., 2015). Léčiva mohou být mikroby rozkládána metabolicky, kdy je léčivo použito jako zdroj energie, uhlíku, dusíku a dalších látek, nebo ko-metabolicky, kdy je léčivo rozloženo enzymem nebo kofaktorem produkovaným během metabolismu jiné sloučeniny. Produkty rozkladu farmak mohou být méně nebo více toxické než původní látka. Například produkt světelného rozkladu naproxenu je výrazně toxičtější, než původní látka (Caracciolo a kol., 2015). Toxické látky mohou vznikat abioticky (chlorací, ozonací, působením UV) i bioticky. Mezi léčiva, jejichž metabolity mohou být v prostředí toxické patří například kyselina acetylsalicylová, karbamazepin, diklofenak a sulfonamidy (Celiz a kol., 2009).

Diklofenak a ibuprofen se málo sorbují na půdní částice a mohou představovat větší riziko pro čistotu podzemní vody, protože se pomalu degradují v podpovrchové aerobní části půdy (Lin a Gan, 2011). Biodegradace diklofenaku pozitivně ovlivňuje metabolismus lysinu, mastných kyselin, benzoátu a propionátu (Thelusmond a kol., 2018).

Některá farmaka jako například karbamazepin, kofein nebo sulfometaxazol v půdě dlouhodobě přetrvávají. Oproti tomu jiná, jako např. diklofenak, ibuprofen nebo naproxen se rozkládají, ať už jim půda předtím byla nebo nebyla vystavena (Grossberger a kol., 2013).

Bakteriální degradace léčiva může být pomalejší, pokud je v půdě více léčiv, než kdyby v půdě bylo jediné (Monteiro a kol., 2009). V prostředí jsou ale mikroorganismy vystaveny směsi různých léčiv (Caracciolo a kol., 2015). V biodegradaci také hraje roli složení již výše zmíněného mikrobiálního společenstva. Například, v laboratorním pokusu Bastos a kol. (2002) bakterie lépe rozkládaly rozpouštědlo 1,3-dichloro-2-propanol v konsorciu než samostatně, což může být způsobeno jejich mutualistickými interakcemi.

Ve studii Zhou a kol. (2013) byly izolovány bakterie z médií zaočkovaných aktivovaným čistírenským kalem schopné rozkládat produkt osobní potřeby triklosan a léčiva bisphenol A, ibuprofen, 17 β -estradiol a gemfibrozil. Většina izolátů degradovala tyto kontaminanty v raných fázích růstu a za přítomnosti bohatého zdroje uhlíku. Bylo zjištěno, že tři z 11 izolovaných kultur rozložily kontaminanty na koncentrace pod limitem kvantifikace, když byl jejich nárůst pod polovinou konečné optické hustoty a 5 izolátů při nárůstu pod čtvrtinou konečné optické hustoty. Nejrychleji byl kontaminant rozložen za 4,2 hodin, nejpomaleji za 120 hodin. U všech sledovaných kontaminantů byla detekována alespoň jedna bakteriální kultura, která ho rozložila na koncentrace pod limit kvantifikace během 24 hodin. Bakterie byly schopné degradovat pouze látky, kterými bylo obohaceno médium, z něhož byly původně izolovány. Sedm z jedenácti izolovaných bakterií byly sphingomonády. Další bakterie byly z rodů *Rhodococcus*, *Nubsella* a *Isoptericola*, ty rozkládaly 17 β -estradiol, a *Bacillus*, který rozkládal gemfibrozil.

V pokusu s biodegradací kyseliny klofibrové, ibuprofenu, naproxenu, triklosanu, diklofenaku a bisfenolu A ve vzorcích čtyř zemědělských půd byl pozorován pomalejší úbytek těchto látek, pokud byla počáteční koncentrace vyšší (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vlhké půdy oproti 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Degradace léčiv probíhala rychleji v půdách s větším množstvím organické hmoty a jílových částic (Xu a kol., 2009). Ibuprofen je rozkládán např. bakteriemi rodu *Nocardia* nebo *Sphingomonas*. Při jeho degradaci mohou bakterie upřednostňovat jeho R(-) isomer (Caracciolo a kol., 2015). Ibuprofen je toxičtější než mix jeho rozkladných produktů, ale například pro zelenou řasu rodu *Chlorella* je toxičtější hlavní rozkladný produkt ibuprofenu, kyselina 4-acetylbenzoová (Rubasinghege a kol., 2018). Naproxen může být degradován některými proteobakteriemi z říční vody. Degradace naproxenu byla také prokázána u aerobní Gram-negativní bakterie *Stenotrophomonas maltophilia*, ale byla zároveň doprovázena poklesem množství buněk,

nejspíš proto, že naproxen nebyl dostačujícím zdrojem uhlíku. V degradaci naproxenu hrají roli i houby. Houba z čeledi chorošovitých, *Trametes versicolor*, rozkládá kromě naproxenu také ibuprofen nebo karbamazepin (Caracciolo a kol., 2015).

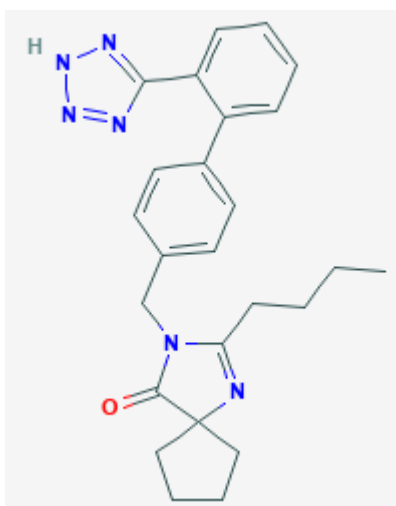
Biologickou degradaci léčiv v prostředí významně ovlivňuje dostupnost kyslíku. Při biologickém čištění odpadních vod se v anaerobních podmínkách podařilo odstranit léčiva venlafaxin, diatrizoát a tramadol, která v aerobních podmínkách přetrvávala (Falås a kol., 2016). Naproti tomu například diklofenak, ibuprofen, naproxen a trimethoprim jsou dobře rozkládány v aerobním prostředí, ale bez přístupu kyslíku v půdě přetrvávají (Caracciolo a kol., 2015).

Při mikrobiální degradaci léčiv, zejména antibiotik je důležité, aby látka neinhibovala aktivitu půdního mikrobiálního společenstva (Caracciolo a kol., 2015). V půdě může docházet k biodegradaci antibiotik tetracyklinu, sulfamethazinu, norfloxacinu, erythromycinu, a chloramphenikolu, nicméně vyšší koncentrace antibiotik jejich degradaci zpomaluje (Pan a Chu, 2016).

2.4 Irbesartan, jiné sartany a jeho využívání

Irbesartan, viz. Obr. 1, (obchodními názvy také Aprovel®, Avapro®, Irbetan®, Karvea®) patří do skupiny léčiv sartanů, antagonistů receptoru pro angiotenzin II (blokuje receptor pro angiotenzin II), čímž snižuje krevní tlak (Croom a Plosker, 2008). Do této skupiny patří řada dalších léčiv, například losartan, valsartan, eprosartan, telmisartan nebo kandesartan (SÚKL: Státní ústav pro kontrolu léčiv, ATC skupiny: Anatomicko–terapeuticko–chemické skupiny). Používá se k léčbě vysokého tlaku a také nefropatie (onemocnění ledvin) u pacientů s vysokým tlakem a cukrovkou 2. typu (Croom a Plosker, 2008). Irbesartan se užívá jednou denně. Doporučená denní dávka pro pacienty s vysokým tlakem je 150 mg, pacienti s vysokým tlakem a cukrovkou užívají 300 mg/den (Příbalová informace, Irbesartan Actavis, SÚKL). Jeho účinek trvá 24 hodin, a poločas jeho odstranění z těla je 11–16 hodin. V lidském těle je metabolizován isozymem 2C9 cytochromu P450 a jeho metabolity mají minimální farmakologickou aktivitu (Croom a Plosker, 2008).

Strukturní vzorec irbesartanu je $C_{25}H_{28}N_6O$, systematický název 2-n-butyl-3-((2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl)-1,3-diazaspiro(4,4)non-1-en-4-one. Jeho molekulová hmotnost je 428,54 g/mol. Je prakticky nerozpustný ve vodě a mírně rozpustný v alkoholu a dichlormethanu. Ve 25 °C je jeho odhadovaná rozpustnost ve vodě 59 µg/l (NIH, PubChem Database, Irbesartan).



Obr. 1: Molekula irbesartanu (NIH, PubChem Database, Irbesartan).

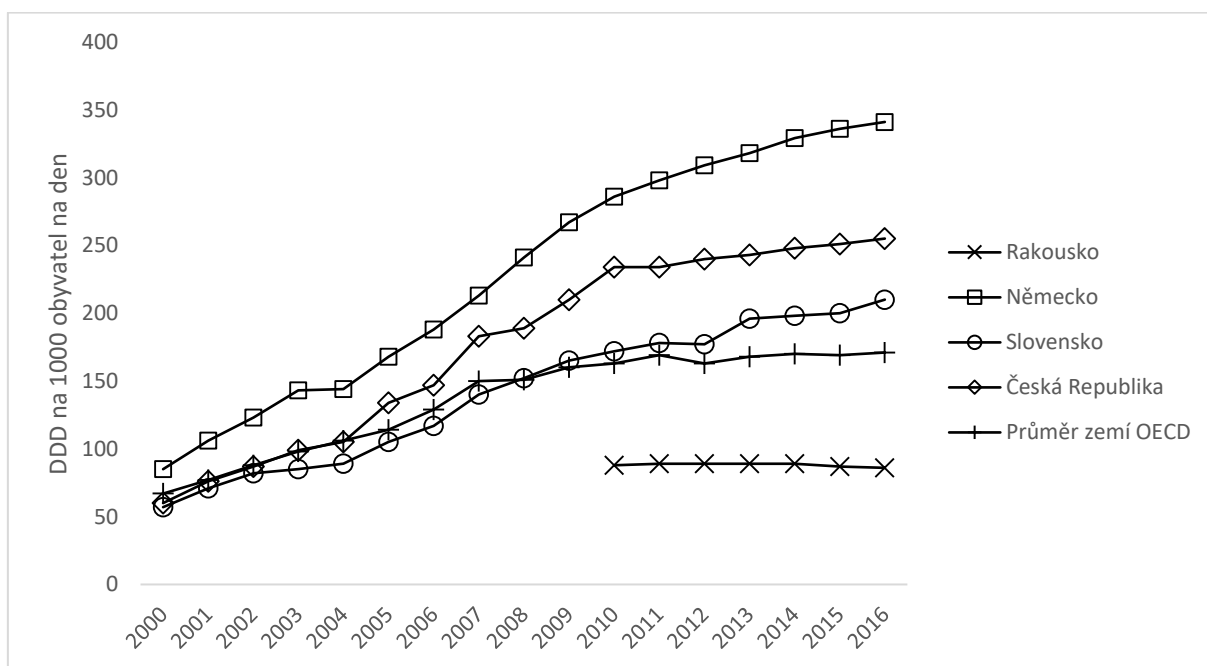
Sartany patří do skupiny C09 (Léčiva ovlivňující renin-angiotenzonový systém). Prodej těchto léčiv se od roku 2000 do roku 2016 značně zvýšil (viz. Obr. 2), nicméně tyto údaje zahrnují kromě sartanů také ACE inhibitory a inhibitory reninu (SÚKL, ATC skupiny) a prodej samotného irbesartanu je o dva řády menší. V ČR je prodej léčiv skupiny C09 nad průměrem zemí OECD, o nichž je dostupný záznam, ale například v sousedním Německu je ještě výrazně vyšší (OECD Stat., Pharmaceutical market).

V celkovém množství vydaných definovaných denních dávek (DDD) irbesartanu (viz. Tab. I) můžeme vidět za poslední roky jistý pokles. Údaje v Tab. I jsou, co se týče vydaného množství irbesartanu, spíše orientační, protože tabulka neobsahuje údaje o prodeji irbesartanu v kombinaci s diuretiky. Definovaná denní dávka irbesartanu je 150 mg (WHOCC), což je doporučená denní dávka pro pacienty s vysokým tlakem. (Příbalová informace, Irbesartan Actavis, SÚKL).

Vyšší prodej léčiv ze skupiny sartanů může souviset se stárnutím populace. Průměrný systolický krevní tlak v lidské populaci roste s věkem. Počet pacientů mezi 35 a 74 lety užívajících medikamenty na vysoký tlak byl v Evropě v průměru 26,8 % populace (data z let 1900 až 1999). Podíl lidí s vysokým tlakem ale dosahoval až 44,2 %. (Wolf–Maier a kol., 2003). V USA, v letech 2011 až 2014, mělo vysoký tlak v dospělé populaci (nad 18 let) 29 % lidí. Ve věkové skupině nad 60 let to bylo 64,9 %. Od roku 1999 do roku 2014 nebylo pozorováno zvýšení počtu lidí s vysokým tlakem, ale u více lidí byl diagnostikován (Yoon a kol., 2015).

Tab. I: Prodej irbesartanu v ČR (nejsou uvedeny údaje o prodeji irbesartanu s diuretiky). DDD je definovaná denní dávka, DDD/1000 obyvatel/den je počet definovaných denních dávek vydaných za jeden den 1000 obyvatelům (Dodávky léčiv-se zaměřením na léčivé látky, 2016, 1. kvartál – 2018, 3. kvartál, SÚKL).

Období	Počet balení (celkem za kvartál)	DDD (celkem za kvartál)	DDD/1000 obyvatel/den
2016, 1. kvartál	64 106	3 072 932	3,19
2016, 2. kvartál	67 037	3 231 338	3,36
2016, 3. kvartál	57 049	2 779 762	2,89
2016, 4. kvartál	65 480	3 118 948	3,24
2017, 1. kvartál	61 338	2 980 618	3,09
2017, 2. kvartál	65 468	3 136 394	3,25
2017, 3. kvartál	55 861	2 607 908	2,70
2017, 4. kvartál	59 390	2 863 351	2,97
2018, 1. kvartál	56 080	2 728 792	2,82
2018, 2. kvartál	57 127	2 756 892	2,85
2018, 3. kvartál	52 664	2 526 624	2,61



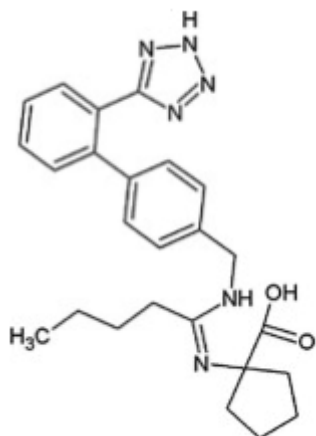
Obr. 2: Prodej léčiv ze skupiny C09 (Léčiva ovlivňující renin-angiotenzonový systém) pro ČR a sousední země, s dostupnými záznamy a průměr zemí OECD s dostupnými záznamy zobrazující počet definovaných denních dávek (DDD) na 1000 obyvatel na den (OECD.Stat, Pharmaceutical market).

2.4.1 Koncentrace irbesartanu a příbuzných látek v prostředí

Nejvíce údajů o koncentraci irbesartanu je z čistírenských vod a z povrchových vod. Málo se ví o koncentracích produktů přeměny irbesartanu, stejně jako o koncentracích irbesartanu v půdách. V těch bývá koncentrace léčiv obecně nižší než ve vodách (Li, 2014). V zemědělské půdě zavlažované recyklovanou odpadní vodou byla zjištěna přítomnost irbesartanu v koncentraci až 5,8 ng/g suché půdy, u jiného sartanu, telmisartanu, však byla naměřena koncentrace až 713 ng/g suché půdy (Martínez-Piernas, 2018).

Koncentrace irbesartanu zaznamenané v odpadních vodách jsou poměrně vysoké. V rámci evropského monitoringu odpadních vod v rámci EU byla zjištěna přítomnost irbesartanu ve všech 90 studovaných vzorcích (Bayer a kol., 2014). Zároveň byl irbesartan mezi farmaky s jednou z vyšších mediánových koncentrací: 85,4 ng/l (celkem testováno 156 mikropolutantů). Jeho průměrná koncentrace byla 480 ng/l a maximální naměřená koncentrace 17,9 µg/l. V této studii pocházelo 7 vzorků odpadních vod z České republiky (Loos a kol., 2013). Další dohledatelné údaje pochází ze Srbska, kde byla v městské odpadní vodě naměřena koncentrace irbesartanu 11,6 ng/l (Petrović a kol., 2014). V Bavorsku byla v letech 2011 a 2012 měřena koncentrace 7 typů sartanů (kandesartan, eprosartan, irbesartan, losartan, olmesartan, telmisartan, valsartan) v řekách a ve vodách vycházejících z ČOV. Bylo zjištěno, že nejvyšší maximální koncentrace mezi sartany měli ve vodě z čističek eprosartan a valsartan. Nejvyšší mediánové koncentrace měl irbesartan: ve vodě z čističky 1,25 µg/l a v říční vodě 0,08 µg/l. V říční vodě měl i nejvyšší maximální koncentraci: 0,8 µg/l.

Koncentrace jednoho z produktů přeměny irbesartanu (viz Obr. 3) byla ve vodě vycházející z čističky stanovena na 440 ng/l, v říční vodě s větším vlivem odpadní vody na 90 ng/l, v Dunaji, kde se předpokládal menší vliv odpadní vody, na 24 ng/l (Letzel a kol., 2015).



Obr. 3: Produkt přeměny irbesartanu detekovaný v říční vodě (Letzel a kol., 2015).

Při monitoringu povrchových vod ve Slovinsku (4 řeky a 1 jezero) se koncentrace irbesartanu pohybovala mezi 0,15 ng/l a 9,33 ng/l (Klančar a kol., 2018). V povrchové vodě v Srbsku se pohybovala od koncentrací pod limitem kvantifikace (1,1 ng/l) do 15,3 ng/l, v pitné vodě byla zjištěna koncentrace do 2,2 ng/l (Petrović a kol., 2014). Ve Španělsku byly v pobřežní mořské vodě na jaře zjištěny koncentrace $0,1 \pm 0,1$ ng/l (průměr \pm směrodatná odchylka), v létě $1,4 \pm 4$ ng/l, na podzim nebyl irbesartan vůbec naměřen a v zimě byla koncentrace $0,2 \pm 0,3$ ng/l. Sezónní výkyvy mohly být dány navýšením počtu lidí v letní sezóně v kombinaci s jejich vyšší aktivitou ve vodě. Vyšší teplota a sluneční záření mohou mít naopak pozitivní vliv na degradaci léčiva (Moreno-González a kol., 2015).

