



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

## MOŽNOSTI ELIMINACE SULFONAMIDŮ Z VODNÍHO EKOSYSTÉMU

POSSIBILITIES OF ELIMINATION OF SULFONAMIDES FROM THE AQUATIC ECOSYSTEM

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Petra Suková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1255/2017  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studentka: **Bc. Petra Suková**  
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Možnosti eliminace sulfonamidů z vodního ekosystému

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši zaměřenou na stanovení sulfonamidů ve vodním ekosystému.
2. Na základě zpracované literární rešerše a s využitím laboratorního vybavení ÚCHTOŽP vypracovat a optimalizovat metodu pro toto stanovení. Metodu následně aplikovat pro analýzu modelových a reálných vzorků.
3. Kromě tradičních postupů eliminace léčiv z vodního ekosystému aplikovat netradiční způsob pomocí hub.
4. Zhodnotit vliv matričního efektu na generované výsledky.
5. Výsledky interpretovat a porovnat s literárními odkazy.

### Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Petra Suková  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na stanovení sulfonamidových antibiotik, zejména na možnosti eliminace těchto léčiv z vodního ekosystému. Kontaminace životního prostředí léčivy a jejich rezidui představuje v současnosti velký problém. Významnými bodovými zdroji kontaminace jsou čistírny odpadních vod (ČOV), protože tyto látky nejsou současnými technologickými postupy z odpadních vod účinně odstraňovány. Z tohoto důvodu dochází k vývoji a testování nových technologických postupů, které by mohly účinně odstraňovat tyto kontaminanty ze životního prostředí (ŽP). Jednou z možností je využití enzymatického aparátu dřevokazných hub, především hub bílé hniloby. Ze skupiny sulfonamidových antibiotik bylo vybráno šest zástupců, pro jejichž izolaci z akvatické matrice byla použita extrakce tuhou fází; jako finální metoda pro identifikaci a kvantifikaci byla aplikována vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Bylo provedeno týdenní sledování koncentrační úrovně vybraných sulfonamidových antibiotik na přítoku a na odtoku ČOV Brno-Modřice. Kromě toho byla ověřena účinnost eliminace vybraných antibiotik z vodního ekosystému pomocí dřevokazných hub *Trametes versicolor* kultivovaných na vhodném nosiči.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis focuses on the determination of sulfonamide antibiotics especially the possibility of elimination of these substances from the aquatic ecosystem. Nowadays, environmental contamination of the pharmaceuticals and their residues is a serious concern. Main sources of this contamination are wastewater treatment plants (WWTPs), where these compounds are not effectively removed by contemporary conventional technology. For this reason, new methods are being developed and tested that could eliminate the number of contaminants entering the environment in this way. There is a possibility to use the potential of the enzymatic system of wood-decay fungi, especially white rot fungi. Six representatives of sulfonamide antibiotics were selected and isolated from the aquatic matrix via solid phase extraction. The final identification and quantification method was high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Monitoring of the concentration level of selected sulfonamide antibiotics at the inflow and effluent at the Brno-Modřice WWTP was carried out weekly. Moreover, the effectiveness of elimination of selected antibiotics from the aquatic ecosystem by the use of *Trametes versicolor* wood-decay fungi cultured on a suitable carrier was verified.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

sulfonamidová antibiotika, houba bílé hniloby, *Trametes versicolor*, odpadní voda, extrakce tuhou fází, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

## **KEYWORDS**

sulfonamide antibiotics, white rot fungi, *Trametes versicolor*, wastewater, solid phase extraction, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

SUKOVÁ, P. *Možnosti eliminace sulfonamidů z vodního ekosystému*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 100 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

*Ráda bych na tomto místě poděkovala paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za její vstřícnost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla jmenovitě poděkovat Ing. Tereze Švestkové a Ing. Pavlíně Landové při poskytnutí rad spojených s prováděním experimentů a také všem akademickým a vědeckým pracovníkům a studentům z ústavu ÚCHTOŽP za jejich podporu a ochotu při řešení této diplomové práce. Dále děkuji Ing. Adéle Žižlavské za možnost podílet se na zajímavém projektu.*

*V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celé své rodině (i tam nahoru) za pochopení, trpělivost a podporu, kterou mi v průběhu celého studia poskytovali.*

*Rovněž děkuji pracovníkům Brněnských vodáren a kanalizací, především Ing. Hrichovi, za umožnění odběru vzorků na jejich pracovišti.*

# Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Sulfonamidová antibiotika.....	8
2.1.1	Spotřeba sulfonamidových antibiotik v ČR.....	8
2.1.2	Princip antibakteriálního účinku sulfonamidových antibiotik.....	10
2.1.3	Struktura a vlastnosti skupiny sulfonamidových látek.....	11
2.1.4	Fyzikální a chemické vlastnosti sulfonamidových antibiotik.....	12
2.1.5	Sledování zástupci sulfonamidů a jejich fyzikálně chemické vlastnosti.....	13
2.1.6	Metabolismus sulfonamidových antibiotik.....	14
2.1.7	Antibiotika jako veterinární léčiva.....	16
2.1.8	Sulfonamidy jako veterinární léčiva.....	16
2.1.9	Vstup sulfonamidů do životního prostředí.....	17
2.1.10	Osud sulfonamidů ve složkách ŽP.....	19
2.1.11	Rizika spojená s kontaminací složek ŽP sulfonamidy.....	20
2.2	Eliminace xenobiotik z vodního ekosystému pomocí dřevokazných hub.....	23
2.2.1	Dřevokazné houby.....	23
2.2.2	Princip eliminace xenobiotik prostřednictvím dřevokazných hub.....	23
2.2.3	Eliminace organických polutantů ŽP s využitím <i>Trametes versicolor</i> .....	25
2.2.4	Eliminace polycyklických aromatických uhlovodíků.....	27
2.2.5	Eliminace léčiv s využitím <i>Trametes versicolor</i> .....	29
2.2.6	Eliminace sulfonamidových antibiotik s využitím <i>Trametes versicolor</i> .....	31
2.3	Metody stanovení sulfonamidů z akvatické matrice.....	33
2.4	Úprava a prekoncentrace akvatických vzorků metodou SPE.....	34
2.5	Finální analýza sulfonamidů.....	38
2.5.1	Kapalinová chromatografie.....	38
2.5.2	Detekce sulfonamidů po chromatografické separaci.....	38
2.5.3	Spojení LC-MS a LC-MS/MS.....	38
2.5.4	Kvantifikace sulfonamidových antibiotik pomocí MS detekce.....	39
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
3.1	Přístroje a pomůcky.....	42
3.2	Používaný software pro zpracování dat.....	42
3.3	Použité chemikálie a standardy.....	42
3.3.1	Chemikálie.....	42
3.3.2	Plyny.....	43
3.3.3	Standardy.....	43
3.4	Sledovaná matrice.....	43
3.4.1	Odpadní voda.....	43

3.4.2	Modelová voda .....	44
3.5	Eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí <i>Trametes versicolor</i> .....	44
3.5.1	Popis experimentu .....	44
3.6	Postup stanovení sulfonamidů z akvatické matrice .....	51
3.6.1	Odběr vzorků a jejich skladování .....	51
3.6.2	Úprava vzorku před izolací sledovaných analytů a finální analýzou .....	51
3.6.3	Optimalizovaná metoda izolace cílových analytů .....	53
3.6.4	Optimalizovaná metoda identifikace a kvantifikace analytů.....	53
3.6.5	Určení matričního efektu .....	54
3.6.6	Určení analytických parametrů metody stanovení – LOD a LOQ .....	55
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	56
4.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	56
4.1.1	Výběr vhodné chromatografické kolony .....	56
4.1.2	Optimalizace gradientu mobilní fáze.....	59
4.1.3	Optimalizace složení mobilní fáze .....	60
4.2	Optimalizace SPE extrakce.....	61
4.2.1	Výběr vhodného stacionární fáze .....	61
4.2.2	Modifikace pracovního postupu extrakce pro kolony Supel Select HLB ....	62
4.2.3	Statistické vyhodnocení .....	65
4.2.4	Matriční efekt .....	66
4.3	Analytické parametry optimalizované metody stanovení - LOD a LOQ .....	66
4.4	Sulfonamidová antibiotika v odpadní vodě .....	68
4.5	Eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí <i>Trametes versicolor</i> .....	70
4.5.1	Srovnání použitých nosičů mycelia.....	70
4.5.2	Printscreen test.....	71
4.5.3	Testy na modelové vodě .....	73
4.5.4	Test na odpadní vodě.....	78
5	ZÁVĚR.....	80
6	SEZNAM CITOVANÝCH ZDROJŮ .....	82
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK - neaktuální .....	90
8	SEZNAM PŘÍLOH .....	92

# 1 ÚVOD

Voda je základ života. Na větší části západní polokoule je této tekutiny poměrně dostatek, případně alespoň množství postačující aktuálním potřebám tamní lidské populace. V jiných částech světa však začíná být hodnota vody srovnávána s hodnotou takových komodit, jako je ropa nebo zlato, a již dnes se zde o tuto základní surovinu svádí nejen ekonomické, ale také fyzické konflikty. V oblastech zemí střední Afriky, blízkého východu, Indie nebo Číny se stává nedostatek pitné vody kritickým. V našich zeměpisných šířkách se v současnosti stále častěji skloňuje slovo „*sucho*“, avšak akutním nedostatkem pitné vody tekoucí z vodovodních kohoutků zatím ohroženi nejsme. Často je však diskutována kvalita pitné vody, protože existují studie, které prokazují v pitné vodě přítomnost stopových koncentrací takových kontaminantů, jakými jsou léčiva, ze kterých asi nejvíce diskutovaná jsou antibiotika, případně jejich degradační produkty.

Spotřeba antibiotik je celosvětově poměrně vysoká. Ve veterinární medicíně jsou používány jako promotory růstu hospodářských zvířat. V humánní medicíně jsou antibiotika stále často pacientům předepisována zbytečně nebo chybně, což je nebezpečné především z hlediska vzniku bakteriální rezistence. Každopádně po podání antibakteriální látky jsou tato léčiva časem z organismu vylučována ve formě metabolitů nebo ve své nezměněné podobě a společně s komunálními odpadními vodami se dostávají na čistírny odpadních vod. Současné konvenční technologické postupy čištění odpadních vod však nejsou v odstranění těchto látek dostatečně účinná, což činí z čistíren odpadních vod bodové zdroje průniku těchto kontaminantů do životního prostředí. Ohroženy jsou zejména povrchové vody, protože zde mohou mít tyto látky negativní vliv na většinu organismů, v odpadních vodách žijících. Odtud se však antibiotika mohou dále šířit a kontaminovat další složky životního prostředí, což může vést až ke kontaminaci podzemních zdrojů vody.

Protože odborná veřejnost si je vědoma závažnosti problematiky vstupu těchto kontaminantů do ŽP prostřednictvím nedostatečně vyčištěných odpadních vod, dochází v poslední době k vývoji a testování nových eliminačních postupů, které by mohly zcela nebo částečně eliminovat množství kontaminantů pronikající do ŽP tímto způsobem. Jedním z těchto způsobů jsou pokročilé oxidační procesy (AOP). Toto řešení je poměrně účinné, avšak poměrně finančně náročné. Proto dochází rovněž k vývoji jednodušších, finančně dostupnějších alternativních postupů, mezi které patří například využití enzymatického aparátu některých jednodušších organismů, jako jsou například dřevokazné houby. Dřevokazné houby jsou poměrně odolné, rychle se množí a rostou a také se dobře přizpůsobují změnám okolních podmínek.

V rámci této diplomové práce byla optimalizována analytická metoda stanovení sulfonamidových antibiotik, která byla následně použita pro určení koncentrace těchto látek ve vzorcích reálné odpadní vody. Tato metoda byla rovněž využita k ověření účinnosti eliminace vybraných sulfonamidových antibiotik, a to při experimentech využívajících mycelium dřevokazné houby *Trametes versicolor* způsobem, který dosud v literatuře publikován nebyl. Z tohoto důvodu byl proveden základní výzkum a charakteristika této netradiční a alternativní metody.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Sulfonamidová antibiotika

Sulfonamidová antibiotika (SA), rovněž nazývaná sulfonamidy, patří mezi nejstarší antimikrobiální přípravky, které jsou používány již od poloviny dvacátého století. Z literatury je známo, že v posledních 50 letech se tato antibiotika často aplikují při léčbě infekcí v humánní i ve veterinární medicíně. Důvodem je především jejich nízká cena, nízká toxicita a relevantní účinnost proti běžným bakteriálním infekcím [1–4].

V Evropské unii jsou sulfonamidová antibiotika po tetracyklinech nejvíce aplikovanými veterinárními antibiotiky [4, 5]. V současnosti v humánní medicíně mírně klesá jejich spotřeba, protože se ve větší míře začala využívat účinnější antibiotika, která pacienti lépe snášejí. Používají se především v kombinaci s diaminopyrimidinovými deriváty, jako jsou trimethoprim a diaverdin. Tato kombinace léčiv je terapeuticky účinná i proti kmenům rezistentním na samotné sulfonamidy [6–9]. I přes zmíněný pokles ve spotřebě těchto antibiotik v humánní medicíně je jejich celková spotřeba stále poměrně vysoká. Například ve Velké Británii představovala v roce 2000 SA téměř 22% podíl z celkového prodeje antimikrobiálních přípravků [4, 8]. V roce 2007 se jejich spotřeba v dalších evropských zemích pohybovala v rozmezí 11–21 % [4, 5]. Z celkového vydaného množství antibiotik v USA tvoří SA asi 2,3 %; jedná se zejména o sulfamethoxypyridazin, sulfachloropyridazin, sulfamethazin a sulfathiazol [4, 8].

Antibakteriální vlastnosti sulfonamidů objevil a poprvé popsal v roce 1935 německý lékař (patolog) a bakteriolog Gerhard Domagk [1].

Strukturně se jedná o deriváty kyseliny sulfanilové (p-aminobenzensulfonová kyselina). Prekursorem sulfonamidů je sulfanilamid (p-aminobenzensulfonamid), který byl poprvé syntetizován v roce 1908 a původně byl využíván jako meziprodukt při výrobě barviv [1].

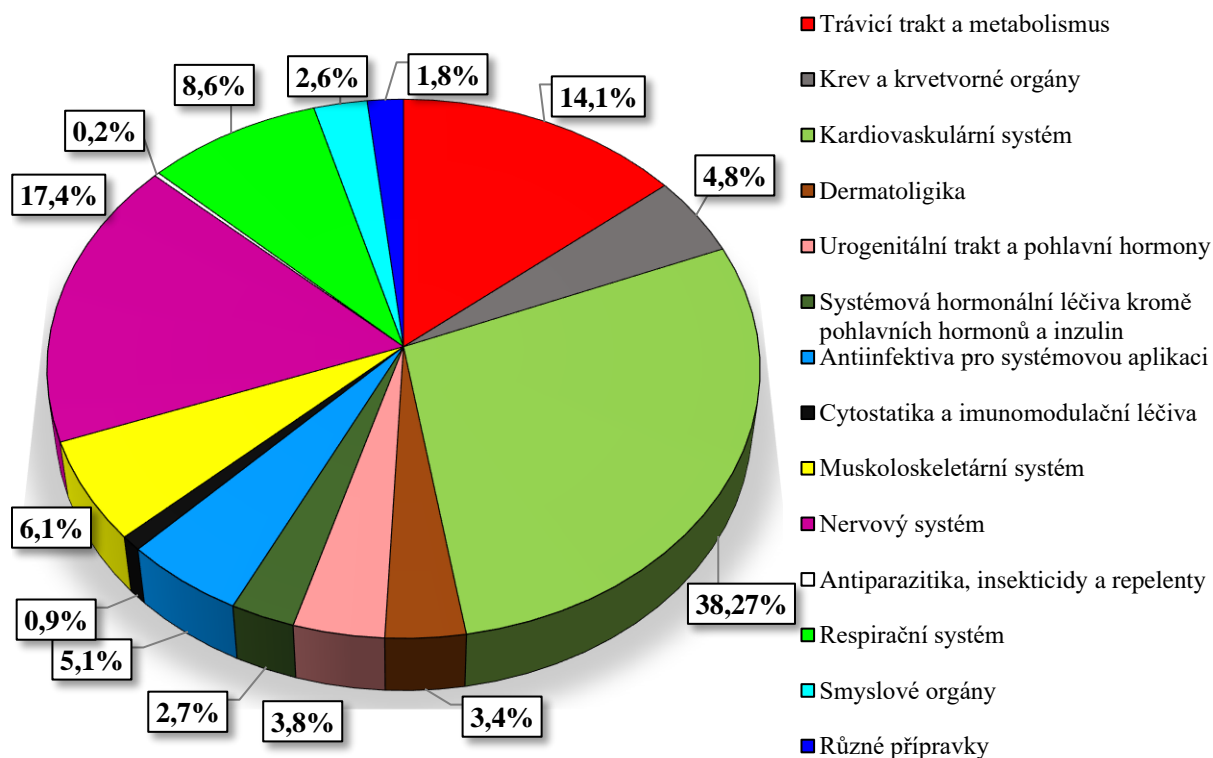
Sulfonamidy jsou bakteriostatické látky se širokospektrální antibakteriální aktivitou, s chemoterapeutickými účinky proti infekcím, které jsou způsobené grampozitivními i gramnegativními bakteriemi [1, 2, 9]. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou využívány k léčbě infekcí močových cest u lidí i zvířat, případně u bronchitidy, bakteriální meningitidy, některých ušních a očních infekcí, infekcí trávicího ústrojí a dýchacích cest [4, 10]. V kombinaci s dalšími látkami se sulfonamidy aplikují také při léčbě infekcí způsobenými prvoky, jakými jsou například malárie nebo toxoplazmóza [1, 6]. Vzhledem k jejich nízké ceně jsou často používány jako stimulanty růstu hospodářských zvířat a ryb na rybích farmách [7, 10].

#### 2.1.1 Spotřeba sulfonamidových antibiotik v ČR

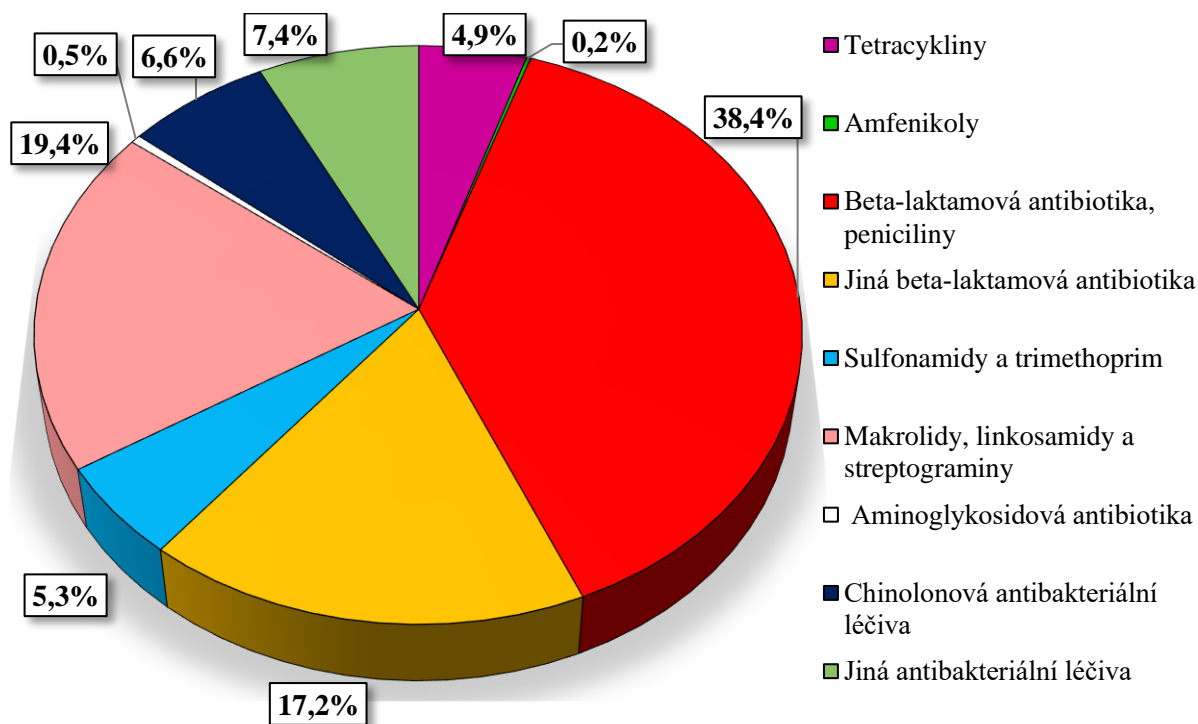
Antibiotika jsou podle mezinárodní anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace léčiv (ATC-klasifikace) zařazena do skupiny nazývané „antiinfektiva pro systémovou aplikaci“.

V roce 2017 bylo v lékárnách na území ČR celkově vydáno přibližně 134,1 milionů balení léčivých přípravků. Z tohoto celkového počtu tvořila skupina antiinfektiv pro systémovou aplikaci přibližně 5,1 %, což odpovídá 6,81 milionům balení. Přibližně 5,3% podíl z vydaných antiinfektiv tvořila právě sulfonamidová antibiotika a trimethoprimem potencované sulfonamidy.





Obrázek 1: Procentuální podíl léčivých přípravků vydaných v lékárnách v ČR v roce 2017 z celkového počtu 134,1 milionů vydaných balení, rozdělených do jednotlivých ATC skupin [11]



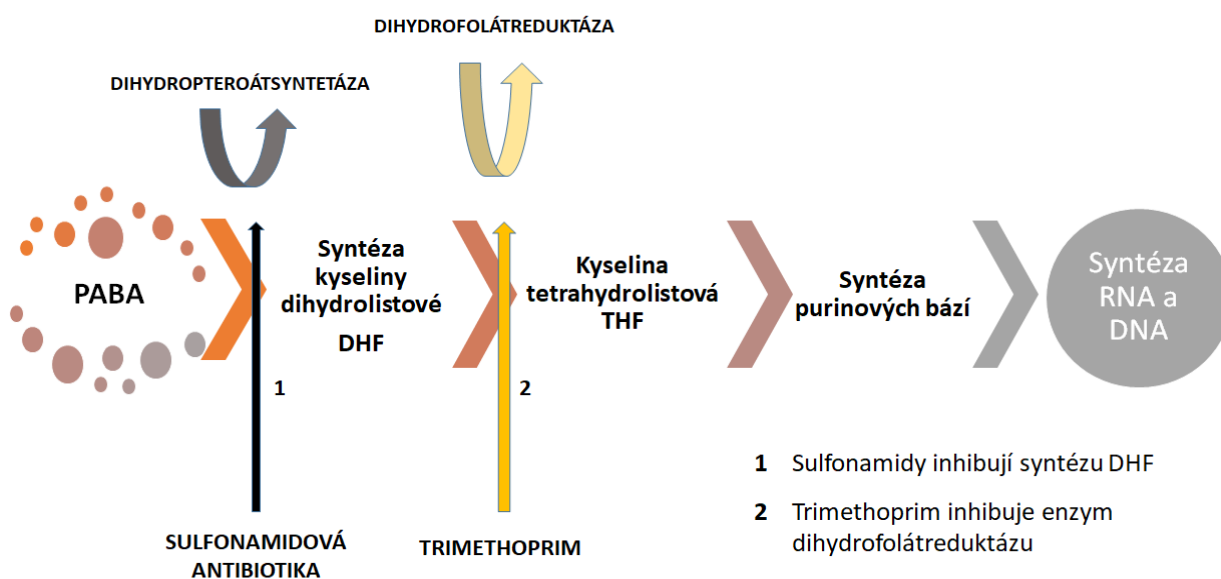
Obrázek 2: Procentuální zastoupení skupin antibiotik z jejich celkové spotřeby v roce 2017 [11]

## 2.1.2 Princip antibakteriálního účinku sulfonamidových antibiotik

Základ antibakteriálního účinku sulfonamidů představuje strukturní analogie mezi sulfanilamidovou skupinou a kyselinou p-aminobenzoovou (PABA), jejímž důsledkem je inhibice syntézy kyseliny dihydrolistové (DHF). PABA je bakteriemi využívána jako růstový faktor a za normálních okolností se na metabolismu podílí tak, že ji bakterie při biosyntéze zabudovávají do molekuly DHF, která je nezbytná pro množení bakterií. DHF je v dalším stupni metabolismu dále redukována na kyselinu tetrahydrolistovou (THF), nutnou pro syntézu purinových látek a tymidinu, podílejících se na syntéze DNA a RNA [1, 5, 6].

### 2.1.2.1 Kompetitivní inhibice syntézy kyseliny listové

Pokud jsou bakteriální buňky vystaveny přítomnosti sulfonamidů, dochází k obsazení cílových míst PABA chemicky podobnou molekulou sulfonamidu s charakteristickou sulfanilamidovou skupinou. V důsledku toho jsou sulfonamidy inhibitory syntézy DHF při kompetici s PABA. Snížení syntézy DHF a následně THF má za následek nedostatečnou syntézu purinů a tymidinu, nutných k syntéze DNA a RNA. Tím je vyvoláván bakteriostatický efekt, který postihuje široké spektrum bakterií. Ještě účinnějšího bakteriostatického efektu může být dosaženo aplikací kombinace sulfonamidu s trimetoprimem; protože takto je dosaženo synergického efektu. Trimetoprim blokuje enzym dihydrofolátreduktázu, což má za následek, že nedochází k redukcí DHF na THF. Farmaceuticky nejvýznamnější je kombinace sulfamethoxazol-trimetoprim. Vůči působení sulfonamidů jsou rezistentní pouze ty druhy bakterií, v jejichž buňkách nedochází k biosyntéze vlastní DHF [1, 6].

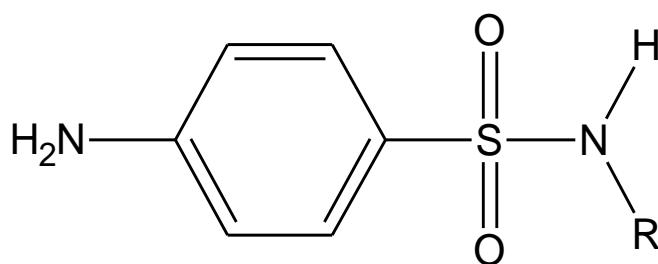


Obrázek 3: Postupná blokáda po sobě následujících stupňů metabolismu bakteriální buňky citlivé vůči působení sulfonamidů – účinek kombinace sulfonamidu a trimethoprimu [1, 6].

Zatímco některé mikroorganismy jsou schopné DHF syntetizovat a dále ji redukovat na THF a jsou v důsledku toho citlivé na sulfonamidy, tak živočišné a lidské buňky tuto vlastnost nemají. Tyto buňky kyselinu přijímají listovou jako exogenní, a proto je nutné ji jim dodávat ve formě vitamínu B9, který patří do skupiny B-komplexu. Sulfonamidy tak nepoškozují základní funkce těchto buněk [1, 6].

### 2.1.3 Struktura a vlastnosti skupiny sulfonamidových látek

Základní chemická struktura sulfonamidů je zobrazena na obrázku „Obrázek 4“.

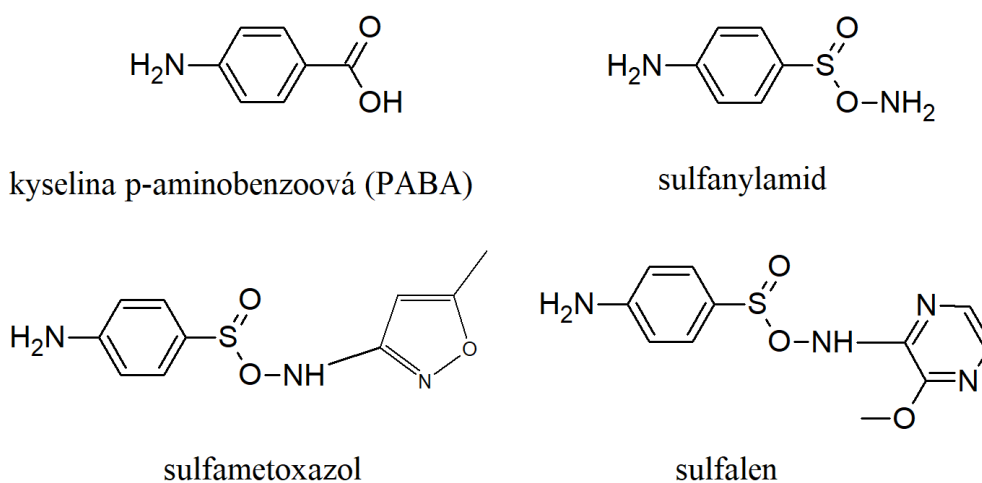


Obrázek 4: Základní chemická struktura sulfonamidů, upraveno podle [2]

Nejjednodušší aktivní strukturu sulfonamidů má **sulfanilamid** (p-aminobenzensulfonamid) [1]. Ve struktuře sulfanilamidu představuje obecná skupina (-R) atom vodíku. V současnosti existuje více jak 10 000 syntetických derivátů sulfanilamidu, které konkurenčně blokují syntézu kyseliny dihydroxyltové v buňkách mikroorganismů; z literatury je však známo, že pouze cca 40 z nich bylo nebo je aplikováno v praxi, tzn. v humánní a veterinární medicíně [1, 2].

Antibakteriální spektrum jednotlivých sulfonamidů je specifické, avšak souhrnně mezi citlivé organismy patří zejména patogenně významné  $G^+$  i  $G^-$  bakterie typu diplokoků, enterokoků, mikokoků, kolibakterií, salmonel, streptokoků, stafylokoků, klostridií, vibrií aj. Většina sulfonamidových antibiotik i potencovaných látek je dobře absorbována zejména v gastrointestinálním systému. Jejich distribuce v organismu je velmi rychlá, přestupují i bariéru placenty a mléčné žlázy. Biotransformace probíhá především v játrech a vylučovány jsou převážně ledvinami [9].

Antagonistický účinek sulfonamidů vůči kyselině p-aminobenzoové (PABA) má chemickou podstatu v sulfanilamidové struktuře [12]. Substituce na dusíku sulfonamidové skupiny způsobuje změny farmakokinetických charakteristik molekul sulfonamidů, přičemž spektrum účinnosti zůstává stejné [1, 6]. Příkladem rozdílné farmakokinetické charakteristiky mohou být sulfonamidová antibiotika *sulfamethoxazol* a *sulfalen*. Zatímco bakteriostatický účinek sulfamethoxazolu je středně dlouhodobý, tak účinek sulfalenu je dlouhodobý [6].



Obrázek 5: Chemická struktura PABA, sulfanilamidu, sulfamethoxazolu a sulfalenu, upraveno dle [6]

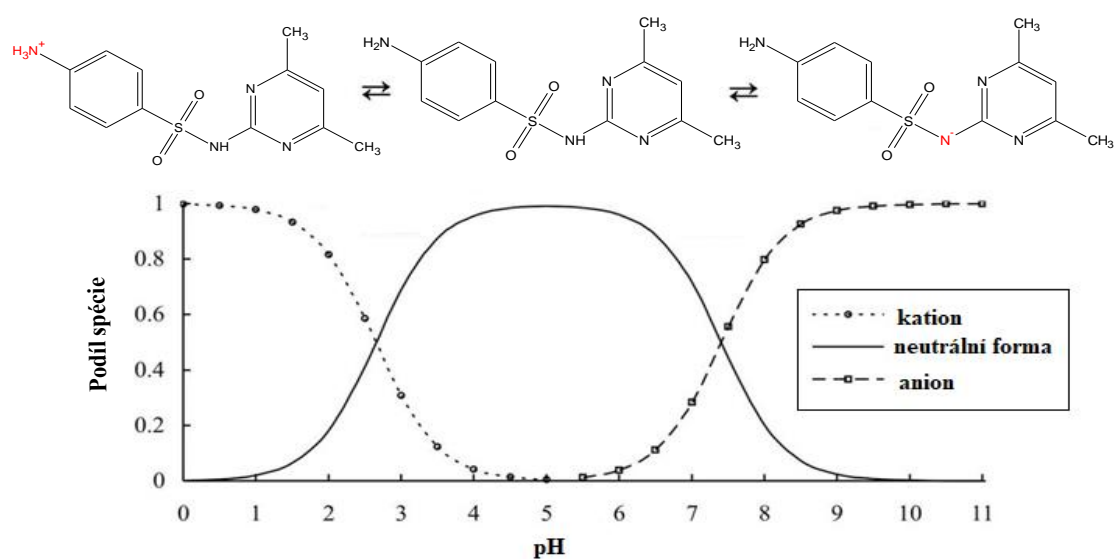
Fyziologicky nejaktivnější sulfonamidové sloučeniny mají dusík sulfonamidové skupiny substituovaný heterocyklickým radikálem. Mnoho sulfonamidů je založeno na pyrimidinu, pyridazinu a dalších heterocyklech [1].

Molekula sulfonamidu je fyziologicky neúčinná v případě, pokud dojde k vytěsnění para-aminoskupiny skupiny do polohy *ortho*- nebo *meta*-. Je-li atom vodíku v aminoskupině nahrazen radikálem, sloučenina rovněž ztrácí svou aktivitu. Pokud však po podání takto substituovaného sulfonamidu dojde v těle k odstranění těchto substituentů, molekula získá zpět svoji fyziologickou aktivitu. Negativní vliv na fyziologickou aktivitu sulfonamidových sloučenin má rovněž zavedení dalších substituentů na aromatický kruh základní strukturní molekuly sulfonamidů. Potom dochází ke snížení, případně k úplné ztrátě fyziologické aktivity příslušné molekuly sulfonamidu [1].

### 2.1.4 Fyzikální a chemické vlastnosti sulfonamidových antibiotik

Sulfonamidy jsou bílé nebo slabě nažloutlé prášky bez zápachu; pro některé z nich je však charakteristická hořká chuť [1].

Většina SA jsou polární, ve vodě poměrně dobře rozpustné sloučeniny s amfoterním charakterem [3, 4], jejichž ionizace závisí na pH matrice. Závislost distribuce iontových forem sulfonamidů na hodnotě pH vodného roztoku je charakterizována jejich disociačními konstantami [12]. Kromě sulfaguanidinu mají všechny SA ve své struktuře dvě bazické skupiny a jedno kyselé centrum. Ve struktuře všech SA je přítomna bazická aromatická aminoskupina, a kromě sulfaguanidinu má každý sulfonamid přítomnou ještě specifickou heterocyklickou bázi. Kyselou funkční skupinou s labilním vodíkem je sulfonamidová skupina. Na základě této struktury mohou být sulfonamidové sloučeniny popsány třemi hodnotami pKa, charakterizujícími dvojitě protonované, jednou protonované, neutrální a záporné formy molekul [3]. V literatuře a databázích jsou udávány pouze dvě hodnoty pKa – nejsilnější bazické skupiny (aromatická aminoskupina) označované jako pKa<sub>1</sub> a kyselé sulfonamidové skupiny označované jako pKa<sub>2</sub>. Na níže uvedeném obrázku „Obrázek 6“ je pro příklad uvedeno schéma závislosti distribuce iontových forem sulfamethazinu na pH matrice.



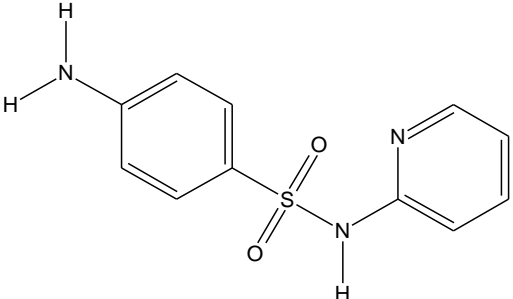
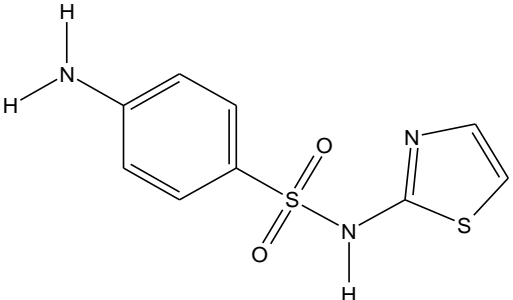
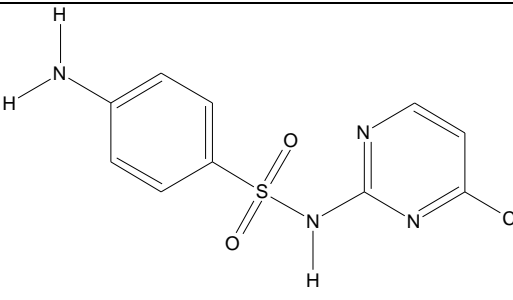
Obrázek 6: Závislost distribuce iontových forem sulfamethazinu na pH vodného roztoku, upraveno podle [13]

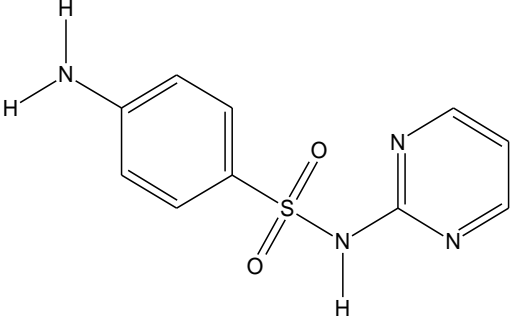
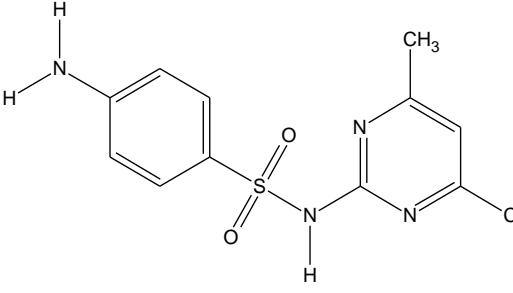
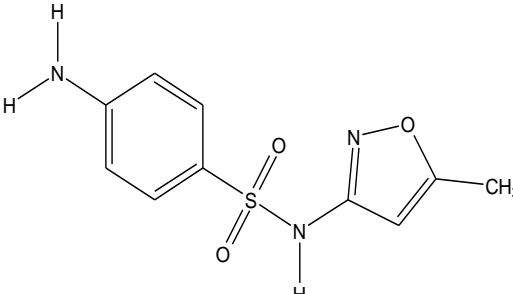
Obecně lze říci, že v kyselém prostředí (přibližně při  $\text{pH} < 2$ ) dochází k protonaci molekul sulfonamidů ( $\text{pK}_{\text{a}1}$  2–2,5), při  $\text{pH}$  3-5 nedochází k disociaci a k deprotonaci; ke vzniku negativně nabitých iontových forem sulfonamidů dochází přibližně při  $\text{pH} > 5$  ( $\text{pK}_{\text{a}2}$  5-8) [1].

### 2.1.5 Sledování zástupci sulfonamidů a jejich fyzikálně chemické vlastnosti

Ze skupiny sulfonamidů bylo za cílové analyty zvoleno šest látek, jejichž standardy byly již dostupné v laboratořích Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí (ÚCHTOŽP). Sledovanými analyty byly sulfapyridin, sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin a sulfamethoxazol, jejichž stručná charakteristika je shrnuta v následující tabulce „*Tabulka 1*“.

Tabulka 1: Základní charakteristika sledovaných zástupců sulfonamidů [14]

Sulfapyridin (SPY)		
Název IUPAC	4-amino-N-(pyridin-2-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	144-83-2
	Molekulová hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	249,288
	Rozpuštnost ve vodě (25 °C) [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	0,235
	$\text{pK}_{\text{a}1}$ (nejsilnější báze)	2,63
	$\text{pK}_{\text{a}2}$	6,24
	Akutní toxicita krys LD 50 [ $\text{mol}/\text{kg}$ ]	1,229 3
Sulfathiazol (STZ)		
Název IUPAC	4-amino-N-(1,3-thiazol-2-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	72-14-0
	Molekulová hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	255,317
	Rozpuštnost ve vodě (25 °C) [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	0,921
	$\text{pK}_{\text{a}1}$ (nejsilnější báze)	2,04
	$\text{pK}_{\text{a}2}$	6,93
	Akutní toxicita krys LD 50 [ $\text{mol}/\text{kg}$ ]	1,793 9
Sulfamerazin (SMR)		
Název IUPAC	4-amino-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	127-79-7
	Molekulová hmotnost [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	264,304
	Rozpuštnost ve vodě (25 °C) [ $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	0,304
	$\text{pK}_{\text{a}1}$ (nejsilnější báze)	2,01
	$\text{pK}_{\text{a}2}$	6,99
	Akutní toxicita krys LD 50 [ $\text{mol}/\text{kg}$ ]	1,913 4

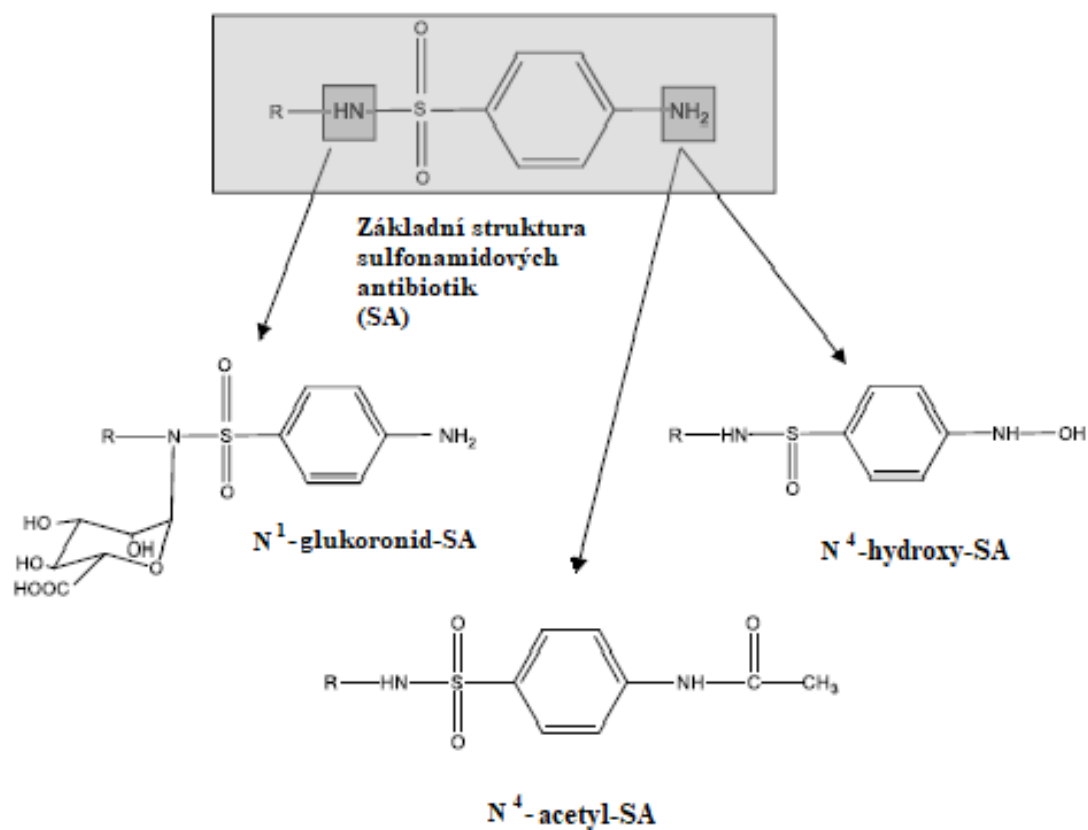
<b>Sulfadiazin (SDZ)</b>		
Název IUPAC	4-amino-N-(pyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	68-35-9
	Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	250,277
	Rozpustnost ve vodě (25 °C) [mg·ml <sup>-1</sup> ]	0,601
	pK <sub>a1</sub> (nejsilnější báze)	2,01
	pK <sub>a2</sub>	6,99
	Akutní toxicita krys LD 50 [mol/kg]	1,835 3
<b>Sulfamethazin (SMZ)</b>		
Název IUPAC	4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	57-68-1
	Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	278,33
	Rozpustnost ve vodě (25 °C) [mg·ml <sup>-1</sup> ]	0,230
	pK <sub>a1</sub> (nejsilnější báze)	2,04
	pK <sub>a2</sub>	6,99
	Akutní toxicita krys LD 50 [mol/kg]	2,135 4
<b>Sulfamethoxazol (SMX)</b>		
Název IUPAC	4-amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzen-1-sulfonamid	
	CAS	723-46-6
	Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	253,278
	Rozpustnost ve vodě (25 °C) [mg·ml <sup>-1</sup> ]	0,459
	pK <sub>a1</sub> (nejsilnější báze)	1,97
	pK <sub>a2</sub>	6,19
	Akutní toxicita krys LD 50 [mol/kg]	1,642 2

### 2.1.6 Metabolismus sulfonamidových antibiotik

Metabolismus sulfonamidů závisí na konkrétním typu sloučeniny. SA se převážně metabolizují v játrech, avšak také v dalších tkáních. Biotransformace sulfonamidových antibiotik probíhá ve dvou fázích na N<sup>1</sup> nebo N<sup>4</sup>-dusíkovém atomu, čímž dochází ke vzniku N<sup>1</sup> a N<sup>4</sup> derivátů, které již nevykazují původní antimikrobiální aktivitu.

V I. fázi, označované také jako fáze nesyntetická, probíhají především oxidační procesy. Ve II. fázi, označované rovněž jako fáze syntetická, dochází převážně k acetylaci. Dalšími principy, uplatňujícími se při metabolismu sulfonamidů, je aromatická hydroxylace a také

konjugace s kyselinou glukuronovou, tzv. glukuronidace. V těchto případech vzniklý metabolit vykazuje 5 – 39,5% antimikrobiální aktivitu mateřské sloučeniny, a to v závislosti na druhu původní SA sloučeniny [4, 12]. Jednoduché schéma metabolismu SA je zobrazeno níže na obrázku „Obrázek 7“.



Obrázek 7: Schéma vzniku hlavních metabolitů sulfonamidových antibiotik, upraveno podle [4]

### 2.1.6.1 Metabolismus sulfonamidů v lidském těle

Ucelenější studie o osudu a distribuci metabolitů farmaceutik v lidském těle jsou poměrně vzácné. Je však již známo, že biotransformace sulfadiazinu zahrnuje oxidaci a acylaci na N<sup>4</sup>-dusíkovém atomu. Sulfadiazin je v tomto případě metabolizován především na N<sup>4</sup>-acetylsulfadiazin a N<sup>4</sup>-hydroxysulfadiazin. Hydroxylové deriváty mohou být dále konjugovány s glukuronovou kyselinou a se sírany.

Produkty metabolismu jsou společně se zbytky původního farmaka vylučovány z těla močí. Předpokládá se, že metabolity jsou z těla eliminovány rychleji, než léčivo ve své původní formě. Po vyloučení z těla mohou jak metabolity, tak také původní sloučeniny, podléhat biotické, popřípadě i abiotické degradaci, jako je například fotodegradace [4].

### 2.1.7 Antibiotika jako veterinární léčiva

Vzhledem k tomu, že spotřeba produktů chovu hospodářských zvířat celosvětově roste, zvyšuje se i související spotřeba veterinárních antibiotik. Veterinární antibiotika jsou využívána nejen k léčbě a ochraně zvířat před infekcemi, avšak v některých zemích jsou stále ještě aplikována rovněž ke zvýšení efektivity krmné dávky a jako stimulanty růstu [15].

Komerční chov vepřů je zemědělskou činností, ve které je spotřebováno největší množství antibiotik, v porovnání s chovem jiných hospodářských zvířat [8]. V minulosti byly zpracovány studie zabývající se odhadem množství antibiotik používaných v živočišné výrobě bez terapeutického významu. Například v roce 2001 byla publikována studie odhadující množství antibiotik použitých v USA v chovu zvířat na 11 200 tun, což představuje 70 % z celkové spotřeby antibiotik v daném sledovaném období [16, 17]. Ve Francii bylo v roce 2005 použito k veterinárním účelům 1 340 tun antibiotik, zatímco v humánní medicíně pouze 760 tun [18]. Výhodou používání antibiotik v chovech hospodářských zvířat je především minimalizace četnosti výskytu infekčních onemocnění zvířat a s tím spojené negativní ekonomické dopady.

Používání antibiotik však přináší i řadu rizik, na což některé státy, a to za účelem zodpovědného přístupu k užívání antibiotik v chovu hospodářských zvířat, reagovaly změnou legislativy. V České republice, stejně jako v celé Evropské unii, je od roku 2006 zakázáno používat antibiotika jako stimulanty růstu v krmivech pro zvířata [17]. Tento zákaz je definován v Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat [19]. Od roku 2006 byl skutečně zaznamenán pokles spotřeby antibiotik používaných v zemědělství [17].

I přes tyto legislativní úpravy jsou však antibiotika, a to podle zákona č. 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), stále legitimně využívána v krmivech formou tzv. *medikovaného krmiva*. Medikované krmivo je aplikováno k léčení nemocných zvířat i k prevenci onemocnění. Je vyráběno jako veterinární léčebný přípravek a je podáváno na předpis ošetřujícího veterinárního lékaře. Hospodářská zvířata v případě, že byla léčena antibiotiky, mohou být na porážku posílána až za určitou dobu po jejich vysazení, což musí být jednoznačně deklarováno [20].

### 2.1.8 Sulfonamidy jako veterinární léčiva

Sulfonamidy jsou společně s tetracykliny,  $\beta$ -laktamy, linkosamidy, diaminopyrimidiny nejčastěji používanými farmaky pro veterinární účely [8]. Zástupce těchto skupin lze zvířatům podávat hromadně i individuálně, celkově i lokálně [9].

Z důvodu vysoké podávané dávky a slabé absorpce antibiotik hospodářskými zvířaty se většina těchto léčiv vylučuje buď v nezměněné formě, případně jako metabolity, což vyplývá z biotransformace výchozích sloučenin [15]. Je známo, že 40 – 90 % z množství podané terapeutické dávky sulfonamidů je obvykle zvířaty vyloučeno během několika dní [4, 15], přičemž 9 – 30 % vyloučených sulfonamidů tvoří léčivo ve své původní formě; 5 – 60 % vyloučených sulfonamidů je ve formě konjugátů kyseliny octové. Acetylová skupina je z těchto konjugátů snadno odštěpována bakteriemi, a proto mohou často sulfonamidy z těchto konjugátů přecházet zpět do formy původního léčiva. Množství sulfonamidů vylučovaných ve své původní formě závisí na konkrétním druhu léčiva a také na druhu a věku zvířete. Stejně jako



u lidí, tak i u zvířat je N<sup>4</sup>-acetylace hlavní dráhou metabolismu sulfonamidů, jejichž produkty jsou metabolity se sníženou antibakteriální aktivitou. Například u prasat je známo, že sulfamethazin se metabolizuje na N<sup>4</sup>-acetylsulfamethazin, deaminosulfamethazin a také na N<sup>4</sup>-konjugát glukózy [4].

Z výše zmíněných důvodů lze odvodit, že velké množství těchto antibiotických zbytků je přítomno ve fekální hmotě produkované hospodářskými zvířaty. Hnůj hospodářských zvířat je všeobecně považován za velmi cenné hnojivo obsahující esenciální živiny pro růst rostlin, jako je například dusík ve formě NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, fosfor a draslík. Aplikace kontaminovaného hnoje jako hnojiva na zemědělskou půdu je proto významnou možností vstupu sulfonamidů a dalších biologicky aktivních látek do ŽP. Tímto způsobem potom dochází k následné kontaminaci jednotlivých složek ŽP [4, 11].

### 2.1.9 Vstup sulfonamidů do životního prostředí

Vstup léčiv, popřípadě zde diskutovaných sulfonamidů do životního prostředí (ŽP), lze charakterizovat pomocí známých faktů o kontaminaci ŽP biologicky aktivními látkami. Léčiva používaná k léčbě lidské populace v nemocnicích, případně jako léky užívané na základě předpisu lékaře, jsou nakonec pacienty z těla vyloučeny. Společně s močí přechází do splaškových vod a kanalizací se následně dostávají na čistírny odpadních vod (ČOV). Kromě toho jsou léčiva s prošlou expirační lhůtou ještě stále často, a to přes všechna doporučení zdravotnického personálu, likvidována také spláchnutím do toalety nebo odstraněna společně s běžným domovním komunálním odpadem. Nedokonalá eliminace těchto látek na konvenčních ČOV je jednou z hlavních předpokládaných příčin vstupu a šíření xenobiotik, popřípadě léčiv a jejich metabolitů a degradačních produktů, do životního prostředí [4].

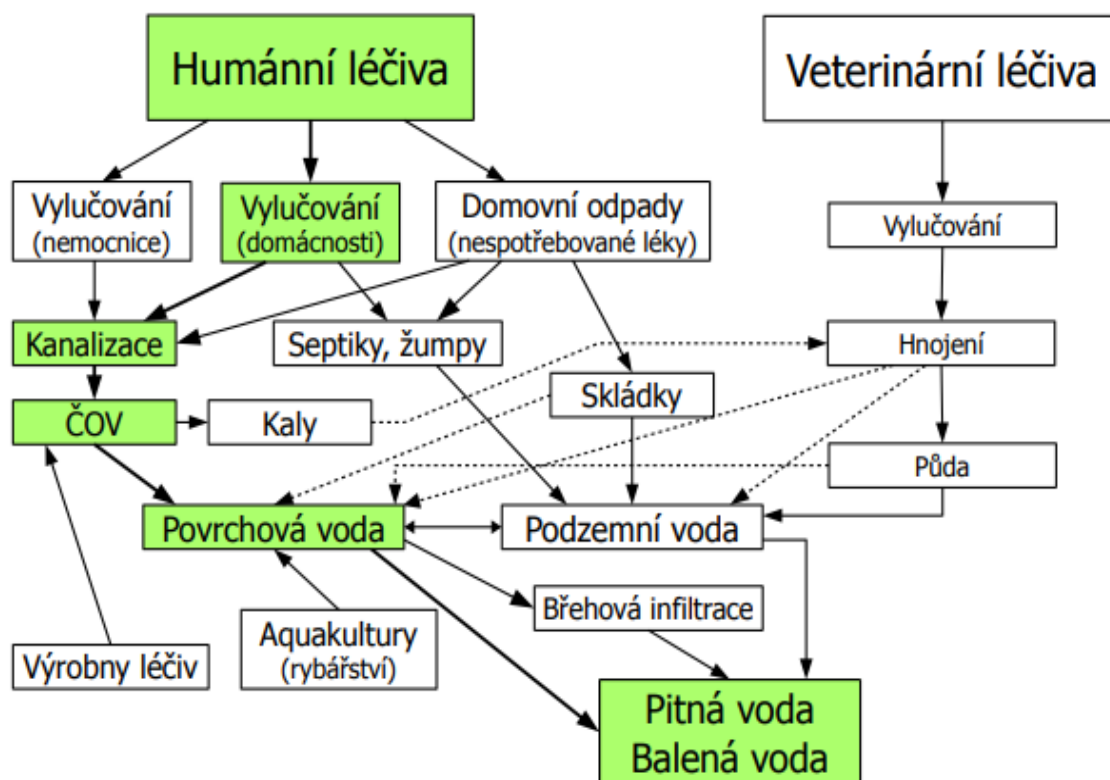
Monitorovacích studií, zabývajících se výskytem a distribucí sulfonamidů v odpadních vodách na přítoku a na odtoku z ČOV, bylo v posledních letech zpracováno poměrně velké množství [21–24]. Malý podíl těchto studií se však zabýval metabolity sulfonamidů jako cílovými analyty [24, 25]. Ve většině případů byla studována účinnost eliminace sulfonamidů probíhající na technologické lince ČOV [23, 26]. Výsledky prezentující podíl eliminace však většinou nezahrnovaly jen množství léčiva podléhající úplné degradaci, ale navíc také podíl zahrnující transformaci původní sloučeniny na jiné meziprodukty a metabolity [4].

Jak již bylo zmíněno v kapitole „*Sulfonamidy jako veterinární léčiva*“, dalším významným vstupem antibiotik do ŽP jsou rezidua veterinárních antibiotik, která jsou obsažena ve zvířecích exkrementech. Antibiotika bývají detekována rovněž v půdách ošetřených kontaminovaným hnojem v časovém rozmezí dní až měsíců po aplikaci [4, 27]. V několika studiích je popisováno odhalení přítomnosti veterinárních reziduí antibiotik v různých složkách životního prostředí, které se vyskytují v blízkosti zemědělských oblastí, a to zejména v půdách, povrchových vodách, podzemních vodách a vodních sedimentech [15, 17, 27–29].

Je však známo, že zejména z důvodů nedostatečných znalostí o vstupu, osudu a účincích většiny léčivých přípravků v ŽP, neexistují žádné regulační mechanismy ani legislativní úpravy, které by stanovovaly závazné limitní úrovně těchto sloučenin v matricích ze ŽP (voda, sediment, půda) [30]. Evropská unie však navrhla, aby celková koncentrace antibiotik v půdě nepřekračovala 100 µg/kg, protože na této koncentrační úrovni testy ekotoxicity, které byly prováděné s veterinárními léčivými přípravky registrovanými v USA, nevykazovaly žádné

negativní účinky na žížalách, mikroorganismech nebo rostlinách. Při překročení této koncentrace je však nezbytné zvážit další hodnocení, vesměs zaměřené na specifické sloučeniny [27]. Odborná veřejnost si je rovněž vědoma závažnosti problematiky vstupu mikropolutantů do ŽP, a to prostřednictvím nedostatečně vyčištěných odpadních vod z konvenčních ČOV. Proto v poslední době dochází k vývoji a testování nových eliminačních postupů, které by mohly zcela nebo alespoň částečně eliminovat množství potenciálních kontaminantů vstupujících do ŽP tímto způsobem. Nejvíce diskutovaný a v některých zemích již používaný postup, který je aplikovaný pro odstranění těchto látek z odpadních vod, je použití pokročilých oxidačních procesů (AOP) [31].

Obecné schéma možných zdrojů a cest výskytu léčiv v ŽP je zobrazeno na následujícím obrázku „Obrázek 8“. Tento princip distribuce lze aplikovat konkrétně i na skupinu sulfonamidových farmak.



Obrázek 8: Schéma možných zdrojů a cest výskytu léčiv ve vodním prostředí [32]

Sulfonamidy vstupující jako kontaminanty do ŽP jsou z důvodu vysoké spotřeby považovány za problémové především v USA a v Evropě. V některých lokalitách, s podezřením na pronikání a výskyt sulfonamidů v určitých maticích, probíhají především dlouhodobé monitorovací studie. K detekci těchto látek vyskytujících se v nízkých koncentracích (až ng/l) jsou nezbytné selektivní analytické metody, s vysokou citlivostí a nízkými mezemi detekce.

### 2.1.10 Osud sulfonamidů ve složkách ŽP

Nutno si uvědomit, že výchozí sloučeniny biologicky aktivních látek, produkty jejich metabolismu a degradace, však mají rozdílné fyzikální a chemické vlastnosti [15]. Proto nelze jejich osud a chování v různých složkách životního prostředí jednoznačně charakterizovat. Jednoduše nelze popsat ani chování jedné skupiny biologicky aktivních látek, například antibiotik. Zatímco terapeutická skupina antibiotik tetracyklinů je v půdě za standardních podmínek imobilní, tak sorpce sulfonamidových antibiotik na půdní částice je poměrně slabá. Sulfonamidy mají vyšší potenciál k mobilitě, a proto často dochází k jejich vyplavování do podzemních vod [27, 33]. Tato možnost již byla zkoumána a byla rovněž popsána v několika publikacích, které jednoznačně dokumentují přítomnost sulfonamidů v této složce odebrané ze ŽP. Tato léčiva se vyskytují v různých koncentracích převážně v podzemních vodách pocházejících z různých lokalit [34–36]. Například ve vzorcích podzemní vody, která byla odebrána pod zemědělcem využívaným polem v Dolním Sasku, byly koncentrace sulfamethazinu až 100 ng/l [36].

Pochopení transportních mechanismů, místních environmentálních podmínek a také jejich dopadu na osud léčiv vyskytujících se v reziduální formě v životním prostředí, hraje klíčovou roli při posuzování a předpokladu dalšího chování sulfonamidových léčiv v životní prostředí [28].

#### 2.1.10.1 Osud sulfonamidů v půdě a půdní vodě

Jak bylo již zmíněno v předchozích kapitolách, jedním z hlavních způsobů vstupu sulfonamidových antibiotik do životního prostředí je aplikace hnoje na zemědělsky využívané půdy, popřípadě únik odpadních vod produkovaných farmami chovající hospodářská zvířata a jejich následný průsak do půdního prostředí. Odtud se mohou sulfonamidy dále šířit a kontaminovat jak podzemní, tak také povrchové vody [27, 28].

Obecným omezujícím faktorem podpovrchového transportu a mikrobiální biodegradace xenobiotik v půdě je adsorpce. Adsorpční koeficienty jednotlivých sulfonamidů jsou ovlivňovány několika faktory, a to složením půdy, strukturou půdních složek a také přítomností organických látek. Se zvyšující se kationovou kapacitou půdy (CEC – cation exchange capacity) je sorpce sulfonamidů v půdě účinnější. Významná je rovněž sorpce sulfonamidů na organický uhlík přítomný v půdě. Vzhledem k vysoké afinitě sulfonamidů na organický uhlík lze přidáním organické hmoty zvýšit sorpci sulfonamidů v půdním prostředí [28].

Sulfonamidy jsou z chemického hlediska organické kyseliny, a proto je jejich distribuce a transport v půdní vodě, která vyplňuje půdní póry, ovlivňován také hodnotou pH půdní vody. Hodnota pH pórové vody se v zemědělských půdách liší, a to v závislosti na obdělávání půdy a způsobu hospodaření [28].

Z výše citovaných skutečností vyplývá, že pro odhad distribuce a transportu, popřípadě pro kvantitativní popis osudu sulfonamidových antibiotik v půdě, je nutné znát nejen její pH a strukturu, ale také vlastnosti půdní vody v dané lokalitě. Dosud neexistuje příliš velké množství publikované literatury, která by byla zaměřena na transport sulfonamidových antibiotik v zemědělských půdách, a to v závislosti na pH a odlišné půdní struktuře. V roce 2016 byla prezentována studie zabývající se sorpcí a transportem tří sulfonamidových antibiotik, tj. sulfamethoxazolu, sulfadimethoxinu a sulfamethazinu v půdě, v rozmezí pH 4,0 – 8,0 [28]. Adsorpční koeficienty  $K_d$  vybraných sulfonamidových antibiotik byly

modifikací pH dávkovaného roztoku silně ovlivňovány. U všech vybraných SA bylo nejsnazší adsorpce na půdní částice dosaženo při pH 4,0. Nejvíce byla změnou pH dávkovaného roztoku ovlivňována adsorpce sulfadimethoxinu [28].

Rozdílná účinnost sorpce sulfonamidových antibiotik na půdní částice při různém pH je důsledkem jejich acidobazických vlastností ve vodném roztoku, které byly již diskutovány v kapitole „*Fyzikální a chemické vlastnosti sulfonamidových antibiotik*“. Sulfonamidy jsou ionizovatelné molekuly. Se vzrůstající hodnotou pH vodného roztoku přechází sulfonamidy z formy kationtů na neutrální částice a následně do aniontové formy. Kladně nabitě a neutrální molekuly jsou elektrostaticky vázány na negativně nabitý povrch půdního materiálu [28].

#### **2.1.10.2 Osud sulfonamidů ve vodní matrici**

Po uvolnění do akvatického prostředí mohou být sulfonamidy na základě svých fyzikálně chemických vlastností, podobně jako u půdy, sorbovány na pevné částice přítomné ve vodě. Kromě toho také ve vodním prostředí podléhají degradačním procesům. Menší měrou mohou k degradaci SA přispět přirozené mikrobiální populace. Abiotickými způsoby degradace sulfonamidů jsou hydrolyza, oxidace a redukce. Sulfonamidová antibiotika jsou navíc na světlo senzitivní molekuly, které mohou podléhat rovněž fotodegradaci. Ve své struktuře mají aromatické kruhy, heteroatomy a další funkční skupiny, které mohou absorbovat sluneční záření (chromofory). Princip fotodegradace tak může významným způsobem přispívat k eliminaci sulfonamidů z akvatických matric ŽP, a to především v povrchových vodách, které jsou vystaveny slunečnímu záření. Účinnost fotodegradace závisí na intenzitě a také na frekvenci záření, typu matrice, pH a tvrdosti vody. Dalším faktorem, který silně ovlivňuje míru fotodegradace léčiv přítomných v povrchových vodách, je přítomnost huminových kyselin a dusičnanů. Fotodegradace může nastat přímou absorpcí slunečního záření (přímá fotolýza) nebo reakcí s přechodnými reaktivními meziprodukty, jakými jsou například hydroxylové radikály nebo jiné reaktivní spíše vznikající v přírodních vodách (nepřímá fotolýza) [25].

V roce 2013 byla publikována studie zabývající se osudem skupiny tří sulfonamidů (sulfamethazin, sulfadiazin, sulfamethoxazol) a jejich  $N^4$ -acetylovaných metabolitů za podmínek simulujících sluneční záření. Ozařování mělo za následek úplnou nebo téměř úplnou degradaci (88 – 98 %) testovaných analytů během 24hodinového ozařování. Pouze eliminace sulfamethazinu byla účinná jen z 52 %. Výsledkem fotodegradace SA mohou být degradační produkty, které však mohou být stabilnější a ještě toxičtější než mateřské sloučeniny [25].

#### **2.1.11 Rizika spojená s kontaminací složek ŽP sulfonamidy**

Průnik biologicky aktivních látek do ekosystému vyvolává otázky týkající se jejich možného negativního zdravotního nebo ekotoxikologického dopadu na životní prostředí.

Znalost o potenciálních negativních dopadech sulfonamidů na životní prostředí je poměrně omezená. Většina publikovaných studií se zabývá zejména účinky akutní expozice, a to především nejčastěji používaným léčivem z této skupiny, tj. sulfamethoxazolem. Mnohá léčiva jsou však připravována tak, aby ovlivnila specifické metabolické dráhy v cílovém organismu v poměrně nízkých dávkách a koncentracích expozice. Z tohoto důvodu je nutné věnovat zvýšenou pozornost rovněž důsledkům subakutních účinků léčiv na necílové organismy, které mohou být minimálně stejně velkou hrozbou a často značným problémem [37].

### 2.1.11.1 Posouzení environmentálního rizika léčiv jako polutantů životního prostředí

Environmentální riziko kontaminovaných akvatických matric (například OV na odtoku z ČOV) se hodnotí na základě výpočtu takzvaného indexu nebezpečnosti (Hazard Quotient – HQ) konkrétního polutantu ve sledovaném vzorku [38]:

$$HQ = c (\text{polutantu}) / PNEC \quad (\text{Rovnice 1})$$

Hodnota PNEC (Predicted No Effect Concentration) je podle Evropské komise definována jako koncentrace 1 000-krát nižší než koncentrace konkrétního kontaminantu působícího toxicky na nejcitlivější testovaný akvatický organismus [39]:

$$PNEC = \frac{EC_{50} \text{ nebo } LC_{50}}{1\,000} \quad (\text{Rovnice 2})$$

### 2.1.11.2 Ekotoxikologický potenciál sulfonamidů

V roce 2011 byla v časopise *Chemosphere* publikována studie zabývající se ekotoxikologickým potenciálem skupiny 12 nejvíce užívaných sulfonamidových antibiotik na různé necílové organismy. Ekotoxikologická testovací baterie byla zvolena tak, aby byly zohledněny jak vodní, tak také terestrické složky životního prostředí, a to na různé trofické úrovni [37].

Použitá testovací baterie zahrnovala enzymy acetylcholinesterázu (AChE) a glutathion reduktázu (GR), luminiscenční mořské bakterie *Vibrio fischeri*, půdní bakterie *Arthrobacter globiformis*, limnické jednobuněčné zelené řasy (*Scenedesmus vacuolatus*) a okřehek menší (*Lemna minor*). V rámci prováděné studie byly použity následující testy: test inhibice acetylcholinesterázy a kvasinkové glutathionové reduktázy, luminiscenční inhibiční test s mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri*, analýza inhibice reprodukce zelené řasy a test inhibice růstu *Lemna minor* [37].

Zajímavým závěrem vyplývajícím z této studie je zjištění, že sulfonamidy mají toxický účinek na zelené řasy ( $EC_{50} = 1,54 - 32,25$  mg/l); některé z nich mají dokonce ještě silnější negativní dopad na okřehek ( $EC_{50} = 0,02 - 4,89$  mg/l), než herbicid atrazin ( $EC_{50} = 2,59$  mg/l). Podrobnější výsledky studie jsou shrnuty do tabulky „*Tabulka 2*“ uvedené na konci kapitoly.

### 2.1.11.3 Bakteriální rezistence

Je nepochybné, že všechny molekuly s antimikrobiální aktivitou přispívají k vývoji bakteriální rezistence [15, 17]. Tato skutečnost by mohla vést k zásadnímu narušení ekosystémů přírodních bakterií a může mít za následek i ohrožení lidského zdraví [30]. Například u bakterií *Escherichia coli*, izolovaných z hnoje hospodářských zvířat, byly nalezeny geny, které jsou zodpovědné za rezistenci vůči určitým skupinám antibiotik. Přítomnost tohoto genu u typických půdních bakterií naznačuje, že vektor šíření genu rezistence na antibiotika není omezen jen na kmeny bakterií gastrointestinálního traktu, avšak může být mobilizován mezidruhově do dalších bakteriálních kmenů [40]. V dalších studiích byl diskutován výskyt vůči antibiotikům rezistentních bakteriálních izolátů v podzemních vodách odebraných ze zdroje, situačně blízkého farmě využívané k chovu hospodářských zvířat.

Závěrem zmiňované studie je tvrzení, že geny zodpovědné za rezistenci vůči antibiotikům se v životním prostředí vyskytují jako přímý důsledek zemědělské činnosti a naznačují, že podzemní voda může být potenciálním zdrojem rezistence vůči antibiotikům [17, 40].

#### 2.1.11.4 Příjem antibiotik rostlinami

U živočišných produktů jsou stanoveny maximální úrovně reziduí antibiotik. U rostlinných produktů, a to především z důvodu omezených informací o příjmu antibiotik rostlinami, případně o následném ovlivnění lidského zdraví, tak zatím učiněno nebylo [27].

Experimentů a studií zabývajících se sledováním příjmu antibiotik rostlinami neexistuje velké množství. Byla však publikována studie [41], jejímž cílem bylo zhodnotit příjem sulfonamidu sulfamethazinu rostlinami plodin kukuřice, salátu a brambor, a to z půdy ošetřené hnojem kontaminovaným antibiotiky. Při prováděných 45-ti denních skleníkových testech se ukázalo, že sulfamethazin je dobře inkorporován všemi třemi plodinami. Bylo zjištěno, že koncentrace antibiotika v rostlinné tkáni byla v rozmezí 0,1 – 1,2 mg/kg sušiny. Sulfamethazin má nízkou molekulovou hmotnost a jeho adsorpce na půdní částice je poměrně slabá. Z tohoto důvodu se koncentrace sulfamethazinu v rostlinné tkáni následně zvyšovala s odpovídajícím zvýšením koncentrace ve hnoji [41].

Na podobném principu mohou být antibiotika inkorporována do rostlinného materiálu z kontaminovaných povrchových nebo podzemních vod využívaných k závlaze rostlin. Proto se lze domnívat, že tato antibiotika mohou později způsobovat potenciální zdravotní problémy u lidí, vyplývající z konzumace nízkých hladiny antibiotik pocházejících z rostlinných produktů vypěstovaných na kontaminovaném hnoji.

Tabulka 2:  $EC_{50} / IC_{50}$  – ekotoxikologický potenciál sulfonamidů, srovnání s referenčními sloučeninami acetonitril a herbicid atrazin, upraveno dle [37]

Sulfonamid	Inhibice enzymu		Bakterie		Řasa	Rostlina
	AChE mg·l <sup>-1</sup>	GR mg·l <sup>-1</sup>	<i>Vibrio fischeri</i> mg·l <sup>-1</sup>	<i>Arthrobacter globiformis</i> mg·l <sup>-1</sup>	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> mg·l <sup>-1</sup>	<i>Lemna minor</i> mg·l <sup>-1</sup>
Sulfaguanidin	>250	>80	>50	>107	3,42	0,22
Sulfapyridin	>250	>80	>50	>125	5,28	0,46
Sulfadiazin	>250	>80	>25	>125	2,22	0,07
Sulfamethoxazol	>250	>80	>100	>127	1,54	0,21
Sulfathiazol	>250	>80	>50	>128	13,1	4,89
Sulfamerazin	>250	>80	>50	>132	11,9	0,68
Sulfisoxazol	>250	>80	>50	>134	18,98	0,62
Sulfamethiazol	>250	>80	>100	>135	24,94	2,54
Sulfadimidin	>250	>80	>100	>139	19,52	1,74
Sulfamethoxypridazin	>250	>80	>100	>140	3,82	1,51
Sulfachloropyridazin	>250	>80	>50	>142	32,25	2,48
Sodná sůl sulfadimethoxinu	>250	>80	>50	>166	9,85	0,02
Acetonitril			24 600		7 380	3 690
Atrazin					0,01	2,59

## 2.2 Eliminace xenobiotik z vodního ekosystému pomocí dřevokazných hub

V důsledku zvyšujícího se zájmu o problematiku úniku a perzistence xenobiotik vyskytujících se v ŽP, a s tím souvisejícím následným řešením přímých a případných potenciálních negativních následků, jsou v poslední době vyvíjeny a testovány zajímavé alternativní postupy, které by měly být účinnější pro odstranění organických kontaminantů z různých matric ŽP. Bioremediační alternativní techniky se v poslední době dostávají do povědomí především díky tomu, že jsou v porovnání s běžnými fyzikálně chemickými postupy tzv. „EKO-friendly“. Jednou z těchto netradičních metod je eliminace xenobiotik z různých matric ŽP pomocí zástupců z třídy dřevokazných hub.

### 2.2.1 Dřevokazné houby

Dřevo je specifický materiál, který je poměrně odolný vůči mikrobiálnímu rozkladu. Hlavní složkou dřevní hmoty jsou převážně polysacharidy, především celulóza a také polymer lignin. Lignin je vysokomolekulární heterogenní polyfenolická amorfni látka, jejíž základní stavební jednotkou jsou deriváty fenypropanu (fenylpropanoidy), označované také jako prekurzory ligninu [42].

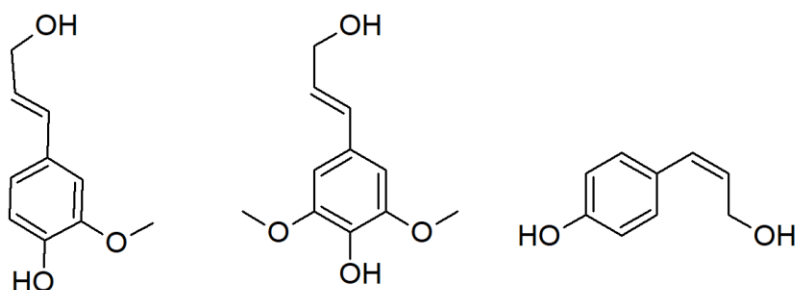
Lignin je poměrně složitý polymer, pro jehož rozklad nejsou všechny mikroorganismy dostatečně enzymaticky vybaveny. Dřevokazné houby jsou po fyziologické stránce specifickou skupinou organismů produkujících extracelulární enzymy, které se specializují na rozrušení lignocelulózového komplexu. Následně je tento komplex postupně rozkládán na jednotlivé složky, které tyto zástupci hub přímo využívají pro svoji výživu [42].

Dřevokazné houby se na základě způsobu rozkladu dřevní hmoty dělí na dvě skupiny, tj. na houby bílé hniloby (např. outkovka pestrá *Trametes versicolor*) a houby hnědé hniloby (např. hnědák Schweinitzův *Phaeolus schweinitzii*). Houby hnědé hniloby (celulózožravé houby) rozkládají jen polysacharidy a lignin ve dřevě zůstává. Houby bílé hniloby, neboli lignovožravé houby (white-rot fungi WRF), rozkládají pomocí svého enzymatického aparátu lignin přítomný v lignocelulózovém substrátu. Mineralizace ligninu probíhá v aerobním oxidačním procesu. Termín bílá hniloba byl odvozen od vzhledu napadeného dřeva těmito houbami, při kterém rozkladem ligninu dochází k blednutí houbami zpracovávaného substrátu. Zajímavé je, že oxidace ligninu nevykazuje žádný čistý energetický zisk. Lignin v důsledku toho není substrátem primárního metabolismu těchto organismů. Význam degradace ligninu je především ve zpřístupnění dřevěných polysacharidů lignocelulózového komplexu, které poskytují pro jiné organismy nepřístupný zdroj energie [42].

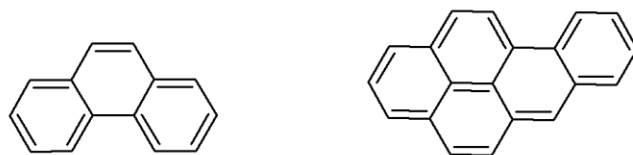
### 2.2.2 Princip eliminace xenobiotik prostřednictvím dřevokazných hub

Procesem nezbytným k eliminaci a metabolizaci xenobiotik druhu hub WRF je jejich nespecifický extracelulární ligninolytický enzymatický systém, zahrnující lakázy a peroxidázy s vysokým redoxním potenciálem. Mezi peroxidázy tohoto systému patří konkrétně ligninperoxidáza (LiP) a manganová peroxidáza (MnP). Tyto extracelulární enzymy jsou souhrnně nazývány lignin-modifikujícími enzymy (LMEs), primárně určenými k mineralizaci ligninu v dřevní hmotě. Houby bílé hniloby, a to v závislosti na druhu, vylučují jeden nebo více z těchto enzymů [42–44].

Ligninolytické enzymy dřevokazných hub bílé hniloby mají širokou substrátovou specifčnost a potenciál podílet se na transformaci a mineralizaci organických polutantů strukturně podobným molekulám prekurzorů ligninu [42]. Struktury prekurzorů ligninu a příklady strukturně podobných molekul organických polutantů, které jsou odstranitelné ligninolytickými enzymy, jsou zobrazeny na obrázku „Obrázek 9“. V minulosti byly publikovány studie zabývající se zapojením těchto ligninolytických enzymů do biologického rozkladu muničních odpadů, pesticidů, polychlorovaných bifenyly (PCB), polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), bělicích látek, syntetických barviv, syntetických polymerů a konzervačních přípravků na dřevo. Také sloužily k rozkladu farmaceutických přípravků z různých terapeutických skupin, tj. antibiotik, nesteroidních protizánětlivých látek, případně hormonů [42, 45]. Některá xenobiotika mohou být prostřednictvím WRF metabolizována také pomocí komplexu intracelulárního cytochromu P450, který má podobný význam i u savců [43, 44].

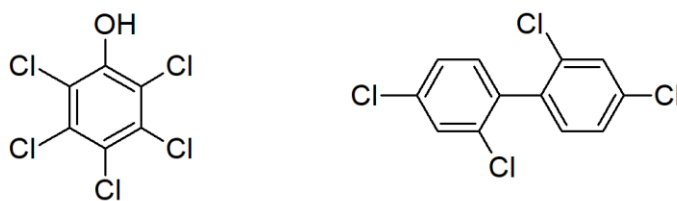


1: koniferylalkohol    2: sinapylalkohol    3: p-kumarylalkohol



4: fenanthren

5: benzo[a]pyren



6: pentachlorofenol

7: 2,2',4,4'-tetrachlorbifenylyl

*Obrázek 9: Struktury sloučenin mineralizovatelných pomocí lygnolytického aparátu WRF: prekurzory ligninu (1-3), polycyklické aromatické deriváty (4-5), halogenované sloučeniny (6-7), upraveno podle [42]*

Většina konvenčních postupů využívá k eliminaci organických polutantů z odpadních vod, a to v biologickém stupni technologické linky ČOV, především bakterie. Účinnost eliminace prováděná tímto způsobem je však často velmi nízká, případně prakticky žádná. Ve srovnání s bakteriemi představuje využití zástupců hub bílé hniloby k eliminaci těchto xenobiotik



výhody především v rozmanitosti sloučenin, které jsou schopny se oxidovat a mineralizovat [42].

Extracelulární povaha LME aparátu WRF zvyšuje biologickou dostupnost některých znečišťujících látek, které jsou pro katabolické dráhy bakterií nepřístupné. Nejvýznamnější rozdíl v bakteriálním a WRF katabolismu polutantu, zahrnující eliminaci a transformaci, je v biochemii. Bakterie obecně využívají organické polutanty jako nutriční zdroj C nebo N. Oxidace substrátu pomocí LME aparátu WRF neprodukuje žádný čistý energetický zisk. Pokud se v matici nevyskytuje jiný zdroj C nebo N, je nezbytné primární metabolismus těchto organismů dotovat zdrojem těchto prvků. Organismy WRF jsou striktně aerobní, zatímco bakterie v závislosti na druhu mohou transformovat a mineralizovat některé znečišťující látky za aerobních, mikroaerofilních i za anaerobních podmínek [42].

#### **2.2.2.1 Houba bílé hniloby: outkovka pestrá (*Trametes versicolor*)**

V České republice je outkovka pestrá (*Trametes versicolor*) běžně se vyskytující dřevokazná houba z čeledi chorošovitě. Způsobuje bílou hnilobu dřeva. Rozkládá dřevěné konstrukce, mrtvé tkáně stromů a také je častým parazitem na živých stromech. Plodnice lze najít na živých i odumřelých kmenech nebo na větvích především listnatých stromů (buk, habr, dub, vrby, třešeň). Vzácněji ji lze naléznout na kmenech jehličnanů. Tento druh dřevokazné houby se vyznačuje vysokou růstovou rychlostí, dobře snáší stresové vlivy a rychle se adaptuje na nepříznivé podmínky [46].



Obrázek 10: Plodnice outkovky pestré na pařezu [47]

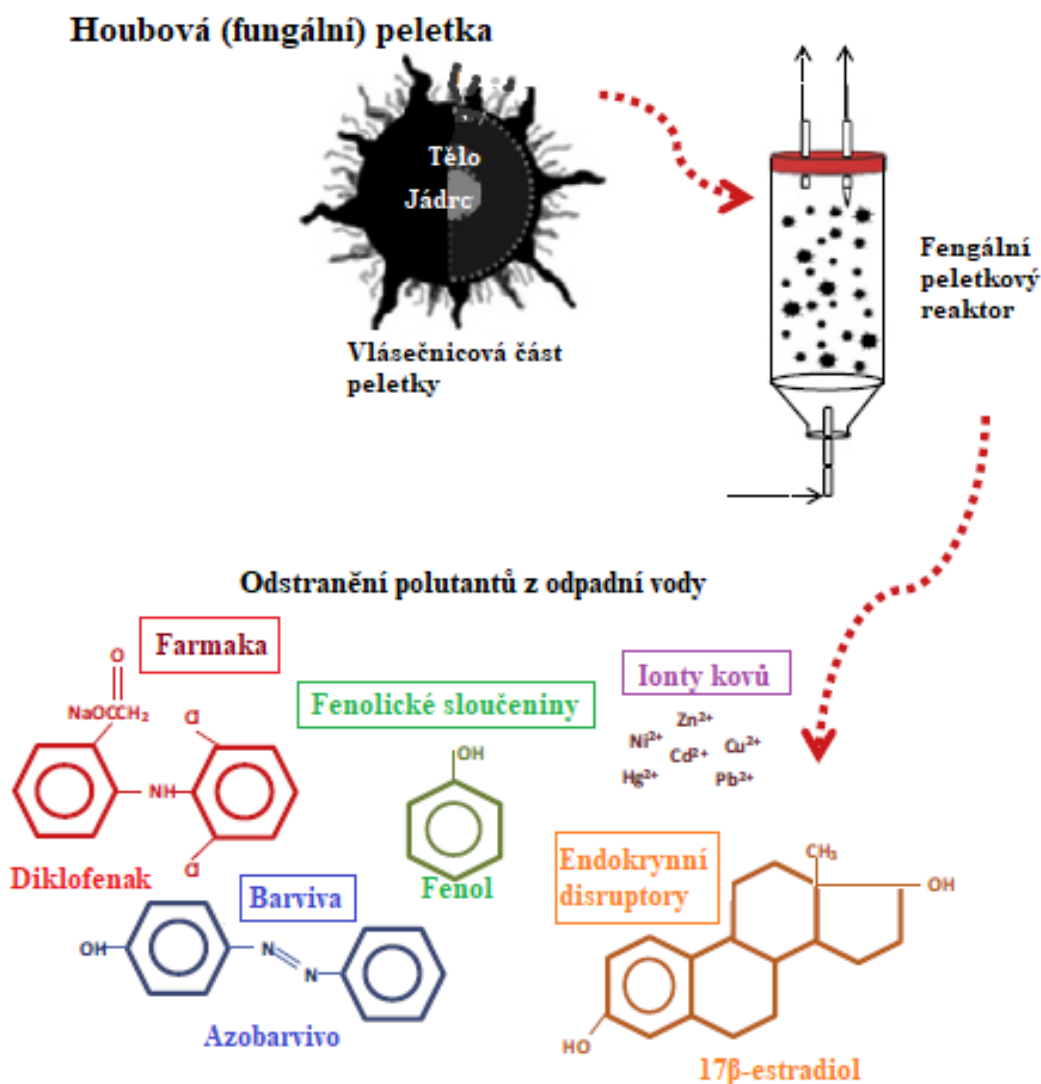
#### **2.2.3 Eliminace organických polutantů ŽP s využitím *Trametes versicolor***

Houba bílé hniloby (WRF) *Trametes versicolor* má díky svému enzymatickému aparátu potenciál k odstranění různých xenobiotik [48-51].

Byly vyvinuty dvě hlavní strategie aplikace WRF pro degradaci xenobiotik v bioreaktorech. První z nich je enzymatická terapie, prováděná za použití purifikovaných enzymů nebo výluhů z houbových kultur. Druhým přístupem je přímá degradace xenobiotik

pomocí aktivních kultur hub, především jejich mycelární formy. Hlavní výhodou používání houbových kultur spočívá v širokém spektru produkovaných enzymů podporujících další transformaci meziproductů biodegradace. Na druhou stranu použití enzymů umožňuje snadnější aplikaci a obsluhu reaktoru. V některých případech je dosahováno rychlejší a účinnější biodegradace [52].

Ve většině publikovaných studií jsou aktivní houbové kultury používány ve formě takzvaných peletek. Postupy produkce, údržby a použití těchto peletek je možné dohledat v publikovaných článcích [53, 54].



Obrázek 11: Přímá degradace xenobiotik pomocí aktivních kultur hub v peletkovém reaktoru, upraveno podle [54]

### 2.2.3.1 Eliminace bromovaných aromátů

V roce 2009 byla v časopise *Chemosphere* publikována studie zabývající se eliminací šesti bromovaných aromatických sloučenin pomocí čtyři dny starých růstových kultur *Trametes versicolor*. Významný pokles koncentrace byl pozorován již po 24 hodinách a po dalších třech dnech se koncentrace sloučenin snížily o 65 až 85 %. S nejvyšší účinností byl odstraňován 2-bromfenol [48].

### 2.2.3.2 Eliminace nitroaromátů

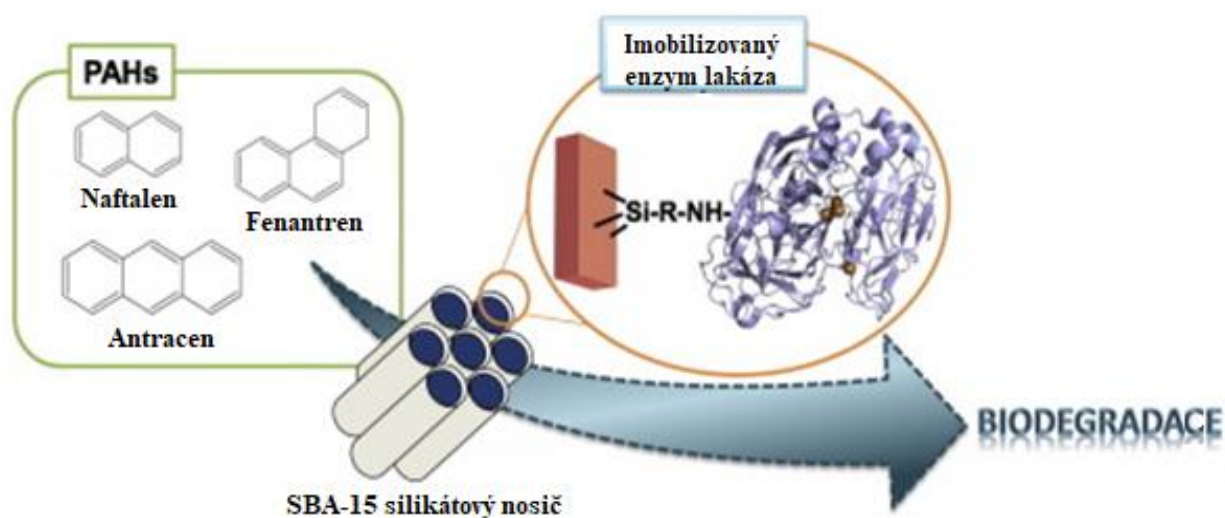
Nitroaromáty jsou považovány za toxické a karcinogenní kontaminanty ŽP. Vzhledem k přítomné nitro skupině jsou tyto sloučeniny, a to v porovnání s nesubstituovanými analogy, odolnější vůči biodegradaci. Odpadní vody obsahující tyto toxické sloučeniny je nezbytné před vypuštěním do recipientu zpracovat tak, aby došlo k jejich defenolizaci, což je cenově náročné a neposkytuje to vždy uspokojující výsledek [49].

V roce 2016 byla publikována studie zabývající se eliminací 4-nitrofenolu prostřednictvím *Trametes versicolor*; 0,5 mM 4 nitrofenolu bylo degradováno z 98,4 %, a to za méně než 96 hodin. Rovněž byla testována technika imobilizovaného mycelia *Trametes versicolor* na nosičích z přírodního pórovitého materiálu rostliny *Luffa aegyptiaca* (egyptská okurka). Obrázek průřezem tohoto materiálu je zobrazen v přílohách „Příloha 1“ „Obrázek 34“. Plod této rostliny je umístěn ve vláknitém dřevitém skeletu, který je vhodným nosičem pro pěstování mycelia WRF. Xenobiotikum 4 nitrofenol, o počáteční koncentraci 1 mM, byl při těchto testech odstraněn z 97 % za 72 hodin [49].

### 2.2.4 Eliminace polycyklických aromatických uhlovodíků

Polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (PAH) je celosvětově věnována vysoká pozornost, a to především z důvodu jejich všudypřítomnosti, dále odolnosti vůči biologickému rozkladu, potenciálu k bioakumulaci a karcinogenní aktivitě.

Lignolytické houby bílé hniloby, jako je *Trametes versicolor*, jsou schopny pomocí svého enzymatického aparátu degradovat a mineralizovat PAHs. V roce 2015 byl v časopise *Chemosphere* publikován článek zabývající se biodegradací polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí enzymu lakáza, izolovaného z *Trametes versicolor*. Lakáza byla při tomto experimentu kovalentně imobilizována na nosičích z mezoporézního oxidu křemičitého SBA-15 s aminovou funkční skupinou. Při experimentech bylo dosaženo vysokého výtěžku inkorporace enzymu na nosič, což vedlo k vynikajícím rychlostem biodegradace vybraných PAHs z vodní matrice. Po 48 hodinách bylo dosaženo 82%, 73% a 55% biodegradace naftalenu, fenantrenu a antracenu [50].



Obrázek 12: Schéma odstranění PAHs pomocí enzymatického aparátu *Trametes versicolor*, upraveno podle [50]

Tabulka 3: Krátký přehled možností eliminace organických polutantů ŽP s využitím *Trametes versicolor*

Odstraňované polutanty		Počáteční koncentrace polutantů	Forma <i>T.versicolor</i>	Délka testu	Účinnost eliminace polutantů	Zdroj
Bromované aromáty	2-bromfenol 4-bromfenolu 2,4-dibromfenol 2,6-dibromfenol 2,4,6-tribromfenol tetrabrombisfenol	1 mM	Rostoucí kultura <i>Trametes versicolor</i>	4 dny	65 – 85 %	[48]
Nitroaromáty	4-nitrofenol	0,5 mM	Start testu při stáří mycelia 7 dní od inokulace.	96 hod	98,4 %	[49]
		1 mM	Imobilizované mycelium. Stáří mycelia 19 dní od inokulace nosičů.	72 hod	97,0 %	
PAHs	Naftalen	43 mg/l	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lakáza izolovaná z <i>Trametes versicolor</i> a imobilizovaná na porézním nosiči.</li> <li>Poznámka: Počátečních koncentrací PAHs bylo dosaženo použitím povrchově aktivního činidla ke zvýšení rozpustnosti PAHs ve vodě.</li> </ul>	48 hod	82 %	[50]
	Fenantren	27 mg/l			73 %	
	Antracen	19 mg/l			55 %	

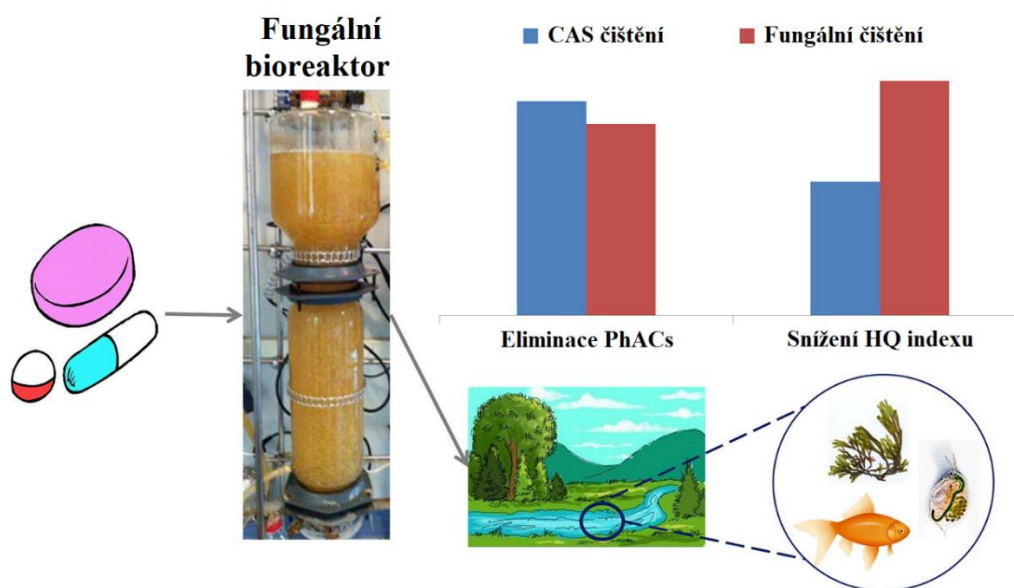
### 2.2.5 Eliminace léčiv s využitím *Trametes versicolor*

V roce 2016 byla publikována studie zabývající se odstraněním 81 léčivých přípravků (PhACs) z 18 terapeutických skupin z odpadních vod, a to s využitím biologického ošetření založeného na aplikaci *Trametes versicolor*. Testům byly podrobeny různé typy odpadních vod, konkrétně odpadní vody z univerzitního kampusu, které byly posuzované jako městské odpadní vody, dále koncentrát z reverzní osmózy aplikovaný na výtoku z městské ČOV, nemocniční odpadní vody a odpadní vody pocházející z veterinární kliniky. Vzorčky odpadních vod byly odebírány na každém odběrovém místě ve dvou vlnách, aby bylo zohledněno i různé koncentrační složení sledovaných látek ve vzorcích [38].

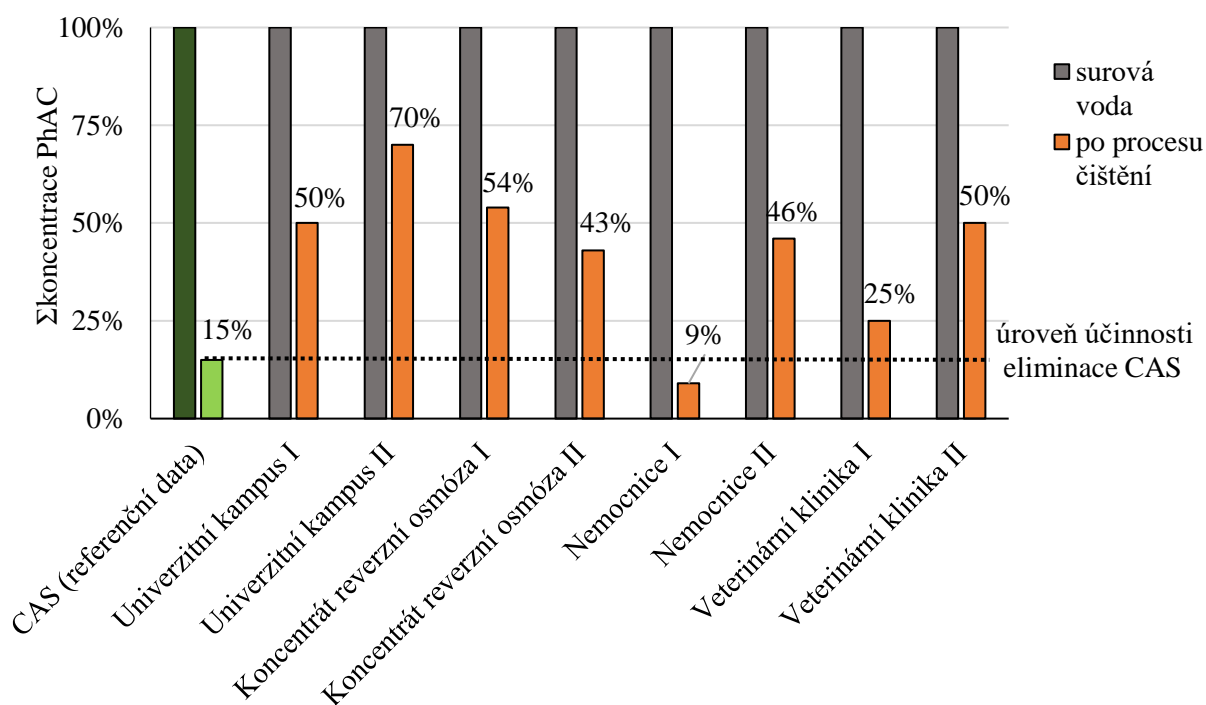
Dosažené výsledky byly porovnávány s výsledky studie zabývající se účinností eliminace léčiv z odpadních vod konvenčním způsobem zpracování, a to prostřednictvím aktivovaného kalu (CAS). K tomuto účelu byly jako referenční využity údaje z monitorovací studie [55] odpadních vod z ČOV z města, nacházejícího se v severovýchodním Španělsku. Zvolená ČOV se nacházela ve vysoce industrializované oblasti a přijímala odpadní vody také z farmaceutického průmyslu. Obě studie se zabývaly stejnými typy cílových analytů a při zpracovávání výsledků této studie byla použita stejná analytická metoda [56]. V rámci této studie rovněž byly pro každou sloučeninu, a to na základě úrovně expozice a její ekotoxicity, stanoveny i indexy nebezpečnosti HQ hodnotící environmentální rizika PhACs především na vodní organismy [38].

V průběhu experimentů byly testovány různé provozní parametry fungálního reaktoru (typ reaktoru kontinuální/pulzní přidávání živin, doba čištění atd.). Průměrná hodnota eliminace PhACs 76 %, která byla dosažená při aplikaci *Trametes versicolor*, byla mírně horší než při konvenčním způsobu

(85 %). Nicméně fungální reaktor dosahoval lepší účinky při odstraňování rizikových sloučenin, jako jsou antibiotika a psychiatrická farmaka, která byla konvenčním způsobem eliminována s velmi špatnou účinností. Takto došlo k výrazným poklesům celkového indexu nebezpečnosti  $\Sigma$ HQ zpracovávaných odpadních vod, a to až o 93 % [38].



Obrázek 13: Fungální bioreaktor, upraveno dle [38]

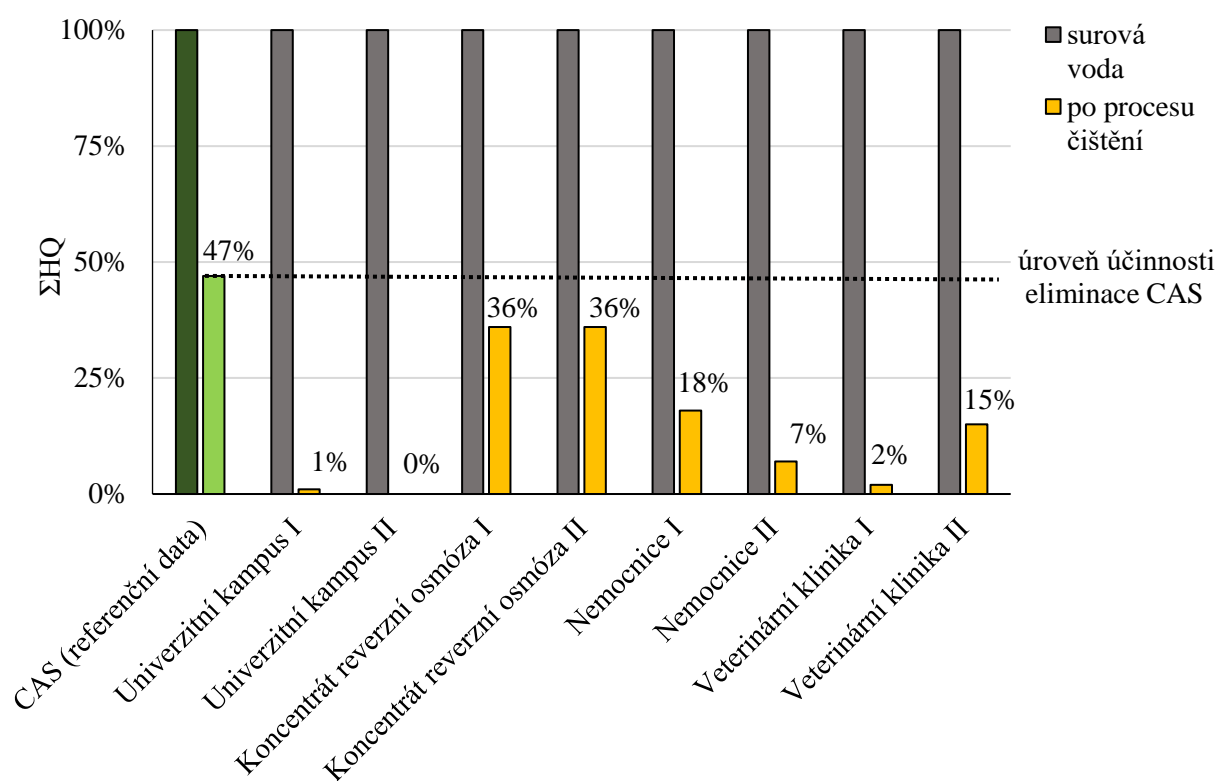


Obrázek 14: Účinnost eliminace farmaceutických přípravků z odpadních vod prostřednictvím fungálního bioreaktoru [38]

Z hodnot PNEC vyplývá, že nejvíce nebezpečnou skupinou farmaceutických látek jsou antibiotika. Hodnoty PNEC některých zástupců této terapeutické skupiny jsou extrémně nízké, v řádech jednotek, maximálně desítek ng/l. Například hodnota PNEC sulfamethoxazolu byla 2,7 ng/l. Antibiotika přispívají k celkovým hodnotám  $\Sigma$ HQ největší měrou, přestože se v odpadních vodách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Například v nemocniční odpadní vodě I a II představovala koncentrace antibiotik pouze 8 a 4 % z celkové koncentrace PhACs. Na hodnotě  $\Sigma$ HQ těchto vzorků odpadní vody se však tyto látky podílely 90 až 93 %. Naproti tomu kontrastní látka iopromid, která byla ve vzorcích nemocniční odpadní vody I a II detekována v poměrně vysokých koncentracích (14 a 67 % z celkové koncentrace PhACs), však k celkovému  $\Sigma$ HQ přispěla méně jak 1 %. Důvodem je vysoká hodnota PNEC iopromidu (256  $\mu$ g/l) [38].

Tyto publikované výsledky lze shrnout do obecného závěru, který poukazuje na to, že z environmentálního hlediska jsou nejvíce nebezpečnými odpadní vody s nezanedbatelnými koncentracemi antibiotik, to znamená především odpadní vody nemocniční a veterinární. Tato rizika, jak je vidět na níže uvedeném grafu „Obrázek 15“, lze alespoň částečně snížit metodou čištění OV pomocí zástupců WRF.

Fungální čištění OV lze proto považovat za dobrou alternativu, případně za doplňkovou metodu ke konvenčním technologickým postupům pro odstraňování PhACs z odpadních vod. Výsledky této komplexní studie však poskytují především představu o účinnosti a také o potenciálu fungálního čištění odpadních vod, protože tyto experimenty s fungálním reaktorem byly prováděny pouze v laboratorním měřítku [38].



Obrázek 15: Účinnost snížení  $\Sigma HQ$  indexu jednotlivých vzorků odpadních vod po jejich čištění prostřednictvím fungálního bioreaktoru [38]

## 2.2.6 Eliminace sulfonamidových antibiotik s využitím *Trametes versicolor*

Poměrně časté jsou studie prokazující procesy transformace a degradace SA z kapalných matric zprostředkované enzymaticky lakázami. V poslední době jsou rovněž často aplikované přístupy založené na aplikaci WRF ve formě peletek v bioreaktorech [44]. Oba dva způsoby eliminace byly celkem úspěšně aplikovány na modelových, sulfonamidy uměle kontaminovaných vzorcích vody. Přiblížení procesů a mechanismů za reálných podmínek poskytují laboratorní studie eliminace cílových analytů z reálných nesterilních odpadních vod, kde je přítomno nejen mnoho kontaminantů v koncentračním rozmezí ng/l – mg/l, ale také mikroorganismů. U nemocničních odpadních vod je toto zatížení umocněno ještě vyššími koncentracemi dalších závažných farmaceutických kontaminantů. Studií zabývajících se eliminací konkrétních sloučenin z nemocničních odpadních vod prostřednictvím *Trametes versicolor* bylo do této doby publikováno poměrně malé množství.

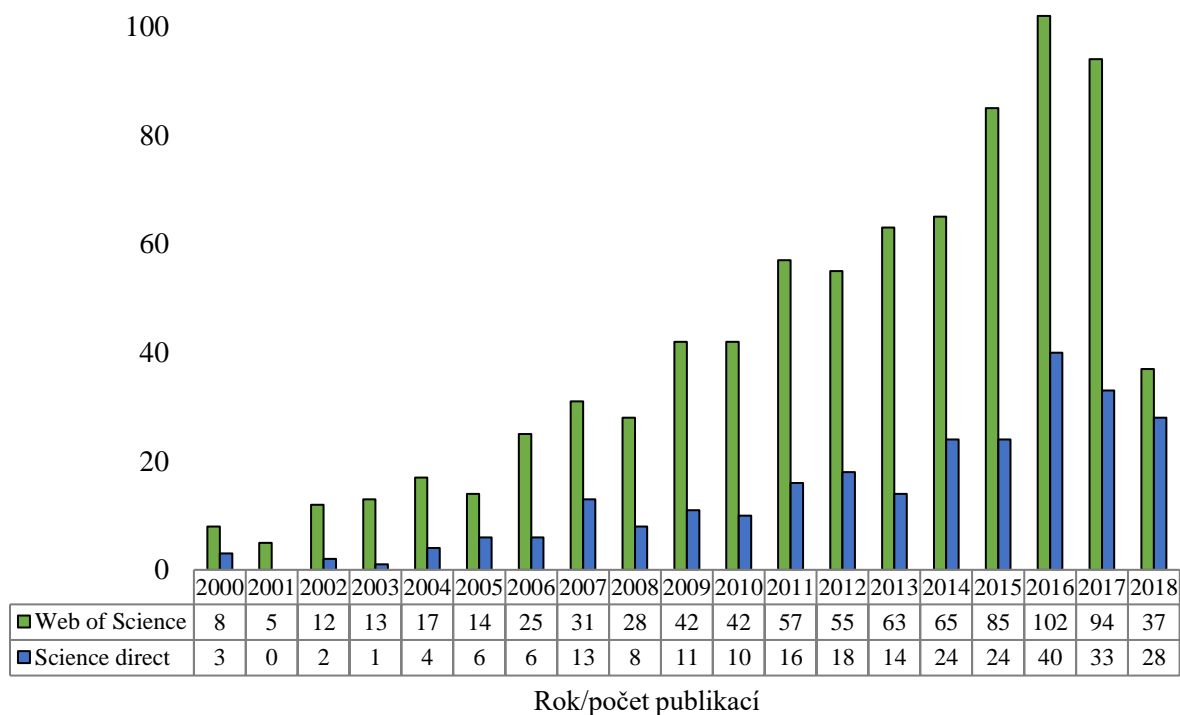
Tabulka 4: Přehled možností a účinnosti eliminace sulfonamidových antibiotik s využitím *Trametes versicolor*

Sledované polutanty		Matrice	Počáteční koncentrace	Způsob degradace	Délka testu	Účinnost eliminace	Zdroj
Směs 38 antibiotik	12 druhů SA	Modelová voda	10 µg/l každého antibiotika	Enzymatická degradace na enzymatickém membránovém reaktoru (EMR).	24 hodin	11 sulfonamidů označeno jako „vysoce odstranitelné“ s úrovní odstranění >60 %	[51]
Směs sulfonamidů	SPY STZ SMZ	Modelová voda	5 mg/l každého antibiotika	Bioreaktor s fluidním ložem z fungálních peletek. Inokulace reaktoru peletkami (sušina) 2,3 g/l.	Hydraulické zdržení 72 hodin	> 94 %	[44]
Vysoká koncentrace farmak a bakterií	SMX	Sterilní nemocniční odpadní voda	5 µg/l	Dávkovací bioreaktor s fluidním ložem s peletkami <i>Trametes versicolor</i>	8 dní	7. den testu SMX nedetekován	[57]
		Surová nemocniční odpadní voda	1,5 µg/l			6. den testu SMX nedetekován	



### 2.3 Metody stanovení sulfonamidů z akvatické matrice

Jak bylo uvedeno v předchozích kapitolách, problematice sulfonamidových antibiotik, jakožto kontaminantům životního prostředí, je v poslední době věnována velká pozornost. Že se opravdu jedná o aktuální téma, potvrzují vzrůstající počty vydaných článků. Na níže uvedeném grafu „Obrázek 16“ je znázorněn časový vývoj počtu takovýchto publikací, které je možné vyhledat v databázích *Web of Science* a *Science Direct*.



Obrázek 16: Počet vydaných článků zabývajících se sulfonamidy v ŽP v období mezi lety 2000 – květen 2018 v databázích *Web of Science* a *Science Direct* [58, 59]

Protože se sulfonamidy v různých matricích životního prostředí vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, jsou k jejich detekci, kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení zapotřebí citlivé, komplexní a zároveň vysoce selektivní analytické metody. Zejména selektivita celého analytického postupu je velmi důležitá, protože SA jsou ve většině případů environmentální analýzy akvatických vzorků sledovány společně s dalšími skupinami antibiotik a farmak. Celý analytický postup obvykle zahrnuje pět kroků, a to vzorkování, přípravu vzorků, chromatografickou separaci, detekci analytů a analýzu dat [60, 61].

Nejdůležitější částí celého analytického postupu je odběr vzorků. Hlavním problémem při odběru vzorku je jeho reprezentativnost. Chyby vznikající během kroku odběru vzorků mohou být způsobené výběrem nesprávné techniky vzorkování, špatným umístěním vzorkovače, nevhodnou frekvencí vzorkování a počtem odebraných vzorků [61]. U vzorkování environmentálních matric se obvykle shromažďují 24hodinové kompozitní vzorky. Další chyby mohou pocházet z nesprávného skladování a manipulace se vzorkem [60, 61].

V publikovaných článcích zabývajících se stanovením sulfonamidových antibiotik ve vzorcích akvatického prostředí lze nalézt různé metodické postupy pro jejich izolaci z matrice, jejich účinnou separaci a detekci.

Velmi důležitým a časově náročným krokem před vlastní analýzou je příprava vzorků k analýze, zahrnující jejich přečištění, eliminaci interferujících látek z matrice, následnou extrakci a prekoncentraci cílových analytů. V ideálním případě by měl být maximálně eliminován vliv matričního efektu při stanovení cílových analytů [61]. Pro izolaci a zakoncentrování sulfonamidů a jejich metabolitů z akvatických matric a k současnému odstranění interferujících látek je využívána především metoda extrakce na pevnou fázi (SPE) [2, 23, 24, 62, 63]. V roce 2010 *Yudthavorasit a kol.* publikovali zajímavou metodu extrakce antibiotik, včetně sulfonamidů, z akvatické matrice pomocí techniky využívající duté vlákno naplněné vhodnou sorpční vrstvou (Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction HF-LPME). Tato technika však byla použita pouze na modelové vzorky vody [64].

Po prekoncentraci cílových analytů následuje jejich separace. Většina odborných článků uvádí jako použitou techniku pro separaci sulfonamidů metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), nejčastěji v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS) nebo s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [34, 65–67]. V menší míře je používána UV detekce [68, 69] nebo fluorescenční (FLD) detekce [70]. Pouze v jednom případě se mi podařilo naleznout publikaci uvádějící jako použitou separační techniku plynovou chromatografii, aplikovanou po derivatizaci sulfonamidů diazomethanem na jejich N<sup>1</sup>-methylderiváty. K detekci byl ve zmiňovaném článku použit detektor atomové emise [71].

## 2.4 Úprava a prekoncentrace akvatických vzorků metodou SPE

V publikovaných člancích, které se zabývaly stanovením sulfonamidových antibiotik jako jedinou skupinou cílových analytů v akvatických matricích, jsou při SPE extrakci používány především kolonky Oasis HLB. SPE kolonky Oasis HLB byly často využívány také při izolaci sulfonamidů v rámci multireziduálních analýz farmakologických polutantů v akvatických matricích [2, 23, 24, 62, 63, 65]. Interakce mezi analyty a sorbentem v kolonkách typu Oasis HLB jsou silnější, pokud jsou analyty v nedisociovaném stavu. Proto je vhodné před aplikací vzorku upravit jeho pH tak, aby bylo dosaženo reprodukovatelných výtěžností cílových analytů [61]. Pro optimální retenci sulfonamidů na tomto typu sorbentu je, a to na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností (především hodnot pK<sub>a</sub>), vhodné upravit pH vzorku na hodnotu v rozmezí 2 – 5. V rámci multireziduálních analýz bylo pH akvatických vzorků upravováno na hodnoty 2,0 až 4,0. Těmito postupy bylo dosahováno poměrně dobrých výtěžností sulfonamidů izolovaných z analyzovaných matric [60].

Při úpravě vzorku pro multireziduální analýzu je před aplikací na SPE, kromě úpravy pH vzorku, také často ke vzorku přidáváno chelatační činidlo EDTA. Důvodem je vyvázání kovů do komplexních sloučenin. Sulfonamidy však komplexy s divaletními a polyvalentními kationty kovů netvoří. Znamená to, že pokud jsou cílovými analyty pouze sulfonamidy, není tato úprava vzorku tedy nutná [60].

Po aplikaci vzorku přes sorbent kolonky je vhodné provést promývací krok vhodným rozpouštědlem, a to k odstranění slabě vázaných interferujících látek. V případě sulfonamidů je v publikovaných postupech používán 5% roztok MeOH nebo ACN, které nemají dostatečnou eluční sílu a nedochází tak ke ztrátám cílových analytů. Eluce bývá nejčastěji prováděna čistým organickým rozpouštědlem MeOH nebo ACN, popřípadě těmito organickými rozpouštědly s organickými modifikátory [2, 23, 24, 62, 63].

Tabulka 5: Publikované SPE metody pro extrakci sulfonamidů z environmentálních akvatických vzorků

Sledované polutanty		Matrice	Úprava vzorku	Typ sorbentu	SPE postup	Účinnost extrakce	Zdroj
Multireziduální analýza	SDZ STZ SMZ SPY SMX N <sup>4</sup> -AcSMX	OV I. stupeň čištění (50ml)	- filtrace přes membránu z nitrátu celulózy (0,45 μm) - přidání 1 g NaCl - zředění 150 ml vody - úprava pH = 4 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Oasis HLB (6 ml/200 mg, Waters)	1) Kondicionace: - 2x1,5 ml směsi MeOH/EtAc (1/1) - 2x1,5 ml 1% NH <sub>3</sub> v MeOH (v/v) - 2x1,5 ml H <sub>2</sub> O pH = 4 2) Aplikace vzorku rychlostí <5 ml/min 3) Promytí sorbentu 1,5 ml směsí MQ/MeOH (95/5) 4) Sušení proudem dusíku 60 minut 5) Eluce: - 2x1,5 ml směsi MeOH/EtAc (1/1) - 2x1,5 ml 1% NH <sub>3</sub> v MeOH (v/v)	91 – 108 %	[24]
		OV II. stupeň čištění (250ml)				95 – 105 %	
		OV III. stupeň čištění (250ml)				93 – 106 %	
Sulfonamidová ATB	8 SA včetně SDZ STZ SMX SMR SMT	Mořská voda	- filtrace přes filtr ze skleněných vláken (1 μm) - filtrace přes membránu z acetát celulózy (0,45 μm) - úprava pH = 4 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) - 5 ml 5% Na <sub>2</sub> EDTA	Oasis HLB (3 ml/540 mg)	1) Kondicionace: - 5 ml ACN - 5 ml MilliQ pH = 4 2) Aplikace vzorku rychlostí 2 ml/min 3) Promytí sorbentu 5 ml 5% ACN 4) Sušení proudem vzduchu 30 minut 5) Eluce: - 6 ml ACN	9 – 111.2 %	[2]

Sledované polutanty		Matrice	Úprava vzorku	Typ sorbentu	SPE postup	Účinnost extrakce	Zdroj
Sulfonamidová ATB	Skupina 11 SA	Povrchová voda (250 ml)	-	Oasis HLB (500 mg/6 ml)	1) Kondicionace: - 6 ml MeOH - 6 ml MilliQ 2) Aplikace vzorku 60 ml/min 3) Promytí sorbentu 1 ml 5% MeOH 4) Sušení proudem vzduchu 30 minut 5) Eluce: 10 ml MeOH obsahující 50 mM HCOOH	87-99%	[62]
		Pitná voda (1 l)					
Multireziduální analýza	SDZ STZ SMZ SPY SMX SMR	OV z různých stupňů technologické linky ČOV (100 ml)	- úprava pH = 2 (37% HCl) - filtrace přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) - filtrace přes membránu z acetát celulózy (0,45 µm) - 400 µl 5 mg/l EDTA	Oasis HLB (200 mg/6 ml)	1) Kondicionace: neuvedeno 2) Aplikace vzorku 10 ml/min 3) Promytí sorbentu 3 ml MQ 4) Sušení proudem dusíku 15 minut 5) Eluce: 2x4ml MeOH	neuvedeno	[23]
Multireziduální analýza antibiotik (celkem 38)	Skupina 12 SA	Modelová voda po enzymatickém procesu čištění lakázou	- filtrace přes filtry s velikostí pórů 2,7 mm, 1,0 mm a 0,45 mm - úprava pH = 3 (0,1 M HCl) - 4% EDTA	Oasis HLB (60 mg, Waters)	1) Kondicionace: - 5 ml MeOH - 5 ml MilliQ 2) Aplikace vzorku 3) Promytí sorbentu: - 4) Sušení proudem dusíku 15 minut 5) Eluce: 6 ml MeOH	neuvedeno	[51]

Sledované polutanty		Matrice	Úprava vzorku	Typ sorbentu	SPE postup	Účinnost extrakce	Zdroj
Sulfonamidová ATB	Skupina 16 SA	OV přítok (250 ml)	- filtrace přes filtr ze skleněných vláken (1 µm) - Na <sub>2</sub> EDTA (0,5 g/l)	Oasis HLB, (500 mg/6 ml)	1) Kondicionace: - 6 ml dichlormethan (DCM) - 6 ml MeOH - 12 ml 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2) Aplikace vzorku 3) Promytí sorbentu: 10 ml MQ 4) Sušení proudem dusíku 5) Eluce: - 6 ml DCM/MeOH (2/1;v/v)	neuvedeno	[65]
		OV odtok (500 ml)					
		Říční voda (1 l)					

## 2.5 Finální analýza sulfonamidů

### 2.5.1 Kapalinová chromatografie

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, jako separační technika při analýze vzorků obsahující SA je téměř výhradně aplikována metoda kapalinové chromatografie.

Nejčastěji využívaným typem chromatografických separačních kolon jsou kolony C18, a to jak pro separaci SA jako jediné cílové skupiny analytů, tak i při multireziduální analýze farmak izolovaných z různých typů akvatických matric. Ojedinele bylo v literatuře také zmiňováno použití kolon C12, C8 nebo HILIC [60, 72–74]. V literatuře jsou publikovány postupy separace antibiotik uvádějící použití chromatografických kolon pro HPLC, s velikostí částic stacionární fáze většinou 3 nebo 5  $\mu\text{m}$ , ale také UHPLC kolon, s velikostí částic stacionární fáze  $<2 \mu\text{m}$ . Hlavní výhodou UHPLC separace je především zvýšení separační účinnosti a citlivosti analytického postupu a také snížení mezí detekce [60, 72].

Jako mobilní fáze byla při separaci SA ve většině publikovaných studií použita směs MeOH nebo ACN s vodou. Jak je běžné u separace vzorků izolovaných z environmentálních matric, eluce analytů byla prováděna ve většině případů gradientem mobilní fáze. Jednotlivé složky mobilní fáze jsou v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech analytů a na použitém typu detekční metody běžně upravovány modifikátory. Při MS detekci je ionizace analytů a tím citlivost metody zvyšována úpravou pH mobilní fáze těkavými látkami, jakými jsou kyselina mravenčí, kyselina octová nebo octan amonný. V případě nutnosti modifikovat pH mobilní fáze při UV detekci se jako vodná složka mobilní fáze používá zejména fosfátový pufr [60, 72].

### 2.5.2 Detekce sulfonamidů po chromatografické separaci

Jednou z metod detekce sulfonamidů je měření jejich fluorescence. Sulfonamidy nejsou přirozeně fluoreskující sloučeniny. Mohou však být snadno derivatizovány fluoreskaminem za vzniku vysoce fluorescenčních derivátů. FLD s pre-kolonovou derivatizací byla využita ve studii zabývající se stanovením SA v povrchové vodě [70].

Další metodu detekce představuje měření sulfonamidy absorbovaného UV záření při 260 nebo 272 nm [68, 69]. V některých studiích byla UV detekce využita pouze jako pomocná metoda pro optimalizaci podmínek chromatografické separace. Pro detekci analytů z reálných environmentálních vzorků již byla využita MS detekce.

Nejvíce využívanou detekční technikou sulfonamidů je hmotnostně spektrometrická detekce (MS), případně tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Metody HPLC-UV nebo HPLC-FLD nedosahují při stanovení SA tak dobré citlivosti, v porovnání s MS detekcí.

### 2.5.3 Spojení LC-MS a LC-MS/MS

Pro LC-MS a LC-MS/MS analýzu farmak jsou nejčastěji využívány dvě ionizační techniky, tj. elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) [60]. Tyto techniky pracují za atmosférického tlaku, což je vhodné pro připojení k systému HPLC. Jedná se o měkké ionizační techniky produkující protonizované  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , popřípadě deprotonizované  $[\text{M}+\text{H}]^-$  ionty. Iontový zdroj ESI je vhodný pro ionizaci polárních i nepolárních analytů a také termolabilních látek [61]. Protože mnoho antibiotik jsou netěkavé látky s vysokou molekulovou hmotností, je pro jejich ionizaci upřednostňována technika ESI, a to především vzhledem ke

své vyšší citlivosti a lepší reprodukovatelnosti. Sulfonamidy mohou tvořit  $[M+H]^+$  i  $[M+H]^-$  ionty. Při jejich ionizaci je však upřednostňován výhradně pozitivní ionizační mód (ESI<sup>+</sup>) při MS i MS/MS detekci [60].

Jako analyzátor při LC-MS/MS analýze antibiotik, byl v literatuře nejčastěji uváděn trojitý kvadrupól, nastavený v režimu monitoringu vybraných reakcí SRM (Selected Reaction Monitoring) [60]. Při použití SRM módu je nejprve v prvním kvadrupólu (Q1) selektován vybraný prekurzorový iont, který je následně fragmentován v druhém kvadrupólu (q2) sloužícím jako kolizní cela. Vybraný fragment (produktový iont) je potom analyzován ve třetím kvadrupólu (Q3). Pro kvantifikaci antibiotik ve vzorku slouží při MS/MS detekci nejintenzivnější fragmentový iont. Druhý nejintenzivnější fragmentový iont slouží jako druhé kritérium pro potvrzení předpokladu strukturní identifikace původní molekuly. Výhodou tohoto režimu je vysoká přesnost a citlivost analýzy, nevýhodou je nemožnost skenování plného rozsahu spektra a neumožňující identifikace a detekce dalších neznámých sloučenin [61]. MS/MS je technika vhodná pro identifikaci stabilních metabolitů antibiotik. Těchto metabolitů se v environmentálních vzorcích vody může vyskytovat nezanedbatelné množství, které však nelze jednoduššími detekčními technikami s jistotou identifikovat a kvantifikovat. Mnohdy však mohou být tyto metabolity nebezpečnější než původní molekula léčiva.

Jak je zřejmé z tabulky „*Tabulka 6*“, protonované molekulové ionty sulfonamidových antibiotik  $[M+H]^+$  se obecně považují za nejlepší prekurzorové ionty pro MS/MS detekci. Sulfonamidy poskytují při MS/MS specifické fragmentové ionty 92 m/z  $[M-RNH_2-SO_2]^+$ , 108 m/z  $[M-RNH_2-SO]^+$  a 156 m/z  $[M-RNH_2]^+$  [60].

#### 2.5.4 Kvantifikace sulfonamidových antibiotik pomocí MS detekce

Při analýze reálných environmentálních vzorků je pro zlepšení přesnosti kvantifikace analytů vhodné použít interní standardy (IS). Při MS detekci analytů ze složitých environmentálních vzorků, jako je například odpadní voda, může vlivem konkurenční ionizace dalších látek z matrice docházet ke snižování odezvy cílových analytů, čemu je vhodné se vyvarovat. K tomuto účelu je nejvhodnější použít látky, které se v prostředí, případně v analyzované matrici, přirozeně nevyskytují. Zároveň by tyto látky měly mít podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (struktura, ionizační účinnost). Nejpřesnějším postupem je použití izotopicky značených standardů analytů (<sup>2</sup>D, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N). Přítomnost těžších izotopů některých prvků v molekule IS způsobuje posun m/z ve spektru, čímž dochází k odlišení signálu IS od neznačené látky. Interní standardy se většinou k analyzovanému vzorku přidávají již před jeho zpracováním. Tímto způsobem je kromě snížení odezvy analytů na detektoru korigována také účinnost extrakce a ztráty analytů, ke kterým dochází v průběhu celého analytického postupu [61].

V případě sulfonamidů bylo v literatuře nejčastěji zmiňováno použití <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-sulfamethazinu jako IS. Dále se používají deuterované standardy jako například D<sub>4</sub>-sulfadiazin, D<sub>4</sub>-sulfathiazol, D<sub>4</sub>-sulfametroxazol a D<sub>4</sub>-sulfadimethoxin, jejichž použití způsobí posun m/z ve spektru o +4 m/z od příslušné neznačené látky [60].

Tabulka 6: Publikované HPLC metody pro stanovení sulfonamidů z environmentálních akvatických vzorků

Sledované polutanty		Matrice/ úprava vzorku	Stacionární fáze, charakteristika chromatografické kolony	Eluce/Mobilní fáze	Ionizace, detekce	Prekursor iontů	Interní standard	LOD/LOQ	Zdroj
Sulfonamidová ATB	14 SA včetně SMX, STZ, SDZ, SMR, SMZ	Odpadní voda (OV)	Symmetry C <sub>18</sub> (150 mm×2,1 mm, 3,5 μm) (20°C)	Gradient MF	ESI <sup>+</sup> , MS/MS (SRM)	[M+H] <sup>+</sup>	–	LOQ = 1 – 3 ng/l	[66]
		SPE		A: 0.2% FAc v MeOH B: 0.2% FAc (MQ)					
Sulfonamidová ATB	16 SA + TMP včetně SMX, STZ, SDZ, SMR, SPY	OV odtok, přítok	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> (100 mm×2,1 mm, 1,7 μm) (40°C)	Gradient MF	ESI <sup>+</sup> , MS/MS (SRM)	[M+H] <sup>+</sup>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -SMZ	LOD: 20–200 pg/l (OV přítok) 16–120 pg/l (OV odtok) 80–60 pg/l (říční voda)	[65]
		Říční voda		A: MeOH B: 0.1% FAc (MQ)					
		SPE							
Sulfonamidová ATB	8 SA včetně SDZ, SPY, SMZ, STZ, SMR	OV	SPE: XTerra MS C <sub>18</sub> (250 mm×2,1 mm, 3 μm) (35 °C) SPME: Ultracarb ODS C <sub>18</sub> (150 mm×4,6 mm, 5 μm) (35 °C)	Gradient MF	ESI <sup>+</sup> , MS/MS (SRM)	[M+H] <sup>+</sup>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -SMZ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> -kofein	LOD: 2.88–9.00 ng/l (SPE) 9.04–55. μg/l (SPME)	[67]
		SPE a SPME		A: 20mM octan amonný v 0,1% HCOOH, pH 3.0 B: 20mM octan amonný ve směsi ACN/MeOH 2/1					
Sulfonamidová ATB	4 SA Včetně SMZ	Podzemní voda	BetaBasic-18 C <sub>18</sub> (100 mm×2,1 mm, 3 μm) 30 °C)	Gradient MF	ESI <sup>+</sup> , MS/MS (SRM)	[M+H] <sup>+</sup>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -SMZ	LOD = 20 – 70 ng/l LOQ = 70 – 240 ng/l	[34]
		SPE		A: ACN B: 0,3% HCOOH (MQ)					



Tabulka 6 (pokračování): Publikované HPLC metody pro stanovení sulfonamidů z environmentálních akvatických vzorků

Sledované polutanty		Matrice/ úprava vzorku	Stacionární fáze, charakteristika chromatografické kolony	Eluce/Mobilní fáze	Detekce	Interní standard	LOD/LOQ	Zdroj
Sulfonamidová ATB	6 SA včetně SDZ	Povrchová voda	LiChrospher 100 RP-C <sub>18</sub> (250mm × 4mm, 5μm)	Gradient MF	FD (405 a 485 nm) (pre-colonová deprivatizace)	–	LOD = 1 – 8 ng/l	[70]
		SPE		A: 10mM acetyloctová kyselina, pH 3.4, B: ACN				
Sulfonamidová ATB	SDZ, STZ, SPY, SMZ, SMX	OV	Diamonsil-C <sub>18</sub> (250 mm×4.6mm, 5 μm)	Gradient MF	UV detekce (260 nm)	–	LOD = 0,15 – 0,35 μg/l	[68]
		Povrchová voda		A: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pufr, pH = 3,4 B: ACN/MQ (75/25)				
		SPE						
Sulfonamidová ATB	8 SA včetně SDZ, STZ, SMZ	OV z chovu prasat	Supelcosil-C <sub>18</sub> (250 mm×4,6 mm, 5 μm) (35 °C)	Gradient MF	UV detekce (272 nm)	–	LOD = 5 – 7,5 ng/l	[69]
		SPE		A: 0.5% acetyloctov27asatZ, SMXkte B: ACN				

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy HR-120-EC, a & D Instruments Ltd.

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Millipore QGARD, Academic

pH metr InoLab WTW series, Nameko, ČR

Ultrazvuková vodní lázeň Kraintek 5

Přístroj pro sušení pod dusíkem Evaterm, LABICOM s. r. o.

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series

- Kolona Kinetex C18 délka 150 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$
- Kolona Ascentis Express C18 délka 150 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu\text{m}$
- Kolona Ascentis Express HILIC délka 150 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu\text{m}$

Hmotnostní spektrometr Agilent Ion Trap 6320 LC/MS

Generátor dusíku Peak Scientific

SPE extraktor SUPELCO a J. T. Baker

Vakuová pumpa KNF LAB LABOPORT

SPE kolonky:

- Supel Select HLB 200 mg, 6 ml
- Oasis HLB 60 mg/3 ml
- Supelclean™ ENVI – 18 500 mg, 6 ml

Filtry:

Munktell papírový filtr, průměr 125 mm, plošná hmotnost 84  $\text{g/m}^2$

Filtry se skleněnými vlákny NM GF 1, průměr 55 mm, Macherey-Nagel, Německo

Stříkačkové filtry PTFE, 0,45  $\mu\text{m}$ , průměr 13 mm, Labicom s.r.o

Stříkačkové filtry Nylon, 0,22  $\mu\text{m}$ , průměr 13 mm, Chromservis

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 3.2 Používaný software pro zpracování dat

MS Excel 2007

MS Word 2007

Chemstation for LC 3D systems Rev. B.01.03-SR2

6300 Series TrapControl Version 6.2

6300 Series DataAnalysis Version 6.2

### 3.3 Použité chemikálie a standardy

#### 3.3.1 Chemikálie

Methanol – Chromasolv®, for HPLC o čistotě  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich

Methanol – LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich

Acetonitril – LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí o čistotě  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich

Mravenčnan amonný čistotě  $\geq 99$  %, p. a., Fluka

Octan amonný o čistotě  $\geq 99$  %, p. a., Fluka

### 3.3.2 Plyny

Dusík – 4.7 Siad Czech spol. s r. o.

Helium – 6.0 Linde gas a. s.

### 3.3.3 Standardy

Sulfapyridin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfadiazin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfathiazol – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfamethoxazol – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfamerazin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfamethazin – Sigma Aldrich, čistota  $\geq 99$  %

Sulfathiazol-d4 – Toronto Research Chemicals

Sulfamethoxazol-d4 – Neochema GmbH, 100  $\mu\text{g/ml}$  v MeOH

## 3.4 Sledovaná matrice

### 3.4.1 Odpadní voda

Analyzovaná odpadní voda byla odebírána z velkokapacitní ČOV Brno-Modřice.

#### 3.4.1.1 *Eliminace sulfonamidových antibiotik na ČOV Brno-Modřice*

V rámci experimentální práce bylo provedeno osmidenní sledování koncentrační úrovně sulfonamidových antibiotik v odpadní vodě odebrané z ČOV Brno-Modřice. Aby mohla být posouzena případná účinnost eliminace těchto xenobiotik na ČOV s níže specifikovaným technologickým uspořádáním, probíhalo vzorkování vždy na přítoku i na odtoku ČOV. Analyzované vzorky odpadní vody byly odebírány v termínu 16. 4. – 23. 4. 2018, vždy se jednalo o 24 hodinové slévané vzorky.

#### 3.4.1.2 *Technologická specifikace ČOV Brno-Modřice*

ČOV Brno-Modřice je mechanicko-biologická čistírna s maximální kapacitou 515 000 EO. Maximální denní přítok odpadních vod je dimenzován na 137 000  $\text{m}^3$ .

Primární – mechanický stupeň čištění je tvořen z lapáku šterku, česle a lapáku písku vybaveným provzdušňováním k separaci tuku. Odtud voda dále natéká do usazovacích nádrží, kde dochází k sedimentaci primárního kalu. Usazovací nádrže jsou vybaveny pojezdy se shrabovacím zařízením primárního kalu a se stíráním plovoucích nečistot. Biologický stupeň je řešen jako aktivace s předřazenou denitrifikací a anaerobní defosfatací. Zbytek biologicky neodbouraného fosforu je srážen chemicky. Z aktivace voda dále natéká do dosazovacích nádrží, kde dochází k separaci vyčištěné vody od aktivovaného kalu. Usazený kal je shrabovacím zařízením stírán do kalového prostoru a recirkulován přes čerpací stanici vratného kalu do denitrifikační zóny aktivace pro odstranění zbytkových dusičnanů. Z dosazovacích nádrží je vyčištěná odpadní voda odváděna přes objekt odtoku do recipientu – řeka Svratka. Objekt odtoku je vybaven měřením množství a kvality vody, odváděné do recipientu [75].

Primární kal a přebytečný biologický kal je zpracováván v rámci kalového a plynového hospodářství. Kalové hospodářství zahrnuje zahušťovací nádrž a flotační jednotku k zahuštění kalu a dále vyhnívací nádrže. Vyhnílý kal je strojně odvodňován a následně sušen při teplotě 105 °C. Bioplyn vznikající při vyhnívání kalu je veden do plynojemu a po odsíření je spalován v plynových motorech. Tyto plynové motory o výkonu 1 000 kW slouží ke kogenerační produkci elektrické a tepelné energie využívaných v areálu ČOV [75].

### 3.4.2 Modelová voda

Jedním ze zadaných cílů diplomové práce bylo ověřit účinnost eliminace sulfonamidových antibiotik z vodního ekosystému pomocí hub, konkrétně dřevokazné houby *Trametes versicolor*. K tomuto účelu sloužila pitná voda, uměle kontaminovaná směsným zásobním roztokem sledovaných sulfonamidových antibiotik (sulfapyridin, sulfathiazol, sulfadiazin, sulfamethoxazol, sulfamethazin, sulfamerazin). Tímto způsobem byly připraveny tři koncentrační úrovně sulfonamidových antibiotik v modelové vodě, a to 1 mg/l, 100 µg/l a 20 µg/l každého antibiotika.

## 3.5 Eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí *Trametes versicolor*

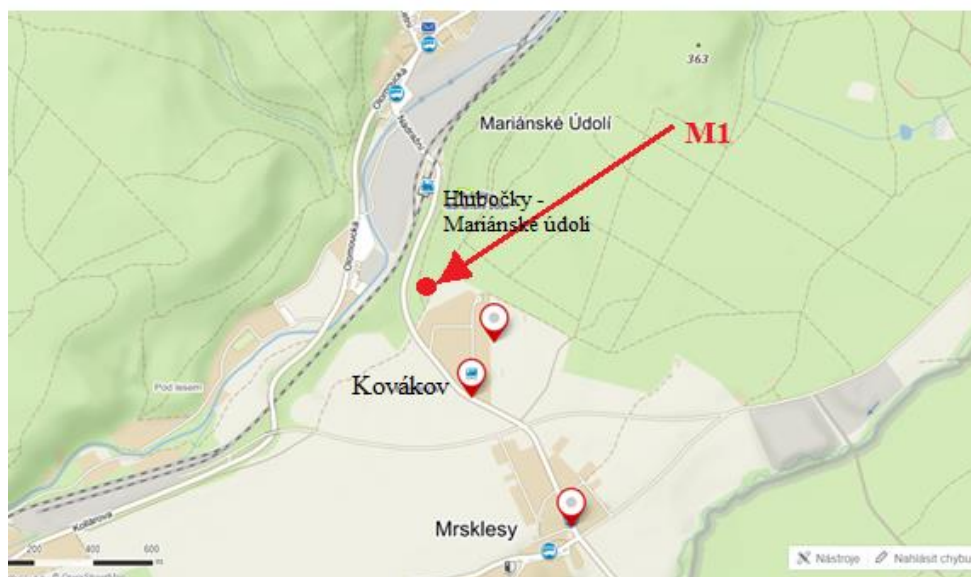
Tato část experimentální práce byla zpracovávána v rámci mezifakultní spolupráce s Ing. Adélou Žižlavskou z Fakulty stavební VUT Brno, Ústavu vodního hospodářství, která se při zpracování své dizertační práce na téma „*Odbourávání vybraných xenobiotik z městských odpadních vod*“ zabývala netradiční technikou odbourávání xenobiotik z odpadních vod pomocí dřevokazných hub druhu *Trametes versicolor*. Navrhla nový, dosud nepublikovaný způsob provedení experimentu, který je jedinečný ve způsobu pěstování a formě použití *Trametes versicolor*.

K účelům základního výzkumu prováděného v laboratorním měřítku byla jako cílová skupina sledovaných xenobiotik zvolena skupina sulfonamidových antibiotik (sulfapyridin, sulfathiazol, sulfadiazin, sulfamethoxazol, sulfamethazin, sulfamerazin). K ověření účinnosti této techniky bylo nutné navrhnout a optimalizovat metodu stanovení vybraných analytů izolovaných z akvatické matrice. Na základě studia literatury a výsledků dosažených při primárních experimentech bylo nutné také navrhnout metodiku dalšího testování tak, aby výsledky dosažené v základním výzkumu byly reprodukovatelné a bylo z nich možné vyvodit relevantní závěry.

### 3.5.1 Popis experimentu

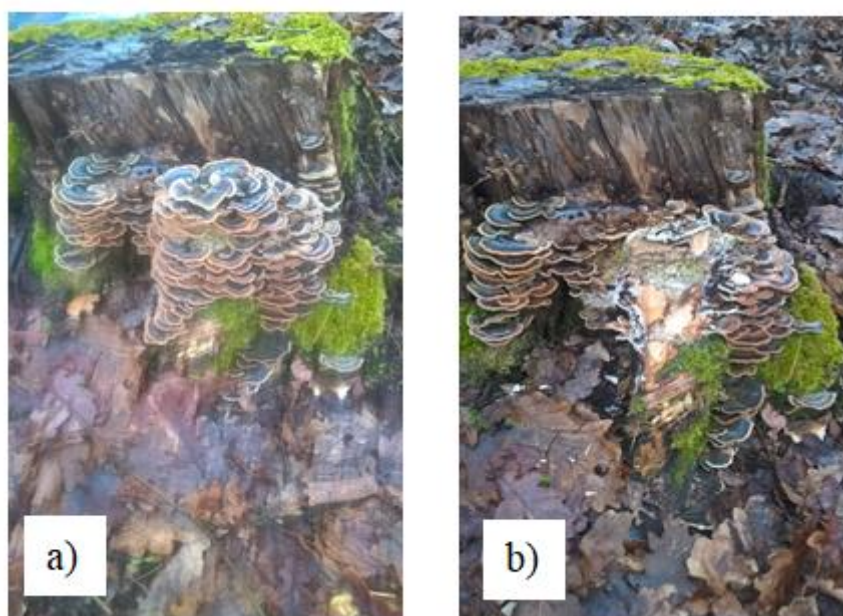
#### 3.5.1.1 Sběr plodnic *Trametes versicolor*

K provedení experimentu byly použity plodnice dřevokazné houby *Trametes versicolor*, které byly vypěstovány Ing. Adélou Žižlavskou. Sběr plodnic proběhl ve čtvrtek 15. 3. 2018 v 6:30 hod, při teplotě okolního vzduchu 4,5 °C v lokalitě M1 – les mezi částí obce Mrsklesy-Kovákov a obcí Hlubočky-Mariánské údolí (Olomoucký kraj).



Obrázek 17: Poloha odběrného místa M1 [76]

Plodnice hub *Trametes versicolor* byly odebrány z pařezu dubu letního (*Quercus robur*) s velmi vzrostlým pokryvem tohoto druhu dřevokazné houby. Plodnice houby *Trametes versicolor* se jako cizopasníci na pařezech listnatých stromů v této lokalitě vyskytují velice často. Mateřské plodnice byly odebrány sterilizovaným nožem do čistého uzavíratelného sáčku a pečlivě označeny. Protože sběr mateřských plodnic hub proběhl za poměrně nízkých venkovních teplot, bylo nutné provést nejprve aklimatizaci plodnic hub na podmínky, při kterých byly následně prováděny experimenty. Ihned po sběru byly plodnice ponechány v podmínkách venkovního prostředí. Potom byly přemístěny do prostředí s teplotním rozdílem 10 °C oproti venkovním teplotám a dále byly přemístěny do prostředí s okolní pokojovou teplotou. Po celou dobu aklimatizace byly mateřské houby uloženy ve vzorkovacích sáčcích a zdržení v každé teplotní zóně bylo minimálně 7 hodin. Následně byly odebrané plodnic hub transportovány do laboratoře výzkumného centra AdMaS, kde byly zváženy [47].



Obrázek 18: Pařez dubu letního a) před odběrem, b) po odběru plodnic *Trametes versicolor* [47]

### 3.5.1.2 Nosiče houbového mycelia

Před zahájením vlastních experimentů eliminace sulfonamidových antibiotik z akvatické matrice bylo vždy nutné provést inokulaci nosiče houbou *Trametes versicolor* a nechat na něm vytvořit dostatečné množství houbového mycelia. Byly aplikovány dva postupy inokulace, při kterých byly využity 2 typy nosičů mycelia:

#### A) SUBSTRÁT V KOŠÍCH

Pro první experimenty možnosti eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí hub WRF byl navržen postup použití mycelia *Trametes versicolor* vypěstovaného v koši naplněném substrátem, který tvořily piliny, kusy lepenky, zbytky dřevní hmoty a čedičové kostky. Substrát v tomto uspořádání testu plnil funkci nosiče houbového mycelia.

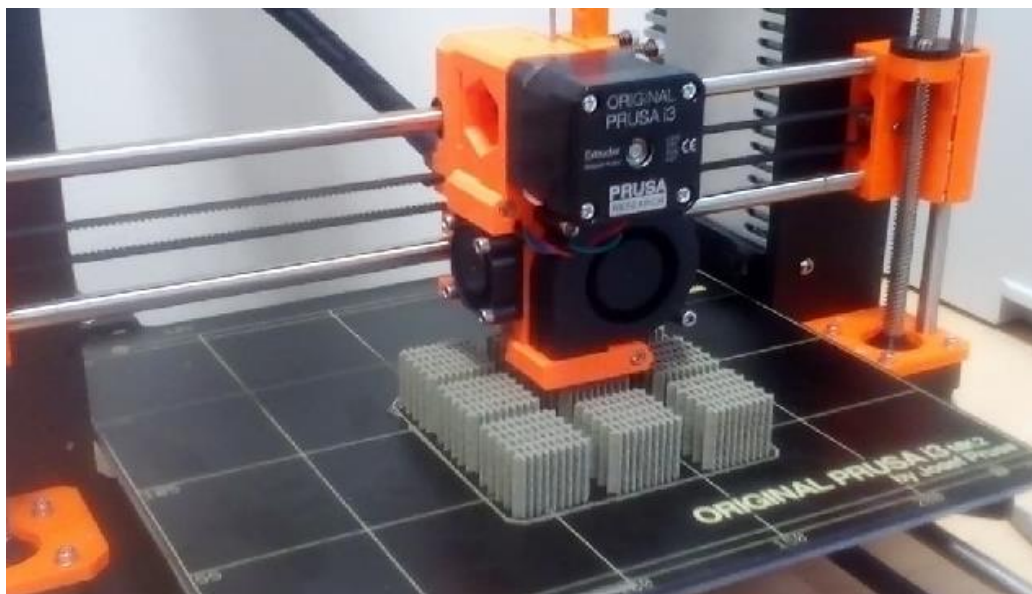


Obrázek 19: Substrát použitý jako nosič houbového mycelia v koších [47]

#### B) 3D KOSTKY

Jako nosiče houbového mycelia byly v tomto případě použity krychle o velikosti 25x25x25 mm s vnitřní mřížkou, vytištěné na 3D tiskárně z materiálu Timberfill® o průměru 1,75 mm barvy Champagne od firmy Fillamentum. Tento materiál obsahuje cca 1/3 dřevní hmoty z javoru, borovice a pekanového ořechu, zbytek materiálu je tvořen PLA (polylactic acid, kyselina polylactonová), což je biodegradabilní polymer vyráběný z kukuřičného škrobu. Zmiňovaný materiál se ze všech testovaných pro růst a účely pěstování houbového mycelia ukázal jako nejvhodnější [47].

Tisk 3D nosičů provedla Ing. Adéla Žižlavská v laboratoři výzkumného centra AdMaS na 3D tiskárně ORIGINAL PRUSA i3 MK2.



Obrázek 20: Tisk nosičů houbového mycelia z materiálu Timberfill® na 3D tiskárně

### 3.5.1.3 Inokulace nosičů houbového mycelia

#### A) SUBSTRÁT V KOŠÍCH

Nejprve byla provedena inokulace kousků lepenky mateřskou houbou ve sterilizovaných nádobách opatřenými víčkem s odvětráním, které byly umístěny ve tmě při pokojové teplotě. Lepenka byla udržována neustále vlhká. Po 7 dnech inokulace byly pláty lepenky přemístěny do plastového koše, který byl vyložen perlínkou. Do koše byla následně vložena náplň z kostek čedičové vaty, sloužící pro zadržení vlhkosti, piliny, kusy dřevní hmoty a další lepenka. Koše s tímto substrátem byly 2-3 x týdně zkrápěny pitnou vodou za účelem nárůstu *Trametes versicolor*. Přibližně po 7 dnech zapěstování byl koš připraven k zahájení testování. Dále byl připraven jeden koš, jehož substrát byl přímo inokulován odřezanou částí dřevní hmoty s plodnicemi *Trametes versicolor* [47].

#### B) 3D KOSTKY

Inokulace nosičů houbového mycelia vytištěných na 3D tiskárně byla prováděna v laboratoři výzkumného centra AdMaS. Do každé sterilní inokulační nádoby o celkovém objemu 500 ml byly vždy vloženy 3 kusy nosiče o rozměru 25x25x25 mm. Mateřské plodnice houby druhu *Trametes versicolor* byly naporcovány na kousky o velikosti maximálně 2x2,5 cm. K nosičům v inokulačních nádobách bylo vždy vloženo 5 mg takto připravených plodnic hub a následně bylo do každé nádoby přidáno 20 ml agarovo-glukózového roztoku. Agarovo-glukózový roztok byl připraven přidáním 10,0 g glukózy a 15,0 g agaru do 1 litru destilované vody. Inokulační nádoby byly opatřeny alobalovým překrytím s odvětráním a zavíčkovány sterilními víčky; na odvětrání byl přiložen filtr z buničité vaty. Následně byly nádoby uloženy do temna a uchovávány při teplotách do 20 °C. Kontrola růstu mycelia byla prováděna každé 3 až 4 dny. V kontrolní den bylo do inokulačních nádob vždy přidáno 5 ml agarovo-glukózového roztoku a změřeno pH inokulační média (agarovo-glukózový roztok obohacený o vyluhovatelné látky z mateřských plodnic hub, obsahující i volné mycelium) [47].

Mycelium použité pro účely experimentů bylo staré 11 dnů ode dne inokulace nosičů [47].



Obrázek 21: Inokulace nosičů houbového mycelia vytištěných na 3D tiskárně: a) porcování plodnic hub, b) umístění nosičů a plodnic hub v inokulačních nádobách, c) připravené inokulační nádoby [47]

#### 3.5.1.4 Test eliminace sulfonamidových antibiotik

##### A) SUBSTRÁT V KOŠÍCH

Byla sestavena poloprovozní jednotka určená ke zkrápění nosičů mycelia v koších. Zkrápění substrátu probíhalo 4 litry kohoutkové vody kontaminované sulfonamidovými antibiotiky ve třech cyklech, přičemž každý cyklus trval přibližně 7-9 minut. K přečerpávání vody bylo použito akvarijní čerpadlo [47].

##### B) 3D KOSTKY

Navržený postup eliminace sulfonamidových antibiotik byl testován jak na modelové vodě obsahující sulfonamidová antibiotika, tak na vzorcích odpadní vody. Vlastní test probíhal ve stejných nádobách, kde probíhala inokulace nosičů. Před přidáním vzorku modelové případně odpadní vody k nosičům houbového mycelia a zahájením testu však bylo vždy provedeno několik úkonů: fotodokumentace, pozorování a zaznamenání barvy zbylého inokulačního média, zhodnocení a poznamenání si množství nakultivovaného mycelia, odsátí zbylého inokulačního média z inokulační sklenice a orientační zjištění jeho pH.

Do takto připravených nádob bylo k nosičům houbového mycelia nalito vždy 250 ml testovaného vzorku (modelová/odpadní voda) o určité koncentraci sulfonamidových antibiotik. Aby bylo zabráněno fotodegradaci sledovaných analytů, byly nádoby s testovaným médiem umístěny do tmy do termostatu, kde byly uchovávány při stabilních teplotě 25 °C. Pro zachování stabilních podmínek byl sledován odpar kapaliny a objem vzorku byl dle potřeby doplňován pitnou vodou na počátečních 250 ml.



Testování eliminace sulfonamidových antibiotik myceliem *Trametes versicolor* kultivovaného na 3D nosičích probíhalo v několika fázích. Nejprve byl proveden **printscreen test** sloužící k odstranění sulfonamidových antibiotik z modelové vody. Tento test byl proveden za účelem základní představy o účinnosti eliminace sulfonamidových antibiotik z akvatického prostředí za daných laboratorních podmínek pomocí navrženého způsobu aplikace *Trametes versicolor*. Na základě výsledků tohoto printscreen testu byla navržena metodika dalšího testování, tzv. **set-up test**, eliminace sulfonamidových antibiotik z modelové a reálné odpadní vody. Jako reálná odpadní voda byla použita odpadní voda odebraná na odtoku z ČOV Brno-Modřice, která byla před zahájením testu přefiltrována přes filtr ze skleněných vláken. Dále byly provedeny dlouhodobé monitorovací testy sloužící k odstranění sulfonamidových antibiotik z vysoké koncentrační úrovně. Všechny tyto testy byly provedeny v laboratoři výzkumného centra AdMaS. Po uplynutí navržené doby trvání experimentu byly testovací nádoby vytaženy z termostatu, bylo změřeno pH akvatické matrice a experiment byl ukončen separací vzorku vody od nosičů houbového mycelia. Souhrnný přehled a podrobné informace o parametrech všech provedených testů jsou uvedeny v tabulce „*Tabulka 7*“.

Výsledky z experimentů set-up testu budou využity za účelem získání základních parametrů procesů degradace sulfonamidů pomocí houby bílé hniloby WTF *Trametes versicolor*. V rámci dizertační práce Ing. Adély Žižlavské budou získané poznatky využity k optimalizaci navržené techniky, s cílem přiblížit se reálné aplikaci využívání dřevokazných hub k eliminaci xenobiotik z odpadních vod přímo v praxi. To obnáší navrhnout vhodný nosný biofiltr, který by bylo možné aplikovat v podmínkách reálné ČOV, definovat okrajové podmínky praktické aplikace, tj. optimální zkrápění, možnosti ovlivnění rychlosti množení houbové kultury, vliv pH atd.

Tabulka 7: Souhrnný přehled provedených experimentů eliminace sulfonamidových antibiotik prostřednictvím *Trametes versicolor*

Typ testu/vzorek	Koncentrace každého SA antibiotika	Počet nádob	Průběh a podmínky testu	Doba trvání testu [den]	Zpracování vzorku
Printscreen test/ 250 ml modelové vody	1 mg/l	3	Statický test, inkubace při 25 °C, ve tmě	7	přímá analýza LC/MS
Set-up test/ 250 ml modelové vody	100 µg/l	3		3	přímá analýza LC/MS
		3		5	přímá analýza LC/MS
		3		7	přímá analýza LC/MS
Set-up test/ 250 ml modelové vody	20 µg/l	3		3	SPE extrakce → analýza LC/MS
		3		5	
		3		7	
Set-up test/ 250 ml přefiltrované odpadní vody (odtok z ČOV)	20 µg/l	3		3	SPE extrakce → analýza LC/MS
		3		5	
		3		7	
Dlouhodobý monitorovací test/ 250 ml modelové vody	1 mg/l	3		10	přímá analýza LC/MS

## 3.6 Postup stanovení sulfonamidů z akvatické matrice

### 3.6.1 Odběr vzorků a jejich skladování

Vzorky odpadní vody byly každý vzorkovací den odebírány na přítoku i na odtoku z ČOV. Jednalo se o 24 hodinové slévané vzorky, které byly slity do tmavých skleněných vzorkovnic o objemu 1 l. V těchto vzorkovnicích byla odpadní voda transportována do laboratoře ÚCHTOŽP. Zpracování vzorků proběhlo vždy nejpozději do 48 hodin od jejich odběru. Do doby zahájení zpracování a analýzy vzorků byly uchovávány v chladničce při teplotě 4 °C.

Po ukončení testů eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí mycelia *Trametes versicolor* byly vzorky vody slity do tmavých vzorkovnic a ihned transportovány k dalšímu zpracování do laboratoře ÚCHTOŽP. Aby bylo po ukončení testu zabráněno další degradaci zbylých sulfonamidových antibiotik prostřednictvím volného houbového mycelia v kapalině, bylo nutné tyto vzorky vždy okamžitě zpracovat a zanalyzovat.

### 3.6.2 Úprava vzorku před izolací sledovaných analytů a finální analýzou

Před SPE extrakcí bylo nutné odstranit ze vzorků vody suspendované pevné částice. Vzorky odpadní vody z přítoku ČOV byly nejprve přefiltrovány přes papírový filtr a následně byla provedena filtrace přes filtr se skleněnými vlákny. Odpadní voda odebraná na odtoku z ČOV byla přefiltrována přímo přes filtry se skleněnými vlákny. Po filtraci bylo pH vzorků odpadní vody pro ideální retenci analytů na sorbentu SPE kolonky upraveno zředěným roztokem kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 6.

Vzorky vody z testů eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí houbového mycelia bylo, a to vzhledem k velkému množství volného mycelia suspendovaného v kapalině, nutné rovněž nejprve přefiltrovat přes papírový filtr a až poté přes filtr se skleněnými vlákny. Hodnoty pH vzorků, které podle tabulky „*Tabulka 7*“ byly dále zpracovány SPE extrakcí, bylo rovněž upraveno na hodnotu 6. Vzorky, které podle tabulky „*Tabulka 7*“ byly podrobeny přímé analýze na LC/MS, byly přefiltrovány přes stříkačkové nylonové filtry a následně bylo vždy 980 µl takto zpracovaných vzorků napipetováno do vialky o objemu 1,8 ml.

Pro zlepšení přesnosti kvantifikace cílových analytů byly použity interní standardy. U vzorků, které byly podrobeny přímé LC/MS analýze, byly roztoky interních standardů přidávány přímo k 980 µl vzorku připraveného ve vialce. Tímto způsobem bylo korigováno snížení odezvy analytů na detektoru vlivem konkurenční ionizace dalších látek přítomných v matrici. U ostatních vzorků, které byly zpracovávány SPE extrakcí, byly interní standardy přidávány do vzorků před zahájením extrakce. Tímto způsobem byla navíc korigována účinnost extrakce cílových analytů z analyzované akvatické matrice. V laboratoři byly k dispozici roztoky interních standardů sulfathiazol-d4 a sulfamethoxazol-d4 o koncentraci 100 µg/ml v MeOH. Protože byly analyzovány vzorky s různou předpokládanou koncentrační úrovní sulfonamidových antibiotik, byly i interní standardy přidávány k analyzovaným vzorkům v různém množství. K tomuto účelu byly připraveny roztoky interních standardů o koncentraci 10 µg/ml. Postup dávkování interních standardů k analyzovaným vzorkům je shrnut v následující tabulce „*Tabulka 8*“.

Tabulka 8: Přehled postupu dávkování interních standardů k analyzovaným vzorkům

Typ testu/vzorek	Předpokládaná koncentrace SA	Interní standardy (IS)	Výsledná c IS ve vzorku	Další postup
Odpadní voda přítok	max. jednotky $\mu\text{g/l}$	5 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 5 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 200 ml OV	2,5 $\mu\text{g/l}$	SPE extrakce → LC/MS analýza
Odpadní voda odtok	max. jednotky $\mu\text{g/l}$	5 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 5 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 300 ml OV	1, 667 $\mu\text{g/l}$	SPE extrakce → LC/MS analýza
Printscreen test/ modelová voda	max. 1 mg/l	10 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 10 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 980 $\mu\text{l}$ vzorku	1 $\mu\text{g/ml}$	přímá LC/MS analýza
Set-up test/ modelová voda	max. 100 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 10 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (10 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 980 $\mu\text{l}$ vzorku	0,1 $\mu\text{g/ml}$	přímá LC/MS analýza
	max. 20 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 10 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 100 ml vzorku	10 $\mu\text{g/l}$	SPE extrakce → LC/MS analýza
Set-up test/ odtok z ČOV	max. 20 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 10 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 100 ml vzorku	10 $\mu\text{g/l}$	SPE extrakce → LC/MS analýza
Dlouhodobý monitorovací test/250 ml modelové vody	max. 1 mg/l	10 $\mu\text{l}$ SMOX-d4 + 10 $\mu\text{l}$ STZ-d4 (100 $\mu\text{g/ml}$ v MeOH) k 980 $\mu\text{l}$ vzorku	1 $\mu\text{g/ml}$	přímá LC/MS analýza

### 3.6.3 Optimalizovaná metoda izolace cílových analytů

Pro izolaci analytů z matrice odpadní vody a modelové vody byla provedena extrakce na tuhou fázi SPE. Pro extrakci byly použity kolonky Supel Select HLB 200 mg/6 ml.

#### *Optimalizovaný postup SPE extrakce sulfonamidů z akvatické matrice:*

<b>kondicionace</b>	5 ml MeOH 5 ml MQ pH~6
<b>nanesení vzorku</b>	200 ml odpadní voda přítok pH~6 /300 ml odpadní voda odtok pH~6 /100 ml vody po testu s <i>Trametes versicolor</i> pH ~ 6
<b>promytí sorbentu</b>	4 ml MQ pH~6 4 ml 5% MeOH pH~6
<b>sušení</b>	60 minut proudem vzduchu
<b>eluce analytů</b>	2x2 ml MeOH
<b>sušení eluátu</b>	proudem dusíku
<b>rozpuštění</b>	1 ml MeOH/MQ (25/75; v/v)

### 3.6.4 Optimalizovaná metoda identifikace a kvantifikace analytů

Pro identifikaci a kvantifikaci vybraných sulfonamidových antibiotik byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC/MS). Ionizační technikou byl elektrosprej, analyzátozem sférická iontová past. Analyty byly separovány na chromatografické koloně Kolona Kinetex C18 o rozměrech 150 x 3 mm, s velikostí částic 2,6 μm.

#### *Optimalizované HPLC podmínky:*

<b>MF</b>	A: 0,01 M HCOOH pH ~ 2,9 B: MeOH
<b>nástřik vzorku</b>	2 μl
<b>průtok MF</b>	0,30 ml/min
<b>gradient</b>	viz tabulka „Tabulka 9“
<b>termostat</b>	45 °C
<b>délka analýzy</b>	14 minut + 12 minut na ekvilibraci kolony

#### *MS podmínky:*

<b>tlak zmlžovače</b>	35 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	12 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	50 – 400 m/z

Tabulka 9: Gradient mobilní fáze HPLC separace

Čas [min]	A [%]	B [%]
0	30	70
3	40	60
6	80	20
14	100	0

Identifikace analytů byla provedena na základě retenčních času analytů zjištěných z extrahovaných iontových chromatogramů (EIC) příslušných charakteristických hmot  $m/z$ . Kvantifikace analytů byla provedena metodou vnějšího standardu a korigována na výtěžnost deuterovaných standardů sulfathiazolu-d4 a sulfamethoxazolu-d4.

Tabulka 10: Retenční časy a charakteristické hmoty  $m/z$  pro jednotlivé analyty a interní standardy

Analyt	Korekce	Rt [min]	$m/z$
sulfapyridin (SPY)	STZ-d4	3,2	250
sulfadiazin (SDZ)	STZ-d4	2,9	251
sulfamethoxazol (SMX)	SMX-d4	5,1	254
sulfathiazol (STZ)	STZ-d4	3,0	256
sulfamerazin (SMR)	STZ-d4	3,5	265
sulfamethazin (SMZ)	SMX-d4	4,4	279
sulfathiazol-d4 (STZ-d4)	-	3,0	260
sulfamethoxazol-d4 (SMX-d4)	-	5,1	258

### 3.6.5 Určení matričního efektu

Látky přítomné v reálné akvatické matrici mohou mít negativní, pozitivní, případně žádný efekt na účinnost SPE extrakce. Z tohoto důvodu bylo provedeno ověření, jakým způsobem je ovlivněna extrakce sulfonamidů z analyzovaných matric odpadní a modelové vody, použité při experimentech s *Trametes versicolor*. V ideálním případě by měl být matriční efekt vyhodnocován ve vodě bez obsahu sledovaných analytů, která by však zároveň měla mít všechny vlastnosti analyzované akvatické matrice.

#### 3.6.5.1 Odpadní voda

V případě odpadní vody jsou tyto podmínky těžko dosažitelné, protože laboratorně připravená odpadní voda se nemusí zcela shodovat s reálnou odpadní vodou, ve které je, v závislosti na typu konkrétní odpadní vody (komunální, nemocniční, průmyslová odpadní voda atd.) přítomno mnoho interferujících a dalších látek.

Z tohoto důvodu byl pro určení matričního efektu odpadní vody zvolen následující postup. Za optimalizovaného postupu stanovení sulfonamidových antibiotik z odpadní vody z přítoku (200 ml) nebo odtoku (300 ml) byla analyzována odpadní voda z ČOV Brno-Modřice; přičemž do vzorků této vody bylo před SPE extrakcí nadávkováno 500 ng od každého sulfonamidového antibiotika. Současně byl celý postup stanovení zopakován pro vzorky odpadní vody bez přídavku antibiotik. Následně byly od sebe odečteny plochy píků jednotlivých analytů ve vzorku s přídavkem a ve vzorku bez přídavku standardů. Je však potřeba zmínit, že tento způsob vyhodnocení matričního efektu odpadní vody není zcela přesný.

### 3.6.5.2 Modelová voda

Protože v laboratoři bylo možné připravit modelovou vodou prostou od cílových analytů, bylo v tomto případě stanovení matričního efektu jednodušší. Za optimalizovaného SPE postupu stanovení cílových antibiotik byla analyzována modelová voda, která byla na 5 dní umístěna do sklenice s inokulovanými nosiči mycelia *Trametes versicolor*. Do této vody bylo po 5 dnech nadávkováno 500 ng od každého sulfonamidového antibiotika a vzorek byl zpracován optimalizovaným postupem SPE extrakce a následně zanalyzován.

Získané výsledky byly porovnávány s výsledky analýzy modelové matrice, kterou tvořila kohoutková voda s přidavkem standardů. Matriční efekt analyzovaných akvatických matric byl vypočítán podle následující rovnice [77]:

$$M [\%] = 100 \cdot \frac{\text{plocha píku analytu v reálném matrici}}{\text{plocha píku v modelovém matrici}} \quad (\text{Rovnice 3})$$

Zjištěné matriční efekty analyzované odpadní a modelové vody použité na experimenty s *Trametes versicolor* jsou přehledně shrnuty v kapitole 4.2.4 v tabulce „*Tabulka 17*“.

### 3.6.6 Určení analytických parametrů metody stanovení – LOD a LOQ

Mez detekce (LOD) udává nejmenší koncentraci analytu, která vyvolá odezvu měřicího systému a je rozpoznatelná od ostatních vlivů (šumu). LOD je definován jako koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu měřicího přístroje větší než je trojnásobek šumu základní linie [78].

Mez stanovitelnosti udává koncentraci analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a pro kterou byla metoda validována. LOQ je definován jako koncentrace, kdy analyt vyvolá odezvu měřicího přístroje větší než je desetinásobek šumu základní linie [78].

Pro stanovení LOD a LOQ platí tyto rovnice [78]:

$$LOD = 3 \cdot \frac{\bar{N}}{k} \quad (\text{Rovnice 4})$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\bar{N}}{k}, \text{ kde} \quad (\text{Rovnice 5})$$

$\bar{N}$  – průměrný šum základní linie

$k$  – směrnice kalibrační závislosti intenzity výšky píku na koncentraci analytu

Pro zjištění LOD a LOQ bylo nutné sestavit kalibrační závislosti intenzity výšky píků jednotlivých standardů na koncentraci, ze kterých byla určena potřebná směrnice. Průměrný šum základní linie  $N$  byl odečten z EIC chromatogramů cílových hmot, který byl získán analýzou vzorku připraveného postupem zahrnujícím celou metodu stanovení, včetně SPE extrakce, pokud byla prováděna.

Vypočítané hodnoty LOD a LOQ jednotlivých metodických postupů stanovení cílových sulfonamidových antibiotik z analyzovaných vzorků akvatické matrice jsou přehledně uvedeny v kapitole 4.3 v tabulce „*Tabulka 19*“. Grafy kalibrační závislosti jsou prezentovány v příloze „*Příloha 2*“ na obrázcích „*Obrázek 35-42*“.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

#### 4.1.1 Výběr vhodné chromatografické kolony

##### 4.1.1.1 Kolona Ascentis Express HILIC, 150 × 2,1 mm, 2,7 μm

Protože v některých publikacích byly pro separaci sulfonamidových antibiotik a jejich reziduí použity kolony typu HILIC [73, 74], bylo ověřeno použití dostupné kolony Ascentis Express HILIC. Tato kolona pracuje na principu normálních fází. Stacionární fází je nevázaný silikagel, který je stabilní v rozmezí pH 1 až 9. Jako MF je používána směs organického rozpouštědla, nejčastěji ACN, a vody nebo pufru, přičemž analýza je zahajována při vysokém poměru organické složky. Eluční síla MF je zvyšována vzrůstajícím podílem vodné složky MF. HILIC separace je výhodnou pro spojení s MS detekcí. Díky vysoké volatilitě mobilní fáze dochází ke zvýšení účinnosti ionizaci molekul analytů, což vede ke snížení detekčních limitů analýzy. Kolona je vhodná především pro separaci polárních látek, ale také nepolárních bazických aminů [79]. Na koloně byly ověřovány následující podmínky:

<b>HPLC podmínky:</b>	
<b>MF</b>	A: MQ B: ACN
<b>nástřik vzorku</b>	2 μl
<b>průtok MF</b>	0,60 ml/min
<b>eluce</b>	izokraticky
<b>termostat</b>	50 °C
<b>MS podmínky:</b>	
<b>tlak zmlžovače</b>	35 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	12 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	50 – 400 m/z

Bylo provedeno několik experimentů, při kterých bylo měněno složení použité mobilní fáze. Jelikož analyty nevykazovaly na koloně žádnou retenci ani při eluci mobilní fází s nejnižší možnou eluční silou (ACN/MQ : 95/5), bylo použití kolony typu HILIC pro separaci sulfonamidů vyhodnoceno jako nevhodné.

Z výše zmíněného důvodů bylo nutné vyzkoušet další kolonu s jiným druhem stacionární fáze. Ve většině publikovaných prací byly pro separaci sulfonamidových antibiotik použity kolony separující v módu obrácených fází se stacionární fází modifikovanou oktadecylem (C18). Proto bylo provedeno experimentální ověření použití dvou kolon s tímto druhem stacionární fáze.

##### 4.1.1.2 Kolona Ascentis Express C18 150 × 3 mm, 2,6 μm

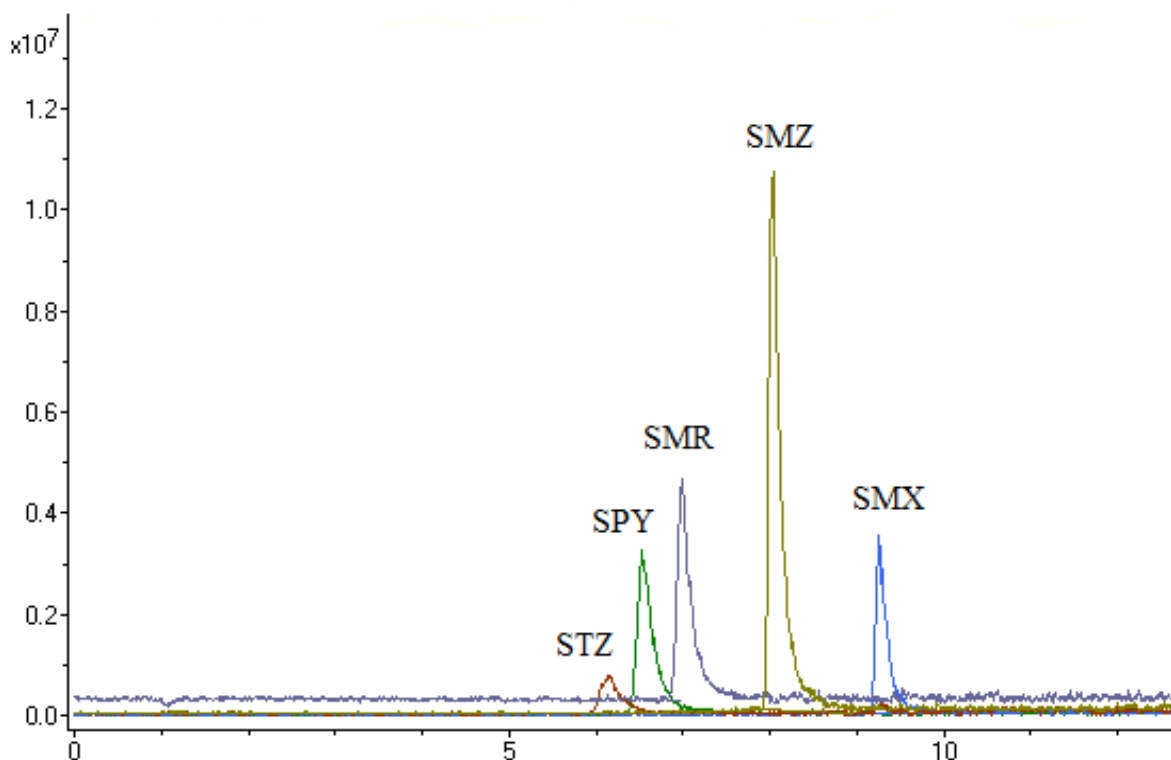
Částice použité v této koloně mají pevné jádro. Výhodou použití těchto částic je snížení difúzní dráhy analytu, čímž se zvyšuje píková kapacita, účinnost a rozlišení separace.



Generovaný zpětný tlak je menší v porovnání s tlakem u stejně velkých porézních částic. To umožňuje použití kolon s tímto typem částic o velikosti do 2  $\mu\text{m}$  i v klasických HPLC systémech [80]. Použitá kolona je stabilní v rozmezí pH 2 – 9, je možné ji používat do tlaku 600 bar a teplotně je stabilní do 60 °C [81].

Pro primární screening separace analytů na této koloně byla provedena analýza kalibračního roztoku pěti analytů (sulfapyridin, sulfathiazol, sulfamethoxazol, sulfamerazin a sulfamethazin) v MeOH o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  podle následujících podmínek. Za polární složku mobilní fáze byl zvolen 0,01 M roztok kyseliny mravenčí o pH~2,9. Na základě hodnot pKa vybraných sulfonamidů by při této hodnotě pH mělo docházet k dostatečné retenci analytů na koloně.

<b>HPLC podmínky:</b>	
<b>MF</b>	A: 0,01 M HCOOH pH ~ 2,9 B: ACN
<b>nástřik vzorku</b>	2 $\mu\text{l}$
<b>průtok MF</b>	0,30 ml/min
<b>Eluce: gradient</b>	0 min 5% ACN od 1. minuty od 5% ACN po 95% ACN v 16. minutě
<b>termostat</b>	45 °C
<b>MS podmínky:</b>	
<b>tlak zmlžovače</b>	35 psi
<b>průtok sušícího plynu</b>	12 l/min
<b>teplota sušícího plynu</b>	350 °C
<b>ionizační mód</b>	pozitivní
<b>scan</b>	50 – 400 m/z



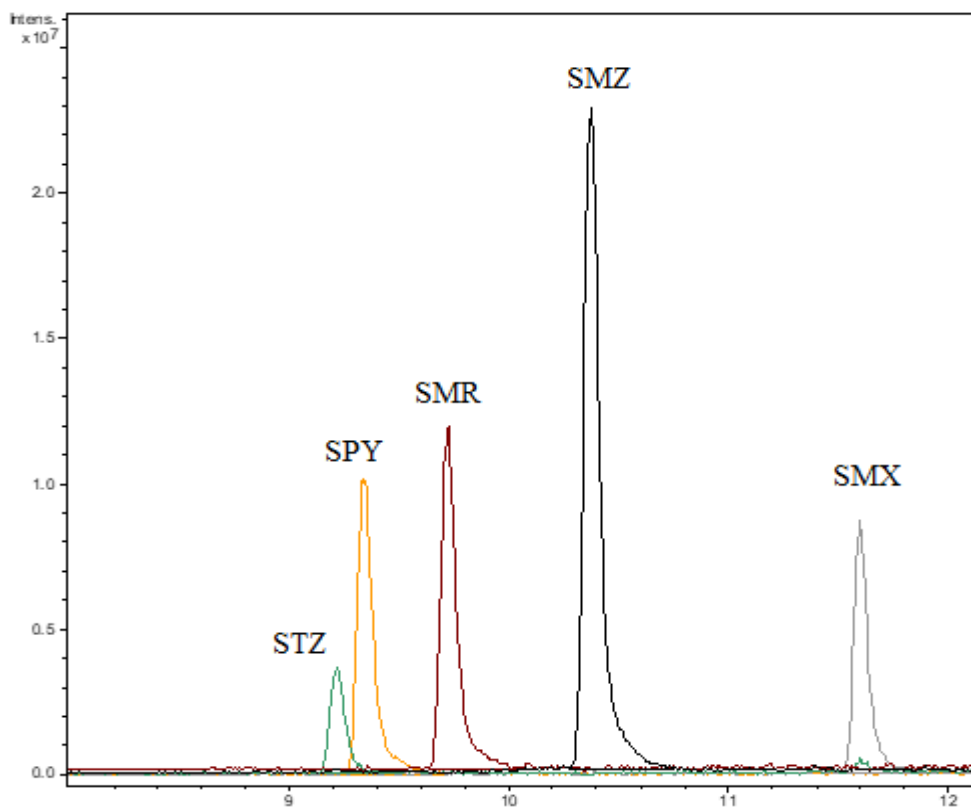
Obrázek 22: EIC jednotlivých sulfonamidových ATB separovaných na koloně Ascentis Express C18

Z extrahovaného iontového chromatogramu na obrázku „Obrázek 22“ je vidět, že za daných chromatografických podmínek nejsou od sebe sulfathiazol, sulfapyridin a sulfamerazin plně separovány a dochází u nich k mírné koeluci, což však pro MS detekci nepředstavuje vážný problém. Píky jsou však poměrně široké a chvostují. Z tohoto důvodu byla dále ověřena účinnost separace další kolony.

#### 4.1.1.3 Kolona Kinetex C18 150 × 3 mm, 2,6 μm

Druhou ověřovanou kolonou separující v módu obrácených fází byla kolona Kinetex C18. Rovněž tato kolona obsahuje částice s pevným jádrem. Částice stacionární fáze jsou ze silikagelu modifikovaného oktadecylem. Kolona je stabilní v rozmezí pH 1,5 až 8,5, je možné ji používat do tlaku 600 bar a teplotně stabilní je do 60 °C [82].

Pro srovnání účinnosti separace obou kolon se stacionární fází C18 byla na koloně Kinetex C18 zopakována analýza kalibračního roztoku pěti sulfonamidů v MeOH o koncentraci 1 ug/ml dle podmínek uvedených v kapitole 4.1.1.2. Výsledkem analýzy byl získán těchto EIC chromatogramů příslušných analytů.

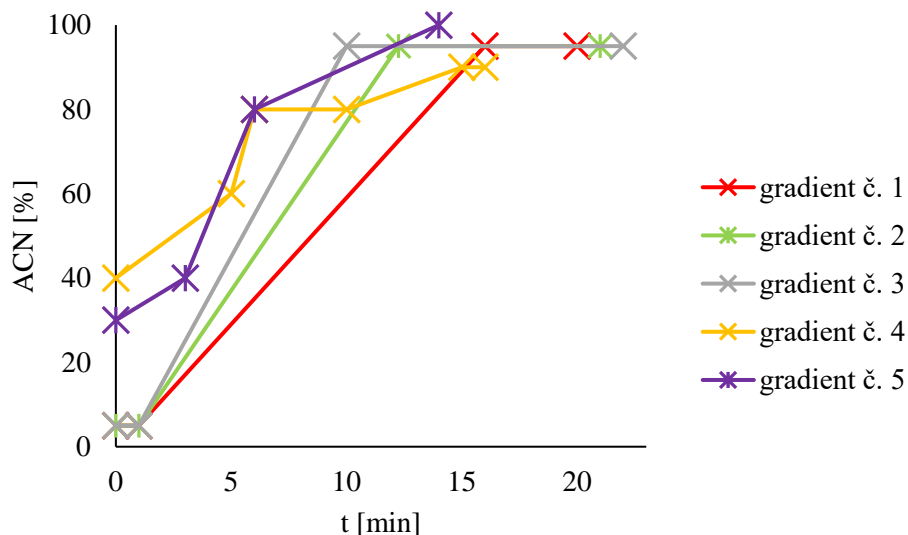


Obrázek 23: EIC jednotlivých sulfonamidových ATB separovaných na koloně KINETEX C18

Na koloně Kinetex C18 došlo k účinnější separaci analytů. Jednotlivé píky byly v porovnání se separací na koloně Ascetis Express C18 užší, jejich intenzita byla vyšší, méně chvostovaly a byly lépe separované a měly celkově lepší tvar. Z těchto důvodů byla kolona Kinetex C18 zvolena jako vhodná kolona pro chromatografickou separaci sulfonamidových antibiotik. Pro nalezení optimálních podmínek bylo však nutné chromatografické podmínky dále optimalizovat.

#### 4.1.2 Optimalizace gradientu mobilní fáze

Prvním optimalizovaným parametrem pro nalezení optimálních podmínek chromatografické separace byl gradient mobilní fáze. Za podmínek nastavených při primárním screeningu separace sulfonamidových antibiotik na koloně Kinetex C18 docházelo k eluci analytů v poměrně dlouhém retenčním čase. Ve snaze zkrátit celkový čas analýzy a popřípadě ještě zvýšit účinnost separace analytů bylo vyzkoušeno několik úprav gradientu mobilní fáze. Průběh ověřovaných gradientů mobilní fáze, vztažených na procentuální složení ACN určující eluční sílu mobilní fáze, je graficky znázorněn na obrázku „Obrázek 24“.



Obrázek 24: Optimalizace gradientu mobilní fáze – ověřované postupy

Pozvolný gradient č. 1 (nárůst ACN o 6 % za minutu) odpovídá gradientu mobilní fáze nastaveným při primárním screeningu separace sulfonamidů na koloně. Gradient č. 2 (nárůst ACN o 8 % za minutu) neměl za následek žádné snížení retenčních časů analytů. Při nastaveném gradientu č. 3 (nárůst ACN o 10 % za minutu) již došlo ke snížení retenčních času analytů a zlepšení účinnosti separace, protože píky byly užší, vyšší a měly lepší tvar. Retenční čas analytů byl však stále poměrně vysoký.

Proto byly následně vyzkoušeny 2 typy gradientů mobilní fáze s vyšším počátečním podílem organické složky. Při analýze s gradientem mobilní fáze č. 4 s počátečním podílem ACN 40 % došlo k výraznému nárůstu výšky píků a ke snížení retenčních časů analytů. Takto značné snížení retenčních časů analytů však už nebylo žádoucí, protože hrozilo, že při analýze reálných vzorků odpadní vody a vzorků vody z testů s myceliem *Trametes versicolor* by mohlo docházet ke koeluci analytů s nečistotami pocházejícími z matrice, což by mohlo negativně ovlivnit MS detekci. Navíc docházelo k výrazné koeluci analytů, což při MS detekci nepředstavuje vážný problém, avšak pro lepší selektivitu je vhodné analyty od sebe separovat. Proto byl dále ověřen gradient č. 5, u kterého byl nastaven počáteční podíl ACN 30 %, který byl do třetí minuty analýzy zvolna zvyšován na 40 %. Výsledkem byl mírný pokles intenzity píků v porovnání s gradientem č. 4; zároveň však došlo k posunu retenčních časů analytů, což bylo pozitivní vzhledem ke snížení pravděpodobnosti koeluce analytů společně s nečistotami z analyzované matrice. Píky jednotlivých analytů byly navíc od sebe lépe separovány. Navíc

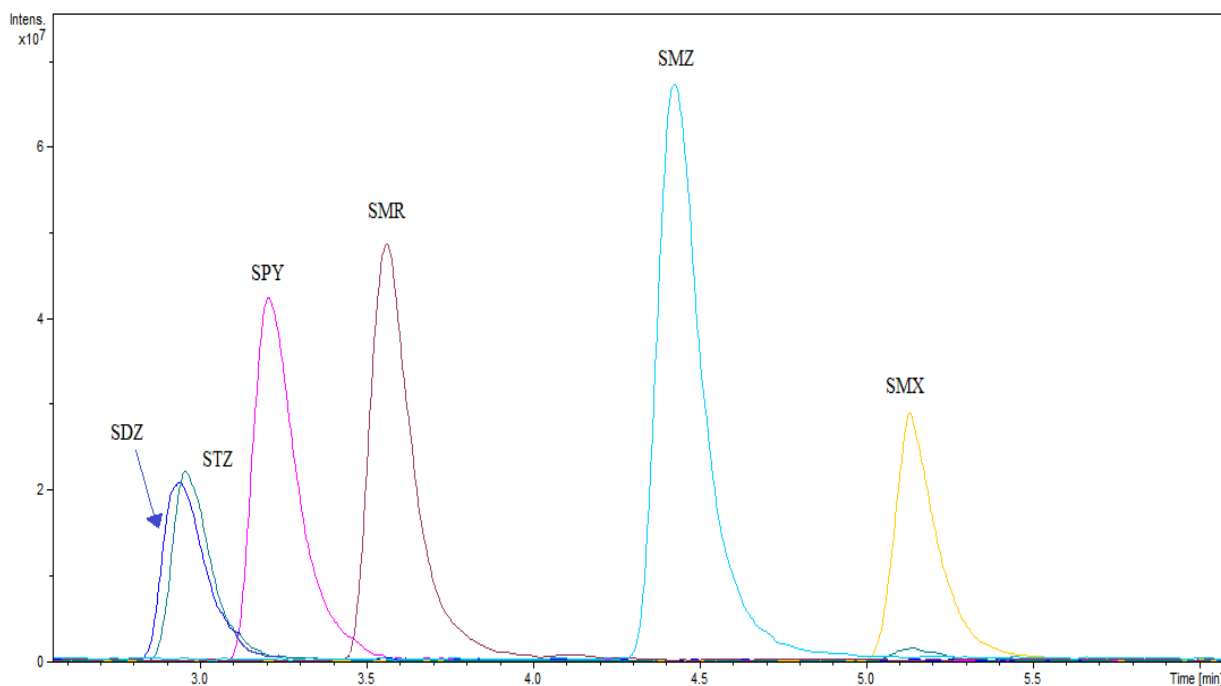
došlo k poklesu analytického šumu korespondujícímu s poklesem analytických parametrů limitujících stanovení, tj. limity kvantifikace (LOQ) a detekce (LOD).

#### 4.1.3 Optimalizace složení mobilní fáze

Vlastnosti mobilní fáze, především její pH, mohou výrazně ovlivnit ionizaci disociovatelných molekul analytů, což vede nejen ke změnám retenčních charakteristik na chromatografické koloně, ale také ke změnám detekčních limitů MS detekce. Z tohoto důvodu bylo experimentálně ověřeno použití několika typů složek mobilní fáze, které jsou vhodné pro spojení LC/MS s elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Pro ideální retenci sulfonamidových analytů na chromatografické koloně bylo vhodné pracovat s pH mobilní fáze v rozmezí 2 – 5, a proto bylo vhodné vyzkoušet jako jednu ze složek mobilní fáze roztoky s pufrací kapacitou. V našem případě byly ověřovány volatiliční látky 0,01 M mravenčnan amonný a 0,01 M octan amonný. Ani jedna ověřovaná mobilní fáze však neměla pozitivní vliv na ionizaci analytů a intenzitu píků, v porovnání s použitím 0,01 M kyseliny mravenčí. V dalším postupu byl dosud používaný ACN jako organická složka mobilní fáze vyměněn za MeOH. Použití MeOH pozitivně ovlivnilo intenzitu píků cílových analytů.

Dále bylo prověřováno několik změn v průtoku mobilní fáze. Žádná z těchto změn však pozitivně neovlivnila stanovení, přestože optimum průtoku mobilní fáze je výrobcem uváděno jako 0,8 ml/min. Vyšší průtoky mobilní fáze pravděpodobně nebyly vhodné pro prováděnou MS detekci, protože docházelo ke snížení intenzity signálu.

Mobilní fáze optimalizované LC metody byla vytvořena MeOH a 0,01 M HCOOH. Optimální průtok mobilní fáze byl stanoven na 0,3 ml/min. Kompletní optimalizovaná metoda LC/MS je uvedena v kapitole 3.6.4. Ukázka chromatogramu z analýzy kalibračního roztoku za optimalizovaných LC/MS podmínek je zobrazena na obrázku „Obrázek 25“.



Obrázek 25: EIC chromatogram pro jednotlivé analyty z analýzy kalibračního roztoku o koncentraci 1 µg/ml za optimalizovaných LC/MS podmínek

Pro omezení případného nežádoucího rozmývání píků a deformace jejich tvaru byly roztoky standardů pro proměření kalibračních závislostí připraveny do směsi rozpouštědel methanolu a MQ vody v objemovém poměru 25/75, který koresponduje se složením MF v době nástřiku vzorku do chromatografického systému. Stejnou směsí rozpouštědel byly také rozpouštěny odparky připravené vysušením SPE extraktu. Při použití 100% MeOH jako rozpouštědla vzorků, by vlivem jeho vysoké eluční síly mohlo docházet především k frontování píků, což by negativně ovlivňovalo účinnost separace.

## 4.2 Optimalizace SPE extrakce

### 4.2.1 Výběr vhodného stacionární fáze

Byla ověřována účinnost 500 ng extrakce sulfonamidových antibiotik z 200 ml vzorku na třech typech dostupných SPE kolonek, a to Supel Select HLB 200 mg/6 ml, Oasis HLB 60 mg/3 ml a Supelclean ENVI-18 SPE 500 mg/6 ml.

Na těchto kolonkách byl ověřován pracovní postup č. 1, uvedený v tabulce „*Tabulka 11*“. U kolonek Supel Select HLB a Oasis HLB byly objemy a druhy kondicionačních, promývacích a elučních činidel zvoleny na základě výrobcem uvedených doporučení a také na základě známých vlastností sledovaných analytů. Na základě hodnot pKa cílových analytů a zpracované literární rešerše bylo pH vzorku vody, pro účely primárního testu účinnosti extrakce, upraveno na hodnotu ~ 3. U kolonek Supelclean ENVI-18 SPE byl aplikován optimalizovaný postup SPE extrakce vycházející ze starších diplomových prací zpracovávaných na ÚCHTOŽP [77].

*Tabulka 11: Postup SPE extrakce pro primární test účinnosti extrakce na různých kolonkách*

<b>Pracovní postup SPE č. 1:</b>		
<b>SPE kolonka</b>	<b>1) Supel Select HLB 2) Oasis HLB</b>	<b>3) Supelclean ENVI-18</b>
<b>kondicionace</b>	5 ml MeOH	2 ml 0,1 M HCOOH v MeOH
	5 ml MQ pH ~ 3	2 ml 5% MeOH
<b>nanesení vzorku</b>	200 ml MQ pH ~ 3 - spike 500 ng každého antibiotika	200 ml MQ pH ~ 3 - spike 500 ng každého antibiotika
<b>promytí sorbentu</b>	5 ml MQ pH ~ 3	2 ml 5% MeOH
	5 ml 5% MeOH pH ~ 3	
<b>sušení</b>	20 minut proudem vzduchu	10 minut proudem vzduchu
<b>eluce analytů</b>	2x2 ml MeOH	4 ml 0,1 M HCOOH v MeOH
<b>sušení eluátu</b>	proudem dusíku	proudem dusíku
<b>rozpuštění</b>	1 ml MQ/MeOH (25/75; v/v)	1 ml MQ/MeOH (25/75; v/v)

Pro každý druh kolonky byly provedeny dvě paralelní stanovení, hodnoty účinnosti extrakce byly zprůměrovány. Průměrné hodnoty účinnosti jednotlivých analytů na různých typech kolonek jsou shrnuty v následující tabulce „*Tabulka 12*“.

Tabulka 12: Srovnání účinnosti extrakce na různých typech SPE kolonkách

Kolonka	Supel Select HLB	Oasis HLB	Supelclean ENVI-18
	$\bar{\eta}$ [%]	$\bar{\eta}$ [%]	$\bar{\eta}$ [%]
SPY	75,2	73,4	52,5
SDZ	60,2	65,5	41,2
SMX	54,2	52,8	44,3
STZ	96,3	95,2	23,8
SMR	103,7	97,8	36,6
SMZ	97,2	105,2	72,7
STZ-d4	89,2	87,7	30,7
SMX-d4	88,2	88,0	47,5

Z výsledků uvedených v tabulce „Tabulka 12“ je patrné, že postup aplikovaný na kolonce Supelclean ENVI-C18 není příliš vhodný pro extrakci sulfonamidových antibiotik. V porovnání s kolonkami Supel Select HLB a Oasis HLB zde docházelo ke slabší retenci cílových analytů na sorbentu, což vedlo k poměrně vysokým ztrátám analytů. Dalším důvodem mohlo být použití elučního činidla s nedostatečnou eluční silou potřebnou pro uvolnění analytů vázaných na sorbentu. Možností, jak dosáhnout vyšších výtěžností cílových analytů by bylo pokusit se postup SPE extrakce na kolonce Supelclean ENVI-18 dále optimalizovat. Protože se však jednalo o již optimalizovaný a v minulosti ověřený postup, nebyly další modifikace postupů extrakce na této kolonce ověřovány. Účinnost extrakce analytů na kolonkách Supel Select HLB a Oasis HLB byla srovnatelná. Obě kolonky byly vhodné k extrakci sulfonamidových antibiotik. Vzhledem k ekonomickým důvodům (výhodnější cena), byla pro další optimalizaci postupu SPE extrakce vybrána kolonka Supel Select HLB (200 mg/6 ml).

#### 4.2.2 Modifikace pracovního postupu extrakce pro kolonky Supel Select HLB

Na účinnost SPE extrakce může mít vliv několik faktorů, mezi které patří zejména množství sorbentu obsaženého v použité SPE kolonce, druh použitého kondicionačního činidla, objem nanášeného vzorku, koncentrace analytů ve vzorku, množství a druh promývacího a elučního činidla. Dalším důležitým parametrem ovlivňujícím extrakci polárních analytů je hodnota pH. Změnou pH lze výrazně ovlivnit disociaci molekul analytů a tím i retenci na sorbentu SPE kolonky. V rámci optimalizace pracovního postupu SPE extrakce byla provedena modifikace některého z výše zmíněných parametrů.

##### 4.2.2.1 Modifikace pH

Ve snaze dosáhnout maximální retence cílových analytů na sorbentu SPE kolonky bylo optimalizováno pH použitého kondicionačního činidla, nanášeného vzorku vody a rozpouštědel použitých v promývacím kroku. Bylo vyzkoušeno 5 modifikací úpravy pH, zahrnující vždy úpravu kondicionačního činidla, nanášeného vzorku a rozpouštědel použitých v promývacím kroku. Tyto postupy byly aplikovány na 200 ml MQ vody s přidavkem standardů cílových analytů 500 ng a současně na 200 ml odpadní vody z přítoku ČOV se stejným přidavkem standardů. Získané výsledky jsou prezentovány v tabulce „Tabulka 13“.

Tabulka 13: Účinnost extrakce modifikovaných postupů SPE extrakce

	pH ~ 3 („Tabulka 12“)	pH ~ 4	pH ~ 5	pH ~ 6	pH ~ 7
<b>Vzorek: MQ</b>	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]
<b>SPY</b>	75,2	77,9	84,5	102,3	69,9
<b>SDZ</b>	60,2	70,6	73,2	63,2	(-)
<b>SMX</b>	54,2	39,7	68,7	117,3	47,6
<b>STZ</b>	96,3	76,5	80,2	116,4	76,0
<b>SMR</b>	103,7	80,3	77,0	85,3	47,8
<b>SMZ</b>	97,2	75,7	70,4	106,3	74,3
<b>STZ-d4</b>	89,2	73,8	78,1	88,9	63,2
<b>SMX-d4</b>	88,2	43,8	43,2	89,3	65,8
	pH ~ 3	pH ~ 4	pH ~ 5	pH ~ 6	pH ~ 7
<b>Vzorek: OV - přítok</b>	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]
<b>SPY</b>	33,4	52,5	49,5	66,0	63,3
<b>SDZ</b>	46,9	57,0	44,6	55,0	(-)
<b>SMX</b>	51,1	58,8	64,4	78,6	22,3
<b>STZ</b>	77,4	72,0	80,5	72,6	61,8
<b>SMR</b>	43,1	46,3	41,2	90,8	22,3
<b>SMZ</b>	49,6	53,3	54,0	63,6	64,5
<b>STZ-d4</b>	66,4	58,4	71,1	79,8	57,6
<b>SMX-d4</b>	49,9	53,9	64,3	72,8	59,5

Z výsledků uvedených v tabulce je patrné, že účinnost SPE extrakce byla úpravou pH do jisté míry ovlivňována. Skupinu zvolených sulfonamidových antibiotik však nebylo možné charakterizovat retenčními vlastnostmi, které by jednoznačně určovaly nejvíce optimální postup úpravy pH. Rozdíl účinností extrakce jednotlivých sulfonamidů se při různých hodnotách pH poměrně lišil. U vzorků MQ vody se z hlediska prekoncentrace celé skupiny cílových analytů, včetně deuterovaných standardů, jako vhodné modifikace jeví hodnoty pH ~ 3 a 6. U reálných vzorků odpadní vody však u hodnoty pH ~ 3 došlo k výraznému snížení účinnosti extrakce ve srovnání s účinnostmi extrakce z MQ vody. To mohlo souviset s matričním efektem odpadní vody. Ze vzorku odpadní vody se za těchto podmínek pH mohlo navázat na sorbent více interferentů, které mohly být elučním činidlem převedeny do eluátu společně s cílovými analyty. Pro izolaci celé skupiny analytů z reálné odpadní vody se jako nejvhodnější postup ukázala úprava pH na hodnotu přibližně 6, s účinností extrakce sulfonamidových antibiotik 55,0 – 90,8 %.

#### 4.2.2.2 Modifikace promývacího kroku

Protože odpadní voda je poměrně složitou environmentální maticí, je promývací krok důležitý k získání co nejčistšího extraktu. Množství interferentů v extraktu má významný vliv na samotnou analytickou koncovku. U experimentů s *Trametes versicolor* byla navíc

očekávána možnost obohacení analyzované matrice o látky vyluhovatelné z inokulačních plodnic použitých hub.

Ve snaze vyvinout univerzální metodu stanovení sulfonamidových antibiotik z matrice odpadní vody a modelové vody, použité pro účely experimentů s *Trametes versicolor*, byla optimalizaci promývacího kroku věnována zvýšená pozornost. Byly vyzkoušeny tři modifikace extrakčního postupu č. 1 s úpravou pH na hodnotu 6, zahrnující změny promývacího kroku. Tyto postupy byly aplikovány jak na vzorky MQ vody, tak také na vzorky reálné odpadní vody z přítoku ČOV. Dosažené výsledky jsou prezentovány v následující tabulce „*Tabulka 14*“.

*Tabulka 14: Vliv promývacího kroku na účinnost extrakce sulfonamidových antibiotik*

<b>Modifikace promývacího kroku</b>	5 ml MQ pH~6	5 ml 20% DCM v HEX 5 ml MQ pH~6	5 ml MQ pH~6 5 ml 25% EtOH pH~6
<b>Vzorek: MQ</b>	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]
<b>SPY</b>	92,2	102,6	52,5
<b>SDZ</b>	75,9	65,0	41,2
<b>SMX</b>	102,2	101,6	44,3
<b>STZ</b>	102,1	94,0	23,8
<b>SMR</b>	80,1	91,9	36,6
<b>SMZ</b>	98,7	91,9	72,7
<b>STZ-d4</b>	77,4	74,1	30,7
<b>SMX-d4</b>	81,3	79,2	47,5
<b>Vzorek: OV-přítok</b>	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]	$\eta$ [%]
<b>SPY</b>	69,9	97,7	19,5
<b>SDZ</b>	(-)	(-)	(-)
<b>SMX</b>	23,0	32,2	21,5
<b>STZ</b>	61,8	38,0	19,2
<b>SMR</b>	43,2	29,8	13,4
<b>SMZ</b>	64,5	77,12	5,2
<b>STZ-d4</b>	29,2	36,1	(-)
<b>SMX-d4</b>	41,9	35,4	17,9

V porovnání s promývacím krokem aplikovaným v extrakčním postupu č. 1, využívajícím 5 ml MQ vody a 5 ml 5% MeOH upravených na pH~6, bylo na MQ vodě u prvních dvou ověřovaných postupů, uvedených v tabulce „*Tabulka 14*“, dosaženo srovnatelných výtěžností cílových sulfonamidových antibiotik. V postupu zahrnujícím jako jedno z promývacích činidel 25% roztok ethanolu, již došlo k výrazným ztrátám analytů. To bylo způsobeno pravděpodobně vysokou eluční silou použitého promývacího činidla.

Při ověřování vlivu těchto modifikovaných postupů promývacího kroku na účinnost extrakce analytů z reálné odpadní vody se však ani jeden z postupů nejevil jako vhodný. Použití MQ vody jako jediného promývacího činidla nebo v kombinaci s 20% roztokem DCM v hexanu, se pro eliminaci interferujících látek ukázalo nedostatečné a při analýze byla



výtěžnost analytů pravděpodobně negativně ovlivňována silným matričním efektem odpadní vody. Silný matriční efekt odpadní vody se nepodařilo eliminovat, ani při použití 25% roztoku EtOH, u kterého byla navíc účinnost extrakce analytů negativně ovlivněna vysokými ztrátami způsobenými velkou eluční silou promývacího činidla.

Jako nejvhodnější možnost eliminace interferujících látek z analyzovaných akvatických matric se proto ukázal původní postup, využívající v promývacím kroku MQ vodu v kombinaci s 5% roztokem MeOH, jejichž pH bylo vhodně upraveno.

#### 4.2.3 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení optimalizované metody SPE extrakce bylo za identických optimalizovaných podmínek provedeno šest paralelních stanovení pro teoretickou maximální koncentrační úroveň sulfonamidů v extraktu 500 ng/ml. Optimalizovaná metoda SPE extrakce je uvedena v kapitole 3.6.3.

Tabulka 15: Výsledky SPE extrakce sulfonamidů ze šesti paralelních stanovení

spike 500 ng	SPY		SDZ		SMX		STZ	
	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]
<b>1</b>	511,5	102,3	316,0	63,2	586,5	117,3	582,0	116,4
<b>2</b>	500,5	100,1	302,5	60,5	566,0	113,2	552,5	110,5
<b>3</b>	491,0	98,2	329,0	65,8	589,0	117,8	549,0	109,8
<b>4</b>	517,0	103,4	316,5	63,3	575,0	115,0	549,5	109,9
<b>5</b>	484,0	96,8	298,5	59,7	554,0	110,8	541,5	108,3
<b>6</b>	513,0	102,6	299,5	59,9	568,0	113,6	568,5	113,7
spike 500 ng	SMR		SMZ		STZ-d4		SMX-d4	
	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]	c [ng/ml]	$\eta$ [%]
<b>1</b>	426,5	85,3	531,5	106,3	444,5	88,9	446,5	89,3
<b>2</b>	439,0	87,8	499,0	99,8	441,5	88,3	438,0	87,6
<b>3</b>	417,0	83,4	501,5	100,3	451,0	90,2	453,0	90,6
<b>4</b>	434,5	86,9	517,5	103,5	438,0	87,6	457,0	91,4
<b>5</b>	438,5	87,7	514,0	102,8	443,5	88,7	444,5	88,9
<b>6</b>	425,5	85,1	531,5	106,3	457,5	91,5	438,5	87,7

Následně byly vypočteny průměrné stanovené koncentrace jednotlivých analytů  $\bar{c}$  a průměrná účinnost jejich extrakce  $\bar{\eta}$ . V MS Excel byla funkcí SMODCH vypočtena směrodatná odchylka S, relativní směrodatná odchylka RSD byla vypočtena podle vzorce:

$$RSD = 100 \cdot \frac{S}{\bar{c}}$$

Pomocí funkce VAR. VÝBĚR byl také vypočten rozptyl naměřených hodnot.

Tabulka 16: Základní statistické parametry SPE extrakce pro spike 500 ng antibiotik

		SPY	SDZ	SMX	STZ	SMR	SMZ	STZ-d4	SMX-d4
$\bar{c}$	[ng/ml]	502,8	310,3	573,1	557,2	430,2	515,8	446,0	446,3
$\bar{\eta}$	[%]	100,6	62,1	114,6	111,4	86,0	103,2	89,2	89,3
S	[ng/ml]	13,26	12,14	13,25	15,09	8,66	14,04	7,07	7,65
RSD	[%]	2,64	3,91	2,31	2,71	2,01	2,72	1,59	1,71
rozptyl	[ng/ml]	175,9	147,5	175,4	227,6	75,0	197,2	50,0	58,5

#### 4.2.4 Matriční efekt

Postup stanovení matričního efektu byl popsán v kapitole 3.6.5. V tabulce „Tabulka 17“ jsou uvedeny stanovené matriční efekty analyzované odpadní a modelové vody použité na experimenty s *Trametes versicolor*.

Tabulka 17: Matriční efekt odpadní a modelové vody

standard		Matriční efekt [%]		
		ODPADNÍ VODA		MODELOVÁ VODA
		Přítok	Odtok	Testy <i>Trametes versicolor</i>
SPY	250 m/z	59,5	89,8	54,2
SDZ	251 m/z	87,0	92,5	97,6
SMX	254 m/z	56,3	81,2	54,3
STZ	256 m/z	62,3	79,5	70,7
SMR	265 m/z	106,4	101,5	61,7
SMZ	279 m/z	59,8	74,2	55,3
STZ-d4	260 m/z	89,7	98,2	92,2
SMX-d4	258 m/z	81,5	89,1	63,8

#### 4.3 Analytické parametry optimalizované metody stanovení - LOD a LOQ

Stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) bylo popsáno v kapitole 3.6.6. V tabulce „Tabulka 18“ jsou uvedeny směrnice kalibračních závislostí  $k$  intenzity výšky píku na koncentraci jednotlivých standardů a průměrné hodnoty šumu  $N$ . Vypočítané meze detekce a stanovitelnosti všech aplikovaných optimalizovaných metodických postupů stanovení sulfonamidových antibiotik z odpadní a z modelové vody jsou uvedeny v tabulce „Tabulka 19“. Grafy kalibrační závislosti jsou prezentovány v příloze „Příloha 2“ na obrázcích „Obrázek 35-42“.

Tabulka 18: Směrnice kalibračních závislostí intenzity výšky píku na koncentraci jednotlivých standardů a průměrná intenzita šumu analyzovaných akvatických matic

standard		směrnice kalibrační závislosti $k$	Průměrná intenzita šumu $\bar{N}$			
			ODPADNÍ VODA		MODELOVÁ VODA	
			Přítok	Odtok	Testy <i>Trametes versicolor</i>	
			SPE-LC/MS	SPE-LC/MS	SPE-LC/MS	LC-MS
SPY	250 m/z	16 673 912	$1,2 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^4$
SDZ	251 m/z	8 467 808	$1,2 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$
SMX	254 m/z	11 682 483	$6,0 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^4$
STZ	256 m/z	9 219 344	$9,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$
SMR	265 m/z	16 979 899	$3,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^4$
SMZ	279 m/z	25 735 614	$1,4 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$
STZ-d4	260 m/z	8 846 230	$1,6 \cdot 10^5$	$1,15 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^4$
SMX-d4	258 m/z	21 147 499	$2,2 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^4$

Tabulka 19: Vypočítané LOD a LOQ všech aplikovaných optimalizovaných metodických postupů stanovení sulfonamidových antibiotik z akvatických vzorků

Specifikace vzorku	ODPADNÍ VODA				MODELOVÁ VODA			
	přítok		odtok		testy <i>Trametes versicolor</i>			
Postup stanovení	SPE-LC/MS		SPE-LC/MS		SPE-LC/MS		Přímá analýza LC-MS	
Standard	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]
SPY	0,108 0	0,359 8	0,048 0	0,159 9	0,188 9	0,314 9	0,028 8	0,096 0
SDZ	0,212 6	0,708 6	0,118 1	0,393 6	0,141 7	0,472 4	0,085 0	0,283 4
SMX	0,077 0	0,256 8	0,077 0	0,256 8	0,128 4	0,428 0	0,041 1	0,137 0
STZ	0,146 4	0,488 1	0,108 5	0,361 6	0,130 2	0,433 9	0,078 1	0,260 3
SMR	0,141 3	0,471 1	0,067 7	0,225 8	0,106 0	0,353 4	0,035 3	0,117 8
SMZ	0,128 2	0,427 4	0,035 0	0,116 6	0,072 9	0,242 9	0,028 0	0,093 3
STZ-d4	0,099 3	0,331 0	0,028 4	0,094 6	0,042 6	0,141 9	0,022 7	0,075 7
SMX-d4	0,050 9	0,169 6	0,067 8	0,226 1	0,203 5	0,678 3	0,081 4	0,271 3

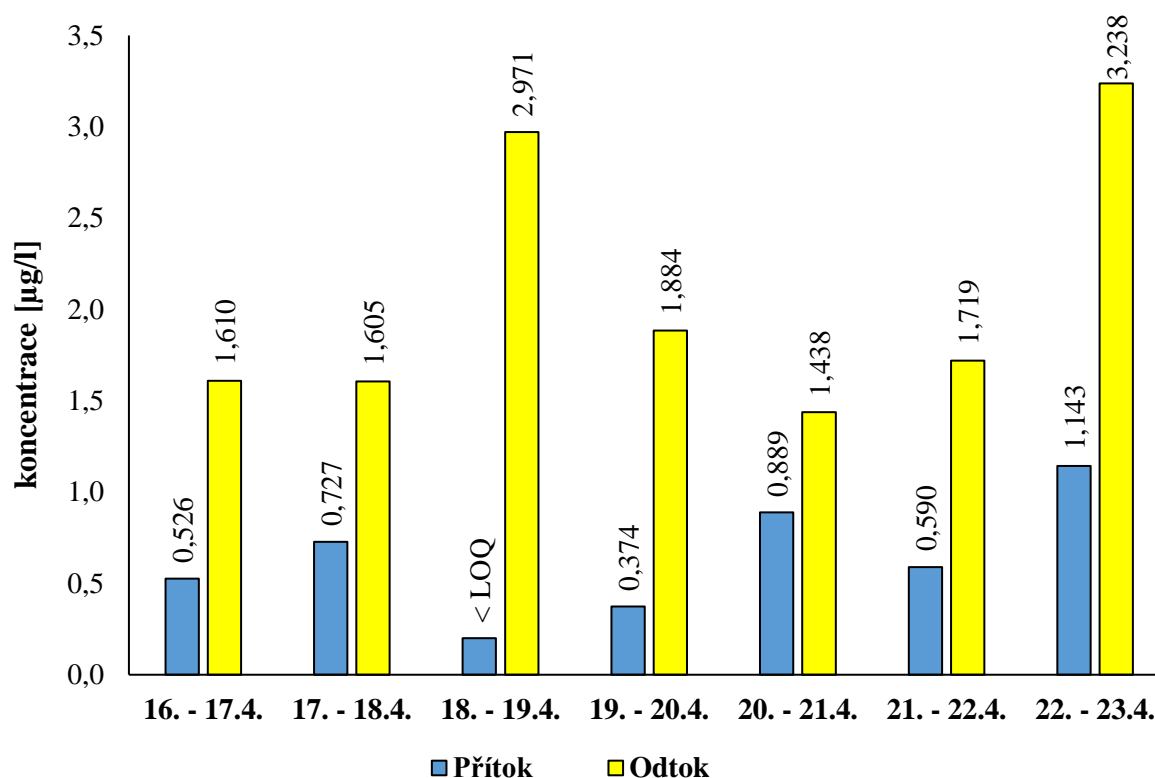
#### 4.4 Sulfonamidová antibiotika v odpadní vodě

Z cílových analytů byly ve vzorcích odpadní vody detekovány a následně kvantifikovány pouze dva z nich, konkrétně sulfapyridin a sulfamethoxazol. Ostatní analyty nebylo možné z extrahovaných iontových chromatogramů příslušných hmot detekovat. Do tabulky a grafů byly proto zpracovány jen výsledky získané pro sulfapyridin a sulfamethoxazol.

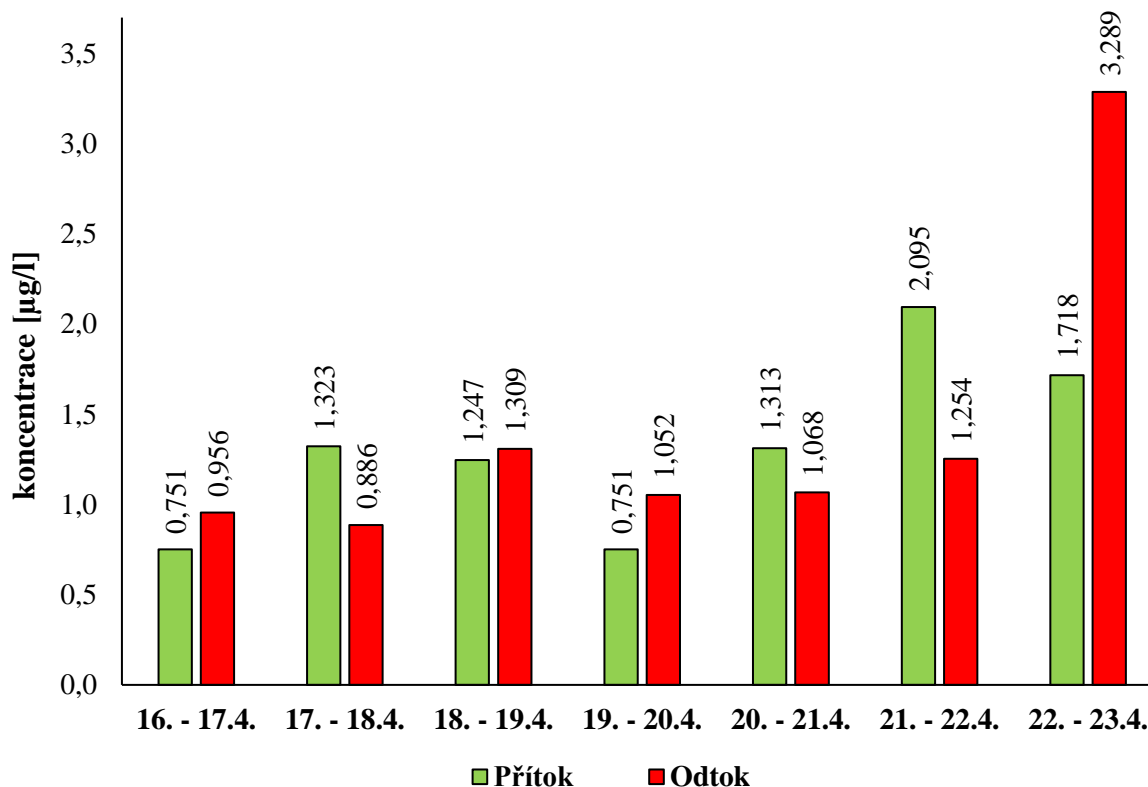
Doba zdržení odpadní vody od nátoky na ČOV a odtoku do recipientu je podle technické specifikace ČOV Brno-Modřice přibližně 24 hodin. Pro účely posouzení účinnosti čistícího procesu je proto vhodné porovnávat mezi sebou koncentrace analytů stanovené na přítoku a odtoku, jejichž vzorkování probíhalo s časovým posunem 24 hodin.

Tabulka 20: Stanovené koncentrace sulfapyridinu a sulfamethoxazolu v reálné odpadní vodě odebírané v termínu 16. – 23. 4. z přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice

Den	SULFAPYRIDIN		SULFAMETHOXAZOL	
	Přítok [µg/l]	Odtok [µg/l]	Přítok [µg/l]	Odtok [µg/l]
16. 4. 2018	0,526 2	0,828 5	0,751 4	0,854 7
17. 4. 2018	0,727 0	1,610	1,323	0,956 0
18. 4. 2018	< LOQ	1,605	1,247	0,885 9
19. 4. 2018	0,373 7	2,971	0,750 6	1,309
20. 4. 2018	0,888 6	1,884	1,313	1,052
21. 4. 2018	0,589 9	1,438	2,095	1,068
22. 4. 2018	1,143	1,719	1,718	1,254
23. 4. 2018	1,047	3,238	1,280	3,289



Obrázek 26: Grafické srovnání koncentrací sulfapyridinu stanovených v reálné odpadní vodě v období 16. – 23. 4. 2018, zohledňující 24 hodinové zdržení vody na technologické lince ČOV



Obrázek 27: Grafické srovnání koncentrací sulfamethoxazolu stanovených v reálné odpadní vodě v období 16. – 23. 4. 2018, zohledňující 24 hodinové zdržení vody na technologické lince ČOV

Na základě podrobného studia informací v databázi SÚKL bylo zjištěno, že v ČR jsou ze skupiny sulfonamidových látek registrovány pouze čtyři léčiva, a to sulfasalazin, sulfadiazin, sulfaacetamid a nejvíce používaný sulfamethoxazol [11], který byl jako jediný zahrnut v šesti cílových analytů. Ve veterinární medicíně je rovněž v největší míře sulfamethoxazol. Při dalším studiu literatury bylo zjištěno, že sulfasalazin po perorálním podání přechází do tlustého střeva, kde je mikrobiálním štěpením diazovazby obsažené v jeho struktuře rozkládán na dvě složky, mesalazin a sulfapyridin [83]. Tyto skutečnosti vysvětlují dosažené výsledky, že v reálných odpadních vodách byly detekovány a kvantifikovány pouze tyto dva analyty.

Jak je patrné z výsledků prezentovaných v tabulce „Tabulka 20“ a obrázcích „Obrázek 26“ a „Obrázek 27“, koncentrace sulfapyridinu i sulfamethoxazolu, stanovené na odtoku ČOV do recipientu, byly ve většině případů vyšší než koncentrace stanovené na přítoku na ČOV. To bylo pravděpodobně způsobeno vysokým matričním efektem odpadní vody z přítoku, který je prezentován v kapitole 4.2.4 v tabulce „Tabulka 17“. Z tohoto důvodu nemělo význam ze stanovených dat vyhodnocovat účinnost eliminace sulfonamidových antibiotik na sledované ČOV.

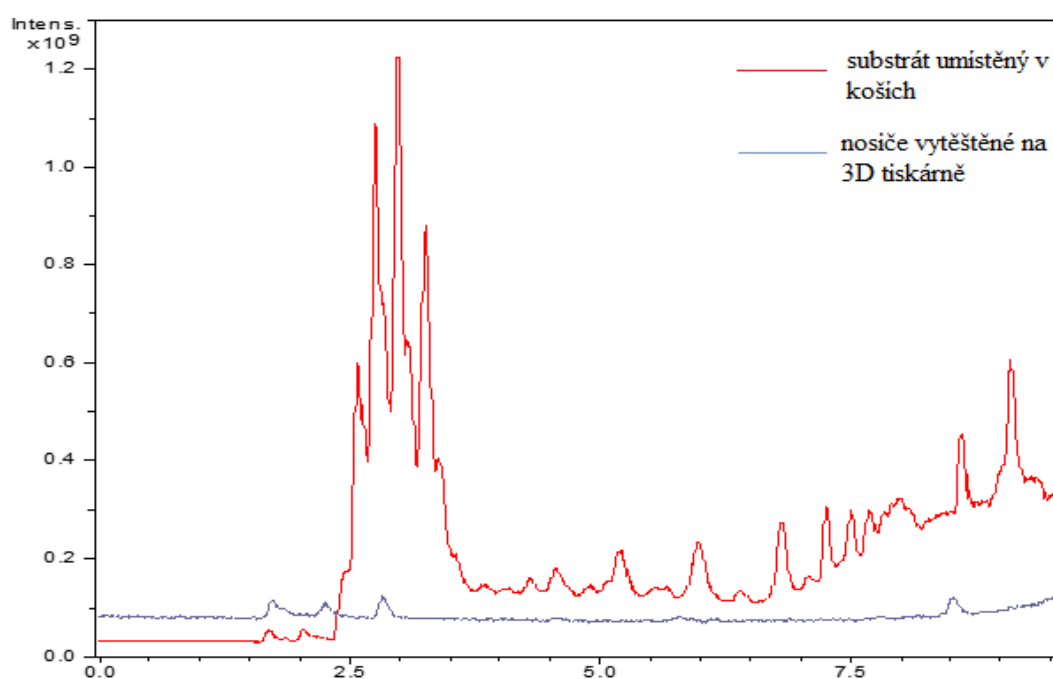
Z koncentrací těchto látek stanovených na odtoku z ČOV, je však zřejmé, že technologie čistícího procesu není dostatečně účinná, aby zmiňované látky kompletně odstranila. Tyto látky z odpadních vod pronikají do recipientu, kde mohou negativně působit na organismy zde žijící a potenciálně se mohou šířit dále do dalších složek životního prostředí. Je proto vhodné zabývat se jinými alternativními metodami, které by v kombinaci s konvenčními procesy čištění mohly zvýšit účinnost eliminace těchto kontaminantů a omezit tak jejich vstup do ŽP.

## 4.5 Eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí *Trametes versicolor*

### 4.5.1 Srovnání použitých nosičů mycelia

Pro první experimenty možnosti eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí hub WRF bylo použito mycelium *Trametes versicolor* vypěstované v koších se substrátem. Na základě předpokládané koncentrace sulfonamidových antibiotik v reálných odpadních vodách, vlivu matričního efektu a limitů detekce, byla pro první test zvolena koncentrace 100 µg/l každého analytu. Po proměření optimalizovanou metodou SPE-LC/MS nebyly z EIC chromatogramů cílových hmot detekovány žádné analyty. Z tohoto důvodu byla koncentrace sulfonamidů v modelové vodě zvýšena na 2 mg/l. V tomto případě byly detekovány pouze 2 analyty, které však byly pod mezemi kvantifikace. Tento způsob nosiče byl proto pro účely testování eliminace nevhodný, a to především z důvodu složitosti matrice a silného matričního efektu, což znemožňovalo stanovení sulfonamidů izolovaných z této matrice. Matriční efekt se nepodařilo eliminovat úpravami SPE postupů ani nastavením LC podmínek. Proto bylo nutné pro další experimenty najít alternativní postup kultivace mycelia hub *Trametes versicolor*.

Pro omezení složité matrice a zároveň nutnosti použití přírodního, ideálně dřevěného materiálu, se jevila jako vhodná varianta vyzkoušet vlákna vhodná do 3D tiskáren. Ty umožňovaly vyrobiť nosiče mycelia podle našich představ s přesně definovanými parametry, díky kterým bylo možné lepším způsobem zajistit opakovatelnost testování. Byl proveden 5 denní test vyluhovatelnosti látek z 3D kostek vodou. Výluh byl dále zpracován optimalizovaným SPE-LC/MS postupem. Tento nosič mycelia se ukázal jako vhodný, protože u něj nedocházelo k výluhům velkého množství látek, které by svým matričním efektem zásadně ovlivňovaly analytickou koncovku. Porovnání TIC (total ion current) chromatogramů, ze kterých vyplývají výše zmíněné závěry, je uvedeno na obrázku „Obrázek 28“.

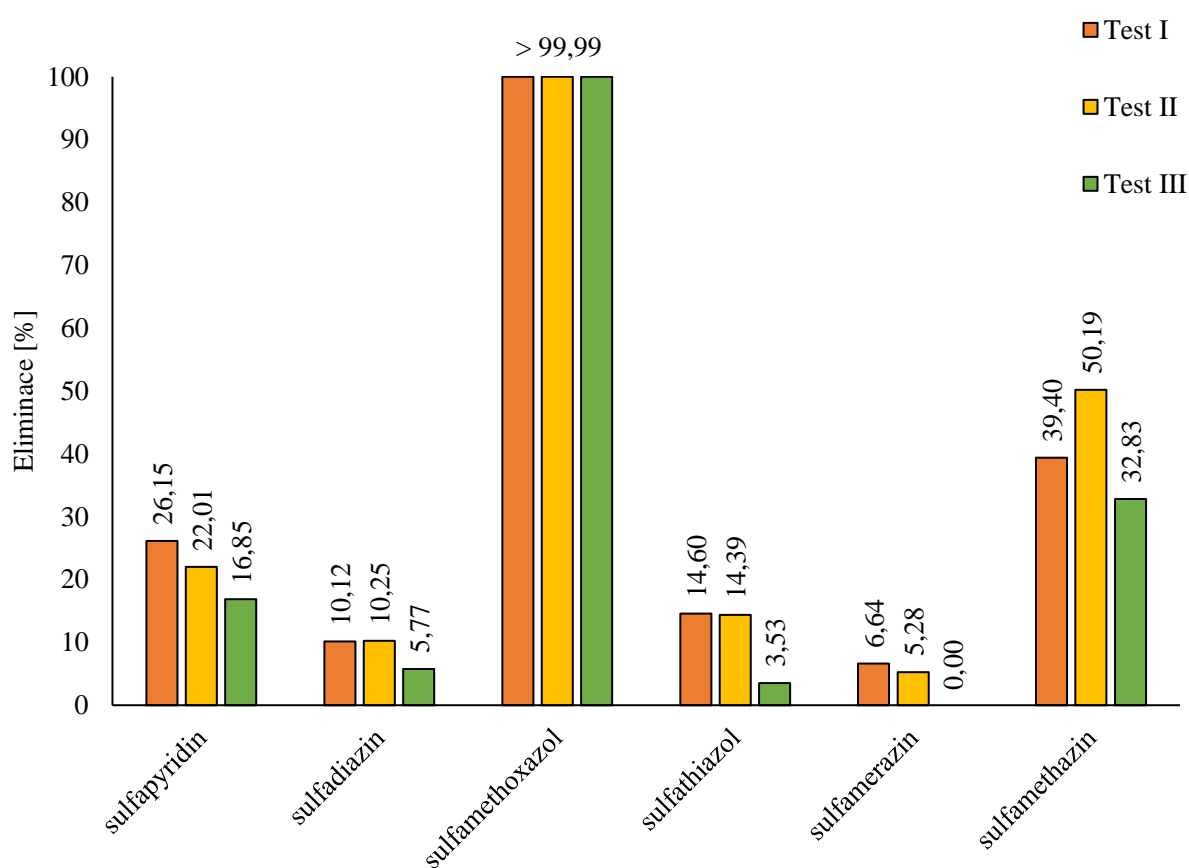


Obrázek 28: Srovnání TIC chromatogramů analýzy matrice z výluhů testovaných nosičů houbového mycelia

## 4.5.2 Printscreens test

Dosud publikované články využívají k eliminaci xenobiotik *Trametes versicolor* ve formě peletek, jejichž použití bylo diskutováno v kapitole 2.2.3. Námí zvolený způsob kultivace mycelia dosud nikde publikován nebyl, proto bylo nejprve nutné určit potenciál eliminace sulfonamidů.

Na základě provedené literární rešerše byla zvolena jako počáteční koncentrační hladina pro odstraňování 1 mg/l. Pro potřeby zjištění opakovatelnosti experimentu byly provedeny 3 paralelní testy, u kterých byly zajištěny shodné podmínky. Printscreens test probíhal 3 dny. Vzorky byly po přefiltrování přes nylonové stříkačkové filtry zpracovány přímou analýzou, a to optimalizovanou metodou LC/MS. Výsledky printscreens testu jsou uvedeny na následujícím obrázku „Obrázek 29“.



Obrázek 29: Výsledky printscreens testu účinnosti eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí mycelia *Trametes versicolor* kultivovaného na 3D nosičích

### 4.5.2.1 Závěry vyplývající z printscreens testu

Z grafu uvedeného na „Obrázku 29“ vyplývá, že námí navrženým postupem je možné eliminovat zvolené analyty ze skupiny sulfonamidových antibiotik z akvatické matrice. Nejlépe odstranitelným se ukázal být sulfamethoxazol, který byl odstraněn až na koncentrační úroveň, jejíž kvantifikace je limitována příslušnou hodnotou LOQ. Hodnota LOQ sulfamethoxazolu metodou stanovení přímé analýzy LC/MS odpovídá koncentraci 0,137  $\mu\text{g/l}$ . Naopak s nízkou účinností < 15 % byly eliminovány sulfadiazin, sulfathiazol a sulfamerazin.

Dále výsledky prokázaly, že je nutné v dalším testování provádět více opakování jednotlivých experimentů. Rozdílné výsledky v rámci jednotlivých opakování testu jsou pravděpodobně dány prací s živými kulturami *Trametes versicolor*, které se nacházely v dynamickém systému, kde jejich chování nelze charakterizovat univerzálně. Přestože jsme se v průběhu celého testování snažili zajistit srovnatelné podmínky a inokulace nosičů proběhla vždy stejným množstvím plodnice *Trametes versicolor*, tak při průběžném pozorování průběhu testu bylo možné zaznamenat znatelné odchylky v jednotlivých testovacích nádobách, např. množství nakultivovaného mycelia, různý podíl volné mycelia v kapalině, barva kapaliny a její pH. Tyto odchylky mohly být dány rozdílnou kvalitou plodnic použitých pro inokulaci, zejména jejich stářím a celkovým stavem, přestože byl jejich sběr proveden jednorázově z jednoho odběrného místa.

Tato technika by mohla mít potenciál pro odstraňování xenobiotik z odpadních vod. Na základě výše prezentovaných výsledků byla navržena metodika dalšího průběhu testování eliminace sulfonamidových antibiotik z akvatické matrice. Pro účely primárního výzkumu byly navrženy tři série testování. V I. sérii byly na modelové vodě testovány koncentrace, které je možné stanovit v odpadních vodách, 100 a 20 µg/l. V II. sérii testu byl průběžně monitorován potenciál eliminace sulfonamidů pomocí *Trametes versicolor* z koncentrace 1 mg/l v delším časovém intervalu 10 dní. Testy II. série probíhaly rovněž na modelové vodě, jejíž vzorky byly z testovacích nádob odebírány průběžně a po přefiltrování přes stříkačkové filtry byly podrobeny přímé LC/MS analýze. V III. sérii testů byla pro experiment použita reálná odpadní voda z odtoku ČOV Brno-Modřice, do které byly přidány standardy cílových analytů v koncentraci 20 µg/l, a to pro zjištění vlivu matrice na účinnost eliminace.

I. a III. série testů byly prováděny jako sedmidenní experimenty, přičemž testy v jednotlivých testovacích nádobách byly každý třetí, pátý a sedmý den od zahájení ukončeny a vzorky vody byly zpracovány postupem popsáním v kapitole 3.6 „*Postup stanovení sulfonamidů z akvatické matrice*“. Na základě výsledků opakovatelnosti z printscreen testu a zajištění správné interpretace výsledků byly každý vzorkovací den ukončeny testy ve 3 testovacích nádobách.

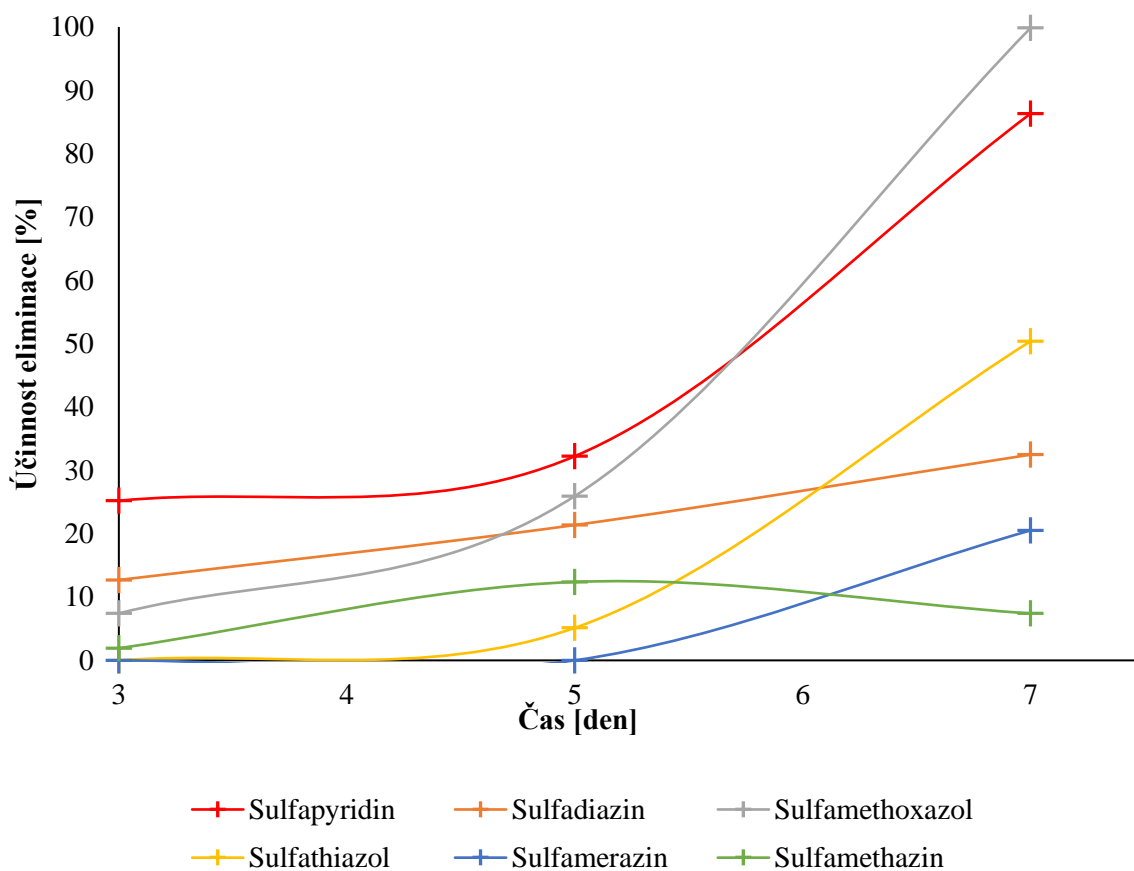


### 4.5.3 Testy na modelové vodě

#### 4.5.3.1 I. série testů: počáteční koncentrační úroveň 100 a 20 µg/l

Tabulka 21: Průměrné hodnoty účinnosti eliminace antibiotik z modelové vody s počáteční koncentrací sulfonamidových antibiotik 100 µg/l s příslušnými směrodatnými odchylkami S. Dále vyhodnocení celkového množství eliminovaných antibiotik ve vymezeném časovém období.

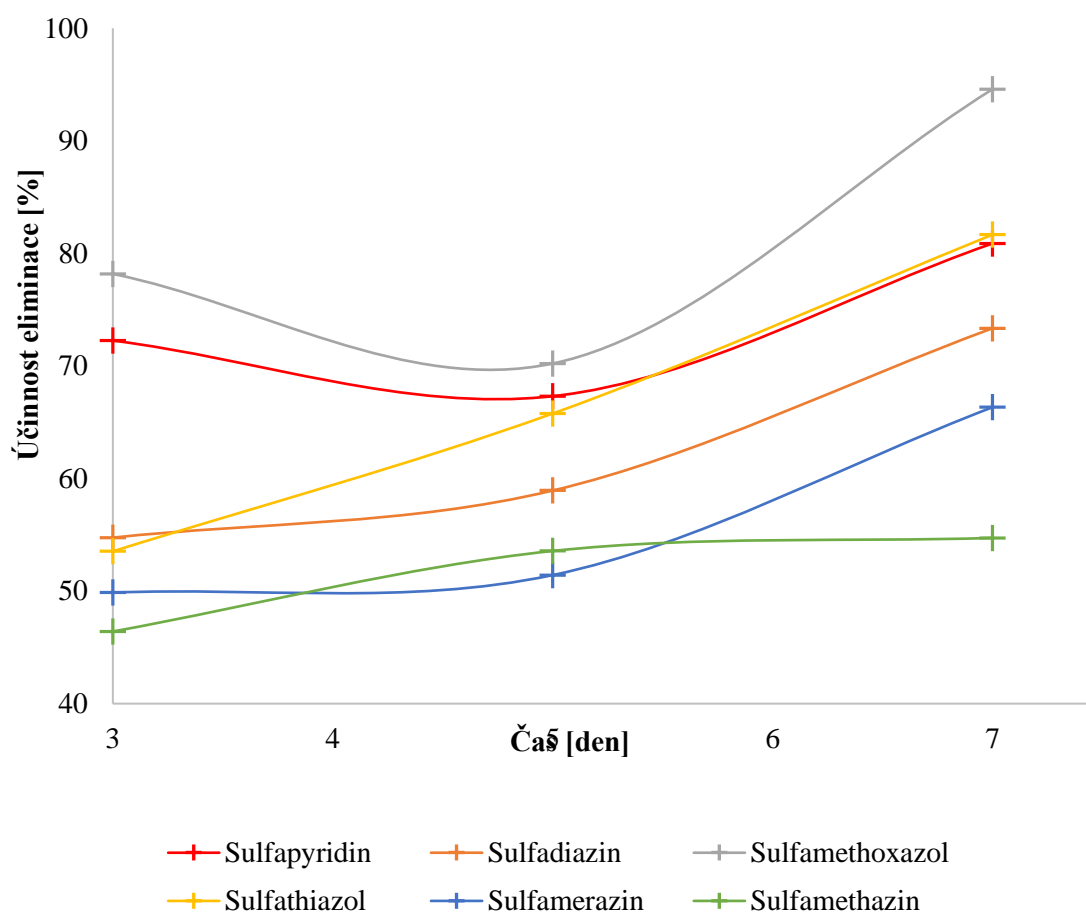
Čas [den]	3.		5.		7.	
Účinnost eliminace (E)	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]
Sulfapyridin	25,2	11,86	32,2	7,97	86,3	2,98
Sulfadiazin	12,7	11,13	21,4	13,45	32,5	9,81
Sulfamethoxazol	7,4	9,76	25,9	6,17	99,8	0,28
Sulfathiazol	0,0	0	5,1	4,67	50,4	7,21
Sulfamerazin	0,0	0	0,0	0	20,5	5,01
Sulfamethazin	1,9	1,79	12,4	11,01	7,4	7,28
Období	zahájení – 3. den		3. – 5. den		5. – 7. den	
$\Sigma$ eliminované množství	47,2 µg		49,8 µg		199,9 µg	



Obrázek 30: Sedmidenní vývoj účinnosti eliminace 100 µg/l sulfonamidových antibiotik z modelové vody prostřednictvím enzymatického aparátu *Trametes versicolor*

Tabulka 22: Průměrné hodnoty účinnosti eliminace antibiotik z modelové vody s počáteční koncentrací sulfonamidových antibiotik 20 µg/l s příslušnými směrodatnými odchylkami S. Dále vyhodnocení celkového množství eliminovaných antibiotik ve vymezeném časovém období.

Čas [den]	3.		5.		7.	
Účinnost eliminace (E)	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]
Sulfapyridin	72,3	4,83	67,3	13,25	80,9	13,79
Sulfadiazin	54,7	2,52	58,9	9,18	73,3	13,78
Sulfamethoxazol	78,2	3,63	70,2	20,65	94,6	3,92
Sulfathiazol	53,5	6,56	65,8	13,19	81,7	9,75
Sulfamerazin	49,9	5,23	51,4	10,47	66,3	15,62
Sulfamethazin	46,4	7,49	53,6	9,02	54,7	18,24
Období	zahájení – 3. den		3. – 5. den		5. – 7. den	
$\Sigma$ eliminované množství	71,0 µg		2,4 µg		16,9 µg	



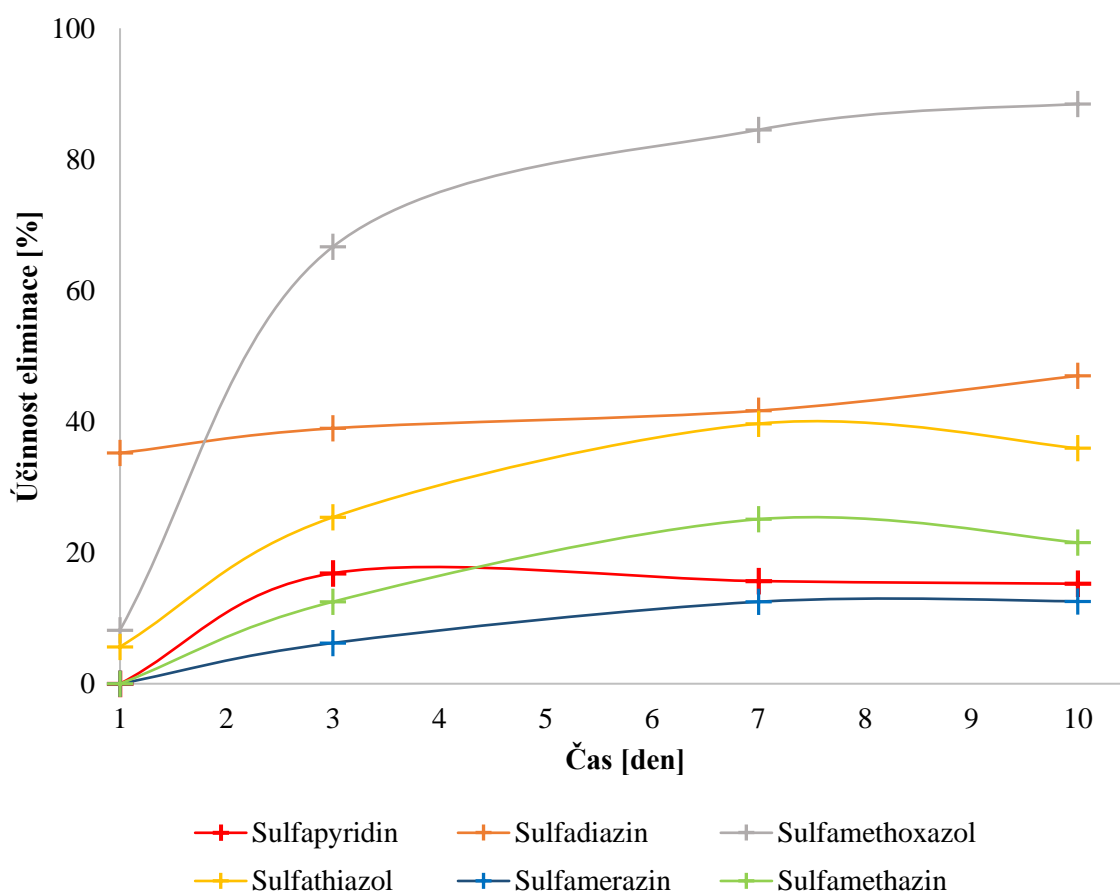
Obrázek 31: Sedmidenní vývoj účinnosti eliminace 20 µg/l sulfonamidových antibiotik z modelové vody prostřednictvím enzymatického aparátu *Trametes versicolor*

V I. sérii testování byly použity možné koncentrace sulfonamidů vyskytující se v odpadních vodách. Na první pohled je zřejmé, že na účinnost eliminace sulfonamidů má vliv počáteční koncentrace. Zatímco u koncentrace 20 µg/l bylo již v první odběrový den dosaženo vysoké účinnosti eliminace u všech testovaných látek v rozmezí 46,4 – 78,2 %, tak při počáteční koncentraci 100 µg/l byl po 3 dnech nejúčinněji, průměrně z 25,2 %, eliminován sulfapyridin. Ostatní látky byly eliminovány jen z 2 – 12,5 % nebo vůbec ne. Na rozdíl od koncentrace 20 µg/l, kde se po čas experimentu účinnost následně zvyšovala pozvolna, tak u 100 µg/l došlo po 5. dni k razantnímu nárůstu účinnosti eliminace, v některých případech blížící se kompletní eliminaci. Z počáteční koncentrace 20 µg/l byly sulfonamidy po 7 dnech eliminovány v rozmezí 54,7 – 94,6 %, u počáteční koncentrace 100 µg/l bylo dosaženo eliminace v rozsahu 7,4 až >99 %. Nejúčinněji byl eliminován sulfamethoxazol, naopak sulfamethazin byl po 7 dnech eliminován pouze ze 7,4 %.

#### 4.5.3.2 II. série testů: počáteční koncentrační úroveň 1 mg/l

Tabulka 23: Průběžné hodnoty účinnosti eliminace antibiotik z modelové vody s počáteční koncentrací sulfonamidových antibiotik 1 mg/l s příslušnými směrodatnými odchylkami S. Dále vyhodnocení celkového množství eliminovaných antibiotik ve vymezeném časovém období.

Čas [den]	1.		3.		5.		7.	
Účinnost eliminace (E)	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]
Sulfapyridin	0	0	16,9	3,83	15,7	1,35	15,3	2,98
Sulfadiazin	35,2	4,17	39,0	4,57	41,7	5,18	47,0	4,81
Sulfamethoxazol	8,2	2,09	66,7	3,63	84,5	3,65	88,5	2,28
Sulfathiazol	5,6	1,01	25,4	6,56	39,7	7,19	35,9	13,21
Sulfamerazin	0	0	6,2	1,3	12,5	5,47	12,6	5,01
Sulfamethazin	0	0	12,5	2,49	25,1	7,02	21,6	9,28
Období	zahájení – 1. den		1. – 3. den		3. – 7. den		7. – 10. den	
$\Sigma$ eliminovaného množství	490,2 $\mu$ g		1175,8 $\mu$ g		525,2 $\mu$ g		16,5 $\mu$ g	



Obrázek 32: Desetidenní vývoj účinnosti eliminace 1 mg/l sulfonamidových antibiotik z modelové vody prostřednictvím enzymatického aparátu *Trametes versicolor*

V II. sérii, byl monitorován celkový potenciál eliminace sulfonamidů pomocí *Trametes versicolor* z koncentrace 1 mg/l v časovém intervalu 10 dní. U sulfadiazinu, v porovnání s ostatními látkami, došlo k výrazné eliminaci již po 24 hodinách od zahájení testu. Následující dny už ale výraznější nárůst eliminace sulfadiazinu pozorován nebyl a naopak docházelo k postupné eliminaci ostatních látek. Po 10 dnech byly testované sulfonamidy z akvatické matrice eliminovány s účinností 12,6 – 47,0 %, kromě sulfamethoxazolu, který byl eliminován nejlépe a to s účinností 88,5 %. Výsledky testu potvrzují, že způsob eliminace antibiotik navrhnutým způsobem je možný aplikovat i na vody kontaminované vyšší koncentrací antibiotik.

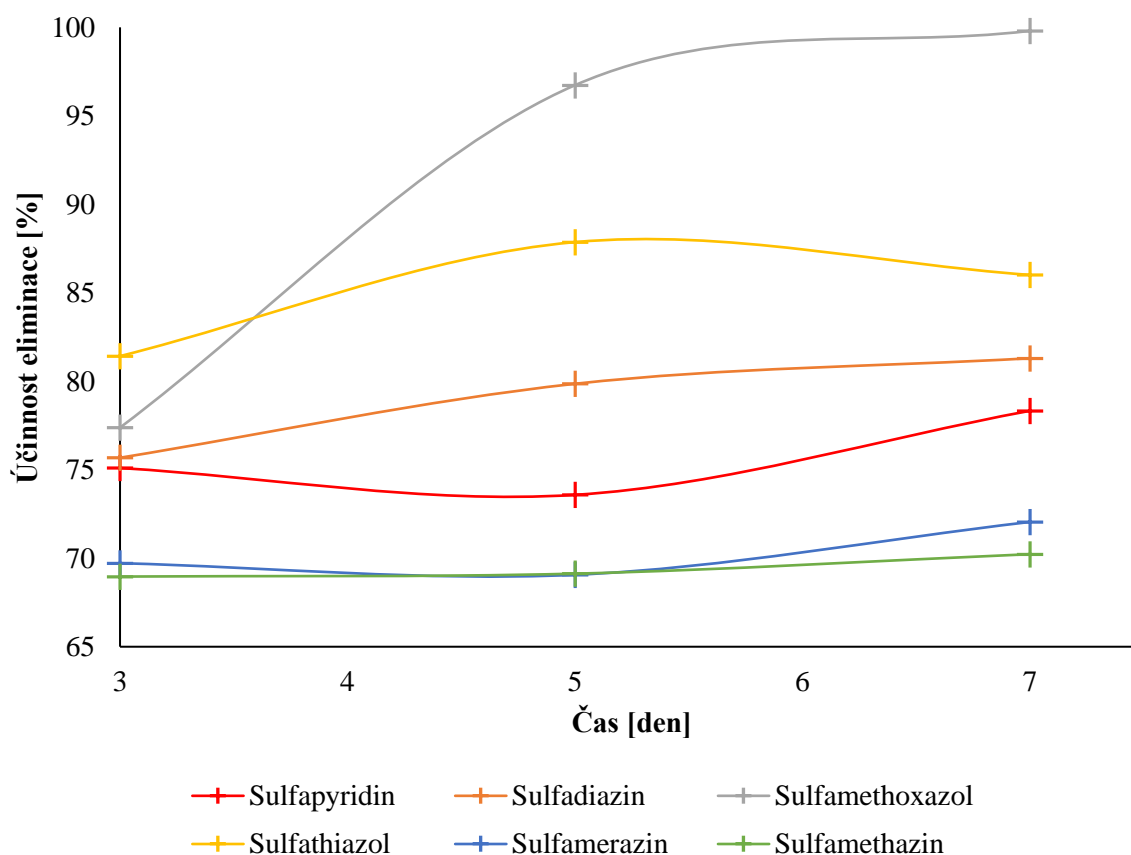
#### 4.5.4 Test na odpadní vodě

Jako matrice pro experimenty byla použita odpadní voda z odtoku ČOV Brno-Modřice, do které byly před zahájením testů přidány standardy sledovaných antibiotik.

##### 4.5.4.1 III. série testů: počáteční koncentrační úroveň 20 µg/l

Tabulka 24: Průměrné hodnoty účinnosti eliminace antibiotik z odpadní vody s počáteční koncentrací sulfonamidových antibiotik 20 µg/l s příslušnými směrodatnými odchylkami S. Dále vyhodnocení celkového množství eliminovaných antibiotik ve vymezeném časovém období.

Čas [den]	3.		5.		7.	
Účinnost eliminace (E)	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]	$\bar{E}$ [%]	S [%]
Sulfapyridin	75,1	6,18	73,6	6,96	78,3	8,60
Sulfadiazin	75,7	3,76	79,9	5,30	81,3	7,78
Sulfamethoxazol	77,4	6,06	96,7	1,80	> 99,4 (LOD)	(-)
Sulfathiazol	81,4	5,12	87,9	4,92	86,0	8,55
Sulfamerazin	69,7	7,24	69,1	8,03	72,1	9,69
Sulfamethazin	69,0	8,78	69,1	9,09	70,2	8,50
Období	zahájení – 3. den		3. – 5. den		5. – 7. den	
Σ eliminované množství	89,65 µg		5,59 µg		2,30 µg	



Obrázek 33: Sedmidenní vývoj účinnosti eliminace 20 µg/l sulfonamidových antibiotik z odpadní vody prostřednictvím enzymatického aparátu *Trametes versicolor*

Z počátku, v průběhu prvního až třetího dne od zahájení experimentu eliminace sulfonamidů z matrice odpadní vody, byl v testovacích nádobách pozorován vysoký nárůst množství mycelia. Odpadní voda se proto ukázala být vhodným médiem pro kultivaci mycelia *Trametes versicolor* a měla pozitivní vliv na rychlost nárůstu biomasy. Tento efekt lze vysvětlit například přítomností nutrientů v odpadní vodě, které byly metabolizovány myceliem *Trametes versicolor* pravděpodobně využity a pozitivně ovlivnily růst biomasy mycelia.

Pravděpodobně, a to v důsledku viditelně vyššího množství mycelia již v průběhu prvních dnů experimentu, bylo již během 3 dnů od zahájení testování dosaženo vysokých účinností eliminace všech sulfonamidových antibiotik, v rozmezí 69,0 až 81,4 %. Pro podrobnější výsledky přesněji popisující účinnost eliminace sulfonamidů z odpadních vod by bylo vhodné experiment zopakovat a naplánovat vyšší frekvenci vzorkování v průběhu prvních tří dní od zahájení testů. Od diskutovaného třetího dne se účinnost eliminace sulfonamidů zvyšovala, s výjimkou sulfamethoxazolu, už jen velmi mírně. Sulfamethoxazol byl po třech dnech od začátku experimentu průměrně odstraněn ze 77,4 %. Po sedmi dnech byl eliminován až na koncentraci pod LOD stanovení. Výsledky dosažené po 7 dnech z testů na odpadní vodě jsou porovnatelné s výsledky testů provedenými na modelové vodě s přidávkou antibiotik na koncentraci 20 µg/l.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vypracovat optimální metodu stanovení sulfonamidových antibiotik v akvatické matici a posoudit možnosti eliminace těchto látek z prostředí vodního ekosystému. Analyzovanou maticí byla odpadní voda odebraná z přítoku a odtoku velkokapacitní ČOV Brno-Modřice a modelová voda, která byla používána pro účely experimentů posouzení účinnosti nově navrženého postupu eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí mycelia dřevokazné houby *Trametes versicolor*.

Bylo vybráno šest antibiotik ze skupiny sulfonamidů, a to sulfapyridin, sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin a sulfamethoxazol. Pro účely jejich stanovení z vodných vzorků byl navržen a optimalizován analytický postup, jehož cílem bylo získání co nejsprávněji kvantifikovatelných výsledků. K izolaci analytů ze vzorků odpadní i modelové vody byla použita extrakce tuhou fází SPE, za použití optimalizovaného postupu s kolonkami Supel Select HLB 200 mg. Pro identifikaci a kvantifikaci byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií HPLC/MS. Použitou ionizační technikou byl elektrosprej, analyzátozem sférická iontová past. Kvantifikace analytů byla provedena metodou vnějšího standardu a korigována na výtěžnost použitých deuterovaných standardů.

Optimalizovaná metoda byla v první části experimentální práce aplikována při analýze reálných vzorků odpadní vody. Ve dnech 16. – 23. 4. 2018 bylo provedeno týdenní sledování koncentrace vybraných analytů na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice. Ze sledovaných analytů byly ve všech vzorcích detekovány pouze dva z nich, a to sulfapyridin a sulfamethoxazol. Koncentrace sulfapyridinu na přítoku byla stanovena v rozmezí 373,3 ng/l až 1,143 µg/l, koncentrace na odtoku byla v rozmezí 828,5 ng/l až 3,238 µg/l. Pouze v jednom případě byl sice sulfapyridin na přítoku detekován, avšak nemohl být správně kvantifikován. Koncentrace sulfamethoxazolu na přítoku byla stanovena na 750,6 ng/l až 2,095 µg/l, na odtoku se pohybovala v rozmezí 854,7 ng/l až 3,289 µg/l. Pravděpodobně vlivem vysokého matričního efektu přítokové odpadní vody byly koncentrace sulfapyridinu i sulfamethoxazolu stanovené na odtoku z ČOV ve většině případů vyšší než koncentrace stanovené na přítoku na ČOV. Z tohoto důvodu nemělo význam z vyhodnocených dat zjišťovat účinnost eliminace sulfonamidových antibiotik na sledované ČOV. Byla však prokázána nedostatečná účinnost eliminace cílových kontaminantů na sledované ČOV.

Náplní druhé části experimentální práce bylo použít optimalizovanou metodu stanovení sulfonamidových antibiotik pro vyhodnocení účinnosti eliminace těchto látek prostřednictvím techniky využívající k eliminaci kontaminantů enzymatický aparát dřevokazné houby *Trametes versicolor*. Bylo prováděno několik experimentů eliminace antibiotik z modelové vody s různou počáteční koncentrací sulfonamidů. Následně byl proveden také experiment s reálnou odpadní vodou z odtoku ČOV Brno-Modřice, obsahující přídavek standardů antibiotik o koncentraci odpovídající běžně se vyskytujícím koncentracím těchto látek v odpadních vodách.

Nejsnáze byl při všech experimentech a různých koncentracích eliminován sulfamethoxazol, jehož účinnost odstranění se téměř vždy blížila kompletní eliminaci. Jako nejhůře odstranitelný byl naopak vyhodnocen sulfamethazin. Časová závislost a celková účinnost eliminace jednotlivých antibiotik však nebylo možné jednoduše charakterizovat,



protože byla ovlivňována také počátečními podmínkami – koncentrace sulfonamidu při zahájení testů. U testů na modelové i odpadní vodě s počáteční koncentrací sulfonamidů 20 µg/l došlo k eliminaci největšího celkového množství antibiotik do tří dnů od zahájení testu. Následně už byl výrazněji eliminován převážně jen sulfamethoxazol. Odpadní voda se zároveň ukázala být vhodným médiem pro kultivaci mycelia, protože pozitivně ovlivnila nárůst biomasy z počátku testu, což mělo pozitivní dopad na účinnost eliminace. Při počáteční koncentraci 100 µg/l v modelové vodě byla účinnost eliminace v krátké době od zahájení testu, s výjimkou sulfapyridinu, poměrně nízká. Nejlepší účinnosti eliminace bylo v tomto případě dosaženo v závěru sedmidenního experimentu.

Z výsledků primárního výzkumu vyplývá, že navrženou technikou použití mycelia *Trametes versicolor* je možné eliminovat kontaminanty z vodního ekosystému u matrice, jakou je odpadní voda. Pro podrobnější výsledky, lépe zhodnocující potenciál této metody, však bude nutné provést další opakování testování a rovněž zařadit do metodiky testování proměnné parametry (vliv pH, zkrápění nosičů mycelia, určení letální koncentrace kontaminantů, variace kontaminantů, atd.), což umožní definovat okrajové podmínky praktické aplikace této techniky.

## 6 SEZNAM CITOVANÝCH ZDROJŮ

- [1] DMITRIENKO, Stanislava G., Elena V. KOCHUK, Vladimir V. APYARI, Veronika V. TOLMACHEVA a Yury A. ZOLOTOV. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection - A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **850**, 6–25. ISSN 18734324. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.08.023
- [2] ERRAYESS, Sophia Ait, Abdellatif Ait LAHCEN, Laila IDRISSE, Caterina MARCOALDI, Salvatore CHIAVARINI a Aziz AMINE. A sensitive method for the determination of Sulfonamides in seawater samples by Solid Phase Extraction and UV–Visible spectrophotometry. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2017, **181**, 276–285. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2017.03.061
- [3] AOSHIMA, Hitoshi. World â€™s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher : nedatováno.
- [4] GARCÍA-GALÁN, M. Jesús, M. SILVIA DÍAZ-CRUZ a Damià BARCELÓ. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, **27**(11), 1008–1022. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.10.001
- [5] KOOLS, S. A E, Johann F. MOLTMANN a Thomas KNACKER. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2008, **50**(1), 59–65. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2007.06.003
- [6] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Pharmakologie und Toxikologie* [online]. 2006. ISBN 3133685171. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-16651-8
- [7] GARCÍA-GALÁN, M. Jesús, M. Silvia DÍAZ-CRUZ a Damià BARCELÓ. Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin. Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environment International* [online]. 2011, **37**(2), 462–473. ISSN 18736750. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2010.11.011
- [8] SARMAH, Ajit K., Michael T. MEYER a Alistair B A BOXALL. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* [online]. 2006, **65**(5), 725–759. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- [9] LAMKA, Jiří a Lubomír DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Vyd. 4. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-802-4627-908.
- [10] NONG, Chunyan, Zongliang NIU, Pengyao LI, Chunping WANG, Wanyu LI a Yingying WEN. Dual-cloud point extraction coupled to high performance liquid chromatography for simultaneous determination of trace sulfonamide antimicrobials in urine and water samples. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, **1051**, 9–16. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.031
- [11] *Dodávky a jiná hodnocení, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [vid. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/dodavky-a-jina-hodnoceni>

- [12] ABDALLAH, H., C. ARNAUDGUILHEM, F. JABER a R. LOBINSKI. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear ion trap-Orbitrap). *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1355**, 61–72. ISSN 18733778. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.05.078
- [13] WEGST-UHRICH, Stacia R., Divina A G NAVARRO, Lisa ZIMMERMAN a Diana S. AGA. Assessing antibiotic sorption in soil: A literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides. *Chemistry Central Journal* [online]. 2014, **8**(1), 1–12. ISSN 1752153X. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-8-5
- [14] *Drugs* - *DrugBank* [online]. [vid. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs>
- [15] SOLLIEC, Morgan, Audrey ROY-LACHAPELLE, Marc Olivier GASSER, Caroline COTÉ, Mylène GÉNÉREUX a Sébastien SAUVÉ. Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Science of the Total Environment* [online]. 2016, **543**, 524–535. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.061
- [16] MELLON, M, C BENBROOK a KI BENBROOK. Hogging it!: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock. *Union of Concerned Scientists* [online]. 2001, (January), 77. ISSN 1535-3877. Dostupné z: doi:10.1097/QCO.0b013e32834e9a6a
- [17] KEMPER, Nicole. *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment* [online]. 2008. ISBN 1470160X (ISSN). Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002
- [18] MOULIN, Gérard, Philippe CAVALIÉ, Isabelle PELLANNE, Anne CHEVANCE, Arlette LAVAL, Yves MILLEMANN, Pierre COLIN a Claire CHAUVIN. A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2008, **62**(3), 617–625 [vid. 2018-02-27]. ISSN 03057453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkn213
- [19] EU. *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. září 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat (Text s významem pro EHP)* [online]. 2003. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&rid=1>
- [20] *378/2007 Sb. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech)* [online]. [vid. 2018-03-28]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378?citace=1>
- [21] ASHTON, D., M. HILTON a K. V. THOMAS. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment* [online]. 2004, **333**(1–3), 167–184. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2004.04.062
- [22] GÖBEL, Anke, Angela THOMSEN, Christa S. MCARDELL, Adriano JOSS a Walter GIGER. Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment. *Environmental Science and Technology* [online]. 2005, **39**(11), 3981–3989. ISSN 0013936X. Dostupné z: doi:10.1021/es048550a

- [23] DE JESUS GAFFNEY, Vanessa, Vitor Vale CARDOSO, Eugénia CARDOSO, Ana Paula TEIXEIRA, José MARTINS, Maria João BENOLIEL a Cristina Maria Martins ALMEIDA. Occurrence and behaviour of pharmaceutical compounds in a Portuguese wastewater treatment plant: Removal efficiency through conventional treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2017, **24**(17), 14717–14734. ISSN 16147499. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-017-9012-7
- [24] GÖBEL, Anke, Christa S. MCARDELL, Marc J.F. SUTER a Walter GIGER. Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2004, **76**(16), 4756–4764. ISSN 00032700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0496603
- [25] PERIŠA, Martina, Sandra BABIĆ, Irena ŠKORIĆ, Tobias FRÖMEL a Thomas P. KNEPPER. Photodegradation of sulfonamides and their N4-acetylated metabolites in water by simulated sunlight irradiation: Kinetics and identification of photoproducts. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2013, **20**(12), 8934–8946. ISSN 09441344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-013-1836-1
- [26] GÖBEL, Anke, Christa S. MCARDELL, Adriano JOSS, Hansruedi SIEGRIST a Walter GIGER. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of the Total Environment* [online]. 2007, **372**(2–3), 361–371. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2006.07.039
- [27] KIM, Kwon-Rae, Gary OWENS, Soon-Ik KWON, Kyu-Ho SO, Deog-Bae LEE a Yong Sik OK. Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, & Soil Pollution* [online]. 2011, **214**(1–4), 163–174 [vid. 2018-04-29]. ISSN 0049-6979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-010-0412-2
- [28] PARK, Jong Yol a Bernd HUWE. Effect of pH and soil structure on transport of sulfonamide antibiotics in agricultural soils. *Environmental Pollution* [online]. 2016, **213**, 561–570. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2016.01.089
- [29] HU, Feng Yang, Li Min HE, Jian Wen YANG, Kui BIAN, Zong Nan WANG, Hai Cui YANG a Ya Hong LIU. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2014, **949–950**, 79–86. ISSN 1873376X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.008
- [30] BOTITSI, Eleni, Charalampia FROSYNI a Despina TSIPI. Determination of Sulfonamide Antibiotics in Wastewater by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry. *Application Note: 397* [online]. 2007, (AN62480\_E 10/07S), 1–4. Dostupné z: www.thermo.com/appnotes
- [31] *Other Micropollutants removing solutions* [online]. [vid. 2018-04-02]. Dostupné z: <http://micropollutants.com/Solutions/Other>
- [32] KOŽIŠEK, František a Petr PUMANN. Léčiva v pitné vodě a vliv médií. *Envigogika* [online]. 2013, **8**(3), 1–14. ISSN 1802-3061. Dostupné z: doi:10.14712/18023061.388
- [33] THIELE-BRUHN, S, T SEIBICKE, H R SCHULTEN a P LEINWEBER. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *Journal of Environmental Quality* [online]. 2004, **33**(4), 1331–1342. ISSN 0047-2425. Dostupné z: doi:33/4/1331 [pii]

- [34] BATT, Angela L., Daniel D. SNOW a Diana S. AGA. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* [online]. 2006, **64**(11), 1963–1971 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.01.029
- [35] BARTELT-HUNT, Shannon, Daniel D. SNOW, Teyona DAMON-POWELL a David MIESBACH. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *Journal of Contaminant Hydrology* [online]. 2011, **123**(3–4), 94–103. ISSN 01697722. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconhyd.2010.12.010
- [36] SPIELMEYER, Astrid, Heinrich HILFPER a Gerd HAMSCHER. Long-term monitoring of sulfonamide leaching from manure amended soil into groundwater. *Chemosphere* [online]. 2017, **177**, 232–238. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.020
- [37] BIAŁK-BIELIŃSKA, Anna, Stefan STOLTE, Jürgen ARNING, Ute UEBERS, Andrea BÖSCHEN, Piotr STEPNOWSKI a Marianne MATZKE. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere* [online]. 2011, **85**(6), 928–933. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2011.06.058
- [38] LUCAS, D., D. BARCELÓ a S. RODRIGUEZ-MOZAZ. Removal of pharmaceuticals from wastewater by fungal treatment and reduction of hazard quotients. *Science of the Total Environment* [online]. 2016, **571**, 909–915. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.074
- [39] EUROPEAN COMMISSION JOINT RESEARCH CENTRE. Technical Guidance Document on Risk Assessment in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances and Directive 98/8/EC of the Europ [online]. 2003 [vid. 2018-05-05]. Dostupné z: [https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2\\_2ed\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf)
- [40] CHEE-SANFORD, J. C., R. I. AMINOV, I. J. KRAPAC, N. GARRIGUES-JEANJEAN a R. I. MACKIE. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(4), 1494–1502. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.4.1494-1502.2001
- [41] DOLLIVER, Holly, Kuldip KUMAR a Satish GUPTA. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil. *Journal of Environment Quality* [online]. 2007, **36**(4), 1224 [vid. 2018-04-29]. ISSN 1537-2537. Dostupné z: doi:10.2134/jeq2006.0266
- [42] POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2001, **57**(1–2), 20–33. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s002530100745
- [43] RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, Carlos E., Aleksandra JELIĆ, Marta LLORCA, Marinella FARRÉ, Glòria CAMINAL, Mira PETROVIĆ, Damià BARCELÓ a Teresa VICENT. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresource Technology* [online]. 2011, **102**(10), 5602–5608. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.02.029

- [44] RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Carlos E., Ma JESÚS GARCÍA-GALÁN, Paqui BLÁNQUEZ, M. Silvia DÍAZ-CRUZ, Damià BARCELÓ, Glòria CAMINAL a Teresa VICENT. Continuous degradation of a mixture of sulfonamides by *Trametes versicolor* and identification of metabolites from sulfapyridine and sulfathiazole. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2012, **213–214**, 347–354. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2012.02.008
- [45] RAHMANI, Kouros, Mohammad Ali FARAMARZI, Amir Hossain MAHVI, Mitra GHOLAMI, Ali ESRAFILI, Hamid FOROOTANFAR a Mahdi FARZADKIA. Elimination and detoxification of sulfathiazole and sulfamethoxazole assisted by laccase immobilized on porous silica beads. *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. 2015, **97**, 107–114. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2014.10.018
- [46] KALINA, Tomáš, Jiří VÁŇA a UNIVERZITA KARLOVA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. B.m.: Karolinum, 2005. ISBN 8024610361.
- [47] ŽIŽLAVSKÁ, A. *Odbourávání xenobiotik z městských odpadních vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební, 2018. 36 s. Školitel dizertační práce prof. Ing. Petr Hlavínek, CSc., MBA
- [48] UHNÁKOVÁ, B., A. PETŘÍČKOVÁ, D. BIEDERMANN, L. HOMOLKA, V. VEJVODA, P. BEDNÁŘ, B. PAPOUŠKOVÁ, M. ŠULC a L. MARTÍNKOVÁ. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. *Chemosphere* [online]. 2009, **76(6)**, 826–832. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.016
- [49] LEVIN, Laura, Maira CARABAJAL, Martin HOFRIKTER a René ULLRICH. Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. 2016, **107**, 174–179. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2015.11.023
- [50] BAUTISTA, Luis Fernando, Gabriel MORALES a Raquel SANZ. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on amino-functionalized SBA-15. *Chemosphere* [online]. 2015, **136**, 273–280. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.071
- [51] BECKER, Dennis, Saulo VARELA DELLA GIUSTINA, Sara RODRIGUEZ-MOZAZ, Rob SCHOEVAART, Damià BARCELÓ, Matthias DE CAZES, Marie Pierre BELLEVILLE, José SANCHEZ-MARCANO, Jean DE GUNZBURG, Olivier COUILLEROT, Johannes VÖLKER, Jörg OEHLMANN a Martin WAGNER. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **219**, 500–509. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.08.004
- [52] BORRÀS, Eduard, Paqui BLÁNQUEZ, Montserrat SARRÀ, Glòria CAMINAL a Teresa VICENT. *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, **42(1)**, 61–66. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2008.05.014

- [53] BLÁNQUEZ, P., N. CASAS, X. FONT, X. GABARRELL, M. SARRÀ, G. CAMINAL a T. VICENT. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research* [online]. 2004, **38**(8), 2166–2172. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2004.01.019
- [54] ESPINOSA-ORTIZ, Erika J., Eldon R. RENE, Kannan PAKSHIRAJAN, Eric D. VAN HULLEBUSCH a Piet N.L. LENS. Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2016, **283**, 553–571. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2015.07.068
- [55] COLLADO, N., S. RODRIGUEZ-MOZAZ, M. GROS, A. RUBIROLA, D. BARCELÓ, J. COMAS, I. RODRