

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav pro životní prostředí**

Studijní program: Ochrana životního prostředí (N0521A030006)



Ing. Jana Šipanová

**Biodegradace mikropolutantů ze skupiny PPCPs pomocí mléčné fermentace**

Biodegradation of micropollutants from the PPCP group using lactic acid fermentation

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: RNDr. Petra Innemanová, Ph.D.

Praha, 2025

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Ing. Jana Šipanová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Petře Innemanové, Ph.D. za její trpělivost, odborné vedení, vstřícnost a cenné rady, které byly neocenitelnou součástí této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petře Najmanové, Ph.D., za poskytnutí skvělých podmínek, díky nimž jsem měla možnost se této práci věnovat naplno. Mé poděkování patří také RNDr. Aleně Nehasilové, Ph.D., za sdílení svých znalostí a provedení analýz farmaceutických látek, které byly klíčové pro realizaci experimentální části. Rovněž děkuji biotechnologické laboratoři v Dřetovicích a společnosti DEKONTA, a.s., za poskytnutí příjemného pracovního zázemí. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své úžasné rodině za trpělivost a stálou podporu během všech mých studií.

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky projektu: Mikroorganismy v ekologické obnově – bakterie jako buněčné továrny pro řízené bioremediace ekosystémů (reg. č. CZ.02.01.01/00/23\_020/0008502).

## **Abstrakt**

Mikropolutanty, především farmaceutické látky a produkty osobní péče (PPCPs), představují závažný problém v ochraně vodních ekosystémů. Tyto látky nejsou během procesu čištění z odpadních vod zcela odstraněny, což vede k jejich akumulaci v prostředí a znečištění vodních zdrojů. Přítomnost PPCPs ve vodách má nejen negativní vliv na ekosystémy, ale také podporuje rozvoj antibakteriální rezistence. Proto je nezbytné vyvinout nové, efektivní a udržitelné metody, které zabrání vstupu mikropolutantů do vodního prostředí a zároveň umožní jejich odstranění z již kontaminovaných zdrojů.

Tato práce se zaměřila na využití symbiotické kultury bakterií a kvasinek (SCOBY) ve formě krystalů Tibi k biodegradaci vybraných farmaceutických látek. V této kultuře byla potvrzena přítomnost bakterií mléčného kvašení (LAB) a dále pro ni byla provedena optimalizace růstových podmínek pomocí měření pH a analýzy celkového množství sacharidů dle Duboise. Degradční schopnosti kultury byly ověřeny na směsích farmaceutických látek a antibiotik, které se v odpadních vodách v nízkých koncentracích běžně vyskytují. Fermentace probíhala ve standardizovaném kultivačním médiu po dobu 2, 7 a 14 dní při teplotě 28 °C. Účinnost procesu byla hodnocena pomocí měření pH, kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC–MS) a testu reziduální inhibiční aktivity (RIL). Výsledky ukázaly, že fermentační kultura Tibi krystalů dokázala významně snížit koncentrace vybraných farmaceutických látek (estronu (E1), diklofenaku, ibuprofenu) a antibiotik (azihromycinu, klarithromycinu, erythromycinu).

**Klíčová slova:** mikropolutanty, biodegradace, mléčné kvašení

## **Abstract**

Micropollutants, especially pharmaceutical compounds and personal care products (PPCPs), represent a serious challenge in the protection of aquatic ecosystems. These substances are not completely removed during wastewater treatment processes, leading to their accumulation in the environment and contamination of water sources. The presence of PPCPs in water not only negatively affects ecosystems but also promotes the development of antibacterial resistance. Therefore, it is essential to develop new, effective, and sustainable methods that prevent the entry of micropollutants into aquatic environments and enable their removal from already contaminated sources.

This study focused on the use of a symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY) in the form of Tibi crystals for the biodegradation of selected pharmaceutical substances. The presence of lactic acid bacteria (LAB) in this culture was confirmed, and optimization of growth conditions was performed using pH measurement and analysis of total carbohydrate content according to Dubois. The degradative abilities of the culture were tested on mixtures of pharmaceutical compounds and antibiotics commonly found in wastewater at low concentrations. Fermentation was conducted in a standardized cultivation medium for 2, 7, and 14 days at a temperature of 28 °C. Process efficiency was evaluated using pH measurement, liquid chromatography with mass spectrometry detection (LC-MS), and a residual inhibitory activity test. The results showed that the Tibi crystal fermentation culture significantly reduced the concentrations of selected pharmaceutical substances (estrone (E1), diclofenac, ibuprofen) and antibiotics (azithromycin, clarithromycin, erythromycin).

**Key words:** micropollutants, biodegradation, lactic acid fermentation

## Seznam použitých zkratk

API – Aktivní farmaceutická látka

ATC – Anatomicky-terapeuticko-chemická klasifikace

BSM – Základní minerální médium (z angl. basic salt medium)

CAS – Databáze chemických látek (Chemical Abstracts Service)

ČOV – Čistírna odpadních vod

ČR – Česká republika

DDT – Dichlordifenyltrichlorethan

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

EU – Evropská unie

E1 – Estron

E2 – 17 $\beta$ -estradiol

EE2 – Ethinylestradiol

EPS – Dextranové expolysacharidy

HCB – Heptachlorbenzen

LAB – Bakterie mléčného kvašení (z angl. lactic acid bacteria)

LC-MS – Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

NEK – Nejvyšší emisní koncentrace

NEK-PR – Průměrná nejvyšší emisní koncentrace

NPK – Nejvyšší přípustné koncentrace

NSAID – Nesteroidní protizánětlivé látky

PAU – Polycyklické aromatické uhlovodíky

PCBs – Polychlorované bifenyly

PFOS – Perfluoroktansulfonová kyselina

POPs – Perzistentní organické polutanty

PPCPs – léčiva a látky osobní péče (z angl. Pharmaceuticals and Personal Care Products)

RIL – Reziduální inhibiční aktivita

SCOBY – symbiotické kolonie bakterií a kvasinek (z angl. Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast)

SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

WFD – Rámcová směrnice o vodách (z angl. Water Framework Directive)

WHO – Světová zdravotnická organizace

WL – Seznam sledovaných látek (z angl. Watch List)

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část.....	3
2.1	Mikropolutanty.....	3
2.2	Farmaceutické látky .....	5
2.2.1	Klasifikace a identifikace léčiv .....	5
2.2.1.1	ATC systém.....	5
2.2.1.2	Registrační číslo CAS .....	6
2.2.2	Struktura farmaceutického řetězce .....	6
2.2.3	Osud farmaceutických látek v životním prostředí.....	7
2.3	Legislativně sledované farmaceutické látky .....	8
2.3.1	Stockholmská úmluva o persistentních organických polutantech.....	8
2.3.2	Evropská legislativa a PPCPs.....	9
2.3.2.1	Seznamy sledovaných látek.....	9
2.3.3	Česká legislativa a PPCPs .....	10
2.4	Antibiotická rezistence .....	14
2.5	Bakterie mléčného kvašení.....	14
2.6	Mléčná fermentace a její možnosti využití.....	15
2.6.1	Mléčná fermentace – princip a přínos .....	15
2.6.2	Využití bakterií mléčného kvašení při zpracování odpadů .....	16
2.6.3	Potenciál mléčné fermentace pro environmentální aplikace .....	17
2.7	Fermentované probiotické kultury a jejich potenciál .....	20
2.7.1	Biologie a struktura SCOBY .....	20
2.7.2	Potenciál využití SCOBY – příklady z praxe.....	21
2.7.2.1	Výroba alternativních textilií .....	21
2.7.2.2	Biosorbce těžkých kovů .....	22
2.7.2.3	Inovativní aplikace ve zdravotnictví .....	22

2.7.2.4	Potravinářství .....	23
2.7.3	Kombucha .....	25
2.7.4	Vodní kefir (Tibi krystaly) .....	26
3	Cíle práce.....	28
4	Metodika.....	29
4.1	Přístrojové vybavení.....	29
4.2	Použitý materiál a chemikálie .....	30
4.3	Optimalizace podmínek experimentu.....	31
4.3.1	Výběr kultury .....	31
4.3.2	Výběr kultivačního média .....	32
4.4	Výběr farmaceutických látek pro experimentální sledování.....	34
4.5	Degradace farmaceutických látek pomocí SCOBY .....	35
4.5.1	Filtrace a příprava vzorků pro analýzu.....	36
4.5.2	Extrakce farmaceutických látek ze SCOBY a předúprava vzorků média.....	37
4.6	Kvantitativní stanovení farmaceutických látek pomocí LC-MS.....	37
4.7	Statistické vyhodnocení dat.....	38
4.8	Měření reziduální inhibiční aktivity (RIL).....	38
5	Výsledky.....	39
5.1	Míra degradace farmaceutických látek pomocí SCOBY .....	39
5.1.1	Kontrola průběhu fermentace pomocí pH.....	39
5.2	Farmaka bez antibiotické aktivity .....	40
5.3	Farmaka s antibiotickou aktivitou .....	55
5.4	Reziduální inhibiční aktivita (RIL) .....	61
6	Diskuse .....	62
7	Závěr.....	68
8	Zdroje .....	69
9	Přílohy .....	84

# 1 Úvod

V posledních desetiletích se problematika znečištění životního prostředí stala klíčovým tématem vědeckého výzkumu a politických debat. Významnou pozornost přitahují mikropolutanty – látky přítomné ve vodních ekosystémech v nízkých koncentracích, jejichž akumulace však může mít zásadní a dlouhodobé dopady na ekologickou rovnováhu i zdraví lidské populace. Mezi nejvýznamnější z těchto látek patří farmaka a produkty osobní péče, jejichž přítomnost ve vodních zdrojích je v současnosti stále častěji detekována po celém světě. Tato problematika vyvolává naléhavé otázky ohledně šíření těchto látek, jejich biologické degradace a potenciálních rizik pro životní prostředí i veřejné zdraví. Jak však uvádí Mompelat et al. (2009), je důležité zdůraznit, že detekce některých těchto látek byla umožněna teprve v posledních letech díky rozvoji nových analytických metod, které dokážou identifikovat i velmi nízké koncentrace těchto syntetických látek v rozmezí  $\mu\text{g}–\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , čímž se otevřela cesta k hlubšímu porozumění jejich vlivu na ekosystémy.

Mikropolutanty ze skupiny farmak a produktů osobní péče se do vodních toků dostávají dominantně z čistíren odpadních vod (ČOV) převážně z měst s větší aglomerací. Nelze ale ani opomenout lokální zdroje znečištění jako jsou emise z nemocnic, zemědělství, průmyslu či akvakultury (Tim aus der Beek et al., 2016). Současné metody čištění nejsou schopny tyto látky zcela odstranit, což vede k jejich akumulaci v povrchových i podzemních vodách. Tento stav představuje nejen environmentální riziko, ale také potenciální hrozbu pro lidské zdraví v důsledku kontaminace pitné vody a trofických sítí. Zvláště znepokojivá je skutečnost, že rezidua antibiotik a dalších farmaceutik mohou přispívat k rozvoji antibakteriální rezistence, která představuje jednu z největších výzev současné medicíny. Znečištěné vodní plochy a řeky fungují jako rezervoáry pro šíření rezistence napříč různými ekosystémy (Liu et al., 2023).

Tato práce se zabývá možnostmi biodegradace farmaceutických látek a dalších mikropolutantů prostřednictvím bakterií mléčného kvašení. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části je věnována pozornost charakteristice závažných mikropolutantů, farmakologickým látkám a jejich osudu v životním prostředí. Práce dále popisuje bakterie mléčného kvašení a procesy spojené s jejich využitím v biodegradaci. Důraz je kladen i na problematiku antibiotické rezistence, která je v současnosti významným globálním rizikem. Pozornost je dále věnována symbiotickým koloniím bakterií a kvasinek (SCOBY) a jejich potenciálnímu využití v této oblasti. Nedílnou součástí teoretické části je i analýza legislativního rámce z pohledu českého i evropského práva.

Praktická část práce se zaměřuje na formulaci výzkumných cílů a podrobný popis metodiky, která byla využita k jejich dosažení. Tato část poskytuje ucelený přehled o provedených experimentech a použitých analytických postupech.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Mikropolutanty

Mikropolutanty zahrnují široké spektrum chemických látek, které se v životním prostředí vyskytují v extrémně nízkých koncentracích, přičemž mohou mít významné negativní dopady na ekosystémy i na zdraví živých organismů. Mezi hlavní skupiny mikropolutantů patří léčiva, pesticidy, stimulanty, persistentní organické polutanty, mikro a nanoplasty, umělá sladidla a produkty osobní péče (Akhtar Abbasi et al., 2022). Evropská i česká legislativa se zaměřuje především na mikropolutanty, které představují riziko pro vodní ekosystémy a lidské zdraví. Tyto látky jsou často označovány jako prioritní nebo znečišťující a byly již detekovány v odpadních vodách, sedimentech, půdách, na skládkách odpadu i v povrchových i podzemních vodách (Masarykova univerzita, 2017).

Tato diplomová práce se zaměřuje na mikropolutanty ze skupiny farmak a produktů osobní péče (PPCP, anglicky pharmaceuticals and personal care products). Potenciální riziko těchto látek je zvláště znepokojivé vzhledem k neustálému růstu trhu s kosmetikou a dalšími produkty osobní péče. Očekává se, že do roku 2026 dosáhne globální hodnota tohoto odvětví 756,63 miliard amerických dolarů (GlobalNewswire, 2020). V následujících letech, konkrétně v období 2025–2030, by měl trh růst průměrným tempem 5,68 % ročně, přičemž do roku 2030 se jeho hodnota odhaduje na 845,2 bilionu amerických dolarů (Mordor Intelligence, 2025). Znamky expanze rovněž vykazuje trh s farmaceutickými produkty, a to zejména díky technologickým inovacím – především s rozvojem umělé inteligence (AI, anglicky Artificial Intelligence) – ale také vlivem stárnutí populace a rostoucího výskytu chronických onemocnění po celém světě (BioSpace, 2025). Tento trend pravděpodobně povede k ještě většímu uvolňování mikropolutantů do životního prostředí, což představuje významnou výzvu, na kterou je nezbytné rychle a efektivně reagovat.

Látky ze skupiny PPCPs jsou problematické hned z několika důvodů. Farmaceutické látky uvolňované do povrchových vod mohou fungovat jako endokrinní disruptory narušující hormonální homeostázu vodních organismů. PPCPs mají také potenciál negativně ovlivnit reprodukční procesy živých organismů, například růst a chování ryb, což představuje závažnou hrozbu pro biodiverzitu a stabilitu vodních ekosystémů, jak potvrzují i odborné studie zaměřené na ekologické důsledky farmaceutického znečištění (Sanchez et al., 2011). Detekce farmaceutických látek a jejich metabolitů v cenných přírodních ekosystémech, včetně národních parků, představuje vážný ekologický problém. Přítomnost těchto látek ve vodách

chráněných oblastí ukazuje, že znečištění farmaky se neomezuje pouze na místa blízka zdrojům vypouštění, jako jsou ČOV, ale šíří se i do ekologicky citlivých a vzdálenějších lokalit (Boxall et al., 2024). Výskyt farmak v povrchových a podzemních vodách v těchto ochránářsky cenných lokalitách i předpoklad vyšší produkce mikropolutantů v následujících letech zdůrazňuje naléhavou potřebu zavedení účinnějších systémů monitoringu, moderních technologií čištění odpadních vod a přísnějších regulačních opatření ke zmírnění dlouhodobých dopadů na životní prostředí.

Jednou z perspektivních technologií pro budoucí odstraňování mikropolutantů z vody jsou nanomembrány, které díky své vysoké selektivitě a účinnosti nabízejí inovativní řešení problematiky. Vývoj této technologie však dosud probíhá a její široké využití v praxi nadále vyžaduje další výzkum a optimalizaci (Wang et al., 2025). Další osvědčené metody pro eliminaci mikropolutantů z vod jsou například pokročilé oxidační procesy, při nichž degradace probíhá pomocí vysoce reaktivních hydroxylových radikálů, a ozonizace (Magesh et al. 2020, Kolofík, 2020). V rešerši Kim et al. (2016) porovnával vědecký tým metody a technologie eliminace vybraných mikropolutantů (včetně PPCPs) na úpravárnách a čistírnách odpadních vod v různých státech a regionech. Jak ukazuje i tato rešerše, nejúčinnějšími technologiemi pro eliminaci mikropolutantů se jeví pokročilé oxidační procesy, které zahrnují aplikaci ozónu a UV záření spolu s peroxidem vodíku. Tyto postupy prokázaly vysokou účinnost, přičemž některé mikropolutanty, jako je karbamazepin a diklofenak, byly odstraněny s účinností přes 95 %. Dále se ukazuje, že kombinace UV a chlorace také zlepšuje odstranění mikropolutantů díky generaci radikálů OH a Cl. Na druhé straně konvenční procesy úpravy a čištění vody, jako je koagulace a adsorpce, dosahují proměnlivých a nižších účinností, které závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých mikropolutantů. Studie Magesh et al. (2020) naopak vyzdvihuje absorpci jako velmi účinnou metodu pro odstraňování mikropolutantů ze skupiny PPCPs. Autoři ale také upozorňují na nevýhody této metody, zejména na problematiku regenerace a likvidace použitých adsorbentů, které mohou představovat dodatečné náklady a environmentální zátěž. Kromě adsorpce tato rešerše kladně hodnotí také pokročilé oxidační procesy včetně využití Fentonova činidla (oxidační směs peroxidu vodíku a solí kovů). Přestože tyto postupy vykazují vysokou účinnost, studie rovněž upozorňuje na jejich vysoké provozní náklady.

Celkově je jasné, že při výběru nejvhodnější metody pro odstranění PPCPs z vody je nezbytné zohlednit nejen účinnost, ale také ekonomickou a environmentální udržitelnost jednotlivých přístupů a technologií.

## 2.2 Farmaceutické látky

Moderní farmaceutické přípravky prošly za posledních sto let významným vývojem, který zásadně přispěl k záchraně a zlepšení kvality života lidí i zvířat. Farmaka se dnes stala nedílnou součástí každodenního života, avšak jejich účinné látky a metabolity často končí v odpadních vodách. Vzhledem k nedostatečné účinnosti konvenčních metod čištění odpadních vod dochází k jejich následnému uvolňování do vodních toků a přírodních ekosystémů (Patel et al., 2019).

Studie Beek et al. (2016), která se zaměřila na tvorbu globální databáze detekovaných farmaceutických látek, identifikovala přítomnost léčiv a jejich metabolitů ve vodním prostředí v 71 zemích světa, napříč všemi kontinenty. Celkem bylo detekováno 631 různých farmaceutických látek, jejichž koncentrace překročily detekční limity analytických metod používaných v daných regionech. Je nutné podotknout, že metabolity látek PPCPs mohou mít na necílové organismy zanedbatelný vliv, nicméně mohou mít i stejný či dokonce vyšší účinek než látka primární (Stejskalová et al., 2021). Tato zjištění zdůrazňují rozsáhlou problematiku globálního šíření farmaceutických reziduí a upozorňují na potřebu zavedení efektivnějších systémů monitoringu a čištění odpadních vod, které by vedlo ke snížení negativních dopadů těchto látek na vodní ekosystémy a veřejné zdraví. Farmaceutické látky se do životního prostředí dostávají především v důsledku vylučování metabolitů a nezměněných účinných látek po jejich konzumaci pacientem, přičemž jejich odstranění v ČOV je často nedostatečné. Ve venkovských oblastech k jejich šíření přispívají septiky, zatímco lokální zdroje kontaminace mohou vznikat v důsledku neodborné likvidace nepoužitých léčiv v domácnostech. Dalším významným zdrojem jsou zemědělské splachy z hospodářských oblastí, kde jsou farmaka aplikována na zvířata plošně, čímž se výrazně přispívá k jejich akumulaci v půdě a vodních zdrojích (Mompelat et al., 2009).

### 2.2.1 Klasifikace a identifikace léčiv

#### 2.2.1.1 ATC systém

ATC nebo také anatomicky-terapeuticko-chemická klasifikace léčivých látek je alfanumerický kód, který pomocí čísel jednoznačně označuje každou účinnou látku v dotyčném farmaku. Jedná se o jednotnou mezinárodní metodiku, kterou lze díky jejímu rozšíření a využití porovnávat a sledovat data o distribuci konkrétních léčivých přípravků v lidské populaci. Klasifikační systém rozděluje ATC kód do pěti úrovní a každému farmaku přiřazuje unikátní sedmimístný kód.

1. úroveň – odpovídá anatomické soustavě, na které léčivo působí. Celkem se jedná o 14 hlavních skupin (například: A – trávicí trakt a metabolismus, D – dermatologika, C – kardiovaskulární systém, Q – veterinární přípravky) a označují se jedním písmenem
2. úroveň – označuje hlavní terapeutickou skupinu označenou dvěma čísly (například: 10 – diabetes)
3. úroveň – značí terapeuticko-farmakologickou podskupinu s označením jedním písmenem (například: B – léčivo snižující množství cukrů v krvi)
4. úroveň – chemicko-terapeuticko-farmakologická podskupina – označení jedním písmenem (například: A – biguanidy)
5. úroveň – konkrétní léčivá látka – označení dvěma číslicemi (například Metformin, celým číslem CAS A10BA2)

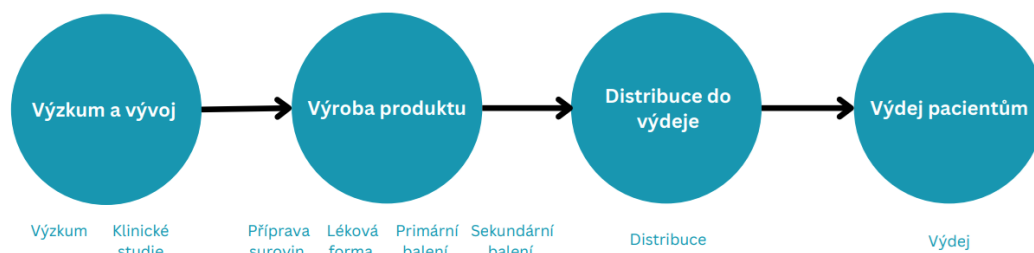
Jedna účinná látka může být označena i více ATC kódy, pokud se liší ve způsobu podání, dávkování, léčivé formě či indikaci. Obecně platí že, jeden ATC kód odpovídá jednomu učenému způsobu podání látky (Storová, 2017).

#### 2.2.1.2 Registrační číslo CAS

CAS (anglicky Chemical Abstracts Service) je číselné označení přidělené chemickým látkám pro jejich snadnou identifikaci. Označení CAS umožňuje jednoznačně rozlišit jednotlivé chemické sloučeniny v různých databázích a publikacích. Jedná se o nejrozšířenější metodu označování látek v chemii, farmacii, toxikologii a environmentálních vědách celosvětově. Zkratka nese název Chemical Abstracts Service, podle organizace, která systém vytvořila a jejíž databáze dnes obsahuje více než 200 milionů látek. Toto číslo je v odborné literatuře často uváděno.

#### 2.2.2 Struktura farmaceutického řetězce

Každý léčivý přípravek obsahuje tzv. aktivní farmaceutické látky (API, anglicky Active Pharmaceutical Ingredients), které představují jeho účinnou složku. Proces vývoje a uvedení farmaka na trh lze analyzovat prostřednictvím farmaceutického hodnotového řetězce, který strukturuje jednotlivé fáze od počátečního výzkumu až po distribuci k pacientovi. Tento řetězec se standardně dělí do čtyř hlavních etap, jak je znázorněno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1: Farmaceutický hodnotový řetězec (upraveno dle IQVIA Solutions a.s., 2024).

Generické léčivo je takový farmaceutický produkt, který obsahuje stejnou účinnou látku jako originální (referenční) přípravek, má stejné množství referenční látky a prodává se i ve stejné formě (kapsle, tablety apod.). Na rozdíl od referenčního přípravku se generikum prodává až po vypršení ochranné patentové ochrany původního léčiva. Jelikož pro tato léčiva již farmaceutická firma nemusí financovat další výzkum, nabízí je zpravidla za mnohem nižší a pro pacienta přijatelnější ceny (IQVIA Solutions a.s., 2024).

### 2.2.3 Osud farmaceutických látek v životním prostředí

Farmaceutické látky se do životního prostředí dostávají především v důsledku lidských činností, zejména během jejich výroby, spotřeby a nesprávné likvidace. Jak již bylo zmíněno výše, dalším důležitým zdrojem těchto látek v přírodě jsou rovněž plošně aplikovaná humánní a veterinární léčiva, mezi něž patří antiparazitika, antibiotika, antimykotika, sedativa, hormony a anestetika (Bártíková et al., 2016). Po vyloučení z organismu nebo po neodborné likvidaci nespotřebovaných léčiv pronikají farmaceutické látky, či jejich metabolity, do odpadních vod, odkud se šíří do povrchových a podzemních vod, půdy a širších ekosystémů. Rezidua farmaceutických látek přítomná ve vodě a půdě mohou být toxická, přičemž mohou narušovat metabolismus, poškozovat orgány hospodářských zvířat a negativně ovlivňovat i jejich růst či produktivitu (Kweon et al., 2025). Zároveň tato kontaminace představuje riziko pro vodní organismy a mikrobiální společenstva, čímž může narušit rovnováhu celých trofických sítí. Perzistence, bioakumulace a potenciální ekotoxikologické účinky těchto látek jsou proto stále předmětem intenzivního vědeckého výzkumu a regulace.

Z hlediska negativních dopadů farmaceutických látek na necílové organismy napříč potravními řetězci je příkladem široce rozšířené farmakum ze skupiny NSAID (nesteroidní protizánětlivé léky) diklofenak, který byl prokázán jako klíčový faktor v úmrtí kriticky ohroženého Supa bengálského (*Gyps bengalensis*). Tento vzácný pták, který se živí mršinami hospodářských

zvířat léčených mimo jiné i diklofenakem, akumuluje tuto látku ve svém těle, což vede k následné intoxikaci. Následkem konzumace je akutní selhání ledvin během několika dnů a smrt postiženého jedince (Oaks et al., 2004). Vliv NSAID na ptáky potvrzuje i studie vědeckého týmu Cuthberta et al. (2007), jež identifikoval farmaka karprofen, diklofenak, ibuprofen, fenylbutazon a flunixin jako toxické pro většinu z 60 jimi sledovaných druhů asijských ptáků. Obě tyto studie představují pouze malý zlomek problému, protože rozsah účinků farmaceutických látek v přírodních ekosystémech je stále nedostatečně prozkoumán. Dlouhodobá akumulace farmaceutických látek v životním prostředí a potravních řetězcích může mít vážný dopad i na zdraví lidské populace. Nejvíce ohroženými skupinami jsou kojenci, těhotné ženy a osoby s oslabeným zdravím (Esposito et al., 2016).

Jak upozorňuje studie Wysowska et al. (2024), zatím není k dispozici dostatek výzkumů zaměřených na monitoring a eliminaci farmak z povrchových a podzemních vod během jednotlivých technologických fází úpravy vody (například pomocí ozonu, chlóru a aktivního uhlí). Nedostatečné je i hodnocení vztahu mezi přítomností farmak a jinými fyzikálně – chemickými parametry vody, jako je teplota, pH nebo množství organického uhlíku. Wysowka et al. (2024) také upozorňuje na nedostatečný monitoring farmaceutických látek v odpadních vodách, přičemž i při vysoké účinnosti jejich úpravy se do prostředí uvolňují geny antibiotické rezistence. K tomu všemu studie zdůrazňuje potřebu vybrat konkrétní farmaka pro pravidelný monitoring v povrchových a podzemních vodních útvarech a upozorňuje i na nekomplexní hodnocení environmentálních rizik, včetně účinků kombinovaných farmak a jejich přeměn na jiné toxičtější sloučeniny.

## 2.3 Legislativně sledované farmaceutické látky

Tato práce se dále podrobně zabývá legislativními limity koncentrací farmaceutických látek (farmak) v povrchových a podzemních vodách, které jsou definovány jak právními předpisy Evropské unie (EU), tak i legislativou České republiky.

### 2.3.1 Stockholmská úmluva o persistentních organických polutantech

Stockholmská úmluva o perzistentních organických polutantech (POPs), přijatá v roce 2001 a platná od roku 2004, se zaměřuje na chemické látky, které se dlouhodobě uchovávají v prostředí, kumulují v organismech skrze potravní řetězce a mohou být v ekosystému transportovány na velké vzdálenosti. Tyto látky zahrnují pesticidy, průmyslové chemikálie a nežádoucí vedlejší produkty vznikající při spalovacích či chemických procesech. Jsou nebezpečné pro ekosystémy i lidské zdraví. Úmluva, vycházející z principu předběžné

opatrnosti, stanovuje rámec pro jejich bezpečnou výrobu, použití, dovoz, nakládání, zneškodňování a odstranění těchto látek, včetně motivačních opatření proti jejich negativním účinkům (MŽP, 2025). PPCPs nejsou součástí Stockholmské úmluvy, ale některé POPs jsou pravidelně zmiňované v evropských Watch listech (WL). Jedná se především o pesticid DDT (dichlordifenyltrichlorethan) či HCB (heptachlorbenzen), PCBs (polychlorované bifenyly), dioxiny a furanové sloučeniny.

### 2.3.2 Evropská legislativa a PPCPs

V rámci evropského práva jsou látky ze skupiny PPCPs regulovány prostřednictvím několika rámcových směrnic, které jsou závazné pro všechny členské státy EU. V současnosti jsou limity týkající se farmaceutických látek v právním rámci EU nedostatečné, neboť regulované látky neodpovídají plně aktuálnímu seznamu potenciálně rizikových látek přítomných v přírodních ekosystémech. Je však důležité zmínit, že byl připraven návrh *směrnice Evropského parlamentu a Rady, kterou se mění směrnice 2000/60/ES (rámcová směrnice o vodní politice), směrnice 2006/118/ES (o ochraně podzemních vod před znečištěním a zhoršováním stavu) a směrnice 2008/105/ES (o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky)*, která by měla seznam potenciálně nebezpečných látek aktualizovat. Tento návrh nově zařazuje na seznam povinně monitorovaných látek devět farmaceutických látek ze skupiny PPCPs, které byly vybrány na základě dlouhodobého monitoringu kvality vod v členských státech prostřednictvím evropských WL.

#### 2.3.2.1 Seznamy sledovaných látek

Seznamy sledovaných látek (anglicky Watch List, WL) jsou nástrojem Evropské unie pro identifikaci látek, které mohou představovat riziko pro ekosystémy a lidské zdraví, avšak pro které existuje omezené množství údajů o jejich výskytu a chování v přírodním prostředí. Jak uvedla Evropská komise, pravidelné aktualizace WL jsou nezbytné pro adaptaci na nové vědecké poznatky a pro efektivní prevenci environmentálních hrozeb (Brennan, 2014). WL jsou součástí Evropské vodní politiky (anglicky Water Framework Directive – WFD), první seznam WL byl vydán v roce 2015, přičemž poslední, pátá verze WL byla zveřejněna v roce 2025.

Členské státy mají povinnost monitorovat potenciálně nebezpečné látky pro životní prostředí, zejména pro vodní ekosystémy. Mezi sledované látky patří například pesticidy, mikroplasty nebo POPs jako DDT, HCB a PCB. Členské státy mohou navrhnout problematické látky k zařazení na WL, přičemž o jejich přijetí rozhoduje Evropská komise. Po zařazení látky na WL

jsou všechny členské státy povinny monitorovat její koncentrace v povrchových vodách. Seznam WL je pravidelně aktualizován každé dva roky (Loos et al., 2024). Výhodou WL je zejména schopnost včas identifikovat potenciální rizika. Rozhodovací proces je založen na odborném vědeckém monitoringu a pravidelná aktualizace seznamu zajišťuje, že látky, které se neprokáží jako rizikové, mohou být z WL opět vyřazeny. Pokud se naopak látka jeví jako potenciálně riziková, může být zařazena na evropský seznam prioritních látek nebo zakázána. Nevýhodou WL je nedostatek dat pro správné odhady možných dopadů na přírodní ekosystémy, vysoké náklady spojené s monitorováním a zapojením odborné veřejnosti a omezený rozsah sledování látek pouze na povrchové vody.

WL pravidelně aktualizují seznam potenciálně nebezpečných látek pro životní prostředí. Do roku 2025 bylo zatím zveřejněno 5 těchto seznamů a na nich se celkem objevilo 16 léčiv. Tabulka č. 1 zobrazuje všechny farmaceutické látky, které se v průběhu let objevily v jednotlivých WL. V tabulce je dále uvedeno jejich unikátní číslo CAS či jejich léčebné užití.

### 2.3.3 Česká legislativa a PPCPs

V české legislativě je problematika monitoringu mikropolutantů upravena prostřednictvím *Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech*, které stanovuje ukazatele a hodnoty přípustného znečištění povrchových a odpadních vod, včetně náležitostí povolení k vypouštění odpadních vod a regulace těchto látek v citlivých oblastech. Mezi klíčové sledované látky patří vybrané mikropolutanty, jako jsou cybutryn, diuron, nonylfenol a perfluoroktansulfonová kyselina (PFOS). Tyto látky jsou monitorovány vzhledem k jejich vysokému ekologickému riziku, potenciální toxicitě a schopnosti ovlivňovat vodní ekosystémy i lidské zdraví. Nařízení zavádí přesně definované emisní limity a podmínky pro vypouštění znečišťujících látek z odpadních vod do vod povrchových, přičemž rozlišuje průměrnou nejvyšší emisní koncentraci (NEK – PR), která vyjadřuje maximální přípustnou koncentraci znečišťující látky jako dlouhodobý průměr a slouží k hodnocení vlivu kontinuálního vypouštění na vodní ekosystémy, a nejvyšší přípustnou koncentraci (NEK – NPK), která představuje jednorázový limit, jehož překročení je nepřijatelné, aby se předešlo akutnímu negativnímu dopadu na vodní prostředí. Nařízení reflektuje současné požadavky na ochranu vodního prostředí a zahrnuje přísné limity, které jsou detailně specifikovány v tabulce č. 2. Koncentrace hormonu ze skupiny PPCPs sleduje i *Vyhláška č. 371/2023 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění*

*pozdějších předpisů*, a to konkrétně 17 $\beta$ -estradiol (E2), který ve vodních ekosystémech působí jako endokrinní disruptor (narušuje hormonální systém vodních organismů) viz tabulka č. 3.

Rozsah sledovaných látek českou legislativou nicméně neodpovídá skutečnému rozsahu a rozšíření farmaceutických mikropolutantů přítomných v povrchových vodách, což výrazně omezuje účinnost legislativy při zajištění jejich bezpečnosti a ochrany vodních ekosystémů i veřejného zdraví. Farmaceutické látky, které se dostávají do životního prostředí, mohou mít přímý dopad nejen na ekosystémy, ale i na lidské zdraví – zejména prostřednictvím střevní mikrobioty, která je zásadní nejen pro naše imunitní a metabolické funkce.

Tabulka č. 1: Vývoj monitoringu farmaceutických látek v evropské legislativě a návrhy na zařazení léčiv do prioritního seznamu na základě evropských Watch listů.

Historický vývoj monitoringu farmak v rámci evropské regulace							
Název látky	CAS	Užití	1st Watch List 2015	2nd Watch List 2018	3rd Watch List 2020	4th Watch List 2022	5th Wach List 2025
AZITHROMYCIN	83905-01-5	antibiotikum	*	*			
DIKLOFENAK	15307-86-5	NSAID	*	*			
ERYTHROMYCIN	114-07-8	antibiotikum	*	*			
ESTRADIOL	50-28-2	hormon	*	*			
FLUKONAZOL	86386-73-4	antimykotikum			*		
IBUPROFEN	15687-27-1	NSAID					
KARBAMAZEPIN	298-46-4	antiepileptikum			*		
KLARITHROMYCIN	81103-11-9	antibiotikum	*	*			
KLINDAMYCIN	18323-44-9	antibiotikum			*	*	*
KLOTRIMAZOL	23593-75-1	antimykotikum			*		
METFORMIN	657-24-9	antidiabetikum			*	*	*
MICONAZOL	22916-47-8	antimykotikum			*		
OFLOXACIN	82419-36-1	antibiotikum				*	*
SULFAMETHOXAZOL	723-46-6	antibiotikum			*		
TRIMETHOPRIM	738-70-5	antibiotikum			*		
VENLAFAXIN	93413-69-5	antidepresivum			*		

Tabulka č. 2: Koncentrace PPCPs sledované podle Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.

<b>Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod (PR NEK – průměrná roční koncentrace, NPK NEK – nejvyšší přípustná koncentrace)</b>				
<b>LÁTKA</b>	<b>DRUH</b>	<b>CAS</b>	<b>NEK - PR (µg/l)</b>	<b>NEK - NPK (µg/l)</b>
CYBUTRYN	biocid/farmakum	28159-98-0	0,0025	0,016
DIURON	herbucid/farmaceutický zbytek	330-54-1	0,2	1,8
NONYLFENOL	narušuje endokrinní soustavu	84852-15-3	0,3	2
PERFLUOROKTANSULFONOVÁ KYSELINA PFOS	perzistentní znečištění v OV	1763-23-1	6,5x10-4	36

Tabulka č. 3: PPCPs ve Vyhlášce č. 371/2023 Sb.

<b>Vyhláška č. 371/2023 - Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů (PR NEK – průměrná roční koncentrace, NPK NEK – nejvyšší přípustná koncentrace)</b>				
<b>LÁTKA</b>	<b>DRUH</b>	<b>CAS</b>	<b>NEK - PR (µg/l)</b>	<b>NEK - NPK (µg/l)</b>
17-beta-estradiol	hormon	50-28-2	1	

## 2.4 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je důsledkem rostoucího selekčního tlaku vyvolaného přítomností antibiotik a dalších antibakteriálních látek v prostředí, jejichž koncentrace, zejména ve vodních ekosystémech, nadále narůstá (Sharma et al., 2005). Jak upozorňuje Světová zdravotnická organizace (WHO), nadměrné používání antibakteriálních látek ve zdravotnictví, zemědělství a rostlinné výrobě podporuje rozvoj rezistentních patogenů. Tento problém postihuje všechny země, ale nejvíce země s nízkými a středními příjmy, kde situaci zhoršují chudoba a nerovnost. Antibakteriální rezistence ohrožuje pokroky v moderní medicíně, ztěžuje léčbu infekcí a činí lékařské zákroky, jako jsou chirurgické operace a chemoterapie, mnohem riskantnějšími. Podle odhadů WHO by antibakteriální rezistence mohla do roku 2050 zvýšit celosvětové náklady na zdravotní péči až o 1 bilion amerických dolarů (WHO, 2023).

Rezistence bakterií vůči antibiotikům představuje rostoucí globální hrozbu, na jejímž vzniku se podílejí faktory jako mezinárodní cestování, prodej antibiotik bez lékařského předpisu, nedostatečná hygiena, vylučování nemetabolizovaných antibiotik do odpadních vod a neodborné zacházení s prošlými léčivými (UNEP, 2023). Abychom docílili zpomalení šíření rezistence, bylo by klíčové zavést technologie, které by dokázaly odstranit antibiotické látky z odpadních vod ještě před tím, než se rozšíří do vodních toků a ovlivní širší ekosystémy. S rostoucím výskytem antibiotické rezistence je proto dále nutné hledat alternativy, které pozitivně ovlivňují složení mikroflóry a zároveň mohou být potenciálně využity v boji s kontaminací. Jednou z poměrně málo prozkoumaných alternativ v tomto směru je technologické využití bakterií mléčného kvašení.

## 2.5 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (anglicky Lactic acid bacteria, LAB) jsou mikroorganismy schopné přeměňovat cukry, zejména glukózu, na kyselinu mléčnou prostřednictvím fermentačního procesu. Jedná se o velmi heterogenní skupinu bakterií s širokou ekologickou nikou a obrovskou biodiverzitou druhů vyvolanou specifickými selektivními podmínkami ekosystémů, ve kterých se jednotlivé druhy LAB nacházejí (McAuliffe, 2018). Běžně se LAB vyskytují v prostředí bohatých na uhlovodíky – příkladem mohou být mléčné produkty (Lahmamsi et al., 2024).

LAB lze rozdělit do dvou hlavních skupin podle způsobu, jakým fermentaci provádějí. Homofermentativní bakterie metabolizují cukry prostřednictvím glykolýzy téměř výhradně na kyselinu mléčnou. Z jedné molekuly glukózy vznikají dvě molekuly kyseliny mléčné, tento proces se nazývá homolaktická fermentace (typická pro rod *Lactobacillus*). Heterofermentativní bakterie naopak přeměňují cukry na několik různých produktů, včetně kyseliny mléčné, alkoholu (etanolu), kyseliny octové a oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>). Z jedné molekuly glukózy vznikají jedna molekula kyseliny mléčné, jedna molekula alkoholu nebo kyseliny octové a jedna molekula CO<sub>2</sub>, což se označuje jako heterolaktická fermentace (typické pro rod *Leuconostoc*). Většina bakterií mléčného kvašení využívá glykolýzu k přeměně cukrů na kyselinu mléčnou za anaerobních podmínek. Výjimkou jsou bakterie rodu *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella*, které využívají jiné metabolické dráhy (VOVCR, 2023). Klíčovými faktory, které ovlivňují druhy dominujících bakterií během fermentace, jsou teplota, množství cukru a obsah soli. Při nižší koncentraci soli a nižší teplotě dominuje *Leuconostoc mesenteroides*. Produkty fermentace jsou především směsí kyselin, alkohol a aromatické estery. Vyšším teplotám pak dominuje rod *Lactobacillus*, který produkuje především kyselinu mléčnou a spadá pod něj více jak 300 bakteriálních druhů (Machala, 2008; Lahmamsi et al., 2024).

LAB jsou předmětem intenzivního zkoumání vědecké komunity, zejména z důvodu jejich dlouhodobého využití v konzervaci potravin, které má hluboké historické kořeny. Kromě toho jsou některé kmeny LAB široce aplikovány v komerčních probiotických přípravcích a funkčních potravinách, neboť mají schopnost pozitivně ovlivňovat zdraví konzumentů. Tyto mikroorganismy se přirozeně vyskytují ve zvířecím i lidském mikrobiomu, kde hrají klíčovou roli při udržování rovnováhy střevní mikroflóry a ochraně organismu před patogeny (De Filippis et al., 2020).

## 2.6 Mléčná fermentace a její možnosti využití

### 2.6.1 Mléčná fermentace – princip a přínos

Principem fermentačního procesu je rozklad přirozeně přítomných sacharidů v médiu nebo potravině za účasti bakterií, které sacharidy využívají jako zdroj uhlíku. Z těchto sacharidů dále vznikají organické kyseliny (kyselina octová, mléčná, propionová a další). Během tohoto procesu vzniká také určité množství oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) a alkohol. Spolu s organickými kyselinami pak alkohol vytváří typické aromatické estery, které produkují nezaměnitelnou vůni fermentace. Během rozkladu cukrů a vzniku organických kyselin se v procesu fermentace

prudce snižuje pH, které chrání produkt před škodlivými mikroorganismy, neboť jim tak vytváří nepříznivé podmínky (Machala, 2008).

Jak uvádí Machala 2008, mléčná fermentace může probíhat ve třech odlišných prostředích. V kulinářském odvětví se nejčastěji využívá fermentace zeleniny v nálevu obsahujícím 15% až 20% roztok soli (například při výrobě kvašených okurek). Další variantou je fermentace na nasolené zelenině bez přidaného nálevu, přičemž nálev se přirozeně vytváří až následně v momentě, kdy sůl osmotickým tlakem uvolní šťávu ze zeleniny. Fermentace však může probíhat i bez přítomnosti soli, což představuje alternativní postup s odlišným mikrobiálním průběhem. Jak uvádí i VOVCR (2023), hlavním významem mléčného kvašení je inhibice hnilobných bakterií za účelem prodloužení trvanlivosti potravin. Pro lidský organismus jsou potraviny kvašené s pomocí LAB velmi zdravé, neboť tvorba kyseliny mléčné v trávicím traktu brání tvorbě jiných nežádoucích hnilobných bakterií.

### 2.6.2 Využití bakterií mléčného kvašení při zpracování odpadů

LAB se využívají i při zpracování organického odpadu, a to včetně odpadu z domácností. Vhodným příkladem je Bokashi fermentace. Jedná se o metodu založenou na anaerobní fermentaci pomocí směsi mikroorganismů, která umožňuje efektivní rozklad organických zbytků bez zápachu, ztráty živin a produkce skleníkových plynů. Na rozdíl od tradičního kompostování umožňuje Bokashi zpracovávat i materiály, jako jsou mléčné a masné produkty, které by v běžném kompostu způsobovaly problémy (SolanaCenter, 2025). Klíčovým principem Bokashi metody je působení symbiotického vztahu fototrofických bakterií, LAB a kvasinek přítomných v inokulu. Když inokulum aplikované na organický odpad dosáhne určitého množství mikroorganismů, populace patogenních bakterií ustupuje a složení výsledné mikroflóry je následně ustáleno převážně na nepatogenních mikroorganismech (EMRO, 2025). Správná směs inokula dále urychluje rozklad organických látek a zároveň zajišťuje celkovou hygienizaci odpadu. Výsledkem je fermentovaný produkt bohatý na živiny, který lze následně využít jako hnojivo. Díky uzavřenému procesu ve vzduchotěsné nádobě se minimalizuje zápach a tím i přítomnost hmyzu a hlodavců (SolanaCenter, 2025). Metoda se tak stává uživatelsky přívětivou. Vzniklý produkt je třeba dále zpracovat, například pomocí vermikompostování nebo běžného kompostování, protože bez této stabilizační (např. humifikační) fáze není vhodný pro přímé použití na půdu.

Hlavní výhodou Bokashi fermentace je její snadná aplikace v domácím prostředí. Tekutý produkt vznikající během fermentace, známý jako Bokashi čaj, lze využít jako účinné hnojivo.

Významnou předností této metody je její nízká energetická náročnost a skutečnost, že na rozdíl od tradičního kompostování neprobíhá za zvýšených teplot. Nespornou výhodou je také ekonomická nenáročnost metody (Olle, 2020). Podobným nízkonákladovým anaerobním přístupem, který rovněž využívá aktivitu LAB, je tzv. terra preta sanitace. Tato metoda, inspirovaná tvorbou antropogenních černozemí v Amazonii, kombinuje mléčnou fermentaci organických zbytků (především lidských exkrementů) s přidavkem uhlíkatých materiálů, jako je biochar, piliny nebo popel. Následným procesem vermikompostování vzniká stabilní humusovitý substrát. Terra preta sanitace nachází uplatnění zejména v rozvojových regionech, či ekologických komunitách, kde slouží jako nízkonákladové řešení hygienizace exkrementů a recyklace živin zpět do půdy (De Gisi et al., 2014).

### 2.6.3 Potenciál mléčné fermentace pro environmentální aplikace

Bakterie sehrávají díky své interakci s rostlinami významnou roli v biologických i environmentálních aplikacích, a to například v oblasti půdního prostředí. Mikrobiom kořenů, tvořený širokou škálou mikroorganismů včetně bakterií a hub, hraje klíčovou roli v podpoře růstu rostlin a jejich odolnosti vůči stresovým faktorům. Schopnost mikroorganismů podporovat růst rostlin je podrobně popsána ve studii Tyler et al. (2008), která se zaměřuje na vliv půdních bakterií rodu *Rhizobium* a hub rodu *Glomus* při zvyšování rostlinné produkce. Tyto organismy symbioticky spolupracují s rostlinami a zlepšují jim tak přístup k živinám, čímž dále podporují jejich růst a vitalitu. Houby rodu *Trichoderma* a bakterie rodu *Pseudomonas* zase hrají důležitou roli v biologické ochraně rostlin. LAB byly již v minulosti využívány v zemědělství jako prostředek ke zlepšení účinnosti hnojení a podpoře růstu rostlin. Přestože jejich pozitivní účinky jsou známy, samotný mechanismus jejich působení zatím nebyl detailně prozkoumán. LAB se vyskytují přirozeně například v rhizosféře kořenových systémů, kde napomáhají rostlinám potlačovat široké spektrum houbových i bakteriálních patogenů, působí jako biostimulanty a zároveň přispívají ke zmírnění abiotických stresů (Lamont et al., 2017). Bylo prokázáno, že u ovocných stromů dokáží LAB potlačovat patogenní plísňe a mohou proto sloužit i jako alternativa ke konvenčně využívaným fungicidním postřikům (Gajbhiye et al., 2016). V laboratorním experimentu týmu Suproniene et al. (2014) byl testován fungicidní účinek různých kmenů LAB na semenech pšenice kontaminovaných houbovými patogeny. Ošetření semen vybranými LAB kmeny, a to především kmenem *Pediococcus pentosaceus* a jeho kombinacemi, vedlo k významnému snížení výskytu hub rodu *Fusarium*, *Alternaria* a *Bipolaris*, přičemž vliv na klíčení a choroby sazenic byl většinou nevýznamný (Suproniene et al., 2014).

Kromě půdních aplikací vykazují LAB i určitý potenciál pro využití v rámci fermentace problematických odpadních materiálů, jako jsou čistírenské kaly. Kaly často obsahují nejen zbytky antibiotik, ale i geny antibiotické rezistence, které mohou v kalu přetrvávat i po běžném biologickém čištění. Studie Koch et al. (2021) zmiňuje, že problém představují jak samotné rezistentní bakterie, tak i volná extracelulární DNA, tedy fragmenty genetického materiálu uvolněné do prostředí po rozpadu buněk. Tyto volné úseky DNA mohou jiné bakterie aktivně přijmout a začlenit do svého genomu, čímž mohou získat nové vlastnosti, včetně odolnosti vůči antibiotikům. K přenosu rezistence tak může dojít i bez přítomnosti živé rezistentní buňky, což významně zvyšuje riziko šíření (Koch et al., 2021). Také farmaceutické látky a jejich metabolity jsou v čistírenských kálech běžně přítomné. Existuje celá řada studií, které se zabývají detekcí a následným odstraněním farmaceutických látek z čistírenských kalů pomocí různých metod. Jednou z nejčastěji využívaných je tradiční kompostování, což je aerobní metoda, při které dochází k biologickému rozkladu organického materiálu za přístupu kyslíku. V průběhu procesu vznikají působením mikroorganismů vyšší teploty v substrátu, díky čemuž dochází k inaktivaci řady patogenů (Martín et al., 2019). Další možnou metodou kompostování využívající aktivitu žížal je tzv. vermikompostování. Oproti klasickému kompostování probíhá při nižších teplotách, dále umožňuje akumulaci těžkých kovů v biomase žížal a zároveň snižuje obsah patogenů v substrátu. Kombinace kompostování a vermikompostování se ukazuje jako efektivní přístup, který urychluje odbourávání některých organických polutantů (Grasserová et al., 2020). Další metodou stabilizace kalu je anaerobní digesce. Jedná se o biologický proces, při kterém mikroorganismy rozkládají organickou hmotu v nepřítomnosti kyslíku. Tento proces probíhá ve speciálních reaktorech, kde mikroorganismy přeměňují organické látky na bioplyn a stabilizovaný kal. I tato metoda je schopna odstraňovat farmaceutické látky z kalu, a to především prostřednictvím biodegradace a sorpce na pevné částice, přičemž míra účinnosti závisí na typu a vlastnostech dané látky a provozních podmínkách (Azizan et al., 2021). V této souvislosti se uvažuje také o využití mléčné fermentace jako předřazeného hygienizačního kroku pro určité typy bioodpadů, včetně čistírenských kalů, před jejich následným zpracováním v kompostárnách, vermikompostárnách či bioplynových stanicích. O vlivu tohoto procesu na přítomné mikropolutanty však zatím není k dispozici dostatek informací.

Další neméně zajímavou oblastí je využití LAB pro přímou degradaci polutantů. Studie Abdelshafy et al. (2024) popisuje schopnost LAB degradovat různé kontaminanty, které mohou být přítomné v potravinách jako jsou pesticidy, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU),

mykotoxiny, akrylamidy, bisfenol A či těžké kovy. Hlavními mechanismy pro eliminaci polutantů je v tomto případě adsorpce kontaminantů na buněčnou stěnu, která je bohatá na peptidoglykan a další strukturní molekuly, a dále biodegradace pomocí enzymatických drah, které vedou k rozkladu nebo přeměně škodlivých látek. Autoři rovněž uvádějí, že použití LAB může být efektivní, bezpečné a ekologicky šetrné řešení pro detoxikaci potravinových výrobků (Abdelshafy et al., 2024). Využití LAB se však neomezuje pouze na potravinářský sektor. Příkladem může být studie Seruga et al. (2015) zaměřená na dekolorizaci vinasy z cukrovarnického průmyslu pomocí kmene *Lactobacillus plantarum*, ve které autoři dosáhli až 67% snížení zbarvení substrátu po sedmidenní fermentaci. Vinasa je vedlejší produkt fermentace melasy s vysokým obsahem barevných a organických látek, jejichž přítomnost ve vodním prostředí může přispívat k eutrofizaci a zhoršení světelné prostupnosti vodního sloupce, čímž negativně ovlivňuje proces fotosyntézy vodních organismů. Biologická aplikace LAB se tak jeví jako perspektivní přístup i pro sanaci odpadních vod s vysokou organickou zátěží (Seruga et al., 2015). Studie Ma (2024) také popisuje LAB v souvislosti s biosorpcí těžkých kovů. V tomto případě hrají hlavní roli funkční skupiny buněčné stěny. Jedná se o karboxylové, hydroxylové nebo aminové skupiny, na které mohou být kovové ionty navázány či mohou být případně transportovány do nitra buňky a tam vázány na intracelulární proteiny. Další mechanismy zahrnují srážení kovů do nerozpustných forem či jejich přeměnu prostřednictvím enzymových nebo redoxních reakcí. Pokud jsou podmínky prostředí stabilní (např. pH, složení iontů), mohou LAB tyto ionty dlouhodobě stabilizovat a omezit tak jejich toxicitu a mobilitu v prostředí. Naopak při nevhodných podmínkách může dojít k desorpci, tedy opětovnému uvolnění již navázaných kovů zpět do okolního prostředí. Významnou roli hraje i přítomnost tzv. koexistujících iontů v okolí (tzn. jiných kationtů a aniontů, které mohou soutěžit o vazebná místa s cílovými kovovými ionty). V některých případech tak dochází k inhibici adsorpce, zejména pokud mají přítomné ionty vyšší afinitu k buněčnému povrchu bakterie. Na druhou stranu může v určitých systémech dojít i k synergickému efektu – například vlivem poškození membrán nebo zvýšení vnitrobuněčné akumulace. Výhodou LAB je i v tomto případě jejich fermentační aktivita. Díky tvorbě organických kyselin dochází ke snižování pH, což může zvýšit biologickou dostupnost kovových iontů a tím i účinnost jejich odstranění (Ma, 2024).

Fermentace takových typů odpadů, jako jsou například čistírenské kaly, pomocí LAB je dosud velmi málo prozkoumanou možností, která by teoreticky mohla pomoci omezit aktivitu těchto rizikových složek. Přímé experimentální ověření takového využití však zatím chybí.

## 2.7 Fermentované probiotické kultury a jejich potenciál

Fermentované probiotické kultury, zahrnující především bakterie a kvasinky, jsou mikroorganismy, které se využívají při fermentaci potravin a nápojů a mají pozitivní vliv na zdraví hostitele, zejména na střevní mikrobiom. Mezi nejběžnější probiotické kultury patří různé druhy laktobacilů (rod *Lactobacillus*) a bifidobakterií (rod *Bifidobacterium*), které jsou schopny přežít v zažívacím traktu živých organismů, podporovat rovnováhu střevní mikrobioty a přispívat k lepšímu trávení a posílení imunitního systému. Fermentované nápoje, jako je kombucha (známá také jako čajová houba či Haipo) a Tibi krystaly (vodní kefir), jsou založeny na symbióze bakterií a kvasinek, které tvoří celulózový biofilm známý jako SCOBY (anglicky Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast). Tento biofilm hraje klíčovou roli v průběhu fermentace, při níž dochází k růstu mikroorganismů a snížení pH, což zlepšuje trvanlivost a chuť potravinářských produktů (Novi Primiani et al., 2018). Probiotické kultury obsažené ve fermentovaných produktech prokazatelně podporují imunitní systém, pomáhají při léčbě zánětů, chrání před infekcemi gastrointestinálního a respiračního systému a mohou také přispět ke snížení hladiny cholesterolu v krvi a zmírnění alergických reakcí. Některé studie naznačují, že probiotika mohou mít rovněž protirakovinné účinky (Gill et al., 2009).

### 2.7.1 Biologie a struktura SCOBY

Od jiných rostlinných zdrojů celulózy se SCOBY odlišuje především specifickou sítí velmi jemných a vysoce porézních mikrofibril, na který jsou uchyceny bakterie LAB a bakterie zodpovědné za octové kvašení (Amarasekara et al., 2020). Navzdory jejich jemné struktuře vykazují mikrofibrily velmi dobré fyzikálně-chemické vlastnosti, a to především tepelnou i mechanickou odolnost a silnou sorpční schopnost. Na rozdíl od rostlinné celulózy neobsahuje celulóza produkovaná SCOBY lignin, pektin ani hemicelulózu, což jí zajišťuje výrazně vyšší čistotu a homogenní strukturu. Dalšími výhodami SCOBY je její pružnost, biokompatibilita, snadné biologické odbourávání a rychlý růst (Naomi et al., 2020).

Průběh fermentace SCOBY kolonie se tradičně sleduje pomocí *ex situ* analytických metod, které se zaměřují na změny chemického složení fermentačního média nebo na fyzikální proměny samotné SCOBY v čase. Nejčastěji se fermentace monitoruje prostřednictvím poklesu pH, stanovením koncentrací hlavních fermentačních produktů (zejména karboxylových kyselin), nebo měřením zbytkového množství alkoholu a cukru. Studie Bertsch et al. (2021) testovala pro sledování nárůstu biomasy i metodu *in situ*, při níž byla biomasa kombuchy ponechána k růstu na rozhraní vzduch/kapalina a zároveň byla v reálném čase sledována pomocí reologické techniky umožňující měření viskoelastických vlastností mezifázových

systémů. Tato metoda odhalila, že růst kombuchového biofilmu probíhá ve dvou odlišných fázích. První fáze zahrnuje adsorpci proteinů a bakterií na rozhraní, což vede ke vzniku tenké viskoelastické vrstvy na hladině. Tato počáteční etapa je značně variabilní a závisí mimo jiné na složení inokula a celkovém množství životaschopných bakterií v kolonii. Ve druhé fázi dochází k produkci bakteriální celulózy, čímž dochází k výraznému nárůstu biomasy a zpevnění biofilmu, tedy i ke zvýšení mechanické stability kolonie SCOBY. Významnou výhodou ISR je možnost kontinuálního, kvantitativního sledování růstu biofilmu během fermentace, a to zcela bez nutnosti zásahu do rozběhlého fermentačního procesu. Ačkoliv se SCOBY nejčastěji spojuje s fermentací v černém čaji, není výjimkou ani její kultivace v jiných typech médií. Příkladem může být fermentace v kávě, mléce, hroznové či mrkvové šťávě, čaji rooibos, pivu nebo červeném vínu. Stále častěji se také zmiňuje potenciál pěstování kolonií SCOBY na biologickém odpadu (Cubas et al., 2023) a její využití v textilním průmyslu, environmentálních technologiích, potravinářství nebo zdravotnictví.

## 2.7.2 Potenciál využití SCOBY – příklady z praxe

### 2.7.2.1 Výroba alternativních textilií

SCOBY představuje cenově dostupný a ekologicky šetrný zdroj celulózy s unikátními vlastnostmi a širokým spektrem využití. Má také mnoho výhod jako je její čistota a čistě přírodní původ, není toxická a je biologicky odbouratelná. Díky těmto vlastnostem má také nižší ekologickou stopu než jiné textilní materiály. Stále častěji se proto uplatňuje v textilním průmyslu, který čelí výzvám spojeným s rostoucí spotřebou surovin, intenzivním využíváním chemikálií, vysokou energetickou náročností a produkcí mikroplastů ze syntetických vláken (RMIT University Vietnam, 2025).

Růst spotřebitelského zájmu o alternativní materiály je aktuálně podpořen zejména rostoucí poptávkou po udržitelných produktech. Studie Bryszewska et al. (2023) se zabývala možností využití celulózy ze SCOBY jako funkčního biomateriálu s potenciálem nahradit veganskou kůži. Ukázalo se, že mezi hlavní výhody SCOBY jakožto textilního materiálu patří jeho nízké výrobní náklady a dobré mechanické vlastnosti. Nevýhodou však zůstává hydrofilní povaha celulózové textilie, což značně omezuje její využití (Bryszewska et al., 2023). Textil vyrobený z celulózy také nemusí být schopen odolávat každodennímu opotřebení jako jiné konvenčně využívané textilie, dále nemusí být pro spotřebitele dostatečně komfortní v porovnání s konvenčně využívanými materiály a je problematické z něj odstranit typický nepříjemný zápach fermentovaných produktů, zejména karboxylových kyselin (Kamiński et al., 2020). Navzdory určitým technickým omezením zůstává celulóza ze SCOBY slibnou alternativou

k syntetickým i živočišným materiálům a její další vývoj může přispět k ekologičtější budoucnosti textilního průmyslu.

#### 2.7.2.2 Biosorbce těžkých kovů

Další oblastí vědeckého zájmu o SCOBY je její využití při čištění odpadních vod. Těžké kovy a další problematické polutanty, jako jsou zinek, selen, chrom, olovo, uran, arsen, nikl, rtuť, kadmium či měď, představují vážné riziko pro vodní ekosystémy i lidské zdraví (Aikpokpodion et al., 2010). Jedním z běžně využívaných a zkoumaných sorbentů pro odstranění těchto kontaminantů je biochar, který díky svému rozsáhlému specifickému povrchu vykazuje výborné sorpční vlastnosti, zejména vůči těžkým kovům. Tento konvenční sorbent však není bez nedostatků – mezi hlavní problémy patří energetická náročnost jeho výroby, komplikovaná regenerace po použití a také otázka ekologické likvidace, jakmile ztratí své sorpční vlastnosti. V tomto ohledu se nabízí využít jiný přírodní zdroj sorbentu s obdobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Díky své unikátní struktuře může celulóza SCOBY nabídnout vhodné podmínky pro sorpci toxických kovů. Specifický povrch mikrofibril a velké množství funkčních skupin na jejich povrchu nabízí mnoho aktivních vazebních míst pro navázání iontů kovů (Milivojević et al., 2024). Jedním z příkladů experimentálního využití SCOBY pro odstraňování těžkých kovů z vody je studie Mousavi et al. (2019), která se zaměřila na sorpci nikelnatých iontů ( $Ni^{2+}$ ) z průmyslových odpadních vod. Autoři využili SCOBY kombuchy jako biosorbent v tříkomorovém bioreaktorovém systému s membránovou filtrací. V rámci reaktoru procházela kontaminovaná voda přes čtyři vrstvy SCOBY, které působily jako fyzicko-biologická bariéra schopná vázat ionty těžkých kovů. Poté voda vstupovala do komory s membránovým modulem, který odděloval zbývající částice a umožňoval recirkulaci roztoku zpět do vstupu reaktoru. V laboratorních podmínkách byly sledovány různé parametry ovlivňující účinnost sorpce – konkrétně pH, teplota, čas, přítomnost elektrolytů a počáteční koncentrace iontů. Za optimálních podmínek (v tomto případě: pH 7, teplota 25 °C, kontaktní čas 15 minut) bylo dosaženo 94,5% odstranění  $Ni^{2+}$  z roztoku, což potvrzuje vysoký sorpční potenciál SCOBY pro čištění odpadní vody (Mousavi et al., 2019). SCOBY se tak jeví jako slibný biosorbent, jehož praktické využití si však vyžaduje další výzkum.

#### 2.7.2.3 Inovativní aplikace ve zdravotnictví

S rostoucím zájmem o přírodní a udržitelné materiály se mikrobiální celulóza ze SCOBY začíná uplatňovat i ve zdravotnictví. Díky své čistotě, biokompatibilitě a schopnosti zadržovat vlhkost se zkoumá především jako materiál pro krytí ran, ale i pro další medicínské aplikace. Zajímavý přístup představuje studie Yakaew et al. (2022), ve které autoři vyvinuli kompozitní filmy

z mikrobiální celulózy SCOBY a hydrolyzovaného kolagenu, následně potažené chitosanem (přírodním polysacharidem získávaným z chitinu známým pro své antimikrobiální a hojivé účinky). Cílem bylo vytvořit bioaktivní materiál vhodný pro krytí ran s vysokou absorpční schopností, mechanickou stabilitou a antimikrobiální aktivitou. Výsledky potvrdily, že tento materiál účinně inhibuje růst bakterie rodu *Staphylococcus aureus*, je netoxický pro kožní buňky a vykazuje dobrý potenciál pro klinické využití.

Další oblastí, kde se SCOBY celulóza uplatňuje, je vývoj bioinkoustů pro regenerativní medicínu. Bioinkoust je směs přírodních polymerů a nanočástic s bioaktivními vlastnostmi, která umožňuje přesnou aplikaci na poškozené tkáně (Transfera, 2025). Výzkumníci ze Seoul National University of Science and Technology izolovali ze SCOBY nanocelulózu a vytvořili z ní speciální bioinkoust, který byl následně použit v digitálně řízeném bioperu (zařízení podobném 3D tiskárně určenému pro tkáňový tisk). Tento nástroj umožňuje vytvářet složité struktury a přesně vyplňovat defekty například u nesouměrných ran. Výsledky ukázaly, že bioinkoust ze SCOBY podporuje rychlé a efektivní hojení, čímž nabízí udržitelný a flexibilní přístup k regeneraci tkání, vhodný i pro použití v akutních a terénních podmínkách (Bhattacharyya et al., 2024). Využití mikrobiální celulózy ze SCOBY tak otevírá nové možnosti v oblasti zdravotnictví, kde může sloužit jako šetrný, efektivní a udržitelný biomateriál pro hojení ran i regeneraci tkání.

#### 2.7.2.4 Potravinářství

Jedním z perspektivních způsobů využití SCOBY celulózy je její aplikace v potravinářském průmyslu. Během výroby nápoje kombuchy se s každou fermentací tvoří nová časem přebytečná biomasa celulózy, které se pěstitelé zbavují různě (prodejem, vyhozením). Studie Chong et al. (2024) přišla se zajímavým nápadem, jak tento přebytečný „odpad“ znovu využít, a to i přímo v domácích podmínkách. Experiment vědeckého týmu spočíval ve výrobě mangové marmelády, v níž byla místo konvenčně využívaných hydrokoloidů jako je pektin nebo agar využita právě přebytečná SCOBY z kombuchy. Studie ukázala, že přidání mikrobiální celulózy ze SCOBY do mango džemu vedlo ke snížení aktivity vody, obsahu vlhkosti a pH, čímž bylo dosaženo mikrobiální stability a prodloužila se tak trvanlivost produktu. Zároveň došlo ke zlepšení textury – džem byl pevnější, lépe roztíratelný a měl vyšší gelovou soudržnost. Sensorické hodnocení potvrdilo, že džemy se SCOBY byly vnímány jako chutnější a vizuálně atraktivnější než kontrolní vzorek, přičemž nejlepší výsledky měl vzorek se 40 g/kg SCOBY

ze zeleného čaje. Celkově se SCOBY prokázala jako účinný přírodní hydrokoloid s potenciálem nahradit tradiční zahušťovadla, jako je pektin či agar (Chong et al., 2024).

Zajímavou možností využití SCOBY v potravinářství je také fermentace mléčných nápojů. Studie Kruk et al. (2021) zkoumala, zda je možné použít kombuchový nápoj a samotnou SCOBY kulturu jako alternativní startér pro výrobu fermentovaných mléčných a bezlaktózových produktů. Výsledky ukázaly, že vzniklé nápoje měly velmi dobrou mikrobiologickou kvalitu, přirozeně snížený obsah laktózy, typické pH pro fermentované výrobky a příznivé senzorycké vlastnosti – zejména pokud šlo o chuť a hladkost textury (Kruk et al., 2021). Využití kulturu SCOBY i jako startér pro fermentaci mléčných nápojů je možné, nicméně pro uvedení do praxe by bylo potřeba dalších experimentů.

Dalším příkladem využití SCOBY celulózy je její kombinace se sójovým proteinem za účelem tvorby funkčních gelů. Studie Guo et al. (2018) byla zaměřena na vývoj nízkotučné zmrzliny, ve které tento komplexní gel účinně nahradil tuk, aniž by došlo ke ztrátě senzorycké kvality produktu. Zároveň došlo ke zlepšení krémovitosti, stability a nutričního profilu výsledného výrobku, což potvrzuje potenciál mikrobiální celulózy jako funkční a ekologicky šetrné potravinářské přísady.

Zajímavý příklad udržitelného přístupu představuje i využití tofu syrovátky – vedlejšího produktu při výrobě tofu – jako alternativního a levného substrátu pro pěstování SCOBY. Místo běžně používaného oslazeného čaje byla tato živinami bohatá syrovátka použita jako fermentační médium, na kterém kolonie SCOBY úspěšně rostla a produkovala bakteriální celulózu. Výsledná celulóza byla následně izolována a vyhodnocena pro možné využití v potravinářství. Studie tak ukazuje, že tento způsob zpracování potravinářského odpadu může vést k ekologicky šetrné produkci hodnotného biomateriálu, který je plně v souladu s principy cirkulární ekonomiky (Feng et al., 2024).

Tyto příklady ukazují, že SCOBY není pouze vedlejší produkt fermentace, ale multifunkční materiál s širokým využitím. Jeho aplikace v potravinářství přináší nejen technologické výhody, ale také odpovídá současným trendům udržitelnosti a cirkulární ekonomiky. Přestože se jedná o oblast, která je teprve ve fázi intenzivního výzkumu, výsledky dosavadních studií potvrzují, že mikrobiální celulóza produkovaná kolonií SCOBY má značný potenciál stát se hodnotnou a ekologicky šetrnou alternativou k tradičním surovinám a aditivům v potravinářské výrobě.

### 2.7.3 Kombucha

Kombucha je známý osvěžující nápoj s jemně sladkou až kyselou chutí, který si získal popularitu po celém světě. Jeho základ tvoří čajový nálev, který fermentuje díky unikátní spolupráci bakterií a kvasinek, vytvářejících tzv. čajovou houbu (*Medusomyces gisevii*). Ačkoliv se o houbu nejedná, bývá za ni často zaměňována kvůli svému slizkému povrchu a houbovitému vzhledu (Sreeramulu et al., 2000). Častěji se s ní lze v odborné literatuře setkat pod označením SCOBY (Chen et al., 2000). Fermentace kombuchy je komplexní proces zahrnující různé mikroorganismy. Přítomné bakterie LAB, *Lactobacillus* (až 30 %) a *Streptococcus*, produkují kyselinu mléčnou, zatímco kvasinky, například *Saccharomyces cerevisiae*, přeměňují cukry na ethanol, kterého je v nápoji nejvíce kolem 7. dne fermentace (sledováno při inkubaci při 28 stupňů Celsia; Chakravorty et al., 2016). Bakterie rodu *Acetobacter* a *Gluconobacter* následně tento ethanol zpracovávají na kyselinu octovou, přičemž *Acetobacter xylinum* současně vytváří celulózný biofilm, který spojuje bakterie a kvasinky do stabilní struktury, který kombuchu tvaruje do typického houbovitého útvaru. Na počátku fermentace kvasinky hydrolyzují sacharózu na glukózu a fruktózu, které dále slouží jako zdroj energie pro ostatní mikroorganismy. Glukóza je metabolizována octovými bakteriemi na kyselinu glukonovou, zatímco fruktóza a ethanol podporují růst kvasinek a produkci dalších aromatických látek. Ve spodní části biofilmu kvasinky pokračují v anaerobní fermentaci. Vrchní bakteriální vrstva je chráněna před kyslíkem a UV zářením (Jayabalan et al., 2014). Mikrobiální aktivita hraje klíčovou roli během fermentace nápoje. Složení dominantních rodů bakterií zůstává po celou dobu fermentace téměř neměnné, přičemž nejvyšší bakteriální biodiverzita nastává kolem 7. dne. V této fázi je druhová rozmanitost bakterií největší jak v biofilmu SCOBY, tak ve fermentovaném nápoji, kde je bakteriální komunita ještě pestřejší. Na rozdíl od bakterií se složení dominantních druhů kvasinek mění, a to především v nápoji, kde byla pozorována postupná změna dominance kvasinek z rodu *Candida sp.* na *Lachancea sp.* (Chakravorty et al., 2016).

Pro výrobu kombuchy se nejčastěji používá zelený nebo černý čaj. Zelený čaj, díky své nefermentované povaze, podporuje efektivnější kvašení a rychlejší růst mikroorganismů. Klíčovým faktorem je kontrola hodnoty pH – ideální je ukončit fermentaci při hodnotě pH 4,2, kdy nápoj dosahuje optimální chuti a kvality. Proces fermentace černého čaje pomocí kombuchy je zobrazen na obrázku č. 2. V domácích podmínkách se nejčastěji používá zelený nebo černý čaj s cukrem v poměru 60 g cukru na 1 litr nápoje. Fermentace probíhá při pokojové teplotě po dobu 5-7 dnů. Po této době je třeba nápoj ochutnat a ukončit fermentaci, pokud je

chuť výsledného produktu uspokojivá. V případě potřeby lze kombuchu uchovávat v lednici ve sladkém čajovém nálevu po dobu několika týdnů, přičemž kolonie by měla být před znovuoobením fermentačního procesu vystavena vyšší teplotě.

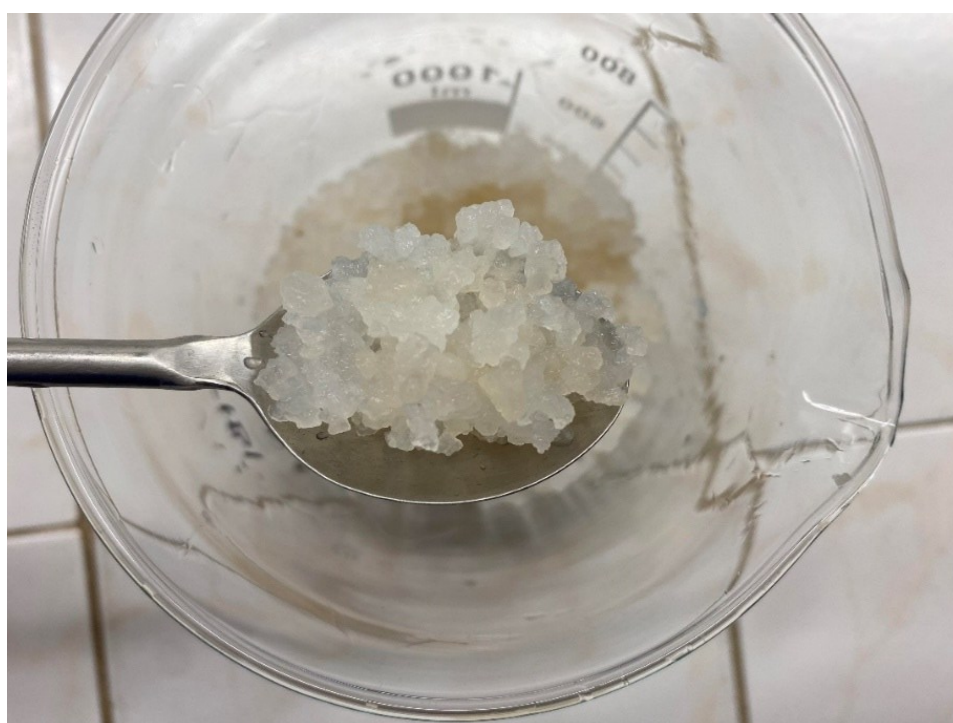
#### 2.7.4 Vodní kefir (Tibi krystaly)

Vodní kefir nebo také Tibi krystaly představují také symbiotickou kolonii mikroorganismů SCOBY. Na rozdíl od kombuchy, která vytváří houbovitý útvar, tvoří Tibi krystaly malé průhledné až mírně zakalené krystalky nepravidelných tvarů, které jsou složeny z gelovité hmoty obsahující dextranové exopolysacharidy (EPS). Struktura krystalků je znázorněna na obrázku č. 3. Mikrobiologické složení této kolonie se liší, zejména u nekomerčně vyráběných produktů. Bakteriální složku tvoří LAB rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*, zatímco kvasinky jsou zastoupeny především rody *Kluyveromyces*, *Candida* a *Saccharomyces* (Gulitz et al., 2011).

Studie vědeckého týmu Laureys et al. (2018) sledovala, zda se se fermentace Tibi krystalů liší při působení různého přidaného sušeného ovoce. Vodní kefir fermentovaný se sušenými meruňkami vykázal největší nárůst nových krystalů a nejnižší hodnoty pH. Naproti tomu fermentace s rozinkami vykazovala nejnižší pH a pouze malý nárůst biomasy krystalků vodního kefiru. Nejvíce živin bylo přítomno při fermentaci s čerstvými fíky. Běžně se v domácnostech připravuje fermentovaný nápoj kombinací 50 g krystalků do 1 litru vody s 50 g sacharózy. Fermentace probíhá ve vodě při pokojové teplotě v anaerobních podmínkách (přičemž nádoba není hermeticky uzavřena) 1-2 dny často se sušenými fíky, meruňkami nebo rozinkami. Výsledný produkt fermentace je jemně sycený, mírně nasládlý alkoholický nápoj nažloutlé barvy a specifickým aromatem.



*Obrázek č. 2: Fermentace černého čaje pomocí kombuchy.*



*Obrázek č. 3: Struktura vodního kefíru.*

### 3 Cíle práce

Přímé využití SCOBY kultur pro průmyslové čištění odpadních vod není příliš efektivní, neboť reakční směs vyžaduje pravidelný přísadavek z kvasitelných cukrů, což celý proces technologicky komplikuje a ekonomicky prodražuje. V oblasti odpadového hospodářství dává větší smysl aplikovat mléčnou fermentaci tehdy, pokud lze jako zdroj fermentovatelných substrátů nebo prebiotik využít jiný odpadní materiál, například otruby či melasu. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.7, mléčná fermentace čistírenských kalů za účelem eliminace přítomných farmak, popřípadě genů antibiotické rezistence, by mohla představovat alternativu ke stávajícím postupům jejich předúpravy před aplikací v zemědělství. Čistírenský kal je přitom velmi komplexní odpadní materiál a nevyhnutelně obsahuje celou řadu různých znečišťujících látek, nejen ze skupiny farmak. Studium tohoto nového přístupu přímo na čistírenském kalu by proto měl předcházet zjednodušený model, kde je možné dosáhnout víceméně definovaných podmínek. V rámci tohoto modelu by bylo ověřeno, zda byl za případný pokles obsahu farmak zodpovědný přímo proces mléčného kvašení. Kultury SCOBY se jeví jako vhodný model pro tento případ.

Cílem této práce je zjistit, zda bakterie mléčného kvašení přítomné ve vodním kefiru mají schopnost biodegradovat aplikovaná farmaka a antibiotika ze skupiny PPCPs. Tento hlavní cíl byl dosažen splněním menších dílčích cílů, které zahrnovaly optimalizaci růstových podmínek pro SCOBY kolonie v laboratorních podmínkách, výběr farmaceutických látek pro experimentální sledování a zhodnocení degradačního potenciálu mléčného kvašení pro vybrané mikropolutanty ze skupiny PPCPs.

V rámci práce byly formulovány následující hypotézy:

**H1:** Bakterie mléčného kvašení obsažené v Tibi krystalech mají schopnost biodegradovat vybraná farmaka, což vede ke statisticky významnému snížení jejich koncentrace po ukončení fermentace.

**H2:** Bakterie mléčného kvašení obsažené v Tibi krystalech mají schopnost biodegradovat vybraná antibiotika, což vede ke statisticky významnému snížení jejich koncentrace po ukončení fermentace.

**H3:** Fermentované médium s Tibi a antibiotiky po fermentaci nevykazuje antibakteriální účinek vůči sporové suspenzi *Bacillus subtilis*, což indikuje rozklad nebo inaktivaci přítomných antibiotik.

## 4 Metodika

### 4.1 Přístrojové vybavení

#### **Biotechnologická laboratoř Dřetovice:**

Agarové médium: DEV agar (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)

Agarové médium: MRS agar (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo)

Analytická váha: ACJ 200-4M (KERN, Německo)

Autokláv: Steam Sterilizer 2540EL (TUTTNAUER, Izrael)

Digitální váha: BL 2002 (Shimadzu, Japonsko)

Inkubátor: IN55plus (Mettler, Německo)

Multifunkční pH metr a konduktometr: HI 5521 (HANNA Instruments, Rumunsko/USA)

Spektrofotometr: UV-1800 (Shimadzu, Japonsko)

#### **Laboratoř Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR:**

Centrifuga: MEDIFRIGER-BL (J.P. Selecta, Španělsko)

Kapalinový chromatograf: Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, USA)

Konduktometr a pH metr: SevenDirect SD20 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Trojité kvadrupólový hmotnostní spektrometr: Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies, USA).

Ultrazvuková čisticí vana: K-12LE (Unimed Praha, Česko)

Vakuová pumpa: N 86 LABOPORT (KNF, Německo)

## 4.2 Použitý materiál a chemikálie

5% roztok fenolu

Demi voda

D-Glukóza

Dihydrogenfosforečnan draselný

Etanol

Filtrační papíry ze skleněných mikrovláken typu MN GF-2 (Macherey-Nagel, Ø 45 mm)

Hydrogenfosforečnan draselný

Chlorid hořečnatý hexahydrát

Chlorid manganatý tetrahydrát

Chlorid sodný

Chlorid vápenatý dihydrát

Koncentrovaná kyselina sírová

Suspenze spor *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, Německo)

Molybdenan sodný dihydrát

Síran amonný

Síran železnatý heptahydrát

## 4.3 Optimalizace podmínek experimentu

### 4.3.1 Výběr kultury

Pro zahájení experimentu bylo nutné vybrat kulturu probiotických bakterií ze skupiny LAB, která se snadno kultivuje v laboratorních podmínkách a zároveň obsahuje vysoký podíl těchto bakterií. Za tímto účelem byly porovnány dvě SCOBY kolonie – kombucha a krystaly Tibi.

Kultura Tibi krystalů byla získána ze soukromé sbírky Spolku živá obŽIVA. Před zahájením prvních laboratorních analýz byly krystaly kultivovány v domácích podmínkách v 5% roztoku sacharózy a odstáté kohoutkové vody při pokojové teplotě. Kultura kombuchy byla získána z internetového obchodu kombucha-prodej.cz ve variantě nálevu v černém čaji. Před analýzou v laboratoři byla také uchovávána při pokojové teplotě v 6% roztoku glukózy ve výluhu černého čaje.

Pro zjištění množství kolonií LAB byl využit agar MRS, který byl připraven dle návodu deklarovaného dodavatelem, a to sice smícháním 30,6 g sušeného agaru s 500 ml demi vody. Po promíchání přísad v Erlenmayerově baňce byl tento roztok sterilizován v tlakovém hrnci po dobu 15 minut. Po vyjmutí z tlakového hrnce a mírném vychladnutí byl agar asepticky přelíván do sterilních skleněných Petriho misek s volně přiléhajícími víčky.

Na ztuhlý agar v Petriho miskách byl asepticky přenesen výluh probiotické kultury kombuchy a Tibi krystalů. Vzorky zeleného čaje s kombuchou, fermentované po dobu 5 dní, a médium z vody a glukózy (5% roztok) fermentované po dobu 48 hodin s kulturou Tibi byly naředěny sériovým ředěním v řadách  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  a  $10^4$ . Jednotlivá ředění byla inokulována v objemu 0,1 ml na připravené agarové misky. Petriho misky byly následně obráceny víčkem dolů (závěsná plocha) a umístěny do termoboxu s teplotou 28 °C na dobu 48 hodin. Po uplynutí doby kultivace byl stanoven počet narostlých kolonií na Petriho miskách s vhodným ředěním (v tomto ředění vyrostly oddělené, dobře počítatelné kolonie). Výsledné množství bakterií LAB na agaru MRS bylo vypočítáno podle vztahu [1].

$$\text{KTJ} = \text{počet kolonií} \times \text{ředění/objem inokula (ml/l)} [1].$$

Na základě stanovení kultivovaných mikroorganismů bylo prokázáno, že LAB jsou přítomny v obou zkoumaných kulturách. Kvantitativní hodnocení však odhalilo vyšší množství LAB v kultuře krystalů Tibi, kde byla zjištěna koncentrace  $9,9 \times 10^6$  KTJ/ml, což převyšuje koncentraci zjištěnou v kultuře kombuchy ( $2,3 \times 10^6$  KTJ/ml). Obě hodnoty byly získány ze vzorků ředěných v poměru  $10^4$ . Na základě těchto výsledků, spolu s ohledem na jednodušší

a časově méně náročnou fermentaci krystalů Tibi v laboratorních podmínkách, byla tato kultura zvolena pro další experimentální práci.

#### 4.3.2 Výběr kultivačního média

Pro další práci s vodním kefirem (resp. krystaly Tibi) v experimentu bylo nezbytné zvolit vhodné kultivační médium, které by umožnilo optimální růst této kultury a zároveň bylo snadno reprodukovatelné v jakékoli mikrobiologické laboratoři. Při domácí kultivaci sloužilo jako zdroj mikronutrientů pro danou kulturu sušené ovoce (fíky, meruňky, rozinky apod.). Potřebné nutrienty pro rozvoj kultury jsou pravděpodobně přítomny v používané kohoutkové vodě. Pro kultivaci v laboratorních podmínkách bylo zvoleno minerální médium BSM (Basic Salt Medium), jehož chemické složení zahrnuje soli  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a demi vodu. Přesné množství jednotlivých látek obsažených v médiu je uvedeno v tabulce č. 4. Množství glukózy v roztoku dále záviselo na jednotlivých testovaných variantách. Médium bylo vždy před použitím v experimentu sterilizováno pomocí autoklávu.

Tabulka č. 4: Složení kultivačního média BSM.

Složení kultivačního média BSM (1 l)			
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,17 g	<b>Stopové prvky:</b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,13 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,71 g	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,26 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,034 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6 g
Stopové prvky	1 ml	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 g
Glukóza	dle potřeby	Demi voda	1000 ml
Demi voda	1000 ml		

Během celého experimentu byla využívána interní zásoba kultury vodního kefiru, která sloužila jako inokulum pro každé opakování cyklu u všech testovaných variant média. Tato matečná kultura byla udržována ve 2 l kádince a kultivována v 5% roztoku D-glukózy v minerálním médiu BSM při teplotě 28 °C. Médium bylo v zásobní kultuře pravidelně měněno a posilováno novou dávkou glukózy pro funkční proces fermentace. Pro zjištění optimálních podmínek pro mléčnou fermentaci byly testovány různé varianty média BSM ve sterilních skleněných nádobách o objemu 200 ml. Do každé nádoby bylo přidáno 175 ml testovaného média a 7 g krystalů Tibi. Před inokulací byly Tibi krystaly vyjmuty z matečné kultury a následně ponechány na filtračním papíře při pokojové teplotě po dobu 15 minut k odstranění přebytečné

vlhkosti před vážením. V experimentu byly testovány celkem čtyři varianty média, vždy ve třech opakováních. Jednotlivé varianty jsou popsány v tabulce č. 5.

*Tabulka č. 5: Složení a označení experimentálních médií.*

<b>Zkratka</b>	<b>Popis</b>
D50	5% roztok glukózy v DEMI BSM médiu
D25	2,5% roztok glukózy v DEMI BSM médiu
SD50	5% roztok glukózy v DEMI BSM médiu s 2% roztokem NaCl
K50	5% roztok glukózy v BSM médiu připraveném z kohoutkové vody

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jaký vliv má množství dostupného cukru na fermentaci a vitalitu SCOBY kultury, zda přítomnost soli – běžně využívané v potravinářství při mléčné fermentaci – ovlivňuje tento proces, a také zda minerály obsažené v kohoutkové vodě podporují růst a prosperitu bakteriální kultury. Během fermentace byly nádoby překryty hliníkovou fólií, aby se minimalizovala kontaminace z vnějšího prostředí. Celý experimentální cyklus probíhal v laboratoři po dobu 7 dnů.

Účinnost fermentačního procesu byla nejprve hodnocena na základě hodnoty pH. Očekávalo se, že v průběhu fermentačního procesu dojde ke snížení hodnoty pH v důsledku metabolické aktivity mikroorganismů, zejména vlivem produkce organických kyselin, jako je kyselina mléčná, octová a další vedlejší metabolity vznikající během fermentačního metabolismu sacharidů. Pokles hodnoty pH je dále popsán a zobrazen na obrázku č. I. v příloze č. 1.

Pro potvrzení funkčního procesu fermentace ve všech testovaných médiích byla dále využita metoda stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise. Metoda dle Duboise je založena na dehydrataci sacharidů v přítomnosti koncentrované kyseliny sírové (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Následně vznikající furfural nebo 5-hydroxymethylfurfural reagují s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, jejichž intenzita odpovídá koncentraci cukrů v roztoku.

Více informací k použité metodě je k dispozici v příloze č. 1. Na základě kombinace snížení hodnoty pH a procentuálního odbourávání cukru bylo pro další část experimentu vybráno médium D50. Porovnání jednotlivých testovaných médií popisuje tabulka č. I. v příloze č. 1.

#### 4.4 Výběr farmaceutických látek pro experimentální sledování

Jak bylo uvedeno v teoretické části a jak vyplývá z tabulky č. 1, členské státy EU, včetně České republiky, budou na základě novelizace Směrnice o vodní politice povinny zavést monitoring devíti farmaceutických látek ze skupiny PPCPs. Tabulka č. 1 uvádí 7 z těchto látek, přičemž tabulka č. 7 níže obsahuje úplný seznam vybraných látek pro experimentální sledování. Seznam je dále rozšířen například o estron (E1) a ethinylestradiol (EE2). Obě látky jsou hormonální povahy – estron (E1) je méně aktivní estrogen, který vzniká metabolizací 17 $\beta$ -estradiolu (E2), zatímco ethinylestradiol (EE2) je syntetický hormon, jenž napodobuje účinky přirozených estrogenů. Tyto látky patří mezi endokrinní disruptory, které mohou vážně narušovat hormonální rovnováhu a stabilitu vodních ekosystémů.

Tabulka č. 6: Experimentálně testované látky s navrženou počáteční koncentrací.

LÁTKA	DRUH	POČÁTEČNÍ KONCENTRACE (ng/ml)
17 $\beta$ -ESTRADIOL (E2)	<i>hormon</i>	250
ESTRON (E1)	<i>hormon</i>	100
ETHINYLSTRADIOL (EE2)	<i>hormon</i>	100
PARACETAMOL	<i>analgetikum</i>	10
KARBAMAZEPIN	<i>antileptikum</i>	10
DIKLOFENAK	<i>antiflogistikum</i>	10
GABAPENTIN	<i>antiepileptikum</i>	10
IBUPROFEN	<i>antiflogistikum</i>	100
NAPROXEN	<i>antiflogistikum</i>	50
TRAMADOL	<i>analgetikum</i>	10
AZITHROMYCIN	<i>antibiotikum</i>	50
KLARITHROMYCIN	<i>antibiotikum</i>	50
ERYTHROMYCIN	<i>antibiotikum</i>	50

Farmaka uvedená v tabulce č. 6 byla vybrána pro experimentální část této práce z několika klíčových důvodů. Prvním důvodem je jejich zařazení do *Návrhu směrnice Evropského parlamentu a Rady, která mění směrnice 2000/60/ES (stanovující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky), 2006/118/ES (o ochraně podzemních vod před znečištěním a zhoršováním stavu) a 2008/105/ES (o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky)*. Druhým důvodem bylo, že se jedná o látky, které byly detekovány i v českých surových a čištěných odpadních vodách, a to konkrétně v povodní Vltavy u vodní nádrže Švihov na Želivce, jak se uvádí v rozsáhlé studii Stejskalová et al. (2021) hodnotící reprezentativní výběr 19 místních obcí s celkovým počtem obyvatel v rozmezí 60 - 15 000. Tato oblast je z hlediska vodní distribuční sítě zásadní, neboť vodárenská nádrž Švihov je

největší zdroj pitné vody pro ČR. Zmíněná studie využívala sadu 24hodinových odběrů a celkem sledovala 102 chemických látek ze skupiny mikropolutantů, zejména ze skupiny farmak a PPCPs.

Výsledná experimentální směs farmaceutických látek ze skupiny PPCPs zahrnovala farmaka uvedená v připravované směrnici EU a vybrané mikropolutanty detekované v českých odpadních vodách podle studie Stejskalová et al. (2021). Konkrétně byly zahrnuty látky gabapentin, paracetamol, naproxen a tramadol.

Na základě těchto zjištění byly připraveny dva roztoky pro další analýzy: směs farmak (gabapentin, paracetamol, tramadol, karbamazepin, diklofenak, ibuprofen, naproxen, estron (E1), ethinylestradiol (EE2), 17-beta-estradiol (E2)) a směs antibiotik (azithromycin, klarithromycin, erythromycin). Koncentrace jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce č. 6. Roztoky farmak a antibiotik byly připraveny a poté i fermentovány odděleně pro případ, že by antibiotika měla negativní vliv na samotný proces mléčné fermentace.

#### 4.5 Degradace farmaceutických látek pomocí SCOBY

Tato část analýz byla realizována v MBÚ AV ČR a jejich cílem bylo zjistit, zda je SCOBY vodního keříru schopné degradovat farmaka či antibiotika v nízkých koncentracích. Pro experiment bylo připraveno šest variant vzorků, přičemž každá varianta byla testována ve třech opakováních a podrobena fermentaci po dobu 2 a 7 a 14 dnů. Hodnota pH vzorků byla měřena před zahájením fermentace i po jejím ukončení. Celkem bylo tedy v této části experimentu analyzováno 54 vzorků. Výběr jednotlivých farmaceutických látek ze skupiny PPCPs je podrobně popsán v předešlé kapitole.

Vzorky byly označeny pomocí vícemístného kódu, který obsahoval následující označení:

- A – SCOBY obsahující výše uvedená antibiotika,
- F – SCOBY obsahující výše uvedená farmaka,
- S – sterilní (autoklávované) SCOBY,
- K1 – SCOBY bez přítomnosti farmak,
- K2 – sterilní médium s antibiotiky a farmaky bez SCOBY,
- První číslice – identifikace konkrétního vzorku,

- Druhá číslice – délka fermentace (varianta 2,7 nebo 14 dní).

Pro každou variantu a časový úsek byly připraveny sterilní lahve o objemu 500 ml, případně nesterilní, pokud byl vzorek před přidáním roztoku farmak či antibiotik sterilizován v autoklávu. Do každé lahve bylo přidáno 140 ml sterilního média D50 a 7 g krystalů Tibi. Některé lahve byly po založení ihned uzavřeny víčkem a rovnou ponechány k fermentaci (varianta K1) nebo do nich před uzavřením byla ještě předtím sterilně přidána farmaka (varianta F) či antibiotika (varianta A) ze zásobního roztoku v metanolu. Zásobní roztok byl namíchán zvlášť pro antibiotika a zbylá farmaka (viz kapitola 4.4.). Z vybraného roztoku se do každé varianty s farmaky (varianta A a F) pipetovalo 350  $\mu$ l roztoku, aby byly dodrženy předem navržené koncentrace zobrazené v tabulce č. 6. Každá varianta s přidavkem farmak a antibiotik byla připravena ve dvou verzích: sterilní (S), kdy vzorek prošel autokláfováním, a nesterilní, kdy vzorek obsahoval aktivní kulturu Tibi.

Fermentace probíhala v inkubátoru při teplotě 28 °C v lahvích s volně nasazenými víčky, aby byla možná výměna plynů mezi lahví a okolním prostředím. Před zahájením fermentace a při ukončování jednotlivých časových variant bylo ve všech vzorcích stanoveno pH. Výjimku z běžného postupu představovala varianta K2, u níž byla hodnota pH měřena pouze na začátku a na konci experimentu, aby nedošlo k narušení sterilních podmínek a případné kontaminaci média. Při prvním provedení experimentu na pracovišti MBÚ byl po 14 dnech zaznamenán výrazný pokles pH, který nebyl očekáván vzhledem k absenci mikrobiální kultury. Z tohoto důvodu byla varianta K2 zopakována za dodržení přísně aseptického režimu.

V kapitole 5.1.1 jsou výsledky uvedeny odděleně jako varianty K2a a K2b, které se liší místem a datem provedení, avšak experimentální podmínky (včetně složení média, inkubační teploty a čas) byly v obou případech totožné.

#### 4.5.1 Filtrace a příprava vzorků pro analýzu

Po ukončení každé časové varianty byl obsah všech lahví přefiltrován přes filtrační papír ze skleněných mikrovláken typu MN GF-2 (Macherey-Nagel, Ø 45 mm, velikost pórů přibližně 1  $\mu$ m) za sníženého tlaku pomocí vakuové filtrace s Büchnerovou baňkou. Filtrační papír byl posléze spolu s pevnou fází zvážen a poté přemístěn do uzavíratelných skleněných zkumavek.

Z každého výsledného filtrátu bylo odebráno dvakrát 1 ml do skleněné vialky pro následnou analýzu farmaceutických látek pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) a reziduální inhibiční aktivity (RIL). Ze zbylého média byla za pomoci pH-metru

stanovena hodnota pH pro každý sledovaný vzorek. Vialky s odebranými vzorky byly do vlastní analýzy uchovávány v mrazícím boxu.

#### 4.5.2 Extrakce farmaceutických látek ze SCOBY a předúprava vzorků média

Pro analýzu látek s potenciální schopností sorpce na povrch krystalů Tibi bylo nejprve nezbytné tyto látky z povrchu krystalů extrahovat. Po filtraci byly krystaly Tibi spolu s filtračními papíry přeneseny do 50ml plastových kónických zkumavek, do kterých byl následně přidán metanol (MeOH, CH<sub>3</sub>OH) v takovém objemu, aby byly krystaly zcela ponořeny. Přesné objemy přidaného metanolu byly zaznamenány pro pozdější výpočet koncentrací sledovaných látek. Vzorky byly posléze umístěny na 30 min do ultrazvukové lázně a centrifugovány 10 minut při akceleraci 200 RPM/s<sup>2</sup>. Metanol byl přelit do předem zvážené 40ml vialky a byl proveden další cyklus extrakce, přičemž objem extrahované kapaliny byl vždy přesně zaznamenán. Extrakt byl následně odpařen na objem přibližně 5 ml a pro zjištění přesného objemu extraktu byla každá vialka opět zvážena. Poté byl 1 ml vzorku převeden do 2ml LC-MS vialky, centrifugován (10 minut, 6 000 RPM) a supernatant byl následně přendán do insertů k LC-MS analýze.

Vzorky média byly centrifugovány (10 minut, 6 000 RPM), supernatant byl přendán do insertů a analyzován metodou přímého nástřiku bez další předúpravy.

### 4.6 Kvantitativní stanovení farmaceutických látek pomocí LC-MS

Ke stanovení farmaceutických látek ve vzorcích byla využita kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS), provedená na přístroji Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS (Agilent Technologies, USA). Sledované analyty byly rozděleny na chromatografické koloně Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 × 3 mm; 2,7 μm) a předkoloně stejného typu (5 × 3 mm; 2,7 μm). Mobilní fáze obsahovala: (A) 0,5 mM fluorid amonný v MiliQ vodě s přídatkem 0,01 % kyseliny mravenčí a (B) 100% methanol. Gradient mobilních fází byl následující (čas [min], % fáze B): 0, 5; 0,5, 5; 3,17, 50; 4,5, 50; 12,5, 100; 14,5, 100; 15,17, 5; 15,83, 5. Z důvodu přítomnosti solí a dalších nežádoucích složek média, které mohou negativně ovlivnit funkci hmotnostního spektrometru (např. kontaminací iontového zdroje), byl eluát během prvních 2,8 minut analýzy odváděn do odpadu. Doba jedné analýzy byla 16,5 minuty, průtok mobilní fáze 0,6 ml/min a objem nástřiku vzorku 2 μl. Teplota v kolonovém prostoru byla 40 °C, teplota zdroje 180 °C a průtok plynu ve zdroji 6 l/min. Data byla vyhodnocena pomocí softwaru MassHunter Workstation Quantitative Analysis (Agilent, v. 10.0).

Výsledná koncentrace sledovaných látek v kapalném médiu byla vyjádřena v ng/ml. Zbytkové množství daného analytu v celém systému kapalné médium + pevná fáze bylo vyjádřeno v procentech původního množství. Korigovaný objem kapalného média (od původních 140 ml byl odečten objem, který zůstal po filtraci jako součást SCOBY) byl vynásoben hodnotou koncentrace. K tomuto údaji byla přičtena hodnota absolutního množství analytu zjištěného analýzou pevné fáze kultury SCOBY.

#### 4.7 Statistické vyhodnocení dat

Statistická analýza byla provedena v softwarovém prostředí RStudio (verze R 4.5.1) s využitím programovacího jazyka R. Pro porovnání hodnot pH a dalších kvantitativních proměnných mezi skupinami byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA). Statistická významnost byla stanovena na hladině  $\alpha = 0,05$ . V případě zjištění významných rozdílů následoval post-hoc test TukeyHSD, pomocí něhož byly identifikovány konkrétní dvojice skupin s významně odlišnými hodnotami.

#### 4.8 Měření reziduální inhibiční aktivity (RIL)

Antibiotický účinek výluhů z Tibi krystalů byl hodnocen u všech získaných filtrátů pomocí standardní diskové difuzní metody, konkrétně aplikované za účelem testování reziduální inhibiční aktivity (RIL). Tato metoda slouží ke zjištění, zda zkoumaný vzorek obsahuje zbytky antibioticky účinných látek, které jsou schopny inhibovat růst referenčního mikroorganismu i po procesu fermentace. Do metodiky byla tato metoda zařazena z důvodu ověření výsledků z předešlé LC-MS analýzy.

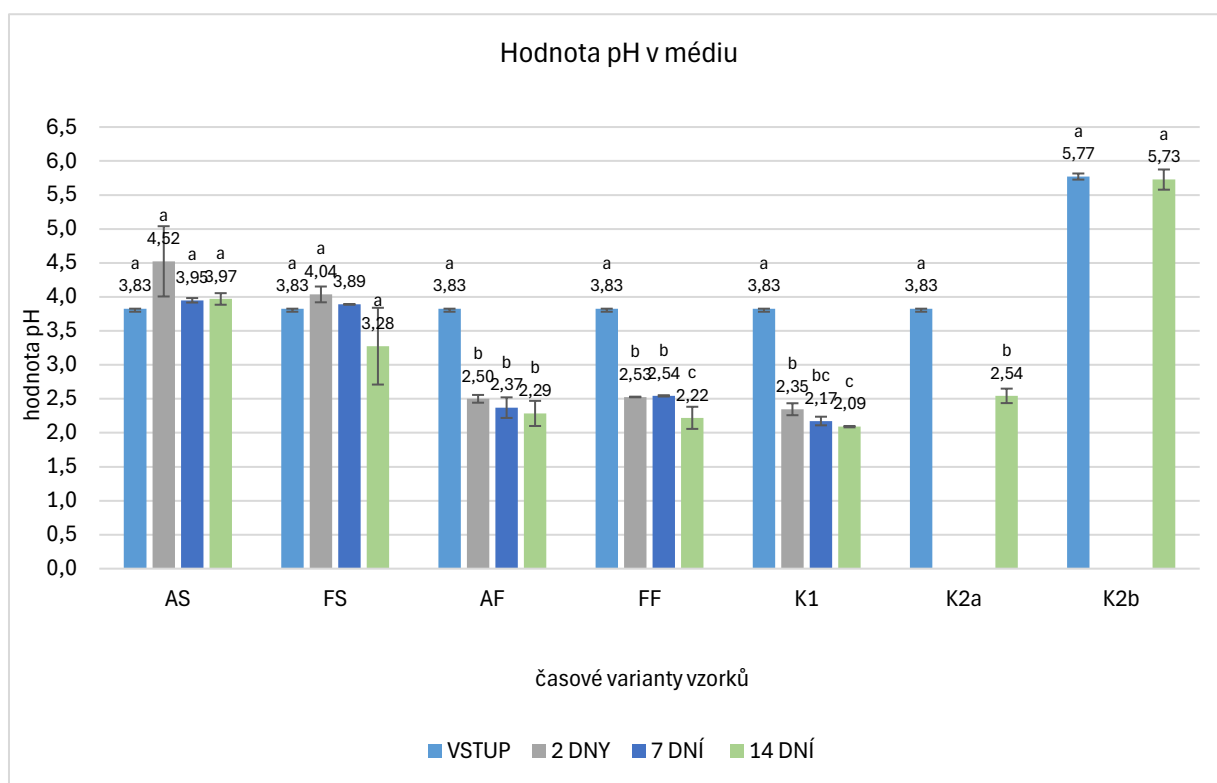
Jako testovací mikroorganismus byla použita suspenze spor *Bacillus subtilis*, kultivovaná na živném agaru DEV. Bakteriální suspenze byla vmíchána do zchlazeného (avšak ještě tekutého) agaru těsně před jeho nalitím do Petriho misek. Po ztuhnutí agarů byly do jeho povrchu sterilním okrajem laboratorní zkumavky vytvořeny otvory, ze kterých byl sterilní pinzetou odstraněn agarový výřez. Do těchto otvorů byla vložena sterilní vata s přídavkem 400  $\mu$ l z každého testovaného vzorku v triplicátech. Petriho misky byly dále inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Vznik inhibičních zón kolem aplikačního místa byl interpretován jako projev přítomnosti antibioticky účinných látek. Pro ověření platnosti testu byly vždy zahrnuty tři typy vzorků: sterilní fyziologický roztok jako negativní kontrola, sterilní antibiotikum (vstupní zásobní roztok) jako pozitivní kontrola a jednotlivé časové varianty AF, AS, FF a FS jako zkoumané vzorky.

## 5 Výsledky

### 5.1 Míra degradace farmaceutických látek pomocí SCOBY

#### 5.1.1 Kontrola průběhu fermentace pomocí pH

Počáteční hodnota pH pro všechny vzorky byla  $3,83 \pm 0$ , jen v případě K2b  $5,77 \pm 0,04$ . Průměrné hodnoty pH po ukončení experimentu zobrazuje obrázek č. 4. Ve vzorcích FF (fermentace Tibi, farmaka) a AF (fermentace Tibi, antibiotika) došlo po 14 dnech fermentace k signifikantnímu poklesu pH (na  $2,22 \pm 0,16$  a  $2,29 \pm 0,19$ ), což odráží vysokou metabolickou aktivitu LAB i v přítomnosti léčiv. Vzorky s inaktivovanou Tibi kulturou (AS, FS) vykazovaly jen minimální změny bez statistické významnosti, což poukazuje na absenci fermentační aktivity. V kontrolním vzorku K1 (Tibi bez farmak) došlo po ukončení experimentu k signifikantnímu poklesu pH ( $2,09 \pm 0,01$ ). Zatímco ve variantě K2 (čistě médium bez Tibi) zůstalo pH u varianty K2b téměř stabilní ( $5,73 \pm 0,22$ ), hodnota pH v případě varianty K2a klesla na  $2,54 \pm 0,11$ . U varianty K2 nebyla ani v jednom případě měřena hodnota pH pro dvoudenní a sedmidenní variantu, aby nedošlo ke kontaminaci kontrolního média, proto nejsou tyto varianty zobrazeny na grafu. Varianta FS (sterilní Tibi, farmaka) po sedmi dnech fermentace nebyla statisticky hodnocena, protože dva vzorky z trojice replik byly znehodnoceny kontaminací a byly dále ze statistické analýzy vyloučeny. Nejnižší hodnoty pH byly zaznamenány u vzorků AF, FF a K1, což naznačuje, že ve vzorcích s aktivní SCOBY kulturou proběhl fermentační proces podle očekávání.



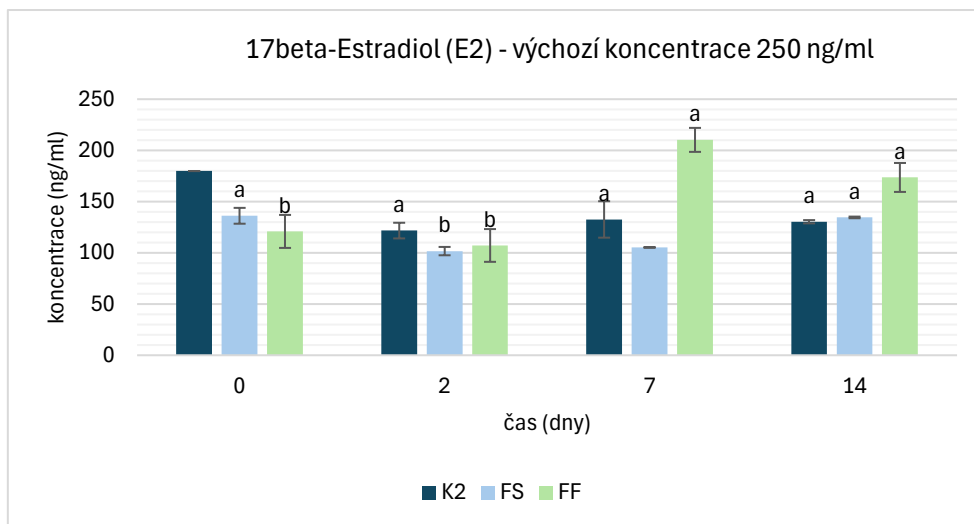
Obrázek č. 4: Hodnoty pH ve fermentovaných a kontrolních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, AF – fermentace Tibi + antibiotika, FS – inaktivované Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + antibiotika, K1 – Tibi + médium, K2a/K2b – médium + farmaka + antibiotika) během 0, 2, 7 a 14 dní. Varianta K2a byla provedena současně s hlavním experimentem, varianta K2b byla zopakována po ukončení pokusu za přísně aseptických podmínek. Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

## 5.2 Farmaka bez antibiotické aktivity

U vzorků obsahujících farmaceutické látky bez antibiotické aktivity nemohla být u variant K2 (vstup) a FS (7 dní) využita jednofaktorová ANOVA pro statistické vyhodnocení z důvodu kontaminace části vzorků, které byly z analýzy vyloučeny.

### 17 $\beta$ -estradiolu (E2)

Koncentrace 17 $\beta$ -estradiolu (E2) v kapalném médiu se v časech mezi jednotlivými variantami statisticky lišily, jak je vidět na obrázku č. 5. Nejvyšší počáteční koncentrace byla naměřena u kontrolního vzorku K2, zatímco varianty FS a FF vykazovaly nižší hodnoty. Po dvou dnech došlo u všech vzorků ke snížení koncentrace E2. Po sedmi dnech bylo zaznamenáno zvýšení koncentrace látky v médiu u varianty FF. Po čtrnácti dnech však koncentrace E2 u FF opět mírně klesla.



Obrázek č. 5: Vývoj koncentrace 17 $\beta$ -estradiolu (E2) v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

V celém systému (kapalné médium + kultura SCOBY) nedošlo u 17 $\beta$ -estradiolu (E2) k významné degradaci ve fermentované variantě FF, jak ukazuje tabulka č. 7. Během prvních dvou dnů sice došlo u této varianty ke snížení detekovaného množství, avšak v sedmém a ve čtrnáctém dni byla koncentrace látky opět vysoká. Tento trend může souviset s možnou chybou při přípravě vzorků nebo při samotném měření, neboť nízké koncentrace byly ve druhém dni zaznamenány i u zbylých variant. Sterilní varianta FS vykazovala statisticky nižší koncentraci E2 ve druhém dni, která však zůstala téměř neměnná i po sedmi dnech. Po čtrnácti dnech byl u FS zaznamenán mírný nárůst koncentrace. Kontrolní varianta K2 nevykazovala žádné statisticky významné změny v čase a hladina E2 zůstávala stabilní (přibližně v rozmezí 48– 52 % počáteční koncentrace).

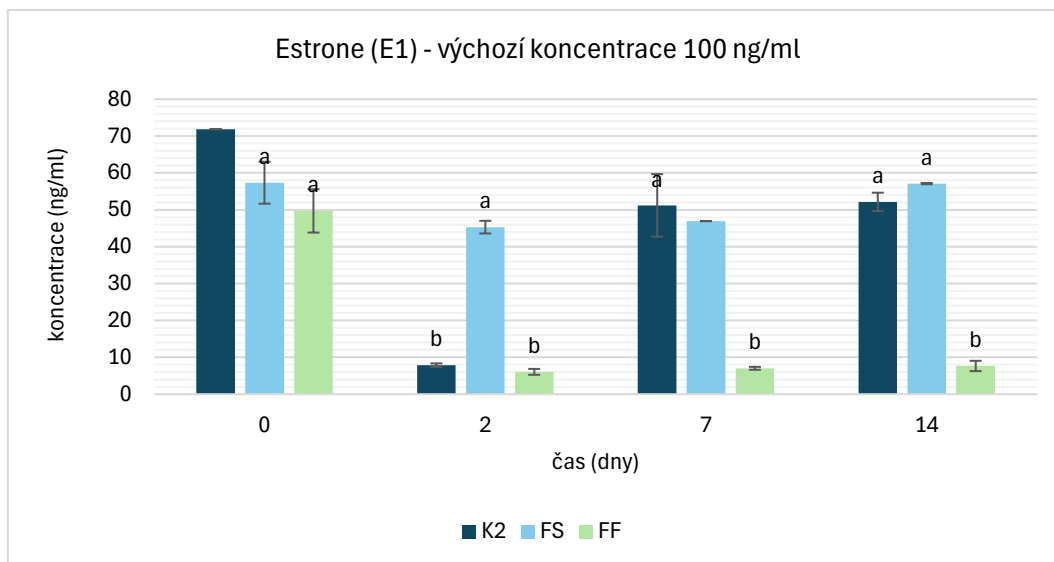
Na základě těchto výsledků nelze potvrdit, že by fermentace pomocí LAB vedla ke snížení koncentrace E2 v systému.

Tabulka č. 7: Procentuální zůstatek 17beta-estradiolu (E2) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	53,53 ± 5,53 <sup>Ab</sup>	96,66 ± 3,80 <sup>Aa</sup>	86,32 ± 6,09 <sup>Aa</sup>
FS	41,52 ± 2,44 <sup>Ab</sup>	42,63 ± 0,00	56,74 ± 1,38 <sup>Ba</sup>
K2	48,69 ± 0,50 <sup>Aa</sup>	53,03 ± 7,11 <sup>Ba</sup>	52,14 ± 0,64 <sup>Ba</sup>

### Estrone (E1)

Mezi jednotlivými variantami se koncentrace estronu (E1) v médiu statisticky lišily, jak ukazuje obrázek č. 6. U varianty FS byly koncentrace hormonu E1 ve všech časových bodech relativně vysoké a bez výraznějších změn v čase. Také kontrolní varianta K2 vykazovala v médiu vysoké koncentrace ve všech časových bodech, s výjimkou druhého dne, kdy byly naměřené hodnoty překvapivě nízké a statisticky se lišily od zbylých dní. Pravděpodobnou příčinou tohoto odchylujícího se výsledku byla chyba při měření koncentrace. Oproti tomu fermentovaná varianta FF vykazovala již od druhého dne nižší hodnoty a ve všech následujících dnech si udržovala statisticky významně nižší koncentrace než varianty K2 a FS. Nejnižší koncentrace E1 byly naměřeny ve fermentované variantě FF po dvou dnech experimentu. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost aktivní SCOBY kultury vedla k poklesu koncentrace E1 v médiu výrazněji než v případě 17β-estradiolu (E2).



Obrázek č. 6: Vývoj koncentrace estronu (E1) v čase v kapalném médiu ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

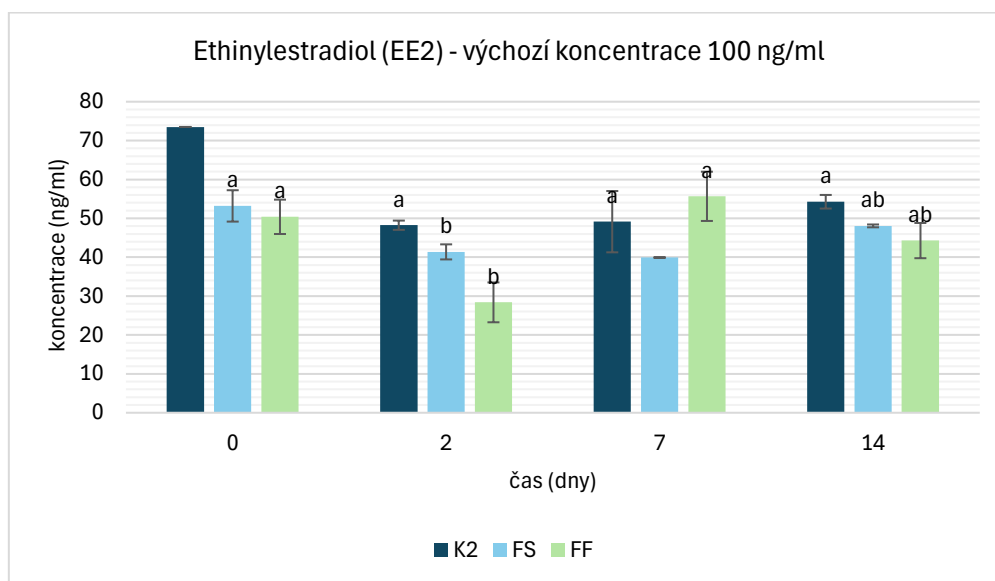
Procentuální změny koncentrací v celém systému zobrazuje pro E1 tabulka č. 8. Také v tomto případě došlo ve variantě FF k výraznému poklesu látky v systému (rozmezí 7,3 – 9,2 %), což je v souladu s výsledky z média. Oproti tomu varianty FS a K2 takové snížení nevykazovaly. Varianta FS se ve dvou a sedmi dnech pohybovala s koncentrací na rozmezí 45-47 % a po čtrnácti dnech opět mírně stoupla. Kontrolní varianta K2 nevykazovala v čase statisticky významné rozdíly a koncentrace se udržely mezi 51 – 52 %. Výsledky nasvědčují tomu, že fermentace pomocí LAB snížila koncentraci estronu v celém systému.

Tabulka č. 8: Procentuální zůstatek estronu (E1) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	7,34 ± 0,90 Ba	8,25 ± 0,56 Ba	9,26 ± 0,86 ca
FS	45,40 ± 2,53 Ab	46,68 ± 0,00	58,89 ± 1,04 Aa
K2	51,44 ± 4,57 Aa	56,25 ± 5,60 Aa	52,16 ± 2,49 Ba

## Ethinylestradiol (EE2)

Signifikantní rozdíly v koncentraci ethinylestradiolu (EE2) v médiu mezi jednotlivými variantami byly zaznamenány převážně ve druhém dni experimentu, kdy fermentovaná varianta FF vykazovala nižší hodnoty než kontrolní skupiny. Vývoj koncentrací látky v čase zobrazuje obrázek č. 7. Vstupní koncentrace byly u všech variant podobné, pouze u varianty K2 byly vyšší. Po dvou dnech se koncentrace EE2 v médiu snížila ve všech variantách, přičemž nejnižší hodnota byla naměřena ve fermentované variantě FF. Po sedmi dnech došlo ke snížení koncentrace u sterilní varianty FS, zatímco koncentrace ve fermentované variantě FF opět vzrostla. Po čtrnácti dnech se koncentrace ve fermentované variantě opět mírně snížila, zatímco v nefermentované variantě FS mírně vzrostla. V tomto čase již mezi skupinami nebyly zaznamenány žádné statisticky významnější rozdíly. Výsledky naznačují, že fermentační kultura mohla krátkodobě přispět ke snížení koncentrace EE2, avšak tento efekt nebyl dlouhodobý ani výrazně patrný.



Obrázek č. 7: Vývoj koncentrace ethinylestradiolu (EE2) v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Procentuální zastoupení ethinylestradiolu (EE2) v celém systému znázorňuje tabulka č. 9. Ani zde se nepotvrdilo, že by fermentovaná varianta FF vedla k výraznému snížení koncentrace látky v čase. Podobně jako v médiu došlo u FF ke snížení koncentrace ve druhém dni experimentu, následně se však hladina EE2 opět zvýšila. Mezi sedmým a čtrnáctým dnem se

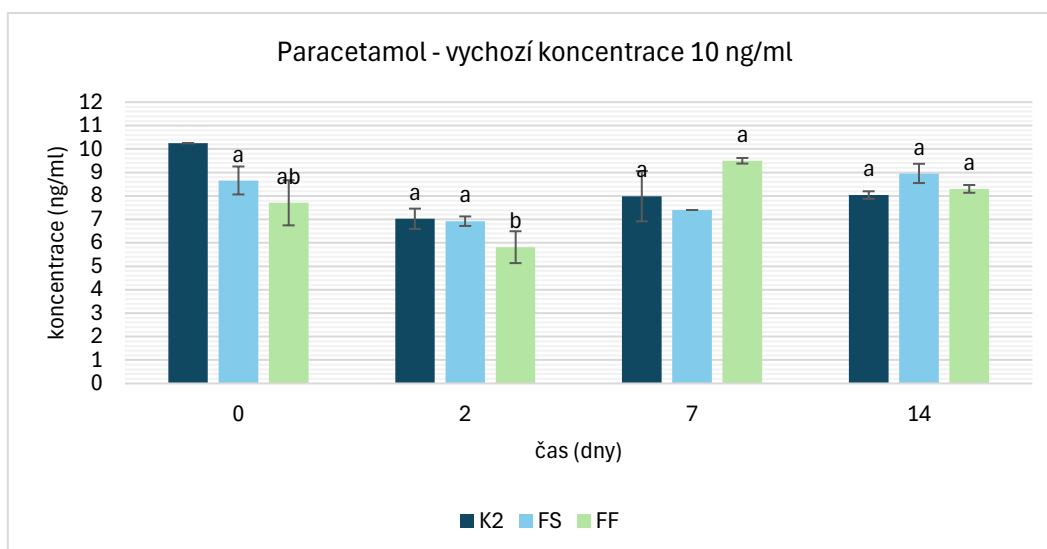
koncentrace již statisticky významně neměnila a ustálila se v rozmezí 60–69 %. Naopak kontrolní varianty FS a K2 vykazovaly po celou dobu nižší zůstatkové koncentrace EE2 než fermentovaná varianta. Výsledky tedy nenaznačují, že by fermentace s aktivní Tibi kulturou vedla k účinnému odbourávání estradiolu v systému. Krátkodobý pokles ve druhém dni mohl být způsoben laboratorní chybou při měření.

*Tabulka č. 9: Procentuální zůstatek ethinylestradiolu (EE2) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	38,97 ± 4,43 <sup>Ab</sup>	69,43 ± 5,07 <sup>Aa</sup>	60,85 ± 5,58 <sup>Aa</sup>
FS	42,09 ± 2,75 <sup>Ab</sup>	41,14 ± 0,00	51,71 ± 0,75 <sup>Aa</sup>
K2	48,71 ± 4,21 <sup>Aa</sup>	49,14 ± 7,89 <sup>Ba</sup>	54,27 ± 1,75 <sup>Aa</sup>

### Paracetamol

Koncentrace paracetamolu se mezi jednotlivými variantami v médiu statisticky významně lišily. Jak je vidět na obrázku č. 8, na počátku experimentu byly hodnoty koncentrací v médiu ve všech variantách relativně vysoké, přičemž varianta K2 dosahovala nejvyšších hodnot. Po dvou dnech došlo ke snížení koncentrace ve všech variantách, přičemž nejnižší hodnota byla zaznamenána u fermentované varianty FF. Po sedmi dnech byla koncentrace u varianty FF naopak nejvyšší, zbylé kontrolní varianty se téměř neměnily. Po čtrnácti dnech se koncentrace ve všech variantách opět mírně zvýšily ovšem bez statistické významnosti. Výsledky implikují, že chování paracetamolu ve sledovaném systému bylo proměnlivé a nelze z něj jednoznačně vyvodit vliv fermentační kultury na jeho degradaci nebo sorpci na povrch biofilmu.



Obrázek č. 8: Vývoj koncentrace paracetamolu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

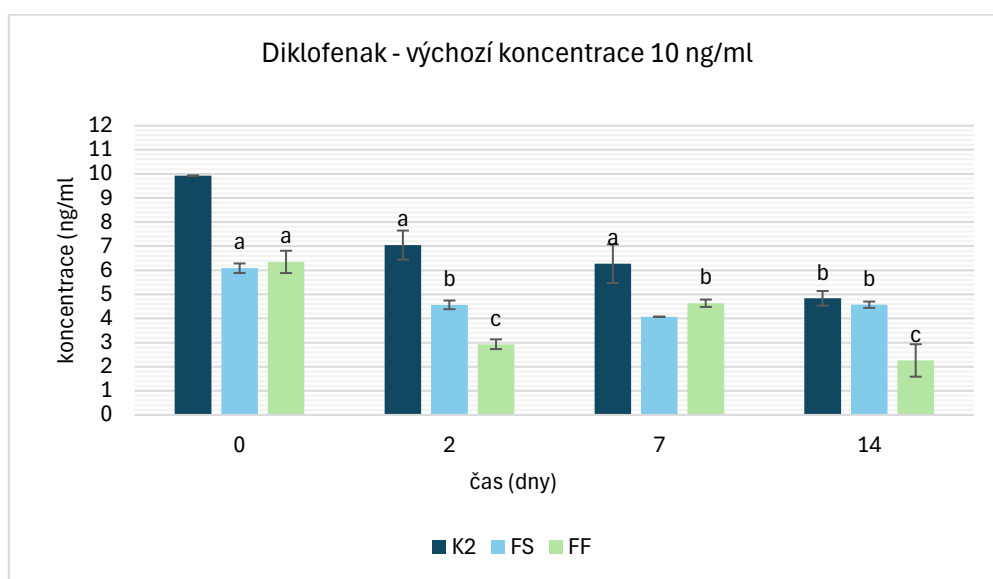
Tuto skutečnost potvrzuje i vývoj koncentrace paracetamolu v celém systému, znázorněný v tabulce č. 10. Také zde lze pozorovat pokles koncentrace ve fermentované variantě FF ve druhém dni experimentu, nicméně v sedmém a čtrnáctém dni byly naměřené hodnoty opět výrazně vyšší. Tento krátkodobý pokles mohl být způsoben chybou při přípravě vzorku nebo při samotném měření. Podobný vývoj byl zaznamenán i u sterilní varianty FS, kde po poklesu ve druhém dni následovalo opětovné zvýšení koncentrace. Naopak kontrolní varianta K2 si po celou dobu experimentu udržovala stabilní koncentraci paracetamolu v systému v rozmezí 78–81 %, bez statisticky významných rozdílů v čase. Na základě těchto výsledků nelze potvrdit, že by přítomnost aktivní fermentační kultury LAB významně přispěla ke snížení koncentrace paracetamolu v systému.

Tabulka č. 10: Procentuální zůstatek paracetamolu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	61,10 ± 6,61 Bc	98,27 ± 1,21 Aa	83,84 ± 1,01 Ab
FS	66,27 ± 2,64 ABb	69,90 ± 0,00	86,03 ± 2,07 Aa
K2	78,56 ± 4,99 Aa	79,90 ± 10,72 Aa	80,38 ± 1,60 Aa

## Diklofenak

Vývoj koncentrace diklofenaku v kapalném médiu zobrazuje obrázek č. 9. Koncentrace diklofenaku v médiu se mezi jednotlivými variantami statisticky významně lišily. Na začátku experimentu byla nejvyšší koncentrace zaznamenána u kontrolní varianty K2, zatímco FS a FF měly nižší, ale statisticky srovnatelné hodnoty. Po dvou dnech došlo ke snížení koncentrace ve všech variantách, přičemž nejnižší hodnota byla naměřena ve variantě FF. Po sedmi dnech zůstávala koncentrace u FF a FS stabilně nižší než u K2, ačkoliv koncentrace FF opět mírně stoupla. Po ukončení čtrnáctého dnu bylo opět nejnižší množství diklofenaku detekováno ve variantě FF, která se statisticky významně lišila od obou zbylých variant.



Obrázek č. 9: Vývoj koncentrace diklofenaku v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Z procentuálního zůstatku diklofenaku v systému (tabulka č. 11) je patrné, že ve fermentované variantě FF došlo již po dvou dnech experimentu k výraznému poklesu koncentrace látky, který byl následně sedmý den částečně vyrovnán, avšak po čtrnácti dnech zůstávalo v systému pouze  $42,90 \pm 3,46$  % původní koncentrace. Ve sterilní variantě FS se koncentrace ustálila již po dvou dnech na přibližně 50 % a v této hladině setrvala až do konce experimentu. Oproti tomu u kontrolní varianty K2 byl zaznamenán statisticky významný pokles v čase – zatímco ve druhém dni zůstávalo v systému přibližně 70 % původní koncentrace, v sedmém i čtrnáctém dni klesla tato hodnota pod 50 %. Výsledky naznačují, že fermentace pomocí LAB mohla

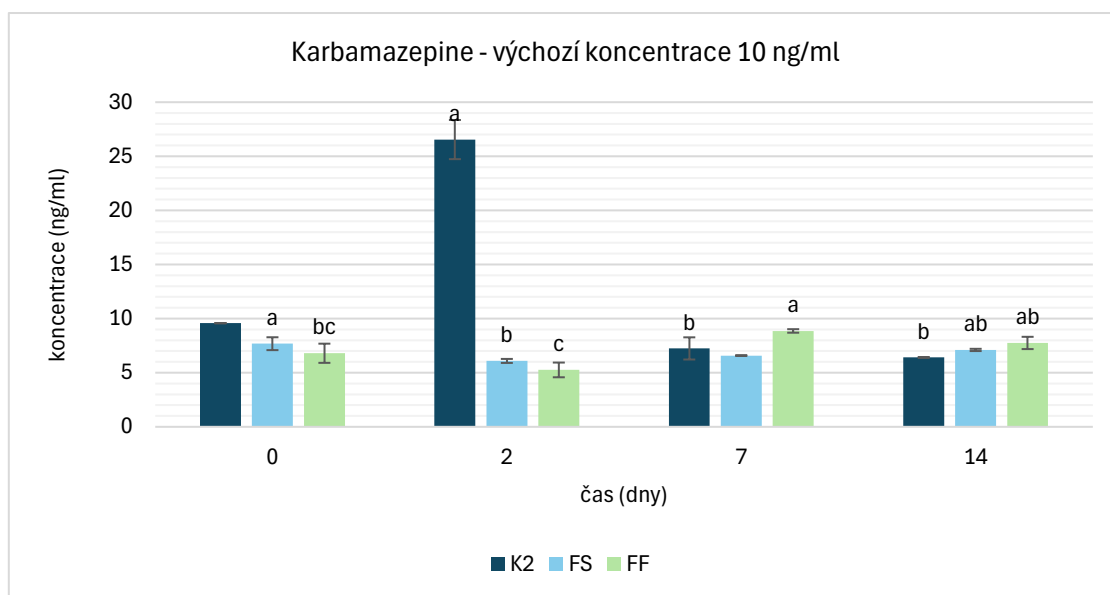
přispět k degradaci diklofenaku, nicméně vzhledem k poklesu koncentrace i v sterilní kontrole K2 nelze vyloučit, že k rozkladu látky docházelo také samovolně.

*Tabulka č. 11: Procentuální zůstatek diklofenaku v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	49,48 ± 2,63 <sup>Bb</sup>	80,32 ± 1,98 <sup>Aa</sup>	42,90 ± 3,46 <sup>Bb</sup>
FS	51,37 ± 2,85 <sup>Ba</sup>	47,98 ± 0,00	55,95 ± 1,91 <sup>Aa</sup>
K2	70,47 ± 6,04 <sup>Aa</sup>	62,75 ± 8,02 <sup>Bab</sup>	48,37 ± 3,03 <sup>ABb</sup>

## Karbamazepine

I u karbamazepinu opět došlo ke statisticky významnému rozdílu mezi jednotlivými variantami v kapalném médiu (obrázek č. 10). Na začátku experimentu byly hodnoty koncentrací v médiu u všech variant srovnatelné. Po dvou dnech došlo ke zvýšení koncentrace u kontrolní varianty K2, která se statisticky významně lišila od ostatních vzorků. Opět se pravděpodobně jednalo o chybu při měření. Ve variantách FS a FF zůstala koncentrace naopak nízká. Po sedmi dnech byly hodnoty koncentrací napříč variantami opět vyrovnanější, přičemž nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u fermentované varianty FF. Poslední čtrnáctý den byly koncentrace ve všech variantách srovnatelné a bez významnějších rozdílů. Výsledky ukazují, že koncentrace karbamazepinu v médiu kolísaly v čase bez jasně patrného vlivu fermentační kultury.



Obrázek č. 10: Vývoj koncentrace karbamazepinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

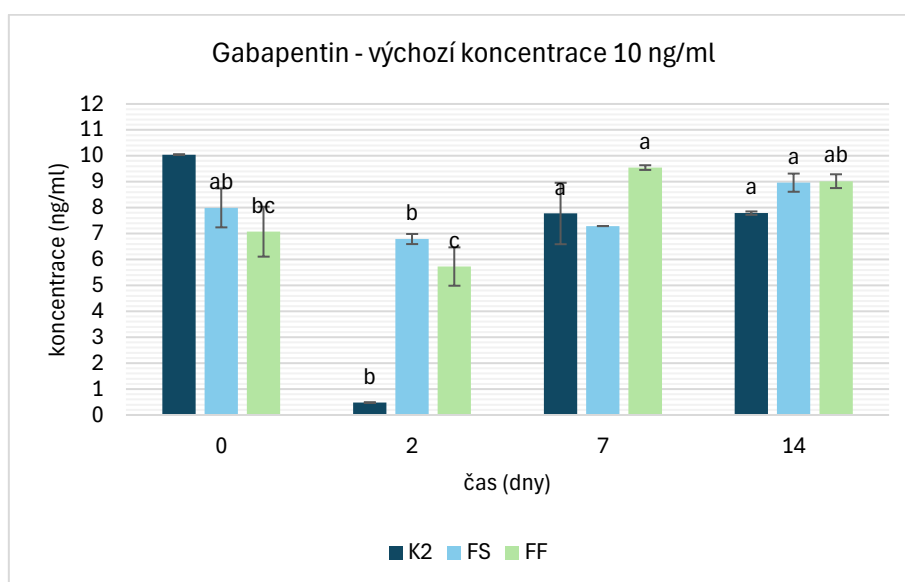
Toto kolísání potvrzují i údaje z tabulky č. 12, která ukazuje procentuální zůstatky karbamazepinu v celém systému. Ve fermentované variantě FF došlo ke krátkodobému snížení koncentrace ve druhém dni experimentu, následně se však hodnoty sedmý den opět zvýšily a ve čtrnáctém dni zůstaly stabilní bez statisticky významné změny. Podobný vývoj byl zaznamenán také ve sterilní variantě FS, kde byla patrná mírná změna ve druhém dni, ale následně se koncentrace ustálila. U kontrolní varianty K2 lze sledovat mírný pokles v čase, avšak ani zde nebyla prokázána statisticky významná změna. Výsledky naznačují, že koncentrace karbamazepinu v systému v průběhu času kolísaly bez zjevného vlivu fermentace.

Tabulka č. 12: Procentuální zůstatek karbamazepinu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	56,33 ± 6,52 <sup>Ab</sup>	93,20 ± 1,48 <sup>Aa</sup>	80,48 ± 6,55 <sup>Aa</sup>
FS	58,51 ± 2,80 <sup>Ab</sup>	62,44 ± 0,00	69,98 ± 0,57 <sup>ABa</sup>
K2	70,26 ± 4,33 <sup>Aa</sup>	72,45 ± 10,24 <sup>Ba</sup>	64,09 ± 0,06 <sup>Ba</sup>

## Gabapentin

Ve sledovaném období byly u gabapentinu zaznamenány statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými variantami v kapalném médiu (obrázek č. 11). Na počátku experimentu byly koncentrace ve všech skupinách vysoké a poměrně vyrovnané. Po dvou dnech došlo k výraznému poklesu koncentrace ve variantě K2, což mohlo být způsobeno chybou v měření. V ostatních variantách klesly hodnoty jen velmi mírně. Sedmý den experimentu přinesl opětovné zvýšení koncentrací ve všech variantách, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena u fermentované varianty FF. Po čtrnácti dnech se koncentrace ve variantách FS a FF ustálily na podobné úrovni, která byla vyšší než na vstupu. Koncentrace ve variantě K2 zůstala téměř stejná jako v sedmém dni.



Obrázek č. 11: Vývoj koncentrace gabapentinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Podobné chování gabapentinu popisuje i tabulka č. 13 s procentuálními zůstatky látky v různých časech. Ve variantě FF je opět vidět pokles po dvou dnech experimentu. Tento počáteční pokles ale opět vzrostl sedmý den a od té doby se již do konce experimentu držel na podobné úrovni bez statisticky významné změny. Zajímavý průběh byl pozorován u varianty FS, kde došlo rovněž k poklesu po dvou dnech, sedmý den koncentrace narostla jen mírně, ale čtrnáctý den došlo k opětovnému zvýšení hodnot. Kontrolní varianta K2 se po celou dobu experimentu pohybovala v rozmezí hodnot 74-75 % a procentuální zůstatky nevykazovaly žádné statisticky významné rozdíly. Výsledky z kapalného média (obrázek č. 11) i z celkové

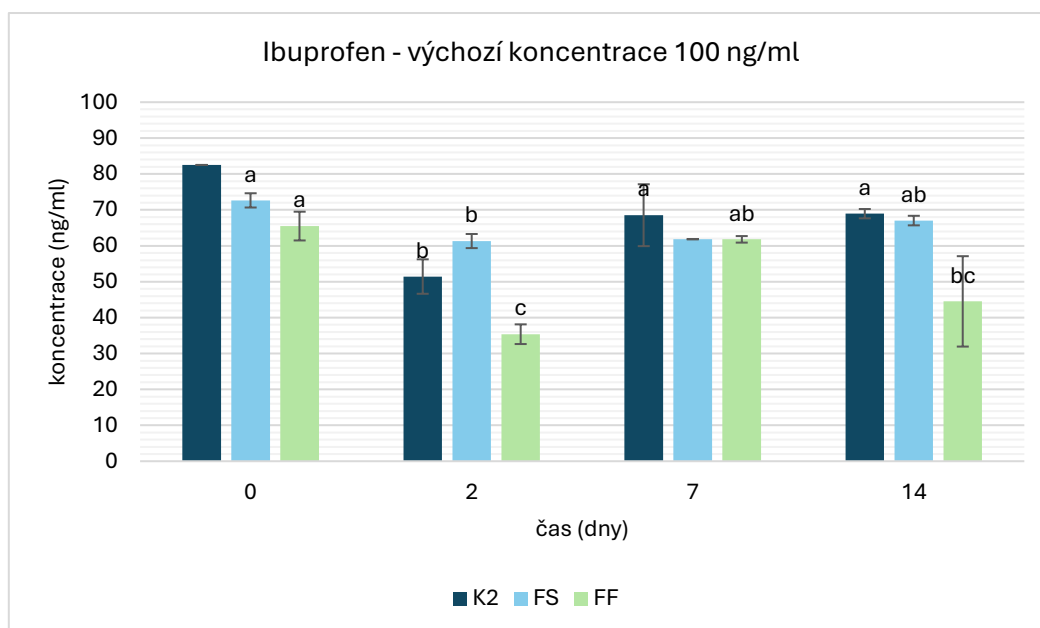
bilance (tabulka č. 13) vypovídají o kolísavém chování gabapentinu v průběhu experimentu a prokazatelný vliv fermentace na pokles koncentrace látky nelze stanovit.

*Tabulka č. 13: Procentuální zůstatek gabapentinu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	60,10 ± 7,25 <sup>Ab</sup>	98,33 ± 0,71 <sup>Aa</sup>	90,71 ± 3,24 <sup>Aa</sup>
FS	64,85 ± 2,49 <sup>Ab</sup>	68,65 ± 0,00	85,45 ± 1,56 <sup>ABa</sup>
K2	75,03 ± 3,95 <sup>Aa</sup>	77,75 ± 11,85 <sup>Aa</sup>	77,88 ± 0,65 <sup>Ba</sup>

### **Ibuprofen**

Statisticky významné rozdíly v koncentracích ibuprofenu mezi jednotlivými variantami byly zaznamenány v kapalném médiu v několika časech, zejména ve druhém a čtrnáctém dni (obrázek č. 12). Na začátku byly koncentrace ve všech skupinách relativně vysoké, přičemž nejvyšší hodnota byla zaznamenána u kontrolní varianty K2. Po dvou dnech došlo ke snížení koncentrace ve všech variantách, přičemž nejnižší hodnota byla naměřena u fermentované varianty FF. Sedmý den se koncentrace ve všech skupinách opět zvýšily a rozdíly mezi nimi byly méně výrazné. Tento den také došlo k opětovnému navýšení koncentrace látky v kapalném médiu u varianty FF. Po čtrnácti dnech zůstaly koncentrace u variant K2 a FS stabilní, zatímco u fermentované varianty FF došlo k opětovnému poklesu, který se statisticky významně lišil od ostatních.



Obrázek č. 12: Vývoj koncentrace ibuprofenu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

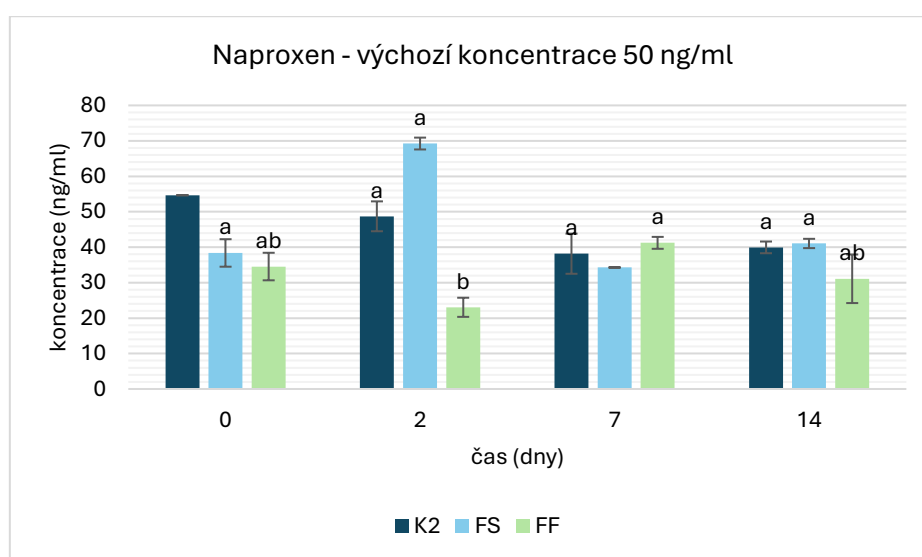
Při porovnání chování varianty FF v systému (tabulka č. 14) lze pozorovat prudký pokles hodnot po dvou dnech experimentu, následovaný opětovným nárůstem procentuálního zůstatku sedmý den, a především opětovným poklesem čtrnáctý den, kdy byl pokles zaznamenán jak v kapalném médiu, tak i ve zbytku systému. Oproti tomu kontrolní varianty FS a K2 nevykazovaly po celou dobu žádné výrazné ani statisticky signifikantní změny koncentrací v systému. Výsledky tak naznačují, že fermentační kultura mohla přispět k postupnému snižování koncentrace ibuprofenu, a to zejména v pozdější fázi experimentu.

Tabulka č. 14: Procentuální zůstatek ibuprofenu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	45,20 ± 2,52 Bb	75,94 ± 0,34 Aa	55,93 ± 10,08 Ab
FS	59,80 ± 2,82 Aa	60,43 ± 0,00	67,49 ± 0,59 Aa
K2	69,19 ± 4,72 Aa	68,53 ± 8,21 Aa	68,94 ± 1,23 Aa

## Naproxen

Statisticky signifikantní rozdíly mezi variantami se v kapalném médiu u naproxenu vyskytly jen v některých dnech, konkrétně ve druhém a čtrnáctém dni (obrázek č. 13). Vstupní koncentrace naproxenu byly mezi skupinami FS a FF podobné, varianta K2 naopak vykazovala koncentrace mnohem vyšší. Ve druhém dni experimentu se koncentrace dále významně zvýšila u sterilní varianty FS, a naopak výrazně klesla u fermentované varianty FF. Dále v sedmém dni došlo k opětovnému snížení varianty FS, a naopak k opětovnému zvýšení varianty FF. Ve čtrnáctém dni se hodnoty ve všech variantách navzájem přiblížily koncentraci naměřené na vstupu.



Obrázek č. 13: Vývoj koncentrace naproxenu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Ačkoliv výsledky z kapalného média (obrázek č. 13) naznačují, že varianta FF krátkodobě přispěla ke snížení koncentrace látky, procentuální zůstatky ze systému (tabulka č. 15) tuto teorii vyvracejí. Jak ukazuje tabulka, koncentrace v systému klesla po dvou dnech, ale sedmý den opět výrazně stoupla téměř na počáteční hodnotu naproxenu. Ve čtrnáctém dni lze sledovat mírný pokles koncentrace. U varianty FS byl pozorován pokles po dvou dnech, avšak v následujících dnech koncentrace látky v systému opět narostla. Varianta K2 si po celou dobu experimentu udržovala stabilní koncentraci bez statisticky významných změn.

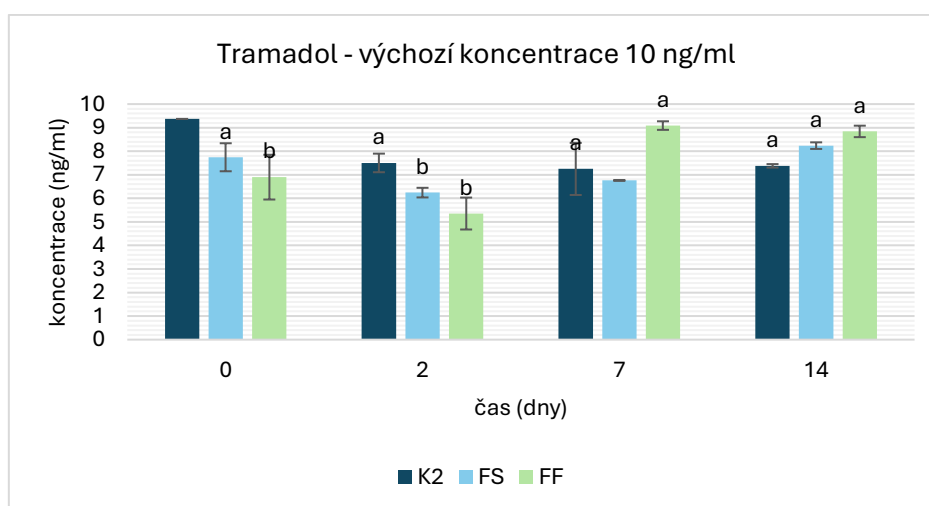
Vliv fermentace na snížení množství naproxenu v experimentu nebyl prokázán, nicméně po čtrnácti dnech lze pozorovat mírný pokles koncentrace. Pro potvrzení nebo vyvrácení této tendence by byl vhodný další a delší experiment.

*Tabulka č. 15: Procentuální zůstatek naproxenu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Varianta	2 dny (%) $\pm$ SD	7 dní (%) $\pm$ SD	14 dní (%) $\pm$ SD
FF	53,28 $\pm$ 4,97 Bb	95,46 $\pm$ 2,59 Aa	70,31 $\pm$ 10,96 Ab
FS	65,61 $\pm$ 3,79 ABb	67,77 $\pm$ 0,00	83,63 $\pm$ 0,87 Aa
K2	76,93 $\pm$ 5,35 Aa	76,33 $\pm$ 11,32 Aa	79,90 $\pm$ 3,30 Aa

## Tramadol

V případě tramadolu byly v kapalném médiu (obrázek č. 14) během experimentu pozorovány rozdíly mezi jednotlivými variantami, přičemž statisticky významné rozdíly byly potvrzeny při vstupu a ve druhém dni experimentu. Vstupní koncentrace byly mezi skupinami víceméně srovnatelné, pouze varianta FF vykazovala nižší hodnotu. Ve druhém dni došlo u všech variant ke snížení koncentrace. Nejvyšší hodnota tramadolu byla zaznamenána sedmý den u fermentované varianty FF, přičemž v tomto bodě byl zároveň potvrzen statisticky významný rozdíl vůči ostatním skupinám, jejichž koncentrace se po předchozím poklesu rovněž zvýšily. Po čtrnácti dnech byly koncentrace tramadolu ve všech variantách statisticky srovnatelné.



*Obrázek č. 14: Vývoj koncentrace tramadolu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Chování tramadolu v celém systému je znázorněno v tabulce č. 16. Také zde došlo u varianty FF ve druhém dni ke krátkodobému snížení koncentrace látky, které bylo statisticky významné ve srovnání s ostatními časovými body. V sedmém a čtrnáctém dni však koncentrace opět vzrostla, což nenaznačuje, že by fermentace vedla ke snížení množství farmaka v systému.

U varianty FS byl rovněž pozorován pokles ve druhém dni, následovaný opětovným navýšením procentuálního zůstatku v dalších fázích experimentu. Hodnoty u kontrolní varianty K2 se po celou dobu statisticky významně neměnily a pohybovaly se kolem 70 % původní koncentrace tramadolu. Celkově výsledky ukazují kolísavý vývoj koncentrace tramadolu bez prokazatelného efektu fermentace.

*Tabulka č. 16: Procentuální zůstatek tramadolu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

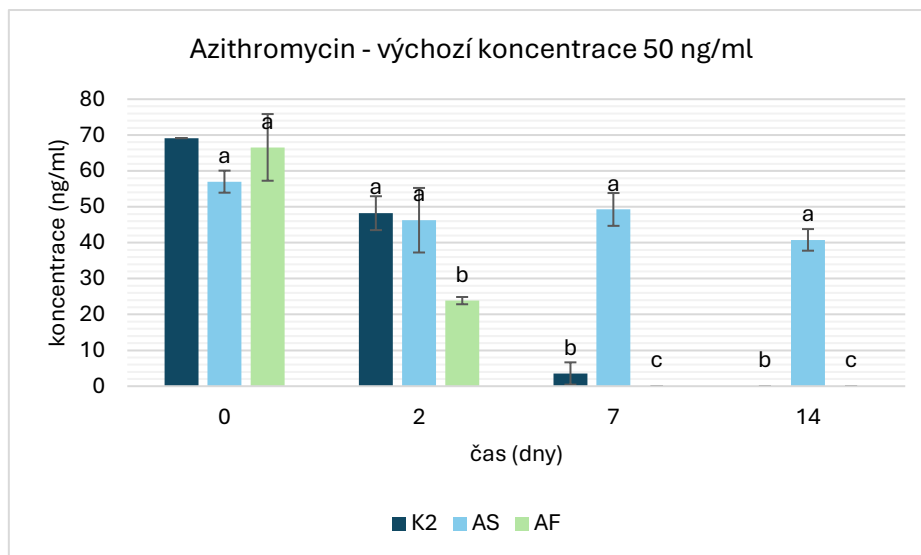
Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
FF	55,99 ± 6,63 <sup>Ab</sup>	93,54 ± 1,76 <sup>Aa</sup>	88,78 ± 3,16 <sup>Aa</sup>
FS	59,67 ± 2,57 <sup>Ab</sup>	63,74 ± 0,00	79,06 ± 0,27 <sup>Ba</sup>
K2	69,77 ± 4,30 <sup>Aa</sup>	72,47 ± 11,06 <sup>Aa</sup>	73,78 ± 0,75 <sup>Ba</sup>

Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že varianta FF s živou kulturou LAB vedla v experimentu k signifikantnímu snížení koncentrace estronu (E1), diklofenaku a ibuprofenu.

## 5.3 Farmaka s antibiotickou aktivitou

### Azithromycin

Rozdíly v koncentraci azithromycinu mezi jednotlivými variantami v kapalném médiu byly během experimentu statisticky významné (obrázek č. 15). Vstupní koncentrace byla u všech skupin srovnatelná, pouze u sterilní varianty AS byla nižší. Již po dvou dnech došlo u fermentované varianty AF ke statisticky signifikantnímu poklesu koncentrace. Snížení bylo zaznamenáno také u variant AS a K2. V sedmém dni koncentrace azithromycinu ve fermentované variantě AF klesla až pod detekční limit. U kontrolní varianty K2 k poklesu sedmý den také došlo, ale pod detekčním limitem byla u této varianty koncentrace látky až den čtrnáctý. U varianty AS byla pozorována jen pozvolná degradace s mírným navýšením v sedmém dni bez statisticky významných změn oproti hodnotám na vstupu.



Obrázek č. 15: Vývoj koncentrace azithromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Jak ukazuje tabulka č. 17, procentuální zůstatek azithromycinu v systému výrazně poklesl u varianty AF již po dvou dnech experimentu. Po sedmi dnech došlo u této varianty k úplné degradaci antibiotika ze systému. Pozvolná degradace byla pozorována i ve variantě K2, kde však byla látka stále detekovatelná ještě sedmý den. Naproti tomu varianta AS si udržovala poměrně stabilní koncentraci antibiotika po celou dobu bez statisticky významných změn a k degradaci zde nedošlo.

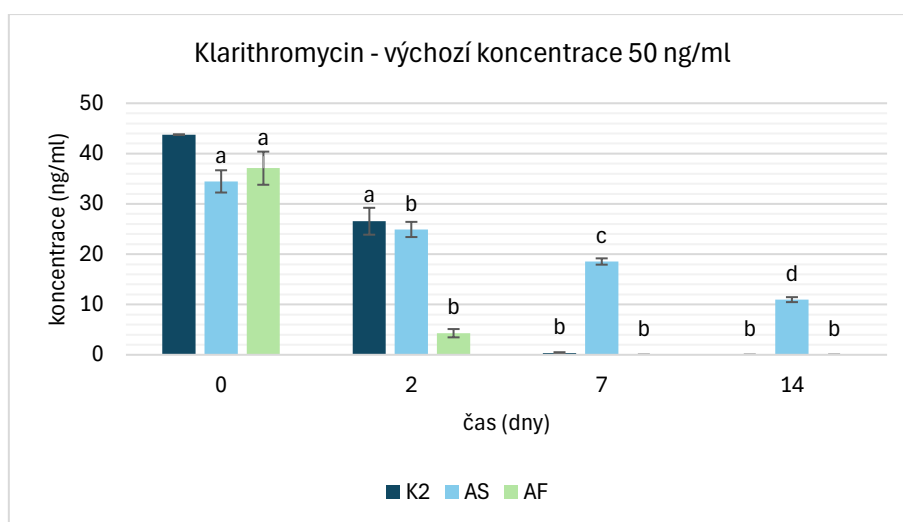
Výsledky naznačují, že azithromycin podléhá rozkladu i bez přítomnosti kultury LAB (varianta K2), avšak ve fermentované variantě AF byl pokles koncentrace rychlejší. Z tabulky 17 vyplývá zajímavý poznatek, že v přítomnosti sterilní SCOBY kultury zůstává množství azithromycinu v celém systému stabilní po celou dobu experimentu.

Tabulka č. 17: Procentuální zůstatek azithromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
AF	49,39 ± 2,49 <sup>Ba</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>Bb</sup>
AS	88,75 ± 12,04 <sup>Aa</sup>	96,16 ± 8,35 <sup>Aa</sup>	81,52 ± 5,71 <sup>Aa</sup>
K2	96,46 ± 2,39 <sup>Aa</sup>	7,10 ± 6,20 <sup>Bb</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>Bb</sup>

## Klarithromycin

Statisticky signifikantní byly i rozdíly v koncentracích v kapalném médiu u klarithromycinu (obrázek č. 16). Na vstupu byly koncentrace ve všech variantách podobné a poměrně vysoké. Po dvou dnech došlo k prudkému poklesu koncentrace látky v kapalném médiu ve variantě AF, která se výrazně statisticky lišila od sterilní varianty AS i kontroly K2. V sedmém byla již koncentrace látky u varianty AF pod detekčním limitem, kde zůstala i po čtrnácti dnech od začátku experimentu. Podobné výsledky vyšly i u kontroly K2, v níž byla koncentrace v kapalném médiu v sedmém dni experimentu změřena jen ve velmi malém množství a ve čtrnáctém dni experimentu byla již látka ve variantě K2 pod mezí detekce. Ve sterilní variantě AS se hodnoty v kapalném médiu v sedmém i čtrnáctém dni pohybovaly v násobně vyšších koncentracích, i když také postupně klesaly.



Obrázek č. 16: Vývoj koncentrace klarithromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Velmi zajímavý vývoj ukazuje fermentovaná varianta AF v tabulce č. 18, která znázorňuje procentuální zůstatek klarithromycinu v systému. Již po dvou dnech se koncentrace antibiotika u této varianty pohybovala pod 10 % původní hodnoty a v sedmém i čtrnáctém dni byla již pod detekčním limitem.

Také u varianty K2 docházelo k postupnému poklesu. Klarithromycin byl v této variantě v systému detekován ještě po dvou dnech kultivace v podstatně vyšší koncentraci než u varianty AF, sedmý den bylo ve variantě již jen jeho zbytkové množství a čtrnáctý den obsah antibiotika

z této varianty již klesl pod mez detekce. Postupný pokles byl pozorován i u sterilní varianty AS, kde docházelo ke statisticky významným rozdílům napříč časovými body. Po čtrnácti dnech se koncentrace ve variantě AS snížila na  $21,53 \pm 0,76$  % oproti původní vstupní koncentraci.

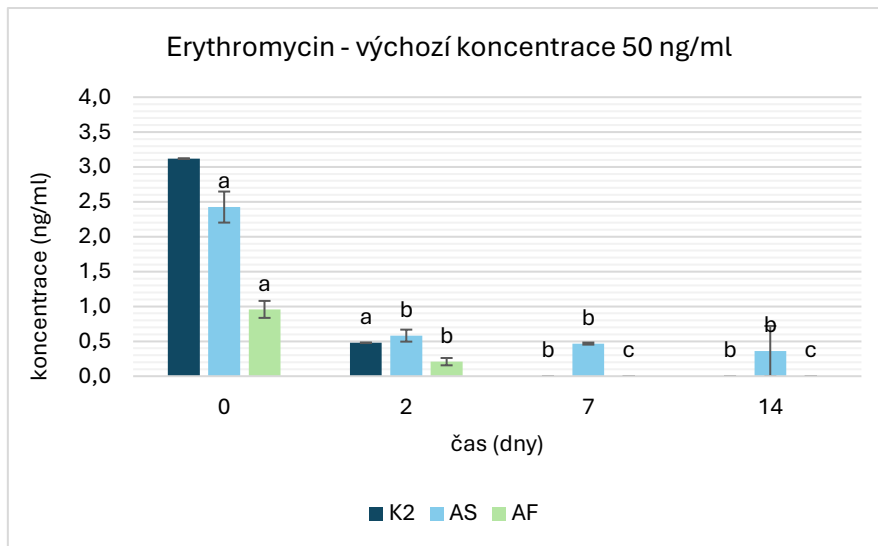
Výsledky naznačují, že varianta AF s aktivní kulturou LAB mohla přispět k rychlejšímu snížení koncentrace klarithromycinu pod detekční limit. K eliminaci antibiotika však došlo i u varianty K2 bez aktivní kultury, pouze s výrazným časovým odstupem. Také u sterilní varianty AS docházelo k postupnému snižování koncentrace látky v systému, což naznačuje přirozený rozklad klarithromycinu v čase opět s pozorovaným protektivním účinkem sterilní biomasy kultury SCOBY.

*Tabulka č. 18: Procentuální zůstatek klarithromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).*

Varianta	2 dny (%) $\pm$ SD	7 dní (%) $\pm$ SD	14 dní (%) $\pm$ SD
AF	$8,88 \pm 1,72$ Ba	$0,00 \pm 0,00$ Bb	$0,00 \pm 0,00$ Bb
AS	$47,33 \pm 0,95$ Aa	$36,30 \pm 1,38$ Ab	$21,53 \pm 0,76$ Ac
K2	$53,09 \pm 3,62$ Aa	$0,67 \pm 0,36$ Bb	$0,00 \pm 0,00$ Bb

## Erythromycin

U erythromycinu byl během experimentu pozorován rychlý pokles koncentrace ve všech variantách v kapalném médiu (obrázek č. 17), přičemž mezi skupinami se vyskytly statisticky signifikantní rozdíly. Vstupní koncentrace byly nejvyšší u kontrolní varianty K2, zatímco fermentovaná varianta AF vykazovala již od počátku mnohem nižší hodnoty. Po dvou dnech klesly koncentrace v kapalném médiu výrazně u všech variant K2, AS i AF. V sedmém i ve čtrnáctém dni se koncentrace v médiu ve variantě K2 i AF již vyskytovaly pod detekčním limitem, zatímco ve variantě AS byly v obou těchto dnech hodnoty rovněž nízké, ale stále detekovatelné.



Obrázek č. 17: Vývoj koncentrace erythromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Velkou míru rozpadu erythromycinu potvrzuje i tabulka č. 19 s procentuálními zůstatky látky v jednotlivých časech. Nejrychlejší úbytek byl zaznamenán ve variantě AF s aktivní kulturou LAB, kde bylo již po dvou dnech detekováno méně než 1 % původní koncentrace. V následujících dnech již antibiotikum ve vzorku detekováno nebylo. Podobný průběh byl pozorován také u kontrolní varianty K2, u níž koncentrace látky klesla na přibližně 1 % již po dvou dnech a dále zůstávala pod detekčním limitem. Ve sterilní variantě AS došlo rovněž k výraznému snížení koncentrace během prvních dvou dnů, nicméně po zbytek experimentu zde obsah antibiotika zůstal na nízké, ale stále detekovatelné úrovni. Výsledky naznačují, že v případě erythromycinu probíhal jeho rozklad v systému i bez přítomnosti LAB, což naznačuje samovolnou degradaci látky v čase a opět určitý, i když slabší protektivní vliv sterilní biomasy kultury SCOBY.

Tabulka č. 19: Procentuální zůstatek erythromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

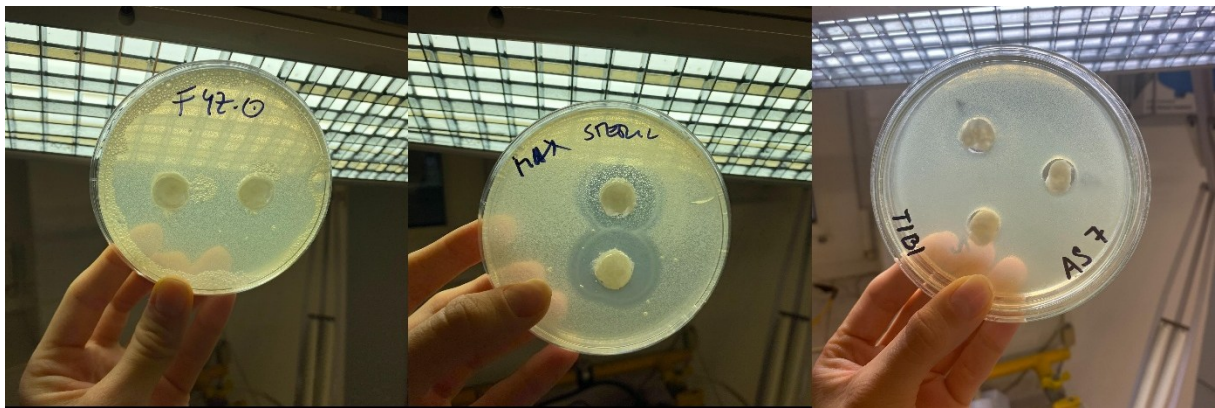
Varianta	2 dny (%) ± SD	7 dní (%) ± SD	14 dní (%) ± SD
AF	0,42 ± 0,11 Ba	0,00 ± 0,00 Bb	0,00 ± 0,00 Bb
AS	1,10 ± 0,22 Aa	0,91 ± 0,03 Aa	0,71 ± 0,12 Aa
K2	0,96 ± 0,01 Aa	0,00 ± 0,00 Bb	0,00 ± 0,00 Bb

Na základě výše popsaných dat lze konstatovat, že všechny tři antibiotické látky (azithromycin, klarithromycin i erythromycin) během experimentu výrazně degradovaly, a to i v kontrolních vzorcích K2 bez přítomnosti LAB. U žádného z antibiotik nedošlo ke snížení koncentrace pod detekční limit ve sterilní variantě AS, což naznačuje, že pokles koncentrací u varianty AF v kapalném médiu s aktivní mikrobiální kulturou nebyl způsoben pouze sorpcí na povrch celulózy Tibi krystalů, ale fermentační aktivitou kultury.

Výsledky rovněž ukazují, že u sledovaných antibiotik může významnou roli sehrávat spontánní chemický rozklad antibiotik v prostředí. Přítomnost aktivní fermentační kultury LAB však u azithromycinu a klarithromycinu vedla k rychlejší degradaci, což může svědčit o synergickém efektu spontánní degradace a mikrobiální aktivity.

## 5.4 Reziduální inhibiční aktivita (RIL)

Tato metoda byla zařazena do experimentu za účelem ověření výsledků získaných pomocí LC – MS analýzy. Po 24hodinové inkubaci na plotnách s agarem (DEV) a suspenzí spor *Bacillus subtilis* nebyla u žádného z hodnocených triplikátů časových variant (AF, FF, AS, FS) ani u negativní kontroly (fyziologický roztok) pozorována inhibiční zóna. Naopak u pozitivní kontroly (sterilní zásobní roztok antibiotik) byla detekována inhibiční zóna o průměrné velikosti 2 cm, což potvrzuje správnou funkci testu. Výsledek vybraných variant testu RIL je znázorněn na obrázku č. 18.



Obrázek č. 18: Porovnání velikosti inhibičních zón vzniklých působením sterilního fyziologického roztoku (negativní kontrola, vlevo), sterilního roztoku antibiotik (pozitivní kontrola, uprostřed) a sedmidenní varianty AS (inaktivované Tibi + antibiotika, vpravo) na růst *Bacillus subtilis*.

## 6 Diskuse

Tato diplomová práce se zabývala možnostmi využití mléčné fermentace k biodegradaci vybraných farmaceutických látek a antibiotik ze skupiny PPCPs. Úvahy nad potenciálním využitím mléčné fermentace jako předúpravné technologie reflektují potřebu omezit přítomnost mikropolutantů a genů antibiotické rezistence v odpadních vodách a kalech určených k zemědělskému využití. Hlavním cílem experimentu bylo ověřit, zda bakterie mléčného kvašení přítomné v Tibi krystalech, které patří mezi symbiotické kultury SCOBY, vykazují schopnost rozkladu vybraných mikropolutantů ze skupiny PPCPs za definovaných podmínek. Tento pokus je součástí projektu zaměřeného na eliminaci mikropolutantů ze skupiny farmak a genů antibiotické rezistence z odpadních vod a zejména čistírenského kalu pomocí biologických metod. Vzhledem k technologickým i praktickým omezením přímého nasazení kultury SCOBY do reálného prostředí byl tento systém zvolen pouze pro laboratorní modelový experiment, který umožňoval kontrolu fermentačních podmínek a usnadnil tak interpretaci procesů v systému.

V rámci experimentálního uspořádání byly sledovány nejen změny koncentrace léčiv, ale také parametry, které signalizují průběh fermentačního procesu a aktivitu mikroorganismů. Výrazný pokles pH ve vzorcích s aktivní Tibi kulturou (AF, FF, K1) potvrzuje, že fermentace probíhala jak v přítomnosti farmaceutických látek, tak i antibiotik. Snížené pH během procesu je pravděpodobně důsledkem produkce organických kyselin, zejména kyseliny mléčné a octové, což odráží vysokou metabolickou aktivitu laktobacilů. Stabilní nebo jen mírně se měnící pH v kontrolních variantách bez aktivní kultury (FS, AS, K2) tak potvrdilo, že k fermentaci a následné acidifikaci dochází výhradně v přítomnosti životaschopné SCOBY. Tato zjištění zároveň navazují na tvrzení Machala (2008), že pokles pH lze vnímat jako spolehlivý indikátor metabolické aktivity fermentační kultury. Pro jednoznačné potvrzení, že fermentace ve variantách AS, FF a K1 skutečně probíhala i za ztížených podmínek způsobených přítomností léčiv, by bylo vhodné při případné replikaci experimentu doplnit měření také o stanovení koncentrací organických kyselin. Pro zvýšení spolehlivosti výsledků by bylo také vhodné využívané směsi farmak a antibiotik rozpuštěné v metanolu přefiltrovat pomocí sterilních membránových stříkačkových filtrů, čímž by byla zajištěna jejich mikrobiální čistota a vyloučen případný vliv kontaminace na průběh fermentace.

Výsledky experimentu částečně potvrzují hypotézu H1, jež tvrdí, že LAB obsažené v Tibi krystalech mohou degradovat vybrané farmaceutické látky. Statisticky významné snížení koncentrací estronu (E1), diklofenaku a ibuprofenu ve fermentované variantě ve srovnání s kontrolními vzorky svědčí o aktivní účasti kultury SCOBY na biologickém rozkladu těchto farmak. Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.4., estron (E1) je metabolickým produktem hormonu  $17\beta$  – estradiolu (E2). Na základě experimentálních dat se tak nabízí otázka, proč byla mléčná fermentace vysoce účinná při degradaci E1, zatímco u jeho metabolického prekurzoru E2 nebyl pozorován žádný významný pokles koncentrace. Jednou z možných příčin rychlého úbytku estronu může být i jeho vyšší náchylnost k degradaci při nižším pH (Feng et al., 2005) nebo možná přirozená chemická nestabilita v kyselém prostředí. Nabízí se zde otázka, zda v systému skutečně došlo k úplné degradaci, nebo pouze k transformaci látky na jinou sloučeninu, kterou již metoda LC-MS nedokázala detekovat. Vhodným doplňkovým postupem by proto bylo měření estrogenní aktivity, které by umožnilo ověřit, zda v systému přetrvávají hormonálně aktivní rezidua.

Biodegradace steroidních hormonů, jako jsou E1, E2 a ethinylestradiol (EE2), je předmětem výzkumu řady studií. Některé z nich uvádějí, že rozklad E2 a EE2 probíhá efektivněji za aerobních podmínek, přičemž v anaerobních či anoxických podmínkách může docházet k jejich akumulaci v prostředí, což může negativně ovlivňovat bentické organismy (Czajka et al., 2006; D'Ascenzo et al., 2003). *In vivo* testy provedené na pstruzích duhových (*Oncorhynchus mykiss*) a ploticích obecných (*Rutilus rutilus*) prokázaly, že i nízké koncentrace hormonů E1 a E2 (v řádu desítek ng/l) mohou během 21denní expozice vyvolat měřitelné biologické efekty na jejich populaci, včetně feminizace jedinců (Routledge et al., 1998). Jak dále uvádějí Routledge et al. (1997), tyto látky se liší i svou estrogenní aktivitou, přičemž estron (E1) vykazuje přibližně poloviční estrogenní účinnost oproti  $17\beta$ -estradiolu (E2) v *in vitro* testech na kvasinkových modelech. Zjištění, že mléčná fermentace dokáže účinně odstranit estron (E1), je významný pro aplikace v anaerobních zónách ČOV či při úpravě kalů. V tomto kontextu může fermentace představovat přírodě blízké řešení pro snižování hormonální zátěže v odpadních vodách. Otázkou je, jak tento proces udržitelně převést do běžného provozu ČOV. Procesy mléčné fermentace je třeba navodit pomocí externě dodaných substrátů s obsahem zkvasitelných cukrů. Tento postup bude pravděpodobně lépe proveditelný v případě fermentace pevné fáze, tedy čistírenských kalů, které je možné míchat s odpady z potravinářských výroby, jako je mláto, otruby, melasa apod.

Zaznamenaný pokles koncentrace diklofenaku ve variantě s aktivní LAB kulturou je zajímavý zejména ve srovnání s kontrolní variantou K2, kde byl rovněž pozorován postupný úbytek farmaka v systému. Tato skutečnost může souviset s již dříve publikovanou náchylností látky k degradaci v anaerobních podmínkách (Yang et al., 2022; da Silva et al. 2020). Přestože tento proces může být i čistě abiotický, výraznější pokles koncentrací ve variantě s aktivní LAB kulturou naznačuje mikrobiální podíl na rozkladu diklofenaku. Je tedy pravděpodobné, že fermentační prostředí nejen umožňuje přímou mikrobiální transformaci diklofenaku, ale zároveň vytváří podmínky, které urychlují jeho přirozený abiotický rozklad.

Také u ibuprofenu byl ve fermentované variantě zaznamenán nejvyšší pokles koncentrace, což statisticky odlišovalo tuto variantu od kontrol a dokazuje vliv kultury LAB na jeho degradaci.

U zbylých testovaných farmaceutických látek (17 $\beta$ -estradiolu, ethinylestradiolu, paracetamolu, karbamazepinu, gabapentinu a tramadolu) nebyl v průběhu experimentu zaznamenán trvalý pokles koncentrací, který by svědčil o jejich biologické degradaci mikrobiální kulturou. U naproxenu, tramadolu a paracetamolu se nicméně po dvou dnech experimentu objevil krátkodobý pokles koncentrací v kapalném médiu. Tento jev může naznačovat dočasnou sorpci těchto látek na povrch Tibi krystalů a jejich následné uvolnění zpět do média v pozdější fázi fermentace, což by odpovídalo opětovnému nárůstu měřených koncentrací. Pouze u naproxenu byl zaznamenán náznak trendu snižování koncentrace během čtrnáctidenní fermentace, nicméně pro spolehlivé posouzení vlivu fermentačního procesu na jeho degradaci by bylo nutné experiment o několik dní prodloužit.

Po vyhodnocení celkové bilance bylo u většiny sledovaných látek pozorováno anomální chování ve vzorcích odebraných po dvoudenní kultivaci. Došlo zde k významnému poklesu koncentrace farmak, konkrétně u variant FF a FS. Tuto skutečnost pravděpodobně nelze vysvětlit sorpcí látek na celulózu, protože došlo k poklesu obsahu farmak v celém systému, tedy v kapalném médiu i v pevné fázi SCOPY kultury. Pravděpodobnou příčinou této anomálie bylo nevhodné zacházení s filtračním koláčem mikrobiální celulózy. Vlivem technického problému (nedostatečného množství funkčních vakuových filtračních aparatur) nebylo možné tento den stihnout přefiltrovat a následně extrahovat všechny vzorky. Filtrát z kapalného média byl odebrán ve stejný den ukončení dvoudenní varianty, k samotné extrakci filtračního koláče, tedy pevné matrice SCOPY pomocí ultrazvuku došlo ale až následující den ráno, kdy byly odebrány zbylé vzorky. Přefiltrované matrice SCOPY byly přes noc ponechány v metanolu

v lednici, což mohlo výsledek měření negativně ovlivnit. V případě replikace experimentu v budoucnu by bylo vhodné provádět filtraci i extrakci vždy ve stejný den.

Z výsledků experimentu lze dále potvrdit i hypotézu H2, která tvrdí, že LAB obsažené v krystalech Tibi mají schopnost biodegradovat vybraná antibiotika, což vede ke statisticky signifikantnímu snížení jejich koncentrace po ukončení fermentace. Z naměřených hodnot vyplynulo, že všechna sledovaná antibiotika (azithromycin, klarithromycin i erythromycin) během pokusu degradovaly ve variantě FF. To může být způsobeno jak samotnou mikrobiologickou aktivitou, tak změnou stability antibiotika vyvolanou sníženou hodnotou pH v médiu (Kim et al., 2004). Vzhledem k tomu, že ve variantách AS nikdy nedošlo k úplné degradaci sledovaných látek, lze předpokládat, že přítomnost pevné matrice sterilní celulózy mohla ovlivnit jejich distribuci v systému. Jak uvádí Mousavi et al. (2019), celulóza tvořená SCOBY kulturou může fungovat jako sorbent těžkých kovů z vody. Je tedy možné, že obdobný mechanismus sorpce mohl hrát roli i v případě antibiotik. Tato hypotéza je podpořena skutečností, že ve variantách AS docházelo k poklesu koncentrací v kapalném médiu, avšak nikoliv k výrazné změně celkového procentuálního množství látky v celém systému. Jak již bylo zmíněno v této práci, bakteriální celulóza se oproti té rostlinné vyznačuje vyšší čistotou a absencí ligninu a hemicelulóz (Naomi et al., 2020). Studie Wang et al. (2024) dále uvádí, že tento typ celulózy se běžně využívá jako materiál v oblasti podávání léčiv. Celulóza bývá za tímto účelem dále upravována tak, aby cíleně prodlužovala uvolňování účinné látky do organismu pacienta a zároveň co nejméně narušovala mikrobiom trávicího traktu. Ve studii Villalva et al. (2024) se vědci zabývali způsobem podávání léčiv, při němž by docházelo ke zpomalenému uvolňování účinné látky po požití. Jako model využili prototyp bakteriální celulózy obohacené o cubosomy (nanostruktury na bázi lipidů s řízeným uvolňováním léčiva). Při pokusu s diklofenakem uvolňovala modifikovaná celulóza účinnou látku po delší dobu než celulóza neupravená. V obou modelových případech však docházelo k zadržení farmaceutické látky v celulóze (Villalva et al., 2024). To podporuje hypotézu, že k navázání antibiotik na povrch celulózy mohlo skutečně docházet a že by tento mechanismus mohl vysvětlovat i pozorované změny ve variantě AS. Dalším vysvětlením pro pozorovaný jev může být fakt, že ve variantách se sterilní kulturou SCOBY bylo pozorováno nejstabilnější pH.

Na tomto místě je dále nutné dodat, že k degradaci antibiotik během experimentu nedocházelo pouze ve fermentovaných variantách FF, ale také ve sterilních kontrolních variantách K2, což naznačuje jejich chemickou nestabilitu ve vodném prostředí a schopnost spontánního rozkladu i bez přítomnosti mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že experiment probíhal bez přístupu

světla a při zvýšené teplotě (28 °C), lze vyloučit podíl fotodegradačních procesů na pozorované degradaci. Přestože byla varianta K2a (MBÚ) vytvořena za sterilních podmínek s použitím sterilního materiálu, došlo u ní po 14 dnech k výraznému poklesu pH, který nelze jednoduše vysvětlit kontaminací cizími mikroorganismy. Ve vzorcích nebyly pozorovány žádné vizuální změny (např. zákal, změna barvy či tvorba sedimentu), které by přítomnost mikroorganismů indikovaly. Z tohoto důvodu byla varianta K2 zopakována v aseptickém prostředí mikrobiologické laboratoře v Dřetovicích (K2b). Naměřené hodnoty pH se u obou variant významně lišily. Zatímco u K2a činilo  $\text{pH } 5,73 \pm 0,22$ , u K2b pokleslo až na  $2,54 \pm 0,11$ . Tento rozdíl nelze v tuto chvíli jednoznačně vysvětlit, nicméně v obou případech se jednalo o výrazně kyselé prostředí kultivačního média. Studie Kim et al. (2004) sledovala degradaci erythromycinu ve vodných roztocích s rozdílným pH (kyselé a zásadité pufr) a přišla se zjištěním, že erytromycin A se v kyselých podmínkách (ve studii pH v rozmezí 3,5 až 5,5) mění na jiné meziprodukty vlivem spontánní dehydratace. Tento princip tak může částečně objasnit pozorovanou degradaci erythromycinu ve variantě K2, neboť nízké pH vytváří vhodné podmínky pro spontánní chemické přeměny účinné látky. Zdá se tedy, že k rozkladu antibiotik dochází i bez přítomnosti aktivních mikroorganismů, a to čistě vlivem kyselého prostředí, což bylo pozorováno nejen u erythromycinu, ale také u azithromycinu a klarithromycinu. Zajímavou shodu mezi výsledky této práce a závěry studie Nakagawa et al. (1992) představuje zjištění, že kyselé pH v kombinaci s vyšší teplotou významně urychluje degradaci erythromycinu. Ve srovnání s klarithromycinem je jeho rozpad za těchto podmínek výrazně rychlejší a látka vykazuje nižší chemickou stabilitu (Nakagawa et al., 1992), což plně potvrzují i experimentální data získaná v rámci tohoto výzkumu. Nicméně výsledky této diplomové práce ukázaly, že fermentace pomocí kultury SCOPY (varianta FF) vedla k výrazně rychlejší a statisticky významnější degradaci antibiotik než u variant K2. LAB tak prokázaly vyšší účinnost při degradaci antibiotik než jejich samovolný rozpad.

Poslední hypotéza H3 předpokládá, že varianta AF po fermentaci nevykazuje antibakteriální účinek vůči sporové suspenzi *Bacillus subtilis*, což indikuje rozklad nebo inaktivaci přítomných antibiotik. I tuto hypotézu lze potvrdit na základě provedeného testu RIL, neboť všechny testované vzorky vykázaly v testu negativní výsledek. Nepřítomnost inhibiční zóny u vzorků, zejména pak u vstupních a dvoudenních variant, kde byla koncentrace antibiotik pomocí LC-MS detekována, může podpořit výše diskutovanou teorii o postupném samovolném rozpadu antibiotických látek v čase. Ačkoliv byly vzorky uchovávány v mrazícím boxu při teplotě  $-18\text{ °C}$  stupňů, metoda RIL byla provedena až několik týdnů po ukončení

experimentu na MBÚ. Je však třeba dodat, že koncentrace antibiotik byly již na počátku experimentu velmi nízké, a metoda RIL tak mohla být nedostatečně citlivá k detekci reziduí v takto nízkých hladinách. Na druhou stranu se jednalo o environmentálně relevantní koncentrace, které v případě studie Pilnáček et al. (2019) vedly k vytvoření zón o velikosti nižších jednotek milimetrů. V této studii se však jednalo o čistírenský kal ze středně velké ČOV. V budoucím výzkumu, zejména v případě reálných vzorků by bylo vhodné doplnit hodnocení i o detekci genů antibiotické rezistence v systému po ukončení experimentu, která by mohla naznačit přetrvávající selekční tlak nebo adaptaci mikrobiální komunity na přítomnost antibiotických reziduí.

## 7 Závěr

Výsledky této diplomové práce potvrdily, že mléčná fermentace za použití aktivní kultury SCOBY může přispět k degradaci vybraných farmaceutických látek a antibiotik. Statisticky významný pokles koncentrací estronu (E1), diklofenaku a ibuprofenu ve fermentované variantě (FF) naznačuje účast mikroorganismů na jejich rozkladu. V případě diklofenaku byl zaznamenán dílčí pokles i v kontrolní sterilní variantě (K2), což naznačuje, že kromě mikrobiální degradace mohla hrát roli i degradace abiotická spojená s nízkým pH. Z antibiotik vykazovaly významnou degradaci azithromycin, klarithromycin a erythromycin, přičemž fermentace (varianta AF) byla účinnější než samovolný rozpad za sterilních podmínek (K2). Nepřítomnost antibakteriální aktivity vzorků vůči *Bacillus subtilis* podpořila závěr o přirozené inaktivaci antibiotik v čase. Negativní výsledek testu RIL však mohl být ovlivněn i nízkými koncentracemi antibiotik ve vzorcích nebo limity detekce této metody, které nebyly schopny zachytit jejich nízkou reziduální aktivitu.

Naopak u látek 17 $\beta$ -estradiolu (E2), ethinylestradiolu (EE2), paracetamolu, karbamazepinu, gabapentinu, a tramadolu nebyla ve fermentované variantě FF pozorována signifikantní změna koncentrace. U naproxenu byl zaznamenán náznak degradačního trendu, který by bylo vhodné ověřit v delším časovém úseku experimentu. U dvoudenních variant všech sledovaných farmaceutických látek byl zaznamenán nesystematický pokles jejich koncentrací, který pravděpodobně souvisel s časovou prodlevou mezi filtrací a následnou extrakcí. Tento poznatek ukázal, že při budoucí replikaci experimentu je nezbytné provádět filtraci a extrakci farmaceutických látek ve stejný den, aby bylo zajištěno konzistentní a validní měření. Významným přínosem práce bylo také zjištění, že nízké pH prostředí může samo o sobě ovlivnit stabilitu antibiotik a některých farmak (estronu (E1)), a to i v kontrolních vzorcích bez přítomnosti aktivní mikrobiální kultury. Dále se ukázalo, že celulóza produkovaná SCOBY by mohla představovat vhodný sorbent pro farmaceutická rezidua.

Výsledky této práce otvírají prostor pro zvážení využití mléčné fermentace jako jednoduché, nízkonákladové a environmentálně šetrné před úpravné technologie, která může být v budoucnu využitelná při snižování obsahu vybraných farmaceutických látek a antibiotik v čistírenských kalech, anaerobních zónách ČOV nebo třeba i v domácích podmínkách.

## 8 Zdroje

### Literární zdroje:

Abdelshafy A. M., Mahmoud A. R., Abdelrahman T. M., Mustafa M. A., Atta O. M., Abdelmeguid M. H., Al-Asmari F., 2024: Biodegradation of chemical contamination by lactic acid bacteria: A biological tool for food safety. *Food Chemistry* 460(2), Article: 140732.

Aikpokpodion P., Ipinmoroti R., Omotoso S., 2010: Biosorption of Nickel (II) from Aqueous Solution Using Waste Tea (*Camellia sinensis*) Materials. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 2(2), Pages: 72–82.

Akhtar Abbasi N., Shahid S. U., Majid M., Tahir A., 2022: Ecotoxicological risk assessment of environmental micropollutants. In: Hashmi M. Z., Wang S., Ahmed Z., eds., *Advances in Pollution Research. Environmental Micropollutants*. Elsevier, Pages 331–337.

Amarasekara A.S., Wang D., Grady T.L., 2020: A comparison of kombucha SCOBY bacterial cellulose purification methods. *SN Applied Sciences* 2(1), Article: 240.

Aus der Beek T., Weber F.A., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A., 2016: Pharmaceuticals in the environment—global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(4), Pages: 823–835.

Azizan N. A. Z., Yuzir A., Abdullah N., 2021: Pharmaceutical compounds in anaerobic digestion: A review on the removals and effect to the process performance. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9(5), Article: 105926.

Bártíková H., Podlipná R., Skálová L., 2016: Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144, Pages: 2290–301.

Bertsch P., Etter D., Fischer, P., 2021: Transient in situ measurement of kombucha biofilm growth and mechanical properties. *Food & Function* 12(9), Pages: 4015–4020.

Bhattacharyya A., Heo J., Priyajanani J., Kim S. H., Khatun M. R., Nagarajan R., Noh I., 2024: Simultaneous processing of both handheld biomixing and biowriting of kombucha cultured pre-crosslinked nanocellulose bioink for regeneration of irregular and multi-layered tissue defects. *International Journal of Biological Macromolecules* 282(3), Article: 136966.

Boxall A.B.A., Collins R., Wilkinson J.L., Swan C., Bouzas-Monroy A., Jones J., Winter E., Leach J., Juta U., Deacon A., Townsend I., Kerr P., Paget R., Rogers M., Greaves D., Turner D., Pearson C., 2024: Pharmaceutical pollution of the English National Parks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 43(11), 2422–2435.

Bryszewska Malgorzata Anita, Tabandeh Erfan, Jędrasik Jakub, Czarnecka Maja, Dzierżanowska Julia, Ludwicka Karolina, 2023: SCOBY Cellulose Modified with Apple Powder—Biomaterial with Functional Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* 24(2), Article: 1005.

Cubas A.L.V., Provin A.P., Dutra A.R.A., Mouro C., Gouveia I.C., 2023: Advances in the Production of Biomaterials through Kombucha Using Food Waste: Concepts, Challenges, and Potential. *Polymers* (15), Article: 1701.

Cuthbert R., Parry-Jones J., Green R. E., Pain D. J., 2007: NSAIDs and scavenging birds: potential impacts beyond Asia's critically endangered vultures. *Biol Lett.* 3(1), Pages: 90–93.

Czajka C. P., Londry K. L., 2006: Anaerobic biotransformation of estrogens. *Science of the Total Environment* 367(2–3), Pages: 932–941.

D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R., 2003: Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of The Total Environment* 302(1–3), Pages: 199–209.

Da Silva T.H.G., de S. Furtado R.X., Zaiat M., Azevedo E.B., 2020: Tandem anaerobic-aerobic degradation of ranitidine, diclofenac, and simvastatin in domestic sewage. *Science of The Total Environment* 721, Article:137589.

De Filippis, F., Pasolli, E., Ercolini, D., 2020: The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS Microbiol Rev* 44(4), Pages: 454– 489.

De Gisi S., Petta L., Wendland, C., 2014: History and Technology of Terra Preta Sanitation. *Sustainability* 6(3), Pages: 1328–1345.

Esposito S., Tenconi R., Preti V., Groppali E., Principi N., 2016: Chemotherapy against cancer during pregnancy: A systematic review on neonatal outcomes. *Medicine* 95(38), Article: 4899.

Feng X., Ding S., Tu J., Wu F., Deng N., 2005: Degradation of estrone in aqueous solution by photo-Fenton system. *Science of The Total Environment* 345(1–3), Pages: 229–237.

Feng X., Ge Z., Wang Y., Xia X., Zhao B., Dong M., 2024: Production and characterization of bacterial cellulose from kombucha-fermented soy whey. *Food Production, Processing and Nutrition* 6, Article: 20.

Gajbhiye M. H., Kapadnis B. P., 2016: Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Science and Technology* 26(11), Pages: 1451–1470.

Grasserová A., Hanč A., Innemanová P., Cajthaml T., 2020: Composting and vermicomposting used to break down and remove pollutants from organic waste: A mini review. *European Journal of Environmental Sciences* 10, Pages: 9–14.

Gill H. S., Grover S., Batish V. K., Gill P., Jain S., Yadav H., 2009: Immunological Effects of Probiotics and their Significance to Human Health: a review. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* [online]. New York, NY: Springer New York 334(1), Pages 901–948.

Guo Y., Zhang X., Hao W., Xie Y., Chen L., Li Z., Zhu B., Feng X., 2018: Nano-bacterial cellulose/soy protein isolate complex gel as fat substitutes in ice cream model. *Carbohydrate Polymers* 198, Pages: 620–630.

Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. 2011: The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 151, Issue 3, Pages: 284– 288.

Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui R., 2016: Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* 220, Pages 63–72.

Chen C., Liu B.Y., 2000: Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J Appl Microbiol* 89, Pages: 834–9.

Chong A. Q., Chin N. L., Talib R. A., Basha R. K., 2024: Application of SCOBY bacterial cellulose as hydrocolloids on physicochemical, textural and sensory characteristics of mango jam. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 105(1), Pages: 285–293.

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar M., 2014: A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity,

and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety\**, Institute of Food Technologists 13, Pages 538–550.

Kamiński K., Jarosz M., Grudzień J., Pawlik J., Zastawnik F., Pandyra P., Kołodziejczyk A. M., 2020: Hydrogel bacterial cellulose: a path to improved materials for new eco-friendly textiles, *Cellulose* 27, Pages: 5353–5365.

Kim M.K., Zoh K.D., 2016: Occurrence and removals of micropollutants in water environment. *Environmental Engineering Research*. 21, Pages: 319–332.

Kim Y.-H., Heinze T.M., Beger R., Pothuluri J.V., Cerniglia C.E., 2004: A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics* 271(1–2), Pages: 63–76.

Koch N., Islam N. F., Sonowal S., Prasad R., Sarma H., 2021: Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. *Current Research in Microbial Sciences* 2, Article: 100027.

Kolofik T., 2020: Odstraňování mikropolutantů z vody pomocí pokročilých oxidačních procesů. Diplomová práce. Masarykova Univerzita. Brno. 76 s.

Kruk M., Trzaskowska M., Ścibisz I., Pokorski P., 2021: Application of the “SCOBY” and kombucha tea for the production of fermented milk drinks. *Microorganisms* 9(1), Article: 123.

Kweon J., Lee H., Kim S., Song G., 2025: Environmental antibiotic emissions and their residual impact on livestock farming. *Molecular & Cellular Toxicology* 21(2), Pages: 351–362.

Lahmamsi H., Ananou S., Lahlali R., Tahiri A., 2024: Lactic acid bacteria as an eco-friendly approach in plant production: current state and prospects. *Folia Microbiologica* 69, Pages: 465–489.

Lamont J.R., Wilkins O., Bywater-Ekegärd M., Smith D.L., 2017: From yogurt to yield: potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry* 111, Pages: 1–9.

Liu C.H., Chuang Y.L., Gurunathan R., Hsieh C.Y., Dahms H.U., 2023: Riverine antibacterial resistance gradient determined by environmental factors. *Environmental Science and Pollution Research* 30(18), Pages: 48169–48181.

Loos R., Daouk S., Marinov D., Gómez L., Porcel-Rodríguez E., Sanseverino I., Amalric L., Potalivo M., Calabretta E., Ferenčík M., Colzani L., Della Vedova L., Amendola L., Saurini M., Di Girolamo F., Lardy-Fontan S., Sengl M., Kunkel U., Svahn O., Weiss S., De Martin S., Gelao V., Bazzichetto M., Tarábek P., Stipaničev D., Repec S., Zacs D., Ricci M., Golovko O., Flores C., Ramani S., Rebane R., Alánde Rodríguez J., Lettieri T., 2024: Summary recommendations on “Analytical methods for substances in the Watch List under the Water Framework Directive”. *Science of the Total Environment* 912, Article: 168707.

Ma X., 2024: Heavy metals remediation through lactic acid bacteria: Current status and future prospects. *Science of The Total Environment* 946, Article: 174455.

Machala K., 2008: *Kvašená zelenina pro zdraví a vitalitu*. Nakladatelství ANAG, Olomouc. 155 s.

Martín J., Camacho-Muñoz M., Santos J., Aparicio I., Alonso E., 2012: Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials* 239–240, Pages: 40–47.

Mazotto A. M., de Ramos Silva J., de Brito L. A. A., Rocha N. U., Soares A. S., 2021: How can microbiology help to improve sustainability in the fashion industry, *Environmental Technology & Innovation* (23), Article: 101760.

McAuliffe O., 2018: Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese. *Journal of Dairy Science* 101, Pages: 3597–3610.

Milivojević M., Antanasković A., Pavićević K., Popović A., Bugarčić M., Trivunac K., Adamović V., Živković V., Lopičić Z., 2024: Application of biochar derived from sourcherry pit and kombucha scoby for the removal of lead(II) ions from wastewater. *Engineering & Processing Management* 16 (1), Pages: 9-14.

Mompelat S., Le Bot B., Thomas O., 2009: Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International* 35(5), Pages: 803–814.

Mousavi S.M., Hashemi S.A., Babapoor A., Savardashtaki A., Esmaili H., Rahnema Y., Mojoudi F., Bahrani S., Jahandideh S., Asadi M., 2019: Separation of Ni (II) from industrial

wastewater by kombucha SCOBY as a colony consisted from bacteria and yeast: kinetic and equilibrium studies. *Acta Chimica Slovenica* 66, Pages: 865–873.

Nakagawa Y., Itai S., Yoshida T., Nagai T., 1992: Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 40(3), Pages: 725–728.

Naomi R., Idrus R. B. H., Fauzi M. B., 2020: Plant- vs. Bacterial-Derived Cellulose for Wound Healing: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), Article: 6803.

Novi Primiani C., Pujiati P., Mumtahanah M., Ardhi W., 2018: Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. *Journal of Physics: Conference Series* 1025, Article: 012073.

Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., Watson R.T., Meteyer C.U., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Iqbal Chaudhry M.J., Arshad M., Mahmood S., Ali A., Khan A.A., 2004: Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, Pages: 630–633.

Olle M., 2021: Review: Bokashi technology as a promising technology for crop production in Europe. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 96(2), Pages:145–152.

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U. Jr., Mohan, D., 2019: Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: Chemistry, occurrence, effects, and removal methods. *Environmental Research*, 176, Article: 108542.

Pilnáček V., Innemanová P., Šereš M., Michalíková K., Stránská Š., Wimmerová L., Cajthaml T., 2019: Micropollutant biodegradation and the hygienization potential of biodrying as a pretreatment method prior to the application of sewage sludge in agriculture. *Ecological Engineering* 127, Pages: 212–219.

Routledge E. J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G. C., Waldock M., Sumpter J. P., 1998: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science and Technology* 32(11), Pages: 1559–1565.

Routledge E. J., Sumpter J. P., 1997: Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated with Estrogenic Activity. *Journal of Biological Chemistry* 272(6), Pages: 3280–3288.

Sanchez W., Sremski W., Piccini B., Palluel O., Maillot-Maréchal E., Betoulle S., Jaffal A., Aït-Aïssa S., Brion F., Thybaud E., Hinfray N., Porcher J.-M., 2011: Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37(8), Pages: 1342–1348.

Seruga P., Krzywonos M., 2015: Screening of Medium Components and Process Parameters for Sugar Beet Molasses Vinasse Decolorization by *Lactobacillus plantarum* Using Plackett-Burman Experimental Design. *Polish Journal of Environmental Studies* 24(2), Pages: 683–688.

Sharma R., Sharma C.L., Kapoor B., 2005: Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian Journal of Medical Sciences* 59(3), Pages: 120–129.

Schindler J., 2008: *Ze života bakterií*. Academia, Praha, 144 s.

Sreeramulu G., Zhu Y., Knol W., 2000: Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6), Pages: 2589–2594.

Stejskalová L., Fiala D., Kólová A., Váňa M., Kučera J., Smetanová L., Rosendorf P., 2021: Farmaka a vybrané mikropolutanty v surových a čištěných odpadních vodách v povodí VN Švihov. *Vodní hospodářství* 71(12), Pages: 6–15.

Suproniene S., Semaskiene R., Juodeikiene G., Mankeviciene A., Cizeikiene D., Vidmantiene D., Sakalauskas S., 2014: Seed treatment with lactic acid bacteria against seed-borne pathogens of spring wheat. *Biocontrol Science and Technology* 25(2), Pages: 144–154.

Tyler J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R., 2008: Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), Pages: 1733–1740.

Villalva D.G., Otoni C.G., Loh W., 2024: Cubosome-carrying bacterial cellulose membrane as a versatile drug delivery platform. *Materials Today Bio* 25, Article: 101000.

Wang Y., Qi J., Zhang M., Xu T., Zheng C., Yuan Z., Si C., 2024: Cellulose-based aerogels, films, and fibers for advanced biomedical applications. *Chemical Engineering Journal* 497, Article: 154434.

Wang Z., Liu H., Liu Z., Wang Y., Yang J., Bai L., Wang J., Zhang H., Li G., Liang H., 2025: Nanofiltration membranes with fast water transport induced by controlled interfacial diffusion to enhance desalination and micropollutant removal. *Water Research* 273, Article: 123070.

Wysowska E., Wiewiórska I., Kicińska A., 2024: The Problem of Health Risk Resulting from the Presence of Pharmaceuticals in Water Used for Drinking Purposes: A Review. *Journal of Ecological Engineering*, 25(5), Pages: 244–256.

Yakaew P., Phetchara T., Kampeerapappun P., Srikulkit K., 2022: Chitosan-coated bacterial cellulose (BC)/hydrolyzed collagen films and their ascorbic acid loading/releasing performance: a utilization of BC waste from kombucha tea fermentation. *Polymers* 14(21), Article: 4544.

Yang J., Duan A., Wang J., Yang X., Liu X., Xiao F., Qin F., Yu Y., Wang D., 2022: The fate of diclofenac in anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Journal of Environmental Management* 322, Article: 116098.

#### **Internetové zdroje:**

BioSpace, 2025: Pharmaceutical Market Size to Surpass USD 2.82 Trillion by 2033 (online) [cit. 2025.01.10], dostupné z <https://www.biospace.com/press-releases/pharmaceutical-market-size-to-surpass-usd-2-82-trillion-by-2033>

Brennan, S., 2014: EU to update surface water pollutants watch list in 2024 (online) [cit. 2025.01.10], dostupné z <https://www.useforesight.io/news/eu-to-update-surface-water-pollutants-watch-list-in-2024>

EMRO, 2025: The Importance of Phototrophic Bacteria in EM (online) [cit. 2025.02.27], dostupné z <https://www.emrojapan.com/living/57>

GlobalNewswire, 2020: Global Beauty and Personal Care Product Market is Expected to Reach USD 756.63 Billion by 2026: Fior Markets (online) [cit. 2025.02.24], dostupné z <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/01/24/1974743/0/en/Global-Beauty-and-Personal-Care-Product-Market-is-Expected-to-Rreach-USD-756-63-Billion-by-2026-Fior-Markets.html>

IQVIA Solutions a.s., 2024: Sektorová analýza farmaceutického průmyslu v České republice, zpracováno pro Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR (online) [cit. 2025.02.27], dostupné

z <https://mpo.gov.cz/cz/rozcestnik/analyticke-materialy-a-statistiky/analyticke-materialy/sektorova-analyza-farmaceutickeho-prumyslu-v-ceske-republice--279849/>

Masarykova univerzita, 2017: Nové typy polutantů (online) [cit. 2025.01.07], dostupné z [https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/Bi7520/um/13\\_EVE\\_-\\_nove\\_typy\\_polutantu\\_2017.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/Bi7520/um/13_EVE_-_nove_typy_polutantu_2017.pdf).

Mordor Intelligence, 2025: Beauty and Personal Care Products Market Report – Industry Analysis, Size & Growth Insights (2025–2030) (online) [cit. 2025.01.07], dostupné z <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-beauty-and-personal-care-products-market-industry>

MŽP, 2025: Stockholmská úmluva o perzistentních organických polutantech (online) [cit. 2025.01.10], dostupné z [https://www.mzp.cz/cz/stockholmska\\_umluva\\_polutanty](https://www.mzp.cz/cz/stockholmska_umluva_polutanty)

NZIP, 2025: Botulotoxin (online) [cit. 2025.01.10], dostupné z <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/1132>

RMIT University Vietnam, 2025: Fermented clothing: How kombucha biofilm can be turned into green textiles. (online) [cit. 19. 5. 2025] Dostupné z: <https://www.rmit.edu.vn/news/all-news/2025/feb/fermented-clothing-how-kombucha-biofilm-can-be-turned-into-green-textiles>

SolanaCenter, 2025: Bokashi method (online) [cit. 2025.02.27], dostupné z <https://solanacenter.org/bokashi-method/>

Storová, B., 2017: Vývoj a výroba léčiv – hodnotový řetězec a klasifikace. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Dostupné z: [https://www.uzis.cz/res/file/akce/20171107-klasifikon/2017-11-07-10\\_storova.pdf](https://www.uzis.cz/res/file/akce/20171107-klasifikon/2017-11-07-10_storova.pdf)

Transfera, 2025: Bioinkoust a biotisk pro hojení ran (online) [cit. 19. 5. 2025], dostupné z: <https://portfolio.transfera.cz/cs/prehled-technologie/detail/229/>

UNEP, 2023: What is fuelling the world's antimicrobial resistance crisis? (online) [cit. 10.6.2025], dostupné z: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/what-fuelling-worlds-antimicrobial-resistance-crisis>

VOVČR, 2025: Katabolické procesy (online) [cit. 2025.01.10], dostupné z <https://www.vovcr.cz/odz/tech/311/page18.html>

WHO, 2023: Antimicrobial resistance (online) [cit. 2025.01.28], dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

### **Obrázky:**

Obrázek č. 1: Farmaceutický hodnotový řetězec (upraveno dle IQVIA Solutions a.s., 2024).

Obrázek č. 2: Fermentace černého čaje pomocí kombuchy.

Obrázek č. 3: Struktura vodního keфіru.

Obrázek č. 4: Hodnoty pH ve fermentovaných a kontrolních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, AF – fermentace Tibi + antibiotika, FS – inaktivované Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + antibiotika, K1 – Tibi + médium, K2a/K2b – médium + farmaka + antibiotika) během 0, 2, 7 a 14 dní. Varianta K2a byla provedena současně s hlavním experimentem, varianta K2b byla zopakována po ukončení pokusu za přísně aseptických podmínek. Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 5: Vývoj koncentrace 17 $\beta$ -estradiolu (E2) v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 6: Vývoj koncentrace estronu (E1) v čase v kapalném médiu ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 7: Vývoj koncentrace ethinylestradiolu (EE2) v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 8: Vývoj koncentrace paracetamolu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 9: Vývoj koncentrace diklofenaku v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 10: Vývoj koncentrace karbamazepinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 11: Vývoj koncentrace gabapentinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 12: Vývoj koncentrace ibuprofenu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 13: Vývoj koncentrace naproxenu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 14: Vývoj koncentrace tramadolu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 15: Vývoj koncentrace azithromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 16: Vývoj koncentrace klarithromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 17: Vývoj koncentrace erythromycinu v kapalném médiu v čase ve třech experimentálních variantách (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Skupiny označené malými písmeny označují statistické rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Obrázek č. 18: Porovnání velikosti inhibičních zón vzniklých působením sterilního fyziologického roztoku (negativní kontrola, vlevo), sterilního roztoku antibiotik (pozitivní kontrola, uprostřed) a sedmidenní varianty AS (inaktivované Tibi + antibiotika, vpravo) na růst *Bacillus subtilis*.

### **Tabulky:**

Tabulka č. 1: Vývoj monitoringu farmaceutických látek v evropské legislativě a návrhy na zařazení léčiv do prioritního seznamu na základě evropských Watch listů.

Tabulka č. 2: Koncentrace PPCPs sledované podle *Nářízení vlády č. 401/2015 Sb.*

Tabulka č. 3: PPCPs uvedené ve *Vyhlášce č. 371/2023 Sb.*

Tabulka č. 4: Složení kultivačního média BSM.

Tabulka č. 5: Složení a označení experimentálních médií.

Tabulka č. 6: Experimentálně testované látky s navrženou počáteční koncentrací.

Tabulka č. 7: Procentuální zůstatek 17beta-estradiolu (EE2) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 8: Procentuální zůstatek estronu (E1) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 9: Procentuální zůstatek ethinylestradiolu (E2) v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 10: Procentuální zůstatek paracetamolu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 11: Procentuální zůstatek diklofenaku v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 12: Procentuální zůstatek karbamazepinu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 13: Procentuální zůstatek gabapentinu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 14: Procentuální zůstatek ibuprofenu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 15: Procentuální zůstatek naproxenu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 16: Procentuální zůstatek tramadolu v systému (FF – fermentace Tibi + farmaka, FS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 17: Procentuální zůstatek azithromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 18: Procentuální zůstatek klarithromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

Tabulka č. 19: Procentuální zůstatek erythromycinu v systému (AF – fermentace Tibi + farmaka, AS – inaktivované Tibi + farmaka, K2 – médium + farmaka + antibiotika). Velká písmena označují statisticky významné rozdíly mezi variantami v rámci jednoho dne, malá písmena označují rozdíly mezi jednotlivými dny v rámci jedné varianty (ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0,05$ ).

### **Legislativa:**

*Směrnici evropského parlamentu a Rady 2013/39/EU ze dne 12. srpna 2013, kterou se mění směrnice 2000/60/ES a 2008/105/ES, pokud jde o prioritní látky v oblasti vodní politiky Text s významem pro EHP.*

*Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky.*

*Návrh SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY, kterou se mění směrnice 2000/60/ES, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky, směrnice 2006/118/ES o ochraně podzemních vod před znečištěním a zhoršováním stavu a směrnice 2008/105/EC o normách environmentální kvality v oblasti vodní politiky.*

*Narizení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.*

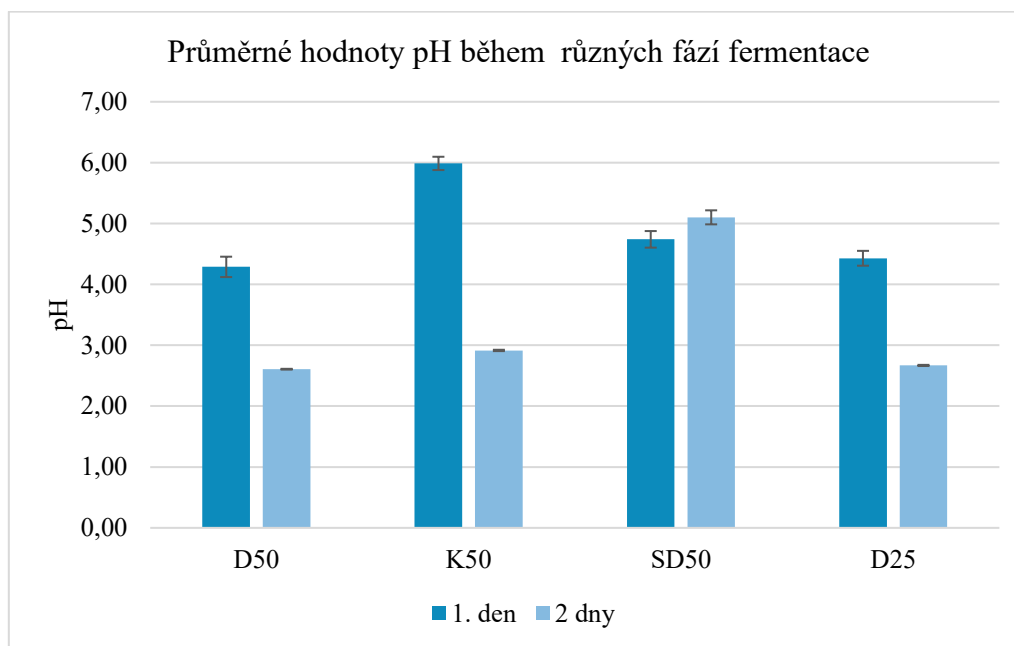
*Vyhláška č. 371/2023, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů.*

## 9 Přílohy

### Příloha č. 1

#### **Pokles koncentrace pH v úvodním experimentu pro výběr kultivačního média**

Jak je vidět na obrázku č. I, hodnota pH klesla po 48 hodinách nejvíce v případě média D50, D25 a K50. Ve všech těchto médiích se pH pohybovalo pod hodnotou 3. Médium K50 nebylo vybráno k dalším experimentům, neboť jeho složení (kohoutková voda obce Dřetovice) nelze jednoduše replikovat v běžných laboratorních podmínkách. Pouze médium SD50 se soli nekleslo pod hranici hodnoty pH 3, což naznačovalo, že fermentace zde sice probíhá, ale není tak účinná v porovnání se zbylými médii. Jako vhodné se proto na základě měření jeví médium D50 a D25.



*Obrázek č. I: Průměrné hodnoty pH během různých fází fermentace (D50 – 5% glukóza v DEMI BSM médiu; K50 – 5% glukóza v BSM médiu z kohoutkové vody; SD50 – 5% glukóza v DEMI BSM médiu s 2% NaCl; D25 – 2,5% glukóza v DEMI BSM médiu).*

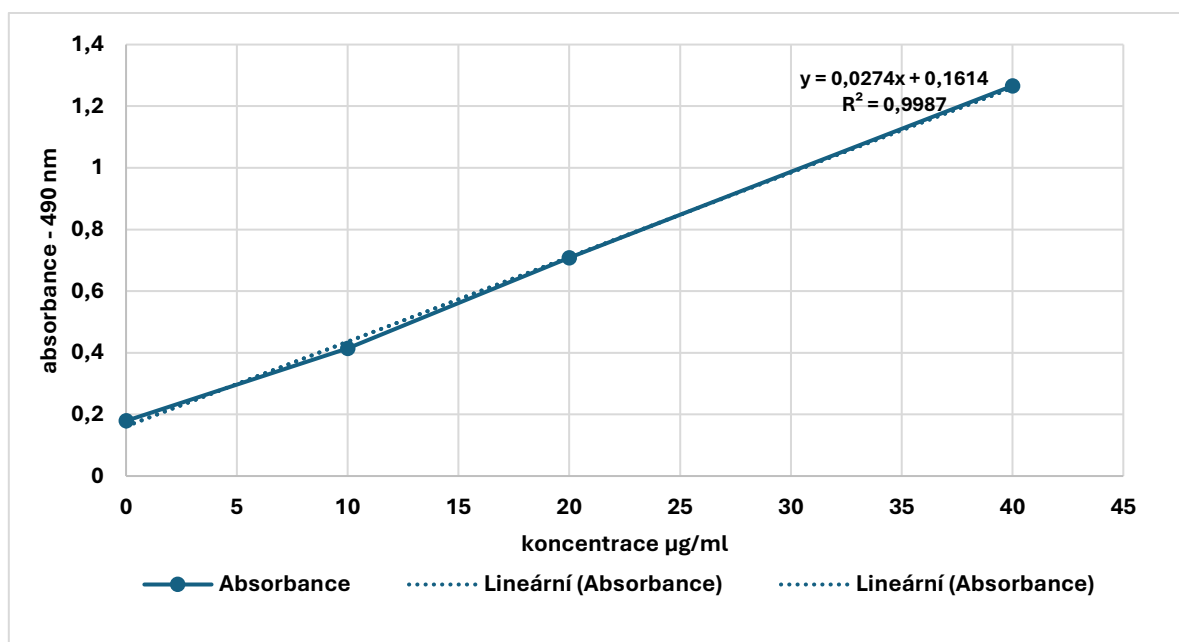
#### **Měření neutrálních sacharidů dle DUBOISE**

Pro další potvrzení funkčnosti fermentačního procesu byla využita metoda stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise (viz kapitola č. 4.3.2.). Nejprve byla připravena kalibrační řada vodných roztoků D-glukózy o koncentracích 0; 25; 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Roztoky byly připraveny pipetováním 0; 0,25; 0,50 a 1,00 ml základního roztoku D-glukózy a doplněním destilovanou vodou do celkového objemu 1 ml. Roztoky byly homogenizovány pomocí vortexu po dobu

10 s. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 5 ml koncentrované kyseliny sírové a následně 1 ml 5% roztoku fenolu. Po smíchání 30 minutách kultivace při laboratorní teplotě byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance vzorků při vlnové délce 490 nm a sestavena kalibrační křivka. Výslednou kalibrační křivku zobrazuje obrázek č. II.

Jak je vidět z tabulky č. I, celkové množství sacharidů kleslo nejméně u média SD50 (médium s přídavkem 2% NaCl), kde bylo mikroorganismy odbouráno 78 % sacharidů. Lze tedy předpokládat, že i vzhledem k menšímu poklesu hodnoty pH v předchozích měření i nižšímu snížení množství celkových sacharidů není toto médium nejvhodnější typ pro další pokusy. V prostředí média K50 se po procesu fermentace projevilo snížení množství sacharidů o celých 96 %. Hodnota pH byla po 48 h fermentace vyšší než v případě médií D50 a D25. Médium K50 nebylo zahrnuto do dalších analýz, neboť jeho replikovatelnost mezi laboratořemi je omezená v důsledku závislosti na lokálním zdroji kohoutkové vody.

Zbylá dvě testovaná média, D50 a D25, se ukázala jako vhodná. Po 48 hodinách fermentace kleslo pH v obou případech pod hodnotu 2,7. Celkový obsah cukru se snížil o 91 % u média D25 a o 90 % u média D50. Hodnota pH po fermentaci byla mírně nižší u média D50 (2,61) než u D25 (2,67). Vzhledem k tomu, že obě média poskytovala vhodné podmínky, bylo pro další analýzu zvoleno médium D50, jelikož se nejvíce podobá konvenčně využívanému médiu pro domácí fermentaci.



Obrázek č. II: Kalibrační křivka D-glukózy při absorbanci 490 nm.

Stejným způsobem byla změřena absorbance u vzorků D50, K50, D25 a SD50 po 48 hodinách fermentace při 28 °C. Naměřené hodnoty byly přepočteny na zbytkovou koncentraci glukózy v médiu a jsou spolu s procentuálním úbytkem glukózy shrnuty v tabulce č. I.

*Tabulka č. I: Výsledná hodnota pH a koncentrace celkových sacharidů v testovaných médiích po 7 dnech fermentace (D50 – 5% glukóza v DEMI BSM médiu; K50 – 5% glukóza v BSM médiu z kohoutkové vody; SD50 – 5% glukóza v DEMI BSM médiu s 2% NaCl; D25 – 2,5% glukóza v DEMI BSM médiu).*

	<b>D50</b>	<b>K50</b>	<b>SD50</b>	<b>D25</b>
koncentrace cukru (µg/ml)	4,8	1,9	11,0	2,2
% odbourání	90,3	96,1	77,9	91,4