Irbesartan má potenciál se bioakumulovat ve vodním prostředí (Ong a kol., 2018). Irbesartan ale ani v koncentraci 40 μ g/l v kombinaci s dalšími 4 sartany ve stejné koncentraci nevykázal žádné ekotoxické efekty na vodní organismy (Bayer a kol., 2014).

Oosterhuis a kol. (2013) se pokusili odhadnout množství několika farmak včetně irbesartanu přicházejícího do ČOV na základě podílu prodaných léčiv v oblasti a léčiv vyloučených exkrecí. V případě irbesartanu počítali, že se vyloučí 31 % zkonsumovaného léčiva. Pro ČOV, do níž se sváděly odpadní vody města Enschede (Nizozemsko) se 157 tisíci obyvateli, se očekával přítok 20 kg irbesartanu za rok. Očekávaná koncentrace byla odhadnuta na 1,09 μ g léčiva na litr odpadní vody. Skutečná koncentrace však byla nižší, a to 0,62 μ g/l. Nižší skutečná koncentrace irbesartanu oproti odhadované byla zjištěna i u druhé, menší čističky: 1,55 μ g/l oproti 1,88 μ g/l. Kromě metoprololu a sotalolu tomu tak bylo u všech léčiv. Jedním vysvětlením může být, že se léčiv zkonsumuje méně, než kolik se ho prodá, což je běžné pro kardiiovaskulární léčiva. Odhad jiného sartanu, losartanu byl 2–3x větší než naměřená koncentrace. Losartan je ale z velké části v ČOV odstraněn, což podle Oosterhuis a kol., (2013) naznačuje, že je tato látka snadno biodegradovatelná a je z vody odstraněna už v kanalizační síti. Irbesartan v čističce v Enschede byl ale odstraněn jen z 6 % a v druhé čističce byla naměřena dokonce vyšší koncentrace ve vodě vycházející z ČOV (88 μ g/l při výstupu, oproti 0,62 μ g/l při vstupu). Mimo to se irbesartan jen velmi málo sorbuje na čistírenský kal a zdá se být perzistentní ve vodním prostředí.

2.4.2 Eliminace irbesartanu v ČOV

Eliminace irbesartanu v ČOV určuje, kolik ho vstoupí do prostředí. Irbesartan se může eliminovat adsorpcí na částice čistírenského kalu a může být přeměňován mikroorganismy v čistírenském kalu (Boix a kol., 2016a). V laboratorních simulacích ČOV se v 6 vzorcích míra odstranění irbesartanu z vody pohybovala v rozmezí 16–40 %, průměr byl 29 %. Mezi

sartany se tato hodnota lišila. Například valsartan byl odstraněn z 94–98 %, olmesartan ze 7–21 % (Bayer a kol., 2014). V čističkách ze studie prováděné ve Švédsku byl irbesartan v průměru odstraněn z 36 % (Fick a kol., 2011).

Při pokusech se splaškovým kalem v anaerobních podmínkách byl irbesartan znatelně degradován v pevné i vodní fázi, nicméně nebyl zcela eliminován. Koncentrace v pevných fázích byla vyšší, což může být způsobeno adsorpcí organického farmaka na pevné částice složené hlavně z organické hmoty. Irbesartan byl transformován lépe v termofilních podmínkách než v mezofilních (Boix a kol., 2016a).

2.4.3 Sorpce irbesartanu

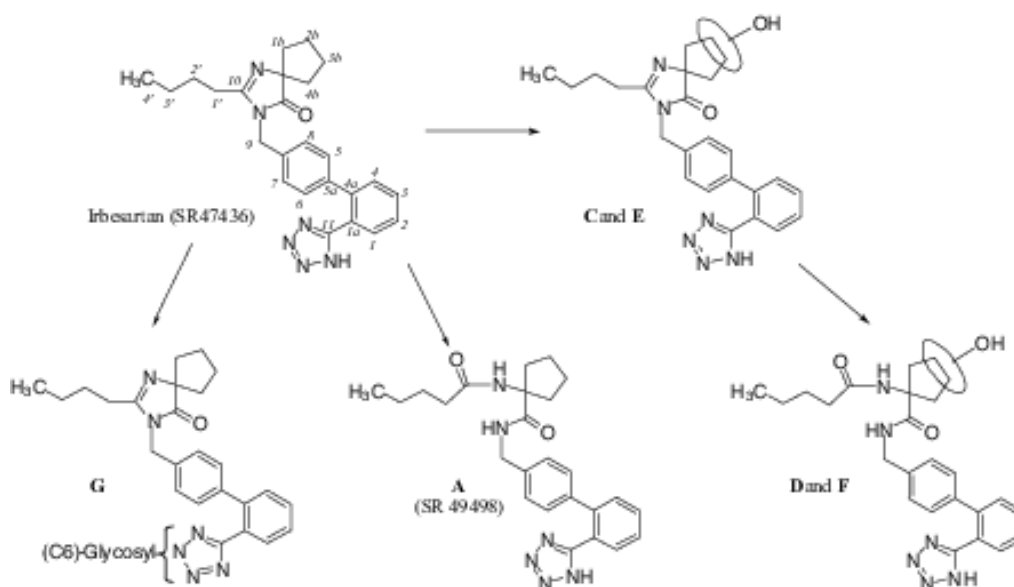
Sorpce a transformace farmak v půdě může vést k vytvoření formací s menší dostupností pro živé organismy. Volně rozpuštěná léčiva mohou být využita mikroby nebo přijata rostlinami (Wu a kol., 2015). Podle Kodešové a kol., (2016), je míra přetrvání léčiva závislá na půdním typu. Léčiva se rychleji eliminují v kvalitnějších půdách. Půdou, ve které dochází k rychlé eliminaci léčiva je i černozem ze stejné lokality, z jaké pochází půda použitá v praktické části práce. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím sorpci léčiva je půdní pH. V závislosti na pH se molekula irbesartanu může vyskytovat ve třech formách: kation, anion a neutrální molekula. Dále byla podle Kodešové a kol., (2016) sorpce irbesartanu pozitivně korelovaná s obsahem organické hmoty v půdě (Cox) a negativně s vysokým obsahem basických kationtů a s nasycením sorpčního komplexu. Sorpce irbesartanu je nejvyšší v kambisolu a arenosolu, kde v roztoku zůstává jenom kolem 20 % léčiva, nejnižší u feozemě a černozemě (haplic černozem), kterou také používáme v praktické části práce, kde v roztoku zůstává kolem 60 %. To je v porovnání s citalopramem, který je prakticky všechn sorbován na půdní složky nebo fexofenadinem, kde v roztoku nezůstane více než 7 % léčiva, poměrně velké množství (Klement a kol., 2018).

2.4.4 Transformace irbesartanu

Irbesartan se může přeměnit působením fyzikálních a chemických vlivů, např. kyseliny nebo zásady, či kyseliny v kombinaci s UV zářením (Shah a kol., 2010) nebo působením mikroorganismů (Alexandre a kol., 2004). Z výsledků pilotních studií usuzujeme, že mikroorganismy mohou přeměňovat irbesartan v námi studované půdě (Chroňáková, osobní sdělení).

Studie Boix a kol. (2016b) zkoumala transformaci irbesartanu v médiu zaočkovaném aktivovaným čistírenským kalem. Za 35 dní bylo odstraněno 25–30 % irbesartanu. Byly také identifikovány rozkladné produkty irbesartanu: isomerické sloučeniny $[C_{25}H_{31}N_6O_2]^+$, vzniklé

hydroxylací a hydrogenací různých částí molekuly a $[C_{24}H_{27}N_6O]^+$, odpovídající demethylovanému irbesartanu. Dále byly detekovány produkty stechiometrickým vzorcem odpovídající oxidaci, nebo alkylation irbesartanu a rovněž oxidaci a následné hydroxylaci molekuly. Podle Alexandre a kol. (2004) patří mezi hlavní mikrobiální metabolity irbesartanu (viz Obr. 4) diastereomerní deriváty hydroxylované na spirocyklopentanovém kruhu (na Obr. 2 C a E), otevřené přeskupené hydroxylované deriváty (D a F) a pravděpodobně N-glykosidový konjugát irbesartanu (G). Pokud je nám známo, vliv produktů přeměny irbesartanu na živé organismy nebyl dosud stanoven.



Obr. 4: Produkty mikrobiální přeměny irbesartanu (Alexandre a kol., 2004).

3 Metodika

3.1 Charakteristika půdy

Lokalita, ze které byla odebrána půda pro laboratorní experimenty, se nachází v blízkosti areálu České zemědělské univerzity v Praze – Suchdolu. Vzorek orné půdy byl odebrán ze svrchní vrstvy 5–20 cm dne 13. 11. 2017. Půda byla klasifikována jako černozem a půdotvorným substrátem byla spraš (Kodešová a kol., 2015). Vybrané charakteristiky půdy ze stejné lokality z jiného odběru jsou uvedeny v Tabulce II. (pH ve vodě a v KCl, podíl organického uhlíku (Cox), podíl uhličitanu vápenatého, kationtová výměnná kapacita (CEC), hydrolytická kyselost (HA), výměnná kyselost (EA), nasycení bazických kationtů (BCS), nasycení sorpčního komplexu (SCS), salinita, hustota částic (ρ_s), podíl jílu, prachu a písku).

Tab. II: Vybrané charakteristiky půdy z jiného odběru v odběrové lokalitě Praha-Suchdol (Kodešová a kol., 2015).

pH (H ₂ O)	8,44	BCS (mmol/kg)	188
pH (KCl)	7,41	SCS (%)	98,1
Cox (%)	0,36	Salinita (μ S/cm)	98,6
CaCO ₃ (%)	20,5	ρ_s (g/cm ³)	2,6
CEC (mmol/kg)	191	Jíl (%)	7,51
HA (mmol/kg)	3,6	Prach (%)	48,31
EA (mmol/kg)	1,13	Písek (%)	44,18

3.2 Úprava a inkubace půdy

Pro izolaci bakterií jsme použili půdy určené pro jiný experiment, který měl za cíl určit vliv irbesartanu na aktivitu mikroorganismů. Jejich příprava probíhala podle následujícího popisu. Půda schla 7 dní na vzduchu a poté byla homogenizována přes 2mm síto. Dále byla skladována v lednici. Do 100ml PE lahvíček bylo naváženo 50 g půdy, obsah vody v půdě byl doplněn 1ml sterilizované vodovodní vody a půda byla předinkubována 4 dny při 20 °C.

První experiment (exp 1), ve kterém byla půda obohacena léčivem irbesartan (CAS: 138402-11-6, >98,0 %, TCI, Japonsko) byl uspořádán následujícím způsobem: vzorky byly zavlaženy roztokem irbesartanu ve dvou různých koncentracích: ve vzorcích označených SI bylo 1,92 μ g irbesartanu na gram vlhké půdy, což se blíží koncentracím nalezeným v prostředí. Ve vzorcích označených SI 100 bylo 192 μ g/g. Irbesartan byl nejdříve rozpuštěn v malém množství etanolu a dále byl rozpouštěn vodou a ředěn na požadovanou koncentraci.

Aplikováno bylo 5 ml roztoku o pracovní koncentraci 19,2 µg/ml. Vzorky označené SC byly kontroly bez irbesartanu.

V druhém experimentu (exp. 2) byla půda zavlažena 5 ml 7% roztoku DMSO ve vodě, do kterého byl přidán irbesartan v různém množství tak, aby výsledná koncentrace irbesartanu byla 0, 1, 10 a 100 µg na gram suché půdy.

Lahvičky v obou experimentech byly volně zašroubované, tak aby mohla volně probíhat výměna plynů. Vzorky byly inkubovány ve tmě při 22 °C, v exp. 1 po dobu 14 dnů, v exp. 2 po dobu 21 dnů. Původní délka inkubace (14 dnů) byla stanovena podle rychlosti degradace irbesartanu ve studované půdě z experimentu, který proběhl o rok dříve (2017, zatím nepublikovaná studie), kdy byla stanovena hodnota DT50 (poločas přeměny irbesartanu) na 29,1 dní a významný pokles koncentrace irbesartanu v půdě byl zaznamenán už po 13 dnech inkubace. Obsah vody v půdě byl pravidelně kontrolován a doplňován na hodnotu polní vodní kapacity sterilizovanou vodovodní vodou.

3.3 Složení a příprava kultivačních médií

3.3.1 Pevná media

R2A pevné medium obsahovalo 15,2 g/l R2A agaru (Merck KGaA, Německo), ke kterému jsme zvláště přidali 2,8 g/l samotného agaru.

M2 medium obsahovalo:

Sladový extrakt	10 g/l
Kvasnicový extrakt	4 g/l
Glukóza	4 g/l
Agar	20 g/l

M2 medium mělo pH upraveno na hodnotu 7,2 – 7,3 pomocí HCl (4 mol/l) nebo NaOH (1 nebo 5 mol/l.) Pro přípravu médií byla použita reverzní osmózou upravená voda. Obě média byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut a rozlita do Petriho misek ve sterilním boxu s laminárním prouděním (TelStar, Biostar).

3.3.2 M9 tekuté médium

M9 médium mělo následující složení:

NH ₄ Cl	1 g/l
Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
2 ml 1M MgSO ₄	

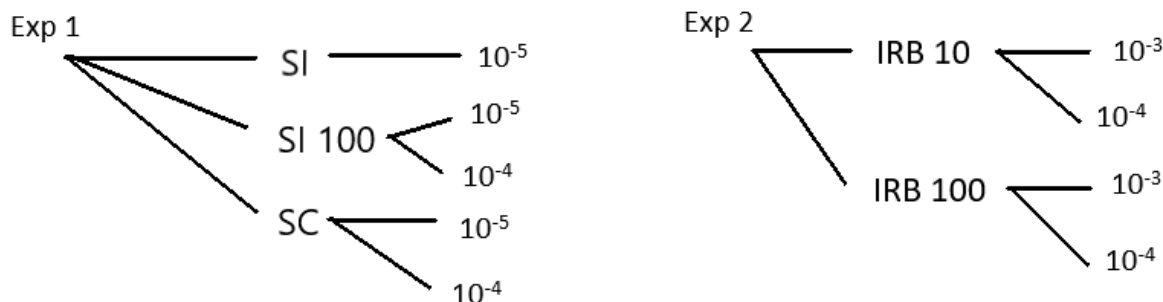
pH média bylo pomocí HCl (4 mol/l) nebo NaOH (1 nebo 5 mol/l) upraveno na hodnotu 7,4. Médium bylo sterilizováno autoklávováním při 121 °C po 20 minut. Erlenmayerovy baňky uzavřené celulózovou zátkou a alobalem byly sterilizovány žiháním při 180 °C po dobu 3 hodin. Kultivační média s přísádky (roztoky síranu hořečnatého, octanu sodného nebo glukózy, irbesartanu) byla rozdělena po 20 ml do Erlenmayerových baněk (o objemu 100ml) pomocí sterilní pipety (jednorázové plastové nebo vyžíhané skleněné). Vše bylo provedeno ve sterilním boxu s laminárním prouděním (TelStar, Biostar).

Výsledná koncentrace přísádků v kultivačních médiích byla 2 mM glukózy, nebo 6 mM octanu sodného. Výsledná koncentrace irbesartanu byla 10 000 ng/l. Na přípravu zásobních médií a roztoků byla použita reversní osmózou upravená voda. Zásobní roztoky octanu sodného a glukózy byly samostatně sterilizovány autoklávováním, aby neinteragovaly se solemi v médiu (Dworkin a kol., 2006). Zásobní roztok síranu hořečnatého byl sterilizován filtrací přes stříkačkový 0,2µm filtr (VWR INTERNATIONAL, Cellulose Acetate membrane, katalog. č. 514-0061), aby se nevysrážel teplem. Zásobní roztok irbesartanu v DMSO o koncentraci 10 mg/l byl sterilizován filtrací přes 0,2µm filtr (Thermo SCIENTIFIC, Nylon membrane, katalog. č. 726-2520).

3.4 Izolace bakterií

Půda odebraná 14. (exp1) nebo 21. (exp 2) den experimentu byla naředěna na půdní suspenzi sterilní vodovodní vodou (ředící řada od 10⁻¹ do 10⁻⁶) a suspenzemi jednotlivých ředění byla zaočkována M2 nebo R2A pevná média na Petriho miskách. Média obsahovala irbesartan v koncentraci 50 mg/l (rozpuštěný v exp 1 v etanolu, v exp 2 v DMSO). Každá miska byla zaočkována 200 µl suspenze. Čtyřicet dva vybraných kolonií bylo přeočkováno na nové R2A nebo M2 agary, na kterých byla provedena izolace čisté kultury. Vybírali jsme morfologicky

odlišné, odděleně rostoucí, reprezentativní kolonie z misek zaočkovaných suspenzemi půd v ředěních 10^{-3} , 10^{-4} a 10^{-5} (viz. Obr 5).



Obr. 5: použitá ředění suspenzí a varianty půd v experimentech.

Z agarových misek byly kolonie čistých kultur následně přeočkovány do tekutého M2 média. Když narostly, odebrali jsme pipetou médium s buňkami do 1,5 ml zkumavky a zahustili centrifugací. Čiré médium jsme odebrali a doplnili zkumavku médiem s buňkami. Postup jsme opakovali. Takto sesbíranou biomasu jsme uchovávali v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dále používali pro izolaci genomické DNA.

Pro účely dlouhodobého uchování kultur jsme vytvořili glycerolové konzervy přenesením 1–2 kliček buněk z pevného média do 15% roztoku glycerolu s čistým M2 médiem. U sporulujících streptomycet byly pro vytvoření glycerolových konzerv použity spory. Tyto konzervy byly dále skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5 Izolace DNA a PCR

K izolaci DNA byl použit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). Rozmražené buňky jsme stočili a odebrali jsme supernatant. Přidali jsme $480\text{ }\mu\text{l}$ 50mM EDTA. Poté jsme přidali $20\text{ }\mu\text{l}$ lysozymu v koncentraci 100 mg/ml (konečná koncentrace asi 4 mg/ml). Buňky jsme inkubovali při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 až 3 hodin, dokud vzorek nezměnil strukturu na viskóznější. Buňky jsme stočili a k odebranému supernatantu přidali roztok dokončující lyzi (Nuclei lysis solution). Vzorky jsme inkubovali při $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, poté jsme je 5 minut chladili na ledu. Ke vzorkům jsme přidali $3\text{ }\mu\text{l}$ roztoku RNázy a inkubovali je 3 hodiny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přidali jsme $250\text{ }\mu\text{l}$ roztoku srážejícího proteiny (Protein precipitation solution) a 5 minut inkubovali na ledu. Poté jsme vzorky stočili a k odebranému supernatantu přidali $700\text{ }\mu\text{l}$ isopropanolu. Poměr isopropanolu a supernatantu byl 1:1. Po vysrážení jsme odpipetovali supernatant a

opláchli pelet DNA 600 μ l roztoku 70% etanolu a vzorky stočili. Po odstranění etanolu (slití po stěně zkumavky) jsme vyschlý pelet rozpustili v 60 μ l TE pufru.

Poté byla měřena koncentrace DNA na přístroji NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC). Zároveň byla kontrolována čistota DNA (poměr absorbancí ve 260/280 nm). Pro následnou PCR byly alikvoty genomické DNA naředěny na cca 150 až 300 ng/ μ l.

Provedli jsme nejprve Box-PCR za použití box A1R primeru o sekvenci 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', který nasedá na repetitivní sekvence v genomu bakterií (Versalovic et al., 1994). Jednu reakční směs tvořilo 6,8 μ l MilliQ vody (Millipore), 1x naředěný LA Hot Start Master Mix (Top-Bio), DMSO v konečné koncentraci 10 %, BSA 0,04 mg/ml, 0,012 μ g/ μ l boxA1 primeru a 280 až 660 ng templátu, kromě vzorku 42, kde bylo 60ng. PCR začala 7minutovou počáteční denaturací v 95 °C, následovanou 30 cykly: 30 sekund při 90 °C, 1 minuta při 53 °C, 8 minut při 65 °C. Konečná syntéza řetězců probíhala 15 minut při 65 °C.

Na 1% agarózový gel jsme nanášeli 3 μ l DNA a 1 μ l Loading Dye (Termo Scientific), použili jsme 3 μ l 1kb žebříčku (O'GeneRuler, 250-10 000 bp, Termo Scientific). Pokud nebyly proužky na gelu dostatečně zřetelné, použili jsme 2% agarózový gel, na který jsme nanесли 20 μ l PCR produktu a 4 μ l Loading Dye (1kb žebříčku 8 μ l). Separace fragmentů na gelu probíhala při proudu 265 mA a napětí 100 V zhruba 1 hodinu. Poté jsme gel barvili v roztoku ethidium bromidu. Fotodokumentace byla pořízena v UV světle v přístroji Azure c280 (Azure Biosystems). Box-PCR jsme prováděli přednostně, abychom zjistili, zda se od sebe kmeny liší nebo jsou některé stejné. Mezi kmeny jsme nenalezli shodu a pro 16S rRNA PCR jsme tedy použili všechny vzorky.

Dále jsme provedli amplifikaci genu pro 16S rRNA pomocí PCR. Forward primer (pAf) měl následující sekvenci: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Turner a kol., 1999), reverse primer (pHr): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (Wilmotte a kol., 1993). V jedné reakční směsi bylo 10 μ l MilliQ vody, 280 až 660 ng templátu (s výjimkou vzorku 42, kde bylo 60ng), pAf a pHr primery, obojí finální koncentrace 0,3 μ M a Fast Start Master (Roche) obsahující Taq DNA polymerázu, jejíž konečná koncentrace byla 0,375 U v celkovém objemu 25 μ l. Počáteční denaturace probíhala 3 minuty při 95 °C, následovalo 34 cyklů: 1 minuta při

94 °C, 30 sekund při 66 °C 30, 1,5 minuty při 72 °C. Konečná syntéza řetězců probíhala 5 minut při 72°C. PCR produkty byly uchovány v lednici.

Fragmenty DNA byly separovány pomocí horizontální gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu, na který jsme nanášeli 3 µl DNA a 1 µl Loading Dye (1kb žebříček 3 µl) při proudu 265 mA a napětí 100 V zhruba 40 minut. Gely byly barveny v roztoku ethidium bromidu. PCR produkty s dobrým výtěžkem jsme připravili na určení sekvence nukleotidů (viz dále). Pokud měl PCR produkt na gelu malý výtěžek, prováděli jsme dále PCR s různým ředěním templátu, dokud jsme neobdrželi PCR produkt o žádané velikosti (1500 bp) a množství.

3.6 Stanovení sekvence nukleotidů metodou Sangerova sekvenování

PCR produkty (16S rDNA) o správné velikosti (1500 bp) a koncentraci jsme zbavili přebytečných primerů a nukleotidů pomocí směsi 1:1 enzymů alkalické fosfatázy (1 U/µl, z telecího střeva, Roche Diagnostics GmbH, 10713023001) a exonukleázy I (20 U/µl, z E. Coli, BioLabs, M0293S). K 5 µl PCR produktu jsme přidali 2 µl ExoSAP. Provádělo se dopřední čtení. Analýzy byly provedeny formou servisu u společností SEQme, s. r. o. a GATC Biotech. Manuální editaci sekvence jsme prováděli v programu Geneious (verze 8.1.6, Biomatters, Ltd., univerzitní multilicence). Sekvence jsme porovnávali v databázi EzBioCloud, která pro porovnání sekvence vzorku s databází používá TrueBac ID algoritmus (<https://www.ezbiocloud.net>, Yoon a kol., 2017).

3.7 Degradace irbesartanu bakteriemi

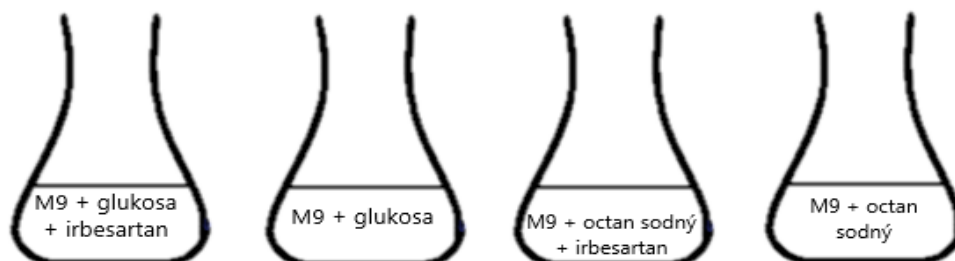
Na základě příbuznosti izolovaných kmenů k bakteriálním rodům, u kterých je znám značný potenciál degradovat kontaminanty, bylo vybráno pro tento experiment 20 kmenů. Ty byly oživeny z glycerolových konzerv přenesením kličkou na agar, na kterém byly izolovány (M2 nebo R2A).

20 kmenů bylo testováno na schopnost transformovat irbesartan. Kmeny byly přeočkovány na nové misky s R2A agarem. 3–4 dny staré kolonie byly zaočkovány do Erlenmayerových baněk o celkovém objemu 100 ml s 20 ml tekutého minimálního M9 média. M9 médium je minimální médium, do kterého se dají přidávat různé zdroje uhlíku.

Pro každý kmeny byly zvoleny tyto varianty složení kultivačního média (viz. Obr. 6):

- M9 s přidavkem glukózy (výsledná koncentrace 2 mM)

- M9 s přidavkem glukózy (výsledná koncentrace 2 mM) a irbesartanu (výsledná koncentrace 10 000 ng/l)
- M9 s přidavkem octanu sodného (výsledná koncentrace 6 mM)
- M9 s přidavkem octanu sodného (výsledná koncentrace 6 mM) a irbesartanu (výsledná koncentrace 10 000 ng/l).



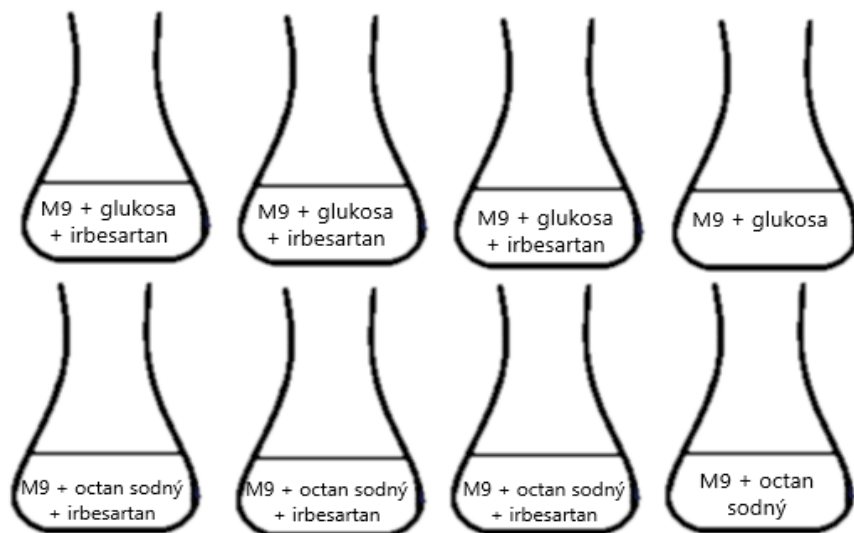
Obr. 6: Varianty médií, do kterých byl zaočkován každý z 20 vybraných kmenů.

Média byla inokulována dvěma plnými kličkami biomasy z čerstvých kultur bakterií napěstovaných na agarových plotnách. Výjimkou byly kmeny 10, 18 a 35. Ty byly zarostlé do agaru a nebylo vždy možné nabrat pouze kolonii bez agaru. U kmenů zarostlých do agaru a sporulujících (7, 15 a 27) byly do kliček nabrány pouze spory a kličky nebylo možné naplnit. Vzorky byly inkubovány deset dnů při 28 °C a 180 RPM.

Po deseti dnech jsme odebrali 0,5 ml a změřili optickou densitu ve 2 μ l média při 600 nm (přístroj Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC). Zbytek média s bakteriemi jsme přefiltrovali přes membránové filtry (velikost pórů = 0,22 μ m, FiltraTECH – Membránové filtry Fisher MCE membrane) za použití filtrační aparatury s vývěvou. Přefiltrovaná média byla uchovávána při -20 °C a dopravena na Fakultu rybářství a ochrany vod ve Vodňanech, kde byla stanovena zbytková koncentrace irbesartanu. Analýzu, která proběhla pomocí LDTD–APCI–MS–MS (Laser diode thermal desorption–Atmospheric–pressure chemical ionization–Tandem mass spectrometry) provedli kolegové v laboratoři vedené doc. Romanem Grabicem (JČU, FROV).

Na základě výsledků pilotního skříníku 20 kmenů bylo vybráno osm, u kterých jsme zaznamenali (alespoň v jednom médiu) úbytek koncentrace irbesartanu alespoň o polovinu. S nimi jsme postup zopakovali ve třech opakováních pro obě média s přidavkem irbesartanu a po jedné kontrole bez irbesartanu (viz Obr. 7). Dále jsme kultivovali po třech blancích s

nezaočkovanými médii s irbesartanem a po jednom blanku s nezaočkovanými médii bez irbesartanu.



Obr. 7: Varianty médií, do kterých byl zaočkován každý z 8 vybraných kmenů.

3.8 Statistické zpracování dat

Pro srovnání koncentrace irbesartanu v médiích s glukózou u 8 vybraných kmenů oproti blankům byla použita jednocestná ANOVA. Pro post-hoc porovnání jsme použili test Tukey HSD. V médiích s octanem sodným nebyly shodné variance, a proto jsme použili neparametrický Kruskal–Wallisův test. V případě, že koncentrace irbesartanu v médiích byla pod limitem kvantifikace, použili jsme pro statistické analýzy hodnotu limitu kvantifikace. K určení vlivu přítomnosti irbesartanu a přídavku glukózy nebo octanu sodného na optickou hustotu ve výběru 20 kmenů byla použita dvoucestná ANOVA. K určení vlivu přítomnosti irbesartanu a přídavku glukózy a acetátu ve výběru 8 vzorků byla použita třícestná ANOVA (kmen byl zahrnut jako další faktor). Z testů s optickou hustotou jsme vyloučili druhy z rodu *Streptomyces* a *Lentzea*, protože v tekutém médiu tvořily kuličky nebo žmolky a měření optické hustoty by nevytvářelo o růstu bakterií. Za průkazné jsme považovali výsledky s hladinou významnosti (p) $<0,05$.

4 Výsledky

4.1 Izolace bakterií a zařazení do druhů

V Exp 1 a Exp 2 se povedlo izolovat 38 bakterií. Druhové určení bakterií bylo provedeno u 30 z nich (shoda > 99 %), přičemž jsme izolovali celkem 26 různých druhů bakterií. Kmeny se shodou nad 97 % jsme zařadili do tříd podle NCBI, Taxonomy Browser. Izolované bakterie spadaly do tříd: Actinobacteria, Bacilli, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria a Flavobacteria, z nichž byly nejvíce zastoupené Actinobacteria. Nejčastější byly zástupci rodů *Streptomyces*, *Bacillus* a *Pseudomonas*, ale nejvíce různých druhů bylo z rodů *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Rhodococcus* (shrnují Tab. III a Tab. IV). Zaznamenali jsme rozdíl mezi použitými izolačními médii. Při použití R2A pevného média dominoval rod *Streptomyces* a při použití M2 média dominoval rod *Pseudomonas* (viz Obr. 8).

U některých kmenů bakterií nebylo možné určit druhovou příslušnost, protože nukleotidová sekvence genu pro 16S rRNA vykazovala stejnou podobnost k různým druhům, např. *Pseudomonas helmanticensis* (99,44 %) / *Pseudomonas baetica* (99,44 %) (Tab. III a Tab. IV). V těchto případech jsme v dalším textu použili pro kmen označení rodu a číslo např.: *Pseudomonas* sp. – kmen 25.

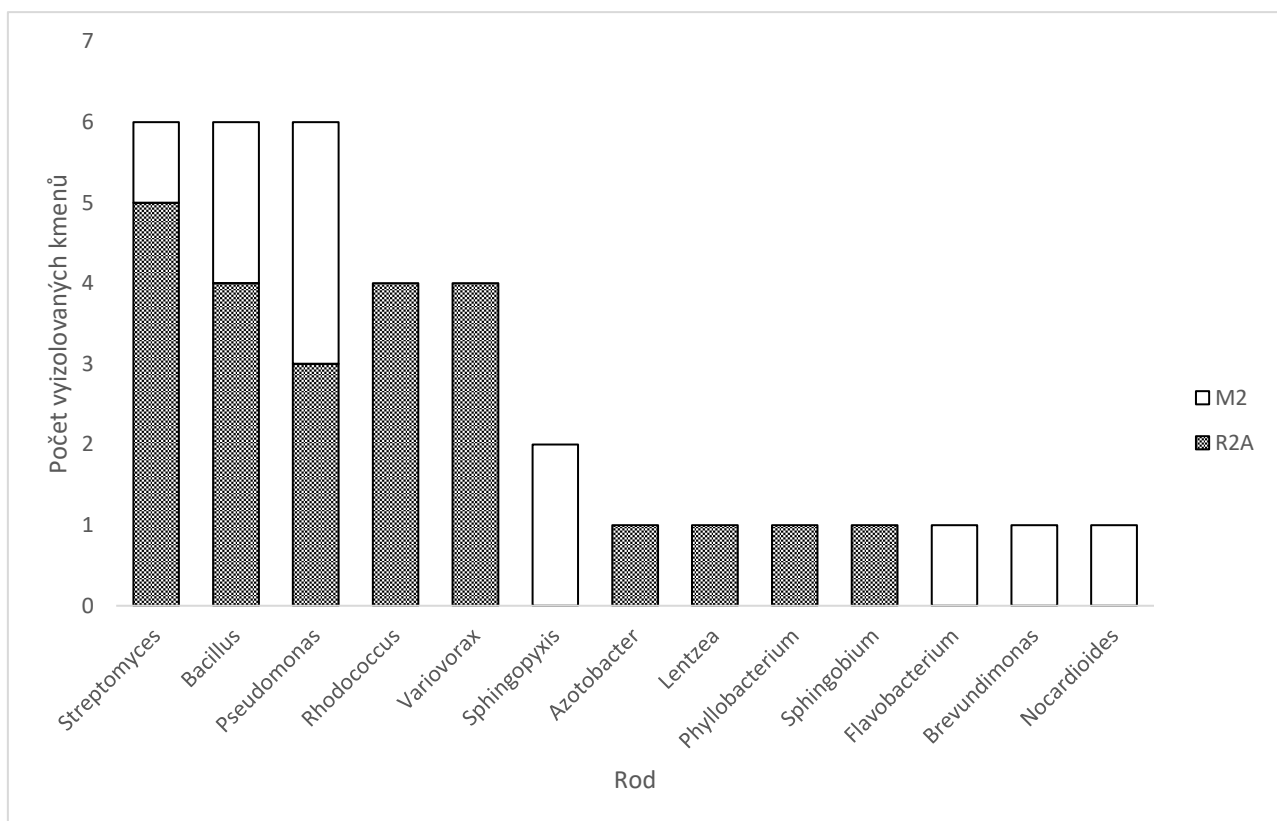
Některé bakteriální izoláty se nepovedlo dále kultivovat či identifikovat. Kmeny 6 a 13 v Tab. III při přeočkování z izolačního agaru na R2A agar nenarostly, u kmenů 3 a 20 byla po přeočkování na R2A agar miska kontaminovaná, a tak jsme s nimi dále nepracovali. U kmene 5 a 28 se nám nepovedlo získat kvalitní sekvenci nukleotidů. U obou kmenů jsme obdrželi špatnou kvalitu sekvence nukleotidů, která měla v databázi na portálu EZBioCloud nejbližší shodu 66,7 %, přestože 2x ředěný 16S rDNA PCR produkt byl na gelu dobře viditelný a měl správnou velikost. U kmenu 29 se nám nepodařilo získat dobrý PCR produkt, proto by bylo potřeba znovu izolovat genomickou DNA.

Tab. III: Přehled vzorků z exp. 1, půda, ze které pocházejí, ředění suspenze, kterou byly zaočkovány a na jaký agar, velikost úseku porovnávaného v EzBioCloud a zařazení kmene do druhu s mírou shody s danou sekvencí v databázi.

Číslo vzorku	Varianta úpravy půdy	Náředění půdy v suspenzi	Izolační agar	Velikost sekvence (kb)	Název bakterie s nejvyšší shodou sekvence v EzBioCloud a míra shody	Název kmene se stejnou mírou shody	Třída
1	SC	10 ⁻⁵	R2A	1,097	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (99,91 %)	-	Actinobacteria
2	SC	10 ⁻⁵	R2A	1,103	<i>Bacillus simplex</i> (100,0 %)	-	Bacilli
3	SC	10 ⁻⁵	R2A	n. d.	-	-	-
4	SI	10 ⁻⁵	R2A	1,103	<i>Sphingobium scionense</i> (100,0 %)	-	Alphaproteobacteria
5	SI	10 ⁻⁵	R2A	n. d.	-	-	-
6	SI	10 ⁻⁵	R2A	n. d.	-	-	-
7	SI	10 ⁻⁵	R2A	1,093	<i>Streptomyces omiyaensis</i> (99,93 %)	-	Actinobacteria
8	SI	10 ⁻⁵	R2A	0,716	<i>Pseudomonas linyingensis</i> (97,07 %)	-	Gammaproteobacteria
9	SI	10 ⁻⁵	R2A	1,093	<i>Bacillus altitudinis</i> (99,77 %)	-	Bacilli
10	SI 100	10 ⁻⁵	R2A	1,089	<i>Streptomyces xantholiticus</i> (99,15 %)	-	Actinobacteria
11	SI 100	10 ⁻⁵	R2A	1,096	<i>Bacillus paralicheniformis</i> (99,78 %)	-	Bacilli
12	SI 100	10 ⁻⁵	R2A	1,092	<i>Azotobacter chroococcum</i> (99,82 %)	-	Gammaproteobacteria
13	SI 100	10 ⁻⁵	R2A	n. d.	-	-	-
14	SI 100	10 ⁻⁵	R2A	1,096	<i>Pseudomonas thivervalensis</i> (99,63 %)	-	Gammaproteobacteria
15	SI 100	10 ⁻⁴	R2A	1,087	<i>Streptomyces coeruleus</i> (99,57 %)	<i>Streptomyces bellus</i> (99,57 %)	Actinobacteria
16	SI 100	10 ⁻⁴	R2A	1,080	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (99,63 %)	-	Gammaproteobacteria
17	SC	10 ⁻⁴	R2A	1,090	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (99,63 %)	-	Actinobacteria
18	SC	10 ⁻⁴	R2A	1,091	<i>Lentzea pudingi</i> (99,43 %)	-	Actinobacteria
19	SC	10 ⁻⁴	R2A	0,945	<i>Bacillus simplex</i> (95,13 %)	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (95,13 %)	n. d.
20	SC	10 ⁻⁴	R2A	n. d.	-	-	-

Tab. IV: Přehled vzorků z exp. 2, půda, ze které pocházejí, ředění suspenze, kterou byly zaočkovány a na jaký agar, velikost úseku porovnávaného v EzBioCloud a zařazení kmene do druhu s mírou shody s danou sekvencí v databázi.

Číslo vzorku	Varianta úpravy půdy	Naředění půdy v suspenzi	Izolační agar	Velikost sekvence (kb)	Název bakterie s nejvyšší shodou sekvence v EzBioCloud a míra shody	Název kmene se stejnou mírou shody	Třída
21	IRB100	10 ⁻⁴	M2	1,054	<i>Sphingopyxis chilensis</i> (99,24 %)	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> (99,24 %)	Alphaproteobacteria
22	IRB100	10 ⁻⁴	M2	0,997	<i>Pseudomonas lini</i> (99,90 %)	-	Gammaproteobacteria
23	IRB100	10 ⁻⁴	M2	1,026	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (99,02 %)	-	Gammaproteobacteria
24	IRB100	10 ⁻⁴	M2	1,082	<i>Nocardioides albus</i> (99,93 %)	-	Actinobacteria
25	IRB10	10 ⁻⁴	M2	1,078	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99,44 %)	<i>Pseudomonas baetica</i> (99,44 %)	Gammaproteobacteria
26	IRB10	10 ⁻⁴	M2	1,103	<i>Sphingopyxis chilensis</i> (99,64 %)	<i>Sphingopyxis panaciterrae</i> (99,64 %)	Alphaproteobacteria
27	IRB100	10 ⁻³	M2	1,073	<i>Streptomyces virginiae</i> (100,0 %)	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> (100,0 %)	Actinobacteria
28	IRB100	10 ⁻³	M2	n. d.	-	-	-
29	IRB100	10 ⁻³	M2	n. d.	-	-	-
30	IRB100	10 ⁻³	M2	1,102	<i>Flavobacterium branchiicola</i> (98,09 %)	-	Flavobacteriia
31	IRB10	10 ⁻³	M2	1,096	<i>Bacillus simplex</i> (100,0 %)	-	Bacilli
32	IRB10	10 ⁻³	M2	1,099	<i>Brevundimonas mediterranea</i> (99,82 %)	-	Alphaproteobacteria
33	IRB10	10 ⁻³	M2	1,089	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> (100,0 %)	-	Bacilli
34	IRB10	10 ⁻⁴	R2A	1,085	<i>Rhodococcus fascians</i> (100,0 %)	-	Actinobacteria
35	IRB10	10 ⁻⁴	R2A	1,093	<i>Streptomyces europaeiscabiei</i> (99,79 %)	-	Actinobacteria
36	IRB10	10 ⁻³	R2A	0,674	<i>Variovorax paradoxus</i> (87,18 %)	-	n. d.
37	IRB10	10 ⁻³	R2A	1,081	<i>Variovorax paradoxus</i> (99,63 %)	-	Betaproteobacteria
38	IRB100	10 ⁻³	R2A	1,071	<i>Variovorax paradoxus</i> (99,63 %)	-	Betaproteobacteria
39	IRB100	10 ⁻³	R2A	0,652	<i>Variovorax paradoxus</i> (94,02 %)	-	n. d.
40	IRB100	10 ⁻⁴	R2A	1,100	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> (100,0 %)	-	Alphaproteobacteria
41	IRB100	10 ⁻⁴	R2A	1,093	<i>Streptomyces puniceus</i> (99,93 %)	-	Actinobacteria
42	IRB100	10 ⁻⁴	R2A	1,087	<i>Rhodococcus jostii</i> (99,91 %)	-	Actinobacteria



Obr. 8: Počty kmenů podle příslušnosti k rodu, izolované z R2A a M2 agaru.

4.2 Transformace irbesartanu

Pro další práci jsme vybrali 20 kmenů, z toho 6x kmeny z rodu *Streptomyces*, 6x *Pseudomonas*, 3x *Rhodococcus*, 1x *Lentzea*, 1x *Sphingobium*, 1x *Azotobacter*, 1x *Variovorax*, 1x *Phyllobacterium*. Dosažená optická hustota v M9 médiu na konci kultivace (po 10 dnech) a koncentrace irbesartanu je uvedena v Tab. V. M9 médium použité pro první část degradačního experimentu (s 20 vzorky) bylo připraveno ve dvou várkách. Blank označený (1/2) pochází z média použitého se vzorky: 4, 12, 14, 16, 17, 22, 34, 37, 41, 42, blank označený (2/2) se vzorky 7, 8, 10, 15, 18, 23, 25, 27, 35, 40.

Na základě těchto výsledků (úbytku koncentrací irbesartanu) jsme vybrali 8 kmenů (z toho 3x z rodu *Streptomyces*, 3x *Pseudomonas*, 1x *Lentzea* a 1x *Phyllobacterium*). V Tab. VI. je uvedena optická hustota a koncentrace irbesartanu pro vybraných 8 kmenů ve všech (3) biologických opakováních. Jako M9-10 jsou označeny blanky, které byly třepány a filtrovány, M9 jsou média, která byla rovnou zamražena, aniž by se kultivovala a filtrovala. U nefiltrovaných médií se naměřené koncentrace blíží 10 000 ng/ml, což je koncentrace, jaké jsme chtěli dosáhnout. Naměřené koncentrace se pohybují se kolem 9 000 ng/ml. Koncentrace blanků, které jsme třepali a filtrovali je ale výrazně nižší, kolem 6 000 – 6 500 ng/ml.

Z rozmražených zbytků médií z první části experimentu jsme tak dále odebírali v různých fázích přípravy vzorky, abychom zjistili, v jaké fázi přípravy se irbesartan ztrácí. Průměr koncentrace irbesartanu v čerstvě rozmražených blankách (den 0) byl 10 300 ng/ml. V blankách po deseti dnech třepání (den 10 před filtrací) byl 6 000 ng/ml. V blankách, které pak byly přefiltrovány, byl 4 700 ng/ml (viz Obr. 9). Kmen 25 poskytl velmi variabilní data při prvním měření, a tak jsme měření opakovali (viz Tab. VII).

Tab. V: Optické hustoty a konečné naměřené koncentrace irbesartanu v médiích u 20 vybraných kmenů a blanků G = glukóza, GI = glukóza a irbesartan, A = octan sodný (acetát), AI = octan sodný + irbesartan, M9 = blank před inkubací (den 0), <500 = koncentrace irbesartanu pod limitem kvantifikace (500 ng/ml)

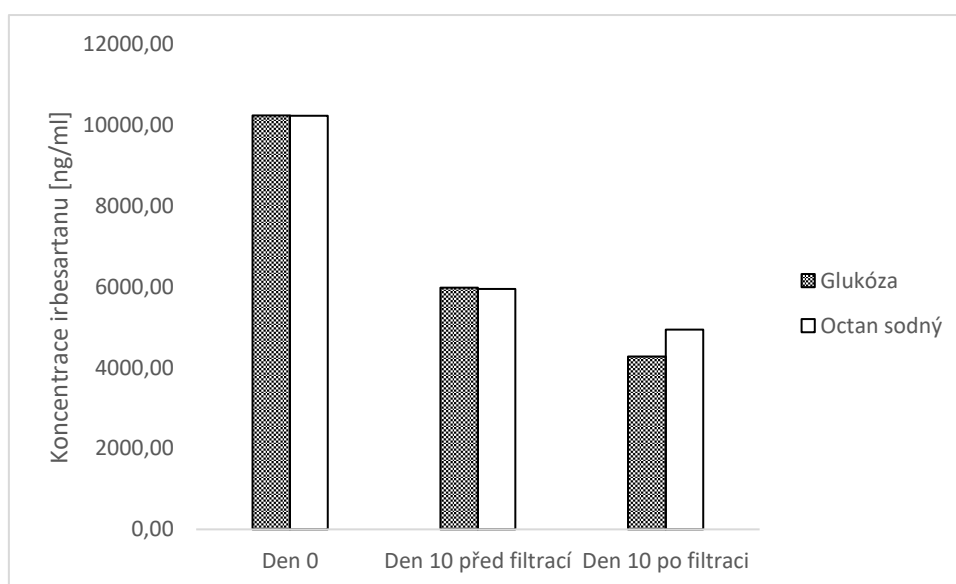
Označení vzorku	Optická hustota při 600 nm	Koncentrace irbesartanu [ng/ml]	Označení vzorku	Optická hustota při 600 nm	Koncentrace irbesartanu [ng/ml]
4A	0,034	<500	23A	0,010	<500
4AI	0,032	5500	23AI	0,025	3600
4G	0,041	<500	23G	0,020	<500
4GI	0,044	6000	23GI	0,020	5200
7A	n. d.	<500	25A	0,009	<500
7AI	n. d.	6500	25AI	0,022	4000
7G	n. d.	<500	25G	0,021	<500
7GI	n. d.	4600	25GI	0,027	4600
8A	0,028	<500	27A	n. d.	<500
8AI	0,025	4100	27AI	n. d.	5100
8G	0,006	<500	27G	n. d.	<500
8GI	0,008	5000	27GI	n. d.	5400
10A	n. d.	<500	35A	n. d.	<500
10AI	n. d.	5200	35AI	n. d.	5300
10G	n. d.	<500	35G	n. d.	<500
10GI	n. d.	2200	35GI	n. d.	6500
12A	0,003	<500	34A	0,017	<500
12AI	0,006	5900	34AI	0,022	5200
12G	0,005	<500	34G	0,055	<500
12GI	0,006	7800	34GI	0,021	6200
14A	0,028	<500	37A	0,027	<500
14AI	0,027	5400	37AI	0,036	4700
14G	0,038	<500	37G	0,049	<500
14GI	0,039	7100	37GI	0,057	5400
15A	n. d.	<500	40A	0,023	<500
15AI	n. d.	3900	40AI	0,026	3400
15G	n. d.	<500	40G	0,035	<500
15GI	n. d.	3000	40GI	0,042	5000
16A	0,024	<500	41A	n. d.	<500
16AI	0,023	6600	41AI	n. d.	5400
16G	0,036	<500	41G	n. d.	<500
16GI	0,039	5900	41GI	n. d.	6400
17A	0,050	<500	42A	0,030	<500
17AI	0,039	6400	42AI	0,025	5700
17G	0,037	<500	42G	0,044	<500
17GI	0,058	5600	42GI	0,064	6300
18A	n. d.	<500	M9+A(1/2)	n. d.	<500
18AI	n. d.	<500	M9+AI(1/2)	n. d.	8600
18G	n. d.	<500	M9+G(1/2)	n. d.	<500
18GI	n. d.	<500	M9+GI(1/2)	n. d.	9900
22A	0,042	<500	M9+A (2/2)	n. d.	<500
22AI	0,034	5300	M9+AI(2/2)	n. d.	8600
22G	0,042	<500	M9+G(2/2)	n. d.	<500
22GI	0,055	7600	M9+GI(2/2)	n. d.	9100

Tab. VI.: Optické hustoty a koncentrace irbesartanu 8 vybraných kmenů a blanků, G = glukóza, GI = glukóza a irbesartan, A = octan sodný (acetát), AI = octan sodný + irbesartan, M9-10 = blank po inkubaci (den 10), M9 = blank před inkubací (den 0), <100 = koncentrace irbesartanu pod limitem kvantifikace (100 ng/ml).

Označení vzorku	Optická hustota při 600 nm	Koncentrace irbesartanu [ng/ml]	Označení vzorku	Optická hustota při 600 nm	Koncentrace irbesartanu [ng/ml]
7AIa	n. d.	5900	23AIa	0,027	5200
7AIb	n. d.	6200	23AIb	0,021	4700
7AIc	n. d.	5000	23AIc	0,024	4400
7A	n. d.	<100	23A	0,021	<100
7GIa	n. d.	6500	23GIa	0,043	6100
7GIb	n. d.	5400	23GIb	0,046	6200
7GIc	n. d.	6200	23GIc	0,044	6700
7G	n. d.	<100	23G	0,042	<100
8AIa	0,030	5700	25AIa	0,017	4200
8AIb	0,031	5000	25AIb	0,016	3400
8AIc	0,033	5000	25AIc	0,005	650
8A	0,020	<100	25A	0,021	<100
8GIa	0,011	4300	25GIa	0,007	1200
8GIb	0,015	5200	25GIb	0,025	4200
8GIc	0,015	4700	25GIc	0,025	4600
8G	0,015	<100	25G	0,028	<100
10AIa	n. d.	5600	40AIa	0,004	4900
10AIb	n. d.	5800	40AIb	0,016	4700
10AIc	n. d.	5300	40AIc	0,005	4700
10A	n. d.	<100	40A	0,001	<100
10GIa	n. d.	4800	40GIa	0,006	7100
10GIb	n. d.	5600	40GIb	0,004	6500
10GIc	n. d.	4200	40GIc	0,011	6100
10G	n. d.	<100	40G	0,025	<100
15AIa	n. d.	4900	M9-10+AIa	n. d.	6400
15AIb	n. d.	4700	M9-10+AIb	n. d.	6900
15AIc	n. d.	4500	M9-10+AIc	n. d.	6200
15A	n. d.	<100	M9-10+A	n. d.	<100
15GIa	n. d.	5900	M9-10+GIa	n. d.	5100
15GIb	n. d.	5200	M9-10+GIb	n. d.	7700
15GIc	n. d.	5400	M9-10+GIc	n. d.	5600
15G	n. d.	<100	M9-10+G	n. d.	<100
18AIa	n. d.	<100	M9+A	n. d.	<100
18AIb	n. d.	<100	M9+AI	n. d.	9300
18AIc	n. d.	<100	M9+G	n. d.	<100
18A	n. d.	<100	M9+GI	n. d.	9900
18GIa	n. d.	<100			
18GIb	n. d.	<100			
18GIc	n. d.	<100			
18G	n. d.	<100			

Tab. VII: Přeměření koncentrace irbesartanu v médiích kmene 25 a koncentrace irbesartanu v blancích z první části experimentu v různých fázích pokusu, G = glukóza, GI = glukóza a irbesartan, A = octan sodný (acetát), AI = octan sodný + irbesartan, <100 = koncentrace irbesartanu pod limitem kvantifikace (100 ng/ml).

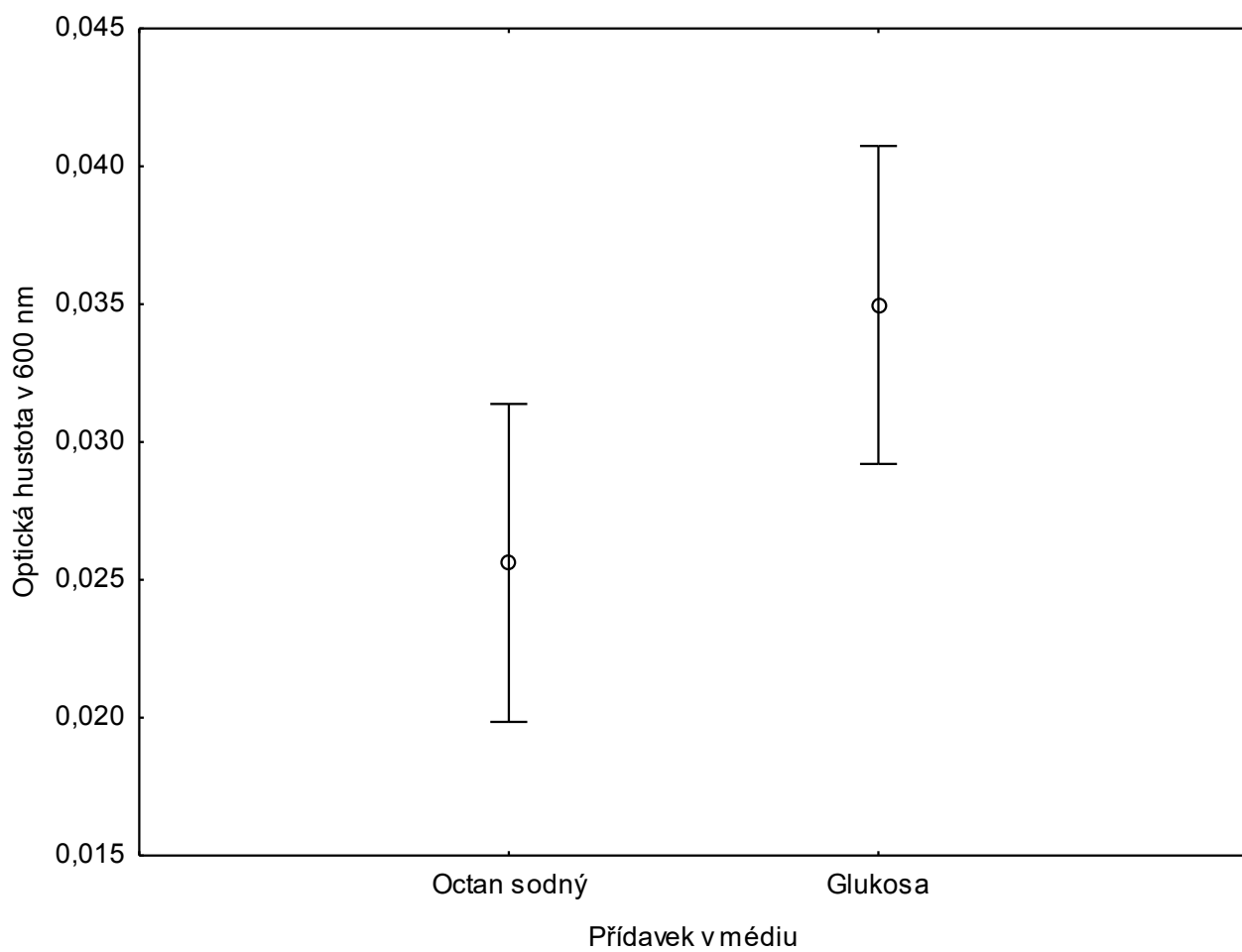
Označení vzorku	Koncentrace irbesartanu [ng/ml]
25AIa	2400
25AIb	2600
25AIb	660
25A	<100
25GIa	1200
25GIb	4000
25GIc	4300
25G	<100



Obr. 9: Pokles koncentrace irbesartanu v M9 médiu s glukózou nebo octanem sodným po třepání a filtraci v abiotických podmínkách.

4.2.1 Vliv přísadků a přítomnosti irbesartanu na růst bakterií

Když jsme ve výběru dvaceti kmenů porovnávali vliv přísadků octanu sodného, glukózy a irbesartanu na růst bakterií měřený pomocí optické hustoty (viz. Obr. 10) vyšel průkazný efekt přítomnosti glukózy a octanu sodného $F_{1,1} = 5,3$, $p = 0,025$. Vliv irbesartanu na růst bakterií nebyl prokázán.

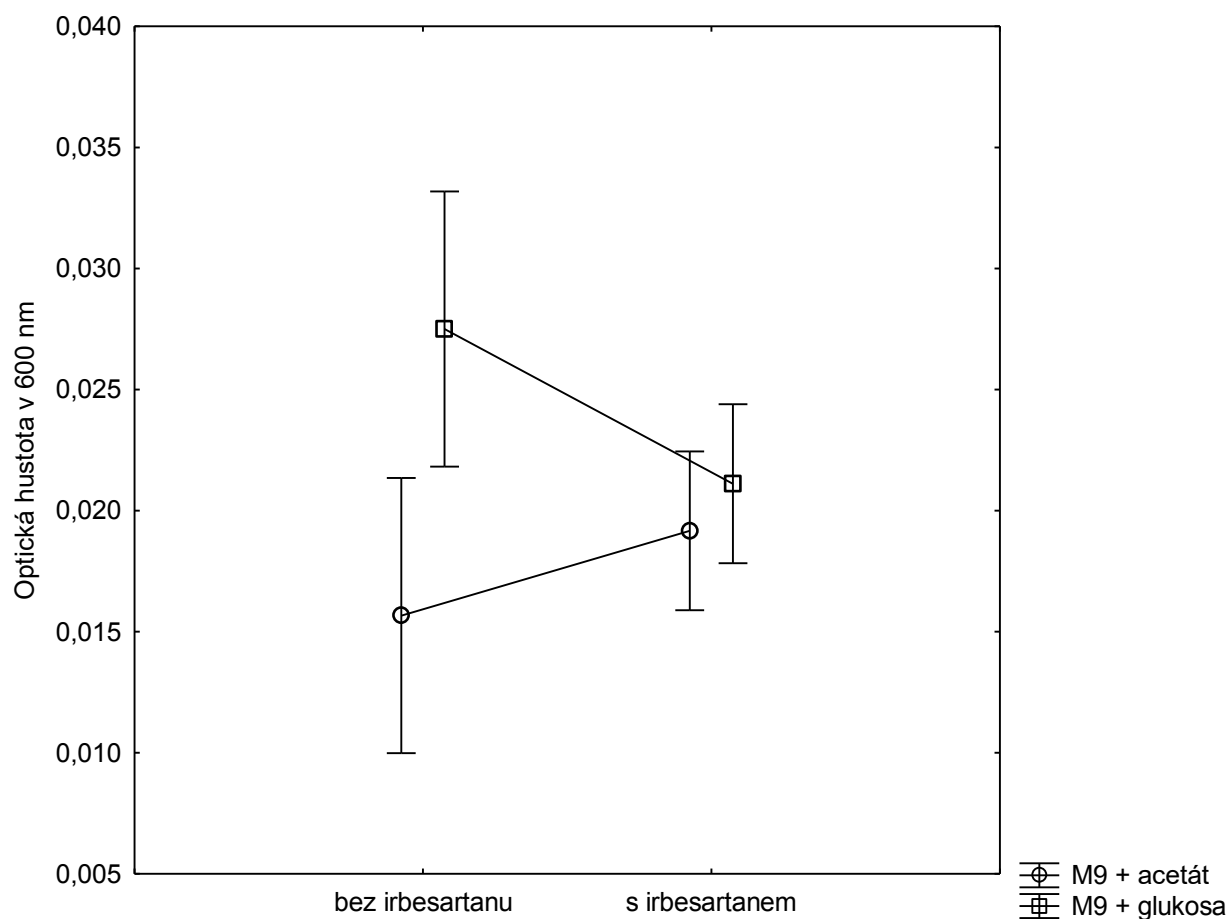


Obr. 10: Průměry optické hustoty při 600 nm pro médium s octanem sodným (n = 20) a s glukózou (n = 20) s 95% konfidenčním intervalem.

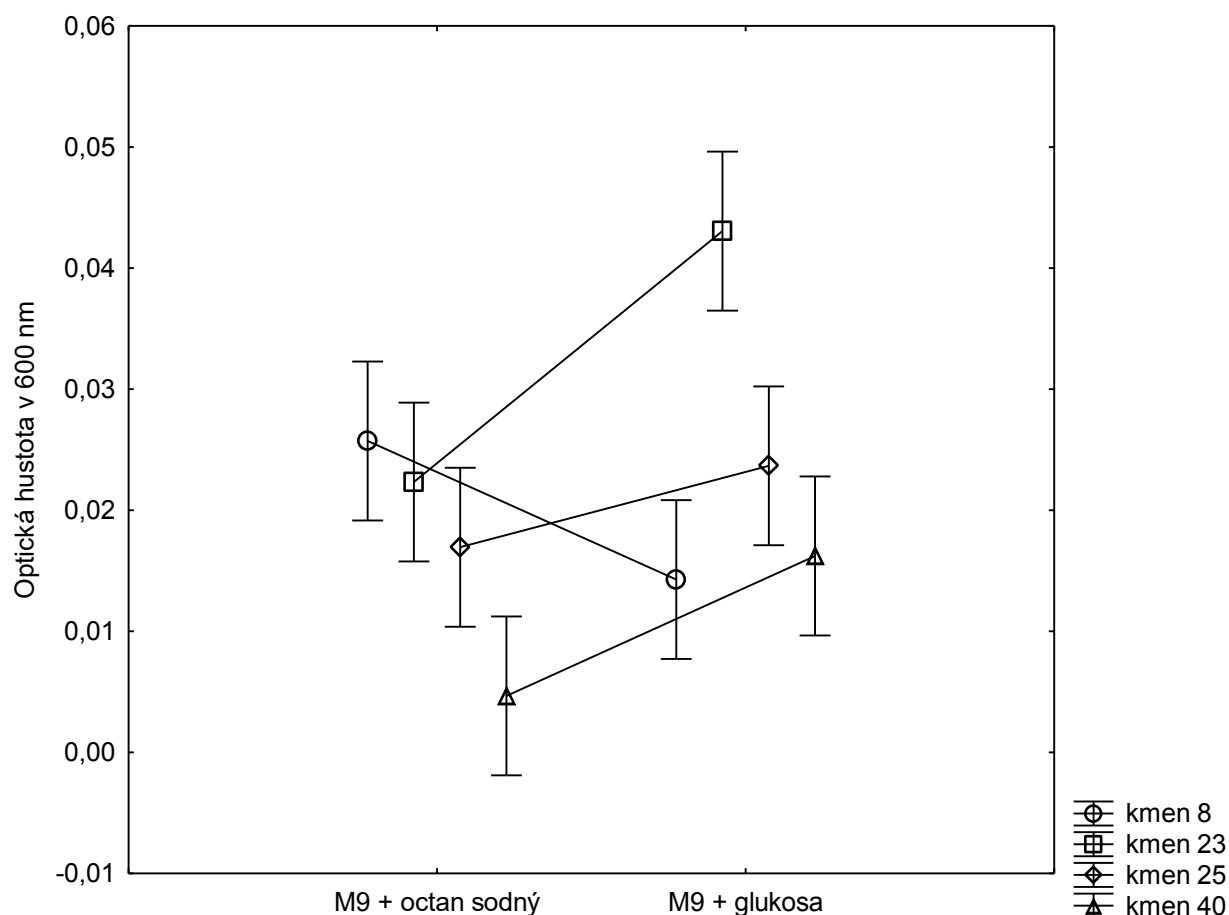
Podle testu prováděného s výběrem osmi kmenů, kde jsme kmen přidali jako další faktor, měl na optickou hustotu vliv kmen a přídavek octanu nebo glukózy. Přítomnost irbesartanu v médiu opět nehrála roli (viz. Tab. IIX.) Průkazná byla i interakce přídavku acetátu a glukózy s ne/přítomností irbesartanu. V médiích bez irbesartanu měl přídavek glukózy a acetátu vliv na optickou hustotu, ale v médiích s irbesartanem ne (viz. Obr. 11). Větší optická hustota byla v médiích s glukózou. Výjimkou byl *Pseudomonas linyingensis*–kmen 8, který narostl do větší optické hustoty v médiu s octanem sodným (viz. Obr.12).

Tab. II X. Stupně volnosti, hodnota testové statistiky, F, dosažená hladina významnosti, p (tučně: $p < 0,05$) (M9 + AI: n = 12, M9 + GI: n = 12, M9 + A: n = 4, M9 + G: n = 4).

	Stupně volnosti	Hodnota testové statistiky F	Hladina významnosti p
Kmen	3	17,3652	0,00028
Přídavek octanu sodného/glukózy	1	9,9056	0,00623
Přítomnost irbesartanu	1	0,4355	0,518692
Interakce: kmen*řídavek octanu sodného/glukózy	3	9,5542	0,000747
Interakce: kmen*řítomnost irbesartanu	3	2,3928	0,106613
Interakce: řídavek octanu sodného/glukózy* řítomnost irbesartanu	1	5,1029	0,038199
Interakce: kmen*řídavek octanu sodného/glukózy*řítomnost irbesartanu	3	1,9414	0,163628



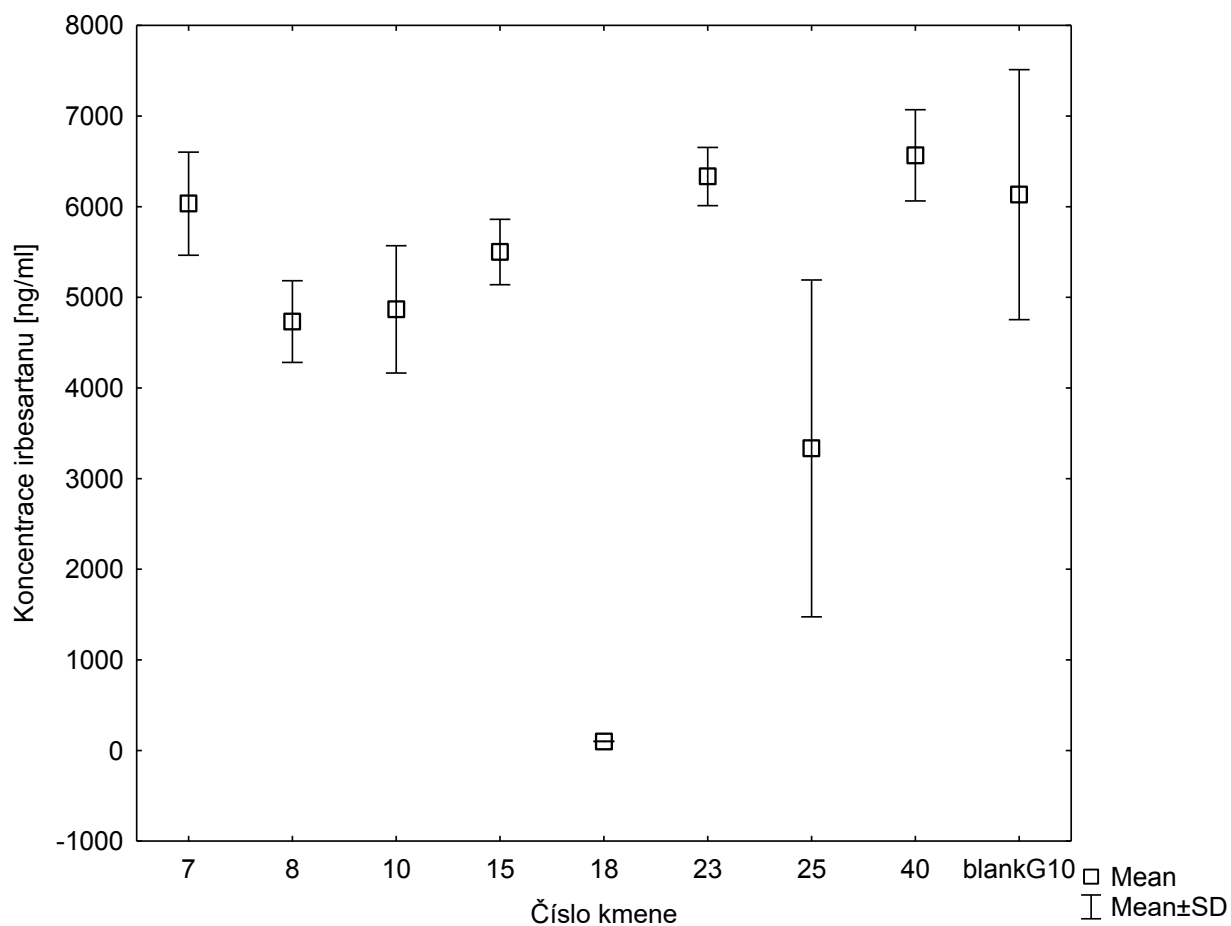
Obr. 11: Průměry optické hustoty při 600 nm pro média s octanem sodným a s glukózou bez a s řídavkem irbesartanu s 95% konfidenčním intervalem, (M9 + AI: n = 12, M9 + GI: n = 12, M9 + A: n = 4, M9 + G: n = 4).



Obr. 12: Průměry optické hustoty při 600 nm pro média s octanem sodným a s glukózou podle kmenů s 95% konfidenčním intervalem (n=32).

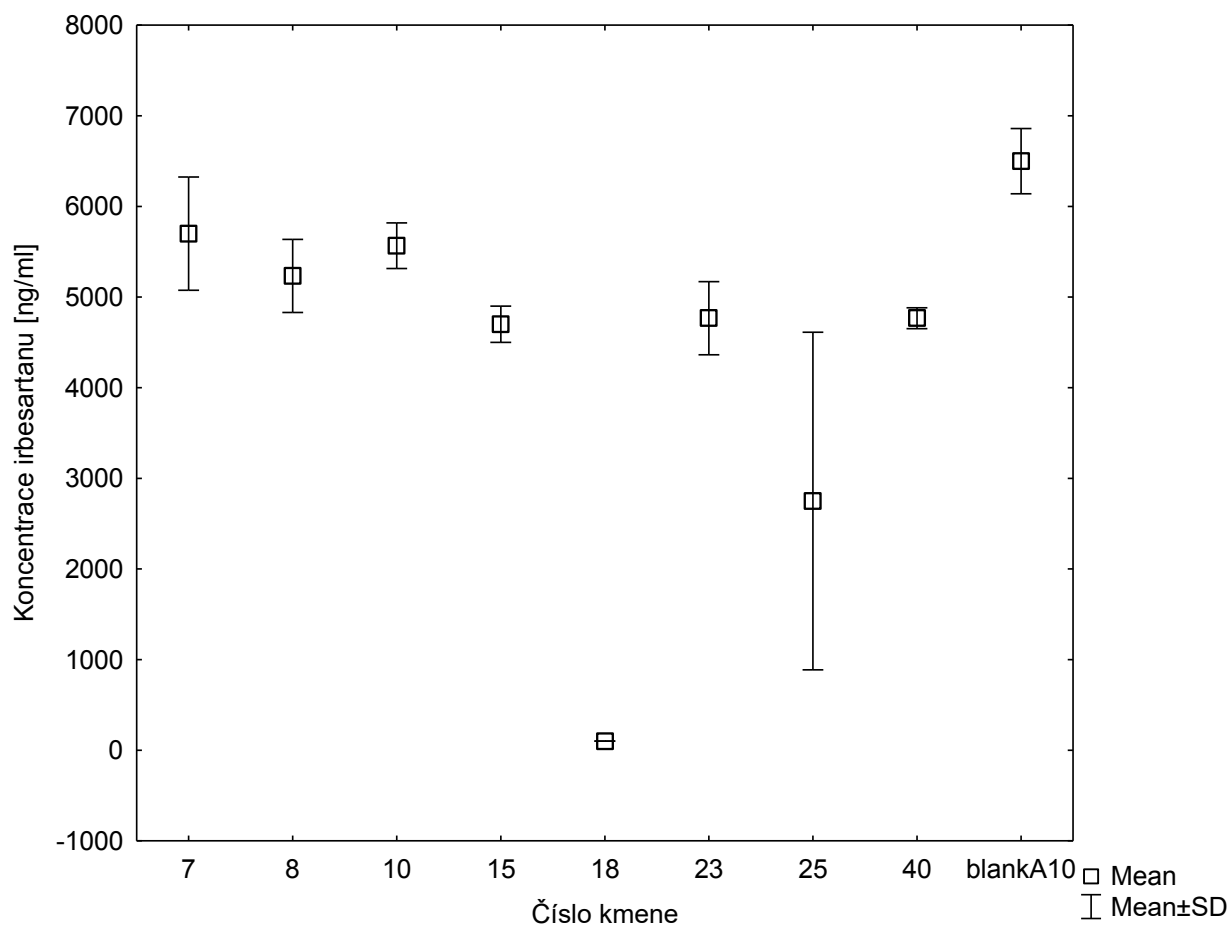
4.2.2 Vliv bakterií na změnu koncentrace irbesartanu v kultivačním médiu

Koncentrace irbesartanu v médiích s glukózou se mezi jednotlivými kmeny (viz. Obr. 13) lišila ($F_{8,17}=16,5$, $p=0,000001$). Následné testy ukázaly, že se od blanku významně liší *Lentzea pudingi* – kmen 18, u něhož byla koncentrace pod limitem kvantifikace (100 ng/ml) ve všech měřeních a *Pseudomonas sp.* – kmen 25 ($p=0,022$) s průměrnou koncentrací 3 333 ng/ml. U kmene 25 byla velká směrodatná odchylka, způsobená velmi nízkou koncentrací u vzorku č. 25 GIa s koncentrací 1 200 ng/ml. Koncentrace blanku (M9-10+GI) byla v průměru 6 133 ng/ml.



Obr. 13: Průměrná koncentrace irbesartanu pro jednotlivé kmeny v médiích s glukózou \pm směrodatná odchylka.

U médií s acetátem nebyl splněn požadavek na homogenitu variací, a tak byl použit neparametrický test. Od blanku se lišila *Lentzea pudingi* – kmen 18 ($p=0,008$), u něhož byla koncentrace pod limitem kvantifikace (100 ng/ml) ve všech měřeních a *Pseudomonas* sp. – kmen 25 ($p=0,047$) s průměrnou koncentrací 2 750 ng/ml (viz Obr. 14)



Obr. 14: Průměrná koncentrace irbesartanu pro jednotlivé kmeny v médiích s octanem sodným \pm směrodatná odchylka.

Pokud bychom do testu nezahrnuli vzorek č. 25 A1c, který se výrazně liší od zbývajících dvou měření, byla by splněná homogenita variancí. Pomocí testu ANOVA bychom tak získali průkazný rozdíl vůči blanku (koncentrace 6 500 ng/ml) u dalších vzorků: *Pseudomonas linyingensis* – kmen 8: $p = 0,01$, *Streptomyces coeruleus* – kmen 15: $p=0,0005$, *Pseudomonas frederiksbergensis* – kmen 23: $p=0,007$ a *Phyllobacterium ifriqiyense* – kmen 40: $p=0,0007$.

5 Diskuze

5.1 Izolace bakterií

Nejvíce vyizolovaných kmenů bylo rodů *Streptomyces* a *Pseudomonas*. *Streptomyces* byl nejpočetnější rod na R2A pevném médiu, *Pseudomonas* na M2 pevném médiu. R2A pevné médium obsahuje 6 různých zdrojů uhlíku, ve velmi malých množstvích, a minerály. M2 pevné médium obsahuje 3 různé zdroje uhlíku ve zhruba 10x větších koncentracích a žádné minerály. R2A médium je koncentrací zdrojů uhlíku bližší M9 mediu, použitému k testování kmenů na schopnost rozkládat irbesartan. Z kmenů s průkazným rozdílem koncentrace irbesartanu oproti blanku byl jeden vypěstován na M2 mediu a jeden na R2A mediu. Mezi izolovanými bakteriemi tedy převládali zástupci tříd: Actinobacteria a Gammaproteobacteria, dále Alphaproteobacteria a Bacilli a ojediněle se objevili zástupci tříd: Betaproteobacteria a Flavobacteriia.

Některé bakteriální kmeny byly identifikovány stejně (37 a 38: *Variovorax paradoxus*, 21, 26: *Sphingopyxis chilensis*, 2, 19, 31: *Bacillus simplex* a 1, 17: *Rhodococcus erythropolis*). Kromě kmenů 1 a 17, které vykazovali jistou podobnost, opakovanou izolaci stejného kmene bakterie vyvrátila analýza box-PCR. Pro degradační experiment jsme vybrali zástupce rodů *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Variovorax*, *Phyllobacterium*, *Lentzea*, *Azotobacter*, *Sphingobium* a *Sphingopyxis*. Kmen *Sphingopyxis chilensis* se nám bohužel nepodařilo ani po více pokusech oživit z glycerolových konzerv.

Rod *Pseudomonas* se spolu s rodem *Rhodococcus* (ten jsme vyizolovali 4x, z toho ve dvou případech stejný druh) vyznačuje schopností degradovat širokou škálu polutantů v prostředí, zejména syntetické organické sloučeniny jako herbicidy, insekticidy nebo průmyslová rozpouštědla. Bakterie z rodu *Pseudomonas* rozkládají například kaprolaktam, bromoxynil, atrazin nebo parathion. Bakterie z rodu *Rhodococcus* mohou rozkládat tetrahydrofuran, bromoxynil, atrazin nebo dibenzothiopen. Bakterie z rodu *Azotobacter* zase mohou degradovat thiokyanát nebo kyselinu 2,4-fenoxyoctovou (Dworkin a kol., 2006). *Variovorax* dokáže degradovat například estery ftalátů (Prasad a Suresh, 2012) nebo 3-nitrotyrosin (Nishino a Spain, 2006). Do rodu *Sphingobium* patří bakterie schopné biodegradace ibuprofenu a bisfenolu A, do rodu *Sphingopyxis* bakterie degradující ibuprofen a triklosan (Zhou a kol., 2013).

Bakterie z rodu *Streptomyces* jsou známé pro svoji schopnost degradovat různé komplexní organické látky včetně xenobiotik. Někteří zástupci (zejména *Streptomyces griseus* a *Streptomyces griseolus*) se nejlépe osvědčili v pokusu Alexandre a kol. (2004), který měl za

cíl za pomoci mikrobů vybraných ze sbírek připravit lidské metabolity irbesartanu. Ve zmíněné studii produkoval metabolity irbesartanu v menším množství i *Rhodococcus erythropolis*, který jsme také izolovali. Nicméně, v první části experimentu zaměřeného na skrínink transformačního potenciálu kmenů jsme u něj nezaznamenali výrazný pokles koncentrace irbesartanu a tak jsme s ním dále nepracovali.

5.2 Nárůst bakterií

Nárůst bakterií jsme stanovovali pomocí měření optické hustoty při 600 nm. Větší nárůst bakterií byl v médiích s glukózou než v médiích s octanem sodným. Pouze u jednoho izolátu, *Pseudomonas linyingensis* – kmen 8, tomu bylo naopak. Koncentrace přídavek byly takové, aby bylo v médiu stejně uhlíku, ale glukóza je pravděpodobně snadněji využitelný zdroj uhlíku než octan sodný. Podle výsledků druhé části transformačního experimentu, hraje přídavek octanu nebo glukózy roli jen v médiích bez irbesartanu (byla průkazná interakce přídavek octanu sodného/glukózy a přítomnosti irbesartanu). Samotný irbesartan vliv na nárůst bakterií neměl.

Optickou hustotu nebylo možné použít ke kvantifikaci nárůstu bakterií, které v médiu tvoří shluky (*Lentzea*, *Streptomyces*), proto bylo množství získaných dat omezené. Použití této metody má i jiné omezení: i u druhů, které shluky netvoří, můžeme při stejném počtu buněk naměřit různé optické hustoty. Buňky mohou mít jinou velikost a jinak rozptylovat světlo. Nepředpokládáme, že by se schopnost bakterií rozptylovat nebo pohlcovat světlo měnila během kultivace, ale pro srovnání různých kmenů mezi sebou jsou údaje o optické hustotě spíše orientační.

5.3 Transformace irbesartanu

Koncentrace irbesartanu v blancích byla po deseti dnech třepání a filtraci značně nižší než cílených 10 000 ng/ml. V pokusu se zbylými médii z první části transformačního experimentu byla průměrná koncentrace 10 300 ng/ml v čerstvě rozmražených médiích, po inkubaci při 28 °C (bez filtrace) 6 000 ng/ml. Více než 40 % irbesartanu tedy bylo přeměněno jen samotnou inkubací. Průměrná koncentrace v médiu po filtraci byla ještě nižší: 4 700 ng/ml. Předpokládáme, že se část irbesartanu zachytila na filtru. Tento krok by bylo tedy potřeba optimalizovat tím, že by se testovaly jiné vhodnější membránové filtry. Ve vodném roztoku při 25 °C a pH 7,4, což bylo i pH M9 média použitého v transformačním experimentu, má podle Mbah (2004) irbesartan poločas rozkladu jen 28 hodin. Rychlostní konstanta reakce navíc rostla s teplotou: rozdíl 10 °C zvýšil rychlostní konstantu zhruba 2x (rozklad irbesartanu odpovídal kinetice reakce 1. řádu). Rozklad byl také katalyzován hydroxylovými ionty a byl

rychlejší ve vyšším pH. Jiné bazické ionty takový efekt neměly. Úbytek irbesartanu ve sterilním kultivačním médiu bychom tedy mohli vysvětlit abiotickým rozkladem ve vodním prostředí. Nicméně, inokulace některými bakteriemi měla zásadní vliv na pokles koncentrace irbesartanu oproti hodnotám dosaženým v abiotickém prostředí. Zejména se jedná o *Lentzea pudingi* – kmen 18, u něhož byla koncentrace irbesartanu v médiu pokaždé pod limitem kvantifikace.

Lentzea pudingi – kmen 18 je grampozitivní, aerobní bakterie s větveným vegetativním myceliem a vzdušným myceliem fragmentovaným do tyčinkovitých spor. Je zajímavé, že byla izolována z půdy SC, tedy z půdy, která nebyla obohacena irbesartanem. Naše sekvence měla shodu s *Lentzea pudingi* (99,43 %), *Lentzea cavernae* (99,01 %), *Lentzea waywayandensis* (99,01 %) a *Lentzea albida* (99,00 %). Podle shody sekvence nukleotidů pro gen 16S rRNA, byl typový kmen *L. pudingi* popsán v práci Cao a kol. (2017) jako velmi příbuzný druhům *Lentzea albida* (98.8 %) a *Lentzea waywayandensis* (98.5 %). Pro ujasnění klasifikace by bylo vhodné provést fylogenetickou analýzu kmene 18.

Lentzea patří mezi aktinomycety, které produkují velké množství bioaktivních metabolitů (antibiotika, imunopresory, biopesticidy, fytotoxiny, enzymy degradující komplexní polymery) a mohly by být užitečné v bioremediaci po znečištění pesticidy a těžkými kovy (Alvarez a kol., 2017). Bakterie blízké příbuzná našemu izolátu č. 18, *Lentzea waywayandensis* je schopna degradace polylaktidu na monomery (Tokiwa a Calabria, 2006.) Do rodu *Lentzea* také patří některé kmeny schopné hydroxylací přeměňovat imunopresivum, inhibitor histon deacetylázy AS1387392, na účinnější AS1429716 (Sasamura a kol., 2010.) Patří sem také některé z kmenů, které stereospecifickou hydroxylací přeměňují lithocholovou kyselinu (LCA) na léčivum, kyselinu ursodeoxycholovou (UDCA) (Kollerov a kol., 2013).

Podle Alexandre a kol. (2004) mikroorganismy mohou produkovat metabolity irbesartanu, které byly identifikovány jako diastereomerní deriváty hydroxylované v spirocyklopentanovém kruhu, otevřené přeskupené hydroxylované deriváty a pravděpodobně N-glykosidový konjugát irbesartanu. Podle Boix a kol. (2016b) mezi rozkladné produkty irbesartanu patří sloučeniny vzniklé hydroxylací a hydrogenací různých částí molekuly a látka, která by mohla být demethylovaný irbesartan. Dále byly detekovány produkty stechiometrickým vzorcem odpovídající oxidaci, nebo alkylaci irbesartanu a rovněž oxidaci a následné hydroxylaci jeho molekuly. Abychom zjistili, zda námi izolovaný kmen přeměňuje

irbesartan také hydroxylací, či dříve popsaným procesem, potřebujeme analyzovat metabolity irbesartanu v médiu. V současné době čekáme na výsledky těchto analýz.

Průkazný rozdíl koncentrace od blanku byl také u *Pseudomonas* sp. – kmene 25. V médiu s glukózou byla jeho průměrná koncentrace 3 333 ng/ml a v médiu s octanem sodným 2 750 ng/ml. U kmene 25 byla ale také značná variabilita mezi koncentracemi naměřenými v biologických opakováních. Nechali jsme proto přeměřit koncentrace v zamražených zbytcích médií kmene 25 ze stejného experimentu, ale výsledky byly velmi podobné. U biologických opakování s malou koncentrací jsme čekali větší nárůst v médiu, který by rozdíl mohl vysvětlit, ale nárůst bakterie v médiích s malou koncentrací irbesartanu byl naopak výrazně menší (zhruba 3,5x). Ačkoliv nám účinky metabolitů irbesartanu na mikroorganismy nejsou známy, nepředpokládáme, že by byly toxické tak aby dokázali nárůst bakterií takto snížit. Proto by bylo experiment vhodné zopakovat.

Kmen 25 má nejbližší shodu s *Pseudomonas helmanticensis* a *Pseudomonas baetica*. Pokud je nám známo, u *P. helmanticensis* zatím nebyla zjištěna schopnost degradovat xenobiotika, ale *P. baetica* by mohl být jedním z druhů schopných rozkládat uhlovodíky v ropě (Korneykova a kol., 2018). U některých kmenů byl průkazný rozdíl v koncentraci irbesartanu oproti blanku pouze v médiu s octanem sodným, a to pouze při vyloučení kmene 25 s velkou variancí, což umožní použití silnějšího testu ANOVA namísto neparametrického Kruskal–Wallisova testu. Týká se to *Pseudomonas linyingensis* – kmen 8, *Streptomyces coeruleus* – kmen 15, *Pseudomonas frederiksbergensis* – kmen 23 a *Phyllobacterium ifriqiyense* – kmen 40. Z těchto kmenů je degradační potenciál znám u *Pseudomonas linyingensis*, což je bakterie poprvé izolovaná z půdy dlouhodobě vystavené sulfonilmočovinným herbicidům (He a kol., 2012) schopná degradovat fenol (Mutlu a Poyraz, 2017) nebo u *Pseudomonas frederiksbergensis*. Ten může degradovat některé alkany (Abdel-Megeed, 2013).

6 Závěr

Z údajů dostupných v literatuře můžeme shrnout, že člověk ovlivňuje koncentraci irbesartanu a jemu podobných látek v prostředí zejména vypouštěním odpadních vod čištěných v ČOV do povrchových vod a hnojením čistírenskými kaly. Koncentrace irbesartanu v čistírenském kalu je podle literatury zhruba 5–50x vyšší než v půdě. Koncentrace irbesartanu v odpadních vodách se pohybuje od desítek ng/l do desetitisíců ng/l a v povrchových vodách od desetin po stovky ng/l. Několik studií popsalo produkty mikrobiální přeměny irbesartanu, přičemž hlavními metabolity byly zejména hydroxylované deriváty irbesartanu.

Ze zemědělské půdy obohacené o irbesartan jsme izolovali 38 kmenů bakterií, z nichž u 30 jsme provedli druhové určení. Z 26 různých druhů bakterií byly nejpočetněji zastoupeny rody *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Rhodococcus*.

Vybrané bakterie jsme testovali na schopnost transformovat irbesartan a zároveň jsme pomocí měření optické hustoty hodnotili jejich nárůst. Větší nárůst bakterií byl v médiích, kde byla zdrojem uhlíku glukóza než v médiích, kde byl zdrojem uhlíku octan sodný. Pokud však byl v médiu irbesartan, neměl zdroj uhlíku na nárůst bakterií vliv. Samotný irbesartan nárůst bakterií neovlivnil.

Izolovali jsme jeden kmen z rodu *Lentzea*, který ve všech vzorcích snížil koncentraci irbesartanu pod limit kvantifikace. Dále koncentraci irbesartanu průkazně snižoval i zástupce rodu *Pseudomonas*. Vzhledem k velké varianci koncentrací u tohoto kmene by bylo vhodné experiment s tímto kmenem zopakovat.

7 Použitá literatura

- ABDEL-MEGEED, Ahmed, 2013. Potential Degradation of Certain Alkanes by *Pseudomonas frederiksbergensis*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. (7), 13–21.
- ALEXANDRE, Vanessa, Sophie LADRIL, Michèle MAURS a Robert AZERAD, 2004. Microbial models of animal drug metabolism. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **29**(1-6), 173-179. DOI: 10.1016/j.molcatb.2004.01.012. ISSN 13811177. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117704000530>
- AL-RAJAB, Abdul Jabbar, Lyne SABOURIN, David R. LAPEN a Edward TOPP, 2015. Dissipation of triclosan, triclocarban, carbamazepine and naproxen in agricultural soil following surface or sub-surface application of dewatered municipal biosolids. *Science of The Total Environment*. **512-513**, 480-488. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.075. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715000972>
- ALVAREZ, Analia, Juliana Maria SAEZ, José Sebastian DAVILA COSTA, et al., 2017. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*. **166**, 41-62. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516312607>
- BARRA CARACCILO, Anna, Edward TOPP a Paola GRENNI, 2015. Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **106**, 25-36. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.11.040. ISSN 07317085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514005767>
- BASTOS, Filipe, José BESSA, Catarina C. PACHECO, Paolo DE MARCO, Paula M.L. CASTRO, Manuel SILVA a Ruben FERREIRA JORGE, 2002. Enrichment of microbial cultures able to degrade 1,3-dichloro-2-propanol: A comparison between batch and continuous methods. *Biodegradation*. **13**(3), 211-220. DOI: 10.1023/A:1020834603785. ISSN 09239820. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020834603785>
- BAYER, Anne, Robert ASNER, Walter SCHÜSSLER, Willi KOPF, Klaus WEIß, Manfred SENGL a Marion LETZEL, 2014. Behavior of sartans (antihypertensive drugs) in wastewater treatment plants, their occurrence and risk for the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*. **21**(18), 10830-10839. DOI: 10.1007/s11356-014-3060-z. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3060-z>
- BOIX, C., M. IBÁÑEZ, D. FABREGAT-SAFONT, E. MORALES, L. PASTOR, J.V. SANCHO, J.E. SÁNCHEZ-RAMÍREZ a F. HERNÁNDEZ, 2016a. Behaviour of emerging contaminants in sewage sludge after anaerobic digestion. *Chemosphere*. **163**, 296-304. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.098. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516309985>

BOIX, Clara, María IBÁÑEZ, Juan V. SANCHO, John R. PARSONS, Pim de VOOGT a Félix HERNÁNDEZ, 2016b. Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products. *Journal of Hazardous Materials*. **302**, 175-187. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.09.053. ISSN 03043894. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389415301084>

CAO, Chengliang, Bo YUAN, Sheng QIN, Jihong JIANG, Faxiang TAO a Bin LIAN, 2017. *Lentzea pudingi* sp. nov., isolated from a weathered limestone sample in a karst area. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **67**(11), 4873-4878. DOI: 10.1099/ijsem.0.002400. ISSN 1466-5026. Dostupné také z:

<http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002400>

CARTER, Laura J., Jim J. RYAN a Alistair B.A. BOXALL, 2016. Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental Pollution*. **213**, 922-931. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.03.044. ISSN 02697491. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749116302251>

CELIZ, Mary D., Jerry TSO a Diana S. AGA, 2009. PHARMACEUTICAL METABOLITES IN THE ENVIRONMENT: ANALYTICAL CHALLENGES AND ECOLOGICAL RISKS. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **28**(12), MS 09-173. DOI: 10.1897/09-173.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z:

<http://doi.wiley.com/10.1897/09-173.1>

CROOM, Katherine F a Greg L PLOSKER, 2008. Irbesartan. *Drugs*. **68**(11), 1543-1569. DOI: 10.2165/00003495-200868110-00008. ISSN 0012-6667. Dostupné také z:

<http://link.springer.com/10.2165/00003495-200868110-00008>

CYCOŃ, Mariusz, Sławomir BORYMSKI, Bartłomiej ŻOŁNIERCZYK a Zofia PIOTROWSKA-SEGET, 2016. Variable Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) on Selected Biochemical Processes Mediated by Soil Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. **7**. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01969. ISSN 1664-302X. Dostupné také z:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01969/full>

DWORKIN, Martin, Falkow STANLEY, Eugene ROSENBERG, Karl-Heinz SCHLEIFER, Erko STACKERBRANDT. 2006. In *The Prokaryotes: A Handbook On The Biology Of Bacteria*, 3rd ed., Vol. 1 str. 97 a Vol. 2 str. 959–963. London: Springer.

FALÅS, Per, Arne WICK, Sandro CASTRONOVO, Jonathan HABERMACHER, Thomas A. TERNES a Adriano JOSS, 2016. Tracing the limits of organic micropollutant removal in biological wastewater treatment. *Water Research*. **95**, 240-249. DOI: 10.1016/j.watres.2016.03.009. ISSN 00431354. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135416301361>

FICK, Jerker, Richard H. LINDBERG, Lennart JAK a Eva BRORSTRÖM LUNDÉN, 2011. *Results from the Swedish National Screening Programme 2010: Subreport 3. Pharmaceuticals* [online]. Swedish Environmental Research Institute.

FRIEDEL, J. K., T. LANGER, C. SIEBE a K. STAHR, 2000. Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and Fertility of Soils*. **31**(5), 414-421. DOI: 10.1007/s003749900188. ISSN 0178-2762. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s003749900188>

GAO, Jie, Jun HUANG, Weiwei CHEN, Bin WANG, Yujue WANG, Shubo DENG a Gang YU, 2016. *Fate and removal of typical pharmaceutical and personal care products in a wastewater treatment plant from Beijing: a mass balance study*. **10**(3), 491-501. DOI: 10.1007/s11783-016-0837-y. ISSN 2095-2201. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11783-016-0837-y>

GROSSBERGER, Amnon, Yitzhak HADAR, Thomas BORCH a Benny CHEFETZ, 2014. Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental Pollution*. **185**, 168-177. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.10.038. ISSN 02697491. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749113005666>

GUIMARÃES, B., V.L. MARIA, J. RÖMBKE a M.J.B. AMORIM, 2019. Multigenerational exposure of *Folsomia candida* to ivermectin – Using avoidance, survival, reproduction, size and cellular markers as endpoints. *Geoderma*. **337**, 273-279. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.09.030. ISSN 00167061. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706118307997>

HE, Wei-Hong, Ya-Nan WANG, Xun DU, Yang ZHOU, Bin JIA, Jiang BIAN, Shuang-Jiang LIU a Guo-Can CHEN, 2012. *Pseudomonas linyingensis* sp. nov: A Novel Bacterium Isolated from Wheat Soil Subjected to Long-term Herbicides Application. *Current Microbiology*. **65**(5), 595-600. DOI: 10.1007/s00284-012-0187-3. ISSN 0343-8651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-012-0187-3>

CHEN, Guangquan, Michiel W. DEN BRAVER, Cornelis A.M. VAN GESTEL, Nico M. VAN STRAALLEN a Dick ROELOFS, 2015. Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. *Environmental Pollution*. **199**, 253-260. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.01.032. ISSN 02697491. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749115000688>

CHRISTOU, Anastasis, George PAPADAVID, Panagiotis DALIAS, Vasileios FOTOPOULOS, Costas MICHAEL, Josep Maria BAYONA, Benjamin PIÑA a Despo FATTA-KASSINOS, 2019. Ranking of crop plants according to their potential to uptake and accumulate contaminants of emerging concern. *Environmental Research*. **170**, 422-432. DOI: 10.1016/j.envres.2018.12.048. ISSN 00139351. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001393511830687X>

JECHALKE, Sven, Holger HEUER, Jan SIEMENS, Wulf AMELUNG a Kornelia SMALLA, 2014. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*. **22**(9), 536-545. DOI: 10.1016/j.tim.2014.05.005. ISSN 0966842X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X14001140>

JENSEN, John, Xiaoping DIAO a Anne Duus HANSEN, 2009. SINGLE- AND TWO-SPECIES TESTS TO STUDY EFFECTS OF THE ANTHELMINTICS IVERMECTIN

AND MORANTEL AND THE COCCIDIOSTATIC MONENSIN ON SOIL INVERTEBRATES. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **28**(2), 08-069. DOI: 10.1897/08-069.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/08-069.1>

KASPRZYK-HORDERN, Barbara, Richard M. DINSDALE a Alan J. GUWY, 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*. **42**(13), 3498-3518. DOI: 10.1016/j.watres.2008.04.026. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135408001802>

KINNEY, Chad A., Edward T. FURLONG, Stephen L. WERNER a Jeffery D. CAHILL, 2006. PRESENCE AND DISTRIBUTION OF WASTEWATER-DERIVED PHARMACEUTICALS IN SOIL IRRIGATED WITH RECLAIMED WATER. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **25**(2), 05-187R. DOI: 10.1897/05-187R.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/05-187R.1>

KLANČAR, Anita, Jurij TRONTELJ a Robert ROŠKAR, 2018. *Development of a Multi-Residue Method for Monitoring 44 Pharmaceuticals in Slovene Surface Water by SPE-LC-MS/MS*. **229**(6). DOI: 10.1007/s11270-018-3845-7. ISSN 0049-6979. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11270-018-3845-7>

KLEMENT, Aleš, Radka KODEŠOVÁ, Martina BAUEROVÁ, et al., 2018. Sorption of citalopram, irbesartan and fexofenadine in soils: Estimation of sorption coefficients from soil properties. *Chemosphere*. **195**, 615-623. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.098. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653517320684>

KODEŠOVÁ, Radka, Roman GRABIC, Martin KOČÁREK, Aleš KLEMENT, Oksana GOLOVKO, Miroslav FÉR, Antonín NIKODEM a Ondřej JAKŠÍK, 2015. Pharmaceuticals' sorptions relative to properties of thirteen different soils. *Science of The Total Environment*. **511**, 435-443. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.088. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969714017999>

KODEŠOVÁ, Radka, Aleš KLEMENT, Oksana GOLOVKO, Miroslav FÉR, Antonín NIKODEM, Martin KOČÁREK a Roman GRABIC, 2019. Root uptake of atenolol, sulfamethoxazole and carbamazepine, and their transformation in three soils and four plants. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-019-04333-9. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-019-04333-9>

KODEŠOVÁ, Radka, Martin KOČÁREK, Aleš KLEMENT, et al., 2016. An analysis of the dissipation of pharmaceuticals under thirteen different soil conditions. *Science of The Total Environment*. **544**, 369-381. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.085. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715310664>

KOLLEROV, V.V., D. MONTI, N.O. DESHCHEREVSKAYA, et al., 2013. Hydroxylation of lithocholic acid by selected actinobacteria and filamentous fungi. *Steroids*. **78**(3), 370-378. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.12.010. ISSN 0039128X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039128X12003418>

KORNEYKOVA, M. V., A. A. CHAPORGINA a V. V. REDKINA, 2019. Oil Destructive Activity of Fungi Isolated from the Soils of the Kola Peninsula. *Urbanization: Challenge and Opportunity for Soil Functions and Ecosystem Services*. Cham: Springer International Publishing, 2019-06-01, 123-134. Springer Geography. DOI: 10.1007/978-3-319-89602-1_16. ISBN 978-3-319-89601-4. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-89602-1_16

LACHASSAGNE, Delphine, Marilyne SOUBRAND, Magali CASELLAS, Adriana GONZALEZ-OSPINA a Christophe DAGOT, 2015. Impact of sludge stabilization processes and sludge origin (urban or hospital) on the mobility of pharmaceutical compounds following sludge landspreading in laboratory soil-column experiments. *Environmental Science and Pollution Research*. **22**(21), 17135-17150. DOI: 10.1007/s11356-015-4918-4. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4918-4>

LETZEL, Thomas, Anne BAYER, Wolfgang SCHULZ, et al., 2015. LC–MS screening techniques for wastewater analysis and analytical data handling strategies: Sartans and their transformation products as an example. *Chemosphere*. **137**, 198-206. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.083. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515007031>

LI, Binghua, Yongtao CAO, Xiangyu GUAN, Yuehua LI, Zhongyong HAO, Wei HU a Liang CHEN, 2019a. Microbial assessments of soil with a 40-year history of reclaimed wastewater irrigation. *Science of The Total Environment*. **651**, 696-705. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.193. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718336386>

LIN, Kunde a Jay GAN, 2011. Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*. **83**(3), 240-246. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.083. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653510015183>

LI, W.C., 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*. **187**, 193-201. DOI: 10.1016/j.envpol.2014.01.015. ISSN 02697491. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749114000219>

LI, Yifei, Bing WU, Guibing ZHU, Yu LIU, Wun Jern NG, Adhityan APPAN a Soon Keat TAN, 2016. High-throughput pyrosequencing analysis of bacteria relevant to cometabolic and metabolic degradation of ibuprofen in horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Science of The Total Environment*. **562**, 604-613. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.020. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896971630701X>

LI, Yuanbo, J. Brett SALLACH, Wei ZHANG, Stephen A. BOYD a Hui LI, 2019b. Insight into the distribution of pharmaceuticals in soil-water-plant systems. *Water Research*. **152**, 38-46. DOI: 10.1016/j.watres.2018.12.039. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135418310571>

- LOOS, Robert, Raquel CARVALHO, Diana C. ANTÓNIO, et al., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*. **47**(17), 6475-6487. DOI: 10.1016/j.watres.2013.08.024. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135413006647>
- MADIKIZELA, Lawrence Mzukisi, Somandla NCUBE a Luke CHIMUKA, 2018. Uptake of pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions and natural occurring plant species: A review. *Science of The Total Environment*. **636**, 477-486. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.297. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896971831475X>
- MBAH, C. J., 2004. Kinetics of decomposition of irbesartan in aqueous solutions determined by high performance liquid chromatography. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Scpp*. **59**(12), 920–922.
- MONTEIRO, SARA C. a ALISTAIR B.A. BOXALL, 2009. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **28**(12), 2546–2554.
- MONTEMURRO, Nicola, Cristina POSTIGO, Antonio LONIGRO, Sandra PEREZ a Damià BARCELÓ, 2017. Development and validation of an analytical method based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection for the simultaneous determination of 13 relevant wastewater-derived contaminants in lettuce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **409**(23), 5375-5387. DOI: 10.1007/s00216-017-0363-1. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0363-1>
- MORENO-GONZÁLEZ, R., S. RODRIGUEZ-MOZAZ, M. GROS, D. BARCELÓ a V.M. LEÓN, 2015. Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water and sediment from a mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environmental Research*. **138**, 326-344. DOI: 10.1016/j.envres.2015.02.016. ISSN 00139351. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935115000444>
- NAIDU, Ravi, Victor Andres ARIAS ESPANA, Yanju LIU a Joytishna JIT, 2016. Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. *Chemosphere*. **154**, 350-357. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.068. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516303836>
- NILGUN POYRAZ, Nilgun a Mehmet Burcin MUTLU, 2017. CHARACTERIZATION OF PHENOL-DEGRADING BACTERIA FROM WASTEWATER TREATMENT PLANTS BY 16S rRNA and PHENOL HYDROXYLASE GENES. *Fresenius Environmental Bulletin*. **26**(6), 4227-4237.
- NISHINO, S. F. a J. C. SPAIN, 2006. Biodegradation of 3-Nitrotyrosine by Burkholderia sp. Strain JS165 and Variovorax paradoxus JS171. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**(2), 1040-1044. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1040-1044.2006. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.72.2.1040-1044.2006>

ONG, Timothy T. X., Ewan W. BLANCH a Oliver A. H. JONES, 2018. Predicted environmental concentration and fate of the top 10 most dispensed Australian prescription pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*. **25**(11), 10966-10976. DOI: 10.1007/s11356-018-1343-5. ISSN 0944-1344. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-1343-5>

OOSTERHUIS, Mathijs, Frank SACHER a Thomas L. TER LAAK, 2013. Prediction of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Science of The Total Environment*. **442**, 380-388. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.10.046. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712013289>

PAN, Min a L.M. CHU, 2016. Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of The Total Environment*. **545-546**, 48-56. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.040. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715311979>

PETROVIĆ, Mira, Biljana ŠKRBIĆ, Jelena ŽIVANČEV, Laura FERRANDO-CLIMENT a Damia BARCELO, 2014. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole–linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of The Total Environment*. **468-469**, 415-428. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.079. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969713010061>

PICÓ, Yolanda a Vicente ANDREU, 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **387**(4), 1287-1299. DOI: 10.1007/s00216-006-0843-1. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0843-1>

PRASAD, Bablu a Sumathi SURESH, 2012. Biodegradation of Phthalate Esters by *Variovorax* sp. *APCBEE Procedia*. **1**, 16-21. DOI: 10.1016/j.apcbee.2012.03.004. ISSN 22126708. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221267081200005X>

RUBASINGHEGE, Gayan, Rubi GURUNG, Hom RIJAL, Sabino MALDONADO-TORRES, Andrew CHAN, Shishir ACHARYA, Snezna ROGELJ a Menake PIYASENA, 2018. Abiotic degradation and environmental toxicity of ibuprofen: Roles of mineral particles and solar radiation. *Water Research*. **131**, 22-32. DOI: 10.1016/j.watres.2017.12.016. ISSN 00431354. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135417310114>

SASAMURA, Satoshi, Hideyuki MURAMATSU, Shigehiro TAKASE, Akihiko FUJIE, Takashi FUJII, Motohiro HINO, Kazutoshi SAKAMOTO a Michizane HASHIMOTO, 2010. Bioconversion of AS1387392: screening and characterization of actinomycetes that convert AS1387392 to AS1429716. *The Journal of Antibiotics*. **63**(11), 637-642. DOI: 10.1038/ja.2010.89. ISSN 0021-8820. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ja201089>

SHAH, Ravi P., Archana SAHU a Saranjit SINGH, 2010. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC–MS/TOF, MSn, on-line H/D exchange and LC–NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **51**(5), 1037-1046. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.11.008. ISSN 07317085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509007031>

THELUSMOND, Jean-Rene, Emily KAWKA, Timothy J. STRATHMANN a Alison M. CUPPLES, 2018. Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. *Science of The Total Environment*. **640-641**, 1393-1410. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.403. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969718320606>

THIELE-BRUHN, Sören, 2009. Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-response relations determined with the iron(III) reduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **24**(4), 869-876. DOI: 10.1897/04-166R.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1897/04-166R.1>

THIELE-BRUHN, Sören a Iris-Constanze BECK, 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*. **59**(4), 457-465. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.023. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505001232>

TOKIWA, Yutaka a Buenaventurada P. CALABIA, 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology and Biotechnology*. **72**(2), 244-251. DOI: 10.1007/s00253-006-0488-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0488-1>

TURNER, Seán, Kathleen M. PRYER, Vivian P. W. MIAO a Jeffrey D. PALMER, 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. **46**(4), 327-338. DOI: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x. ISSN 1066-5234. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

VERSALOVIC, James, Maria SCHNEIDER, Frans J. DE BRUIN a James R. LUPSKI, 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence–Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in molecular and cellular biology*. (5), 25–40.

WALLER, Natasha J. a Rai S. KOOKANA, 2009. EFFECT OF TRICLOSAN ON MICROBIAL ACTIVITY IN AUSTRALIAN SOILS. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **28**(1), 08-224. DOI: 10.1897/08-224.1. ISSN 0730-7268. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1897/08-224.1>

WILMOTTE, Annick, Gert VAN DER AUWERA a Rupert DE WACHTER, 1993. Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium chlorogloeopsis HTF (‘mastigocladus laminosus HTF’) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*. **317**(1-2), 96-100. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81499-P. ISSN 00145793. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793(93)81499-P)

WOLF-MAIER, Katharina, 2003. Hypertension Prevalence and Blood Pressure Levels in 6 European Countries, Canada, and the United States. *JAMA*. **289**(18). DOI: 10.1001/jama.289.18.2363. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.289.18.2363>

WU, Xiaoqin, Laurel K. DODGEN, Jeremy L. CONKLE a Jay GAN, 2015. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. *Science of The Total Environment*. **536**, 655-666. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.129. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969715304708>

XU, Jian, Laosheng WU a Andrew C. CHANG, 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*. **77**(10), 1299-1305. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.063. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653509011552>

YAN, Qing, Yufeng XU, Yonghong YU, Zhi Wei ZHU a Guozhong FENG, 2018. Effects of pharmaceuticals on microbial communities and activity of soil enzymes in mesocosm-scale constructed wetlands. *Chemosphere*. **212**, 245-253. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.059. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653518315340>

YOON, Sung Sug (Sarah), Cheryl D. FRYAR a Margaret D. CARROLL, 2015. Hypertension Prevalence and Control Among Adults: United States, 2011–2014. *NCHS Data Brief*. (220).

ZHANG, Dongqing, Jinxue LUO, Zarraz May Ping LEE, Yogananda MASPOLIM, Richard M. GERSBERG, Yu LIU, Soon Keat TAN a Wun Jern NG, 2016. Characterization of bacterial communities in wetland mesocosms receiving pharmaceutical-enriched wastewater. *Ecological Engineering*. **90**, 215-224. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.12.043. ISSN 09258574. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925857415303517>

ZHOU, Nicolette A., April C. LUTOVSKY, Greta L. ANDAKER, Heidi L. GOUGH a John F. FERGUSON, 2013. Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. *Biodegradation*. **24**(6), 813-827. DOI: 10.1007/s10532-013-9630-9. ISSN 0923-9820. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10532-013-9630-9>

7.1 Internetové zdroje

Definovaná denní dávka irbesartanu, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology Norwegian Institute of Public Health. [Online] 23. 3. 2019. Dostupné z: https://www.whocc.no/atc_ddd_index.

Dodávky Léčiv–Se Zaměřením Na Léčivé Látky, Státní ústav pro kontrolu léčiv. [Online] 7. 10. 2018. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-se-zamerenim-na-lecive-latky>.

EzBioCloud. [Online] Dostupné z: <https://www.ezbiocloud.net/>

YOON, SH, SM HA, S KWON, J LIM, Y KIM, H SEO a J CHUN, 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **67**(5), 1613-1617. DOI: 10.1099/ijsem.0.001755. ISSN 1466-5026. Dostupné také z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.001755>

National Center for Biotechnology Information, PubChem Database, Irbesartan, CID=3749“ [Online] 5. 10. 2018. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3749>
Ncbi, Taxonomy Browser [Online] 9. 4. 2019. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>.

OECD.Stat, Pharmaceutical market. [Online] 4. 4. 2019. Dostupné z: https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC

Příbalová Informace, Irbesartan Actavis. [Online] 5. 10. 2018. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=PI99875.pdf&type=pil&as=irbesartan-actavis-pil>.

Státní ústav pro kontrolu léčiv, ATC skupiny. [Online] 4. 4. 2019. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=C09CA#C09CA

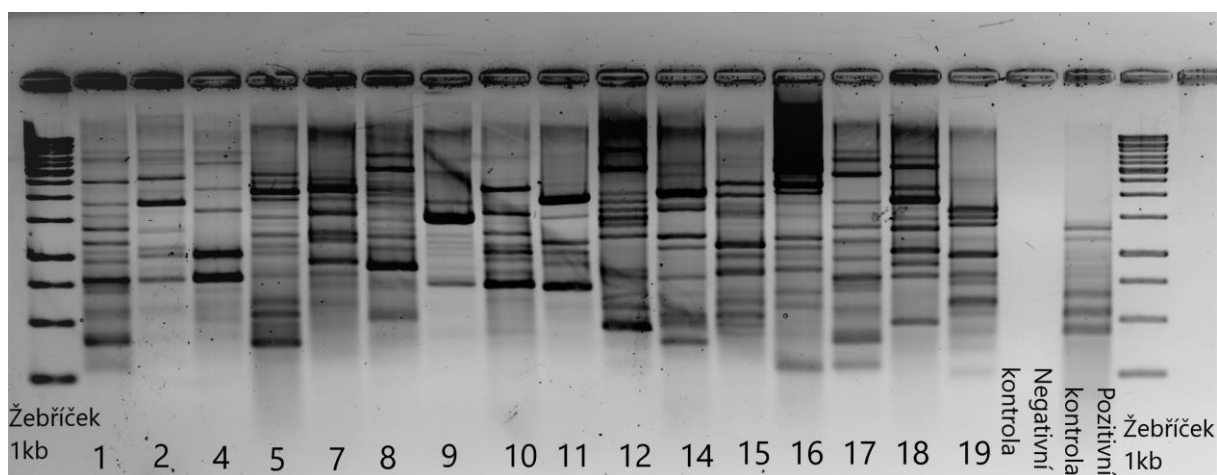
Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon).

Vyhláška č. 437/2016 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě (Zákon o odpadech a o změně některých dalších zákonů).

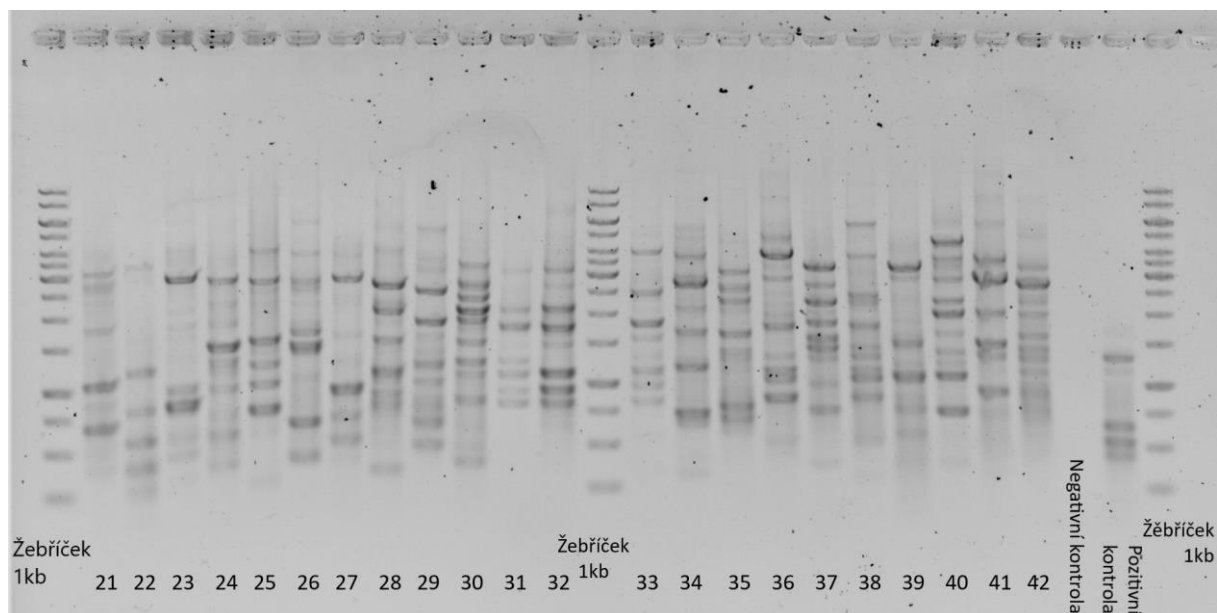
8 Obrazová příloha



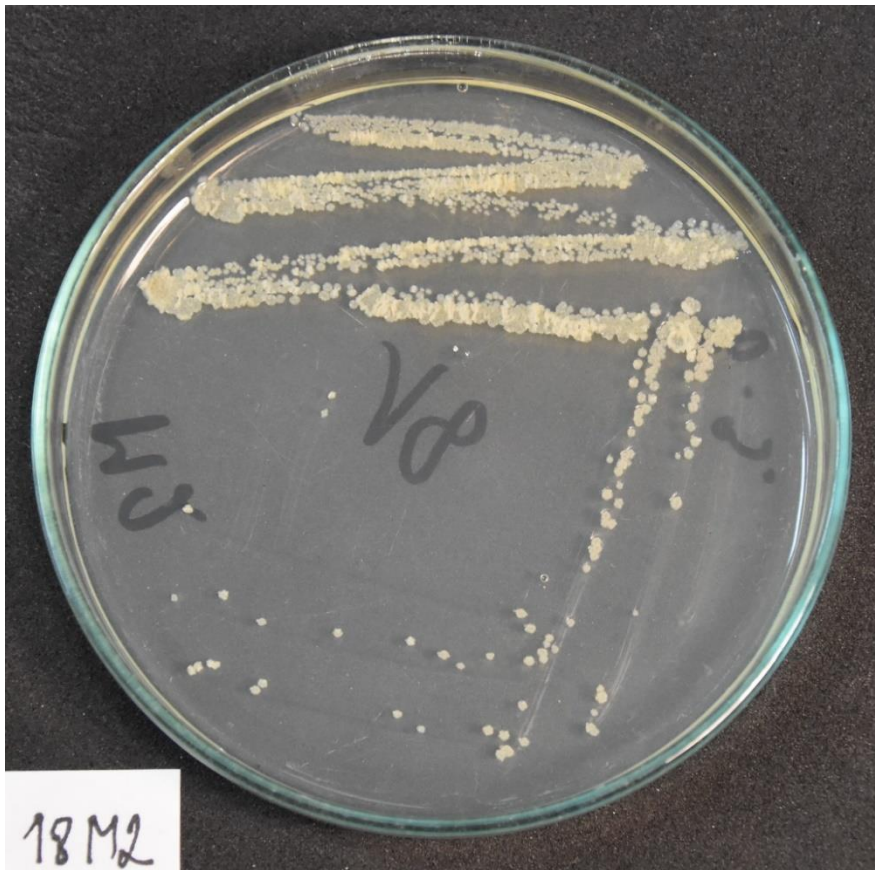
Obr. 15: Příklad misky s R2A agarem zaočkované půdní suspenzí z půdy SI (1,92 μg irbesartanu/g vlhké půdy) naředěné na 10^{-4} .



Obr. 16: Fotografie produktů Box-PCR na 2% agarózovém gelu (20 μ l vzorku + 4 μ l Loading Dye, žebříček 8 μ l) v UV (invertované barvy), s čísly kmenů.



Obr. 17: Fotografie produktů Box-PCR na 1% agarózovém gelu (3 μ l vzorku + 1 μ l Loading Dye, žebříček 8 μ l) v UV (invertované barvy), s čísly kmenů.



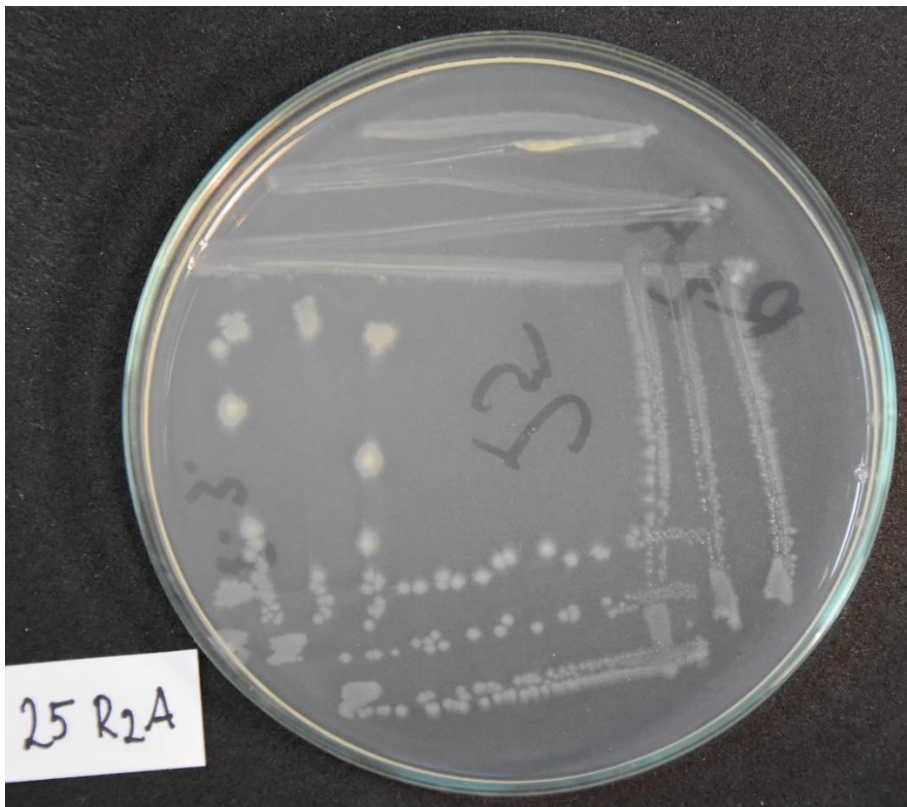
Obr. 18: Kmen 18 na M2 agaru po 4 dnech inkubace ve 28 °C.



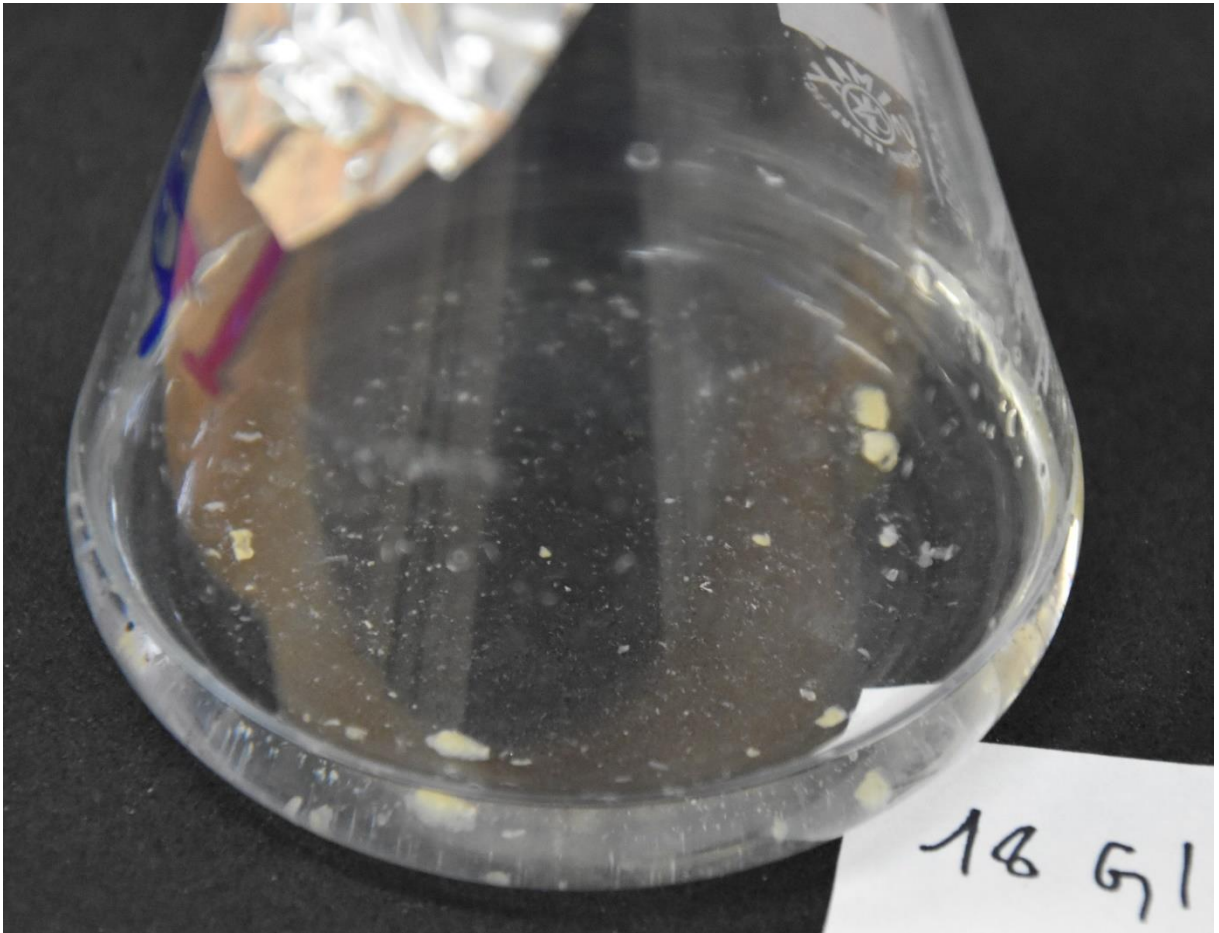
Obr. 19: Kmen 18 na R2A agaru po 4 dnech inkubace ve 28 °C.



Obr. 20: Kmen 25 na M2 agaru po 4 dnech inkubace ve 28 °C.



Obr. 21: Kmen 25 na R2A agaru po 4 dnech inkubace ve 28 °C.



Obr. 22: Kmen 18 v tekutém M9 médiu s glukózou a irbesartanem po deseti dnech inkubace ve 28 °C a 180 RPM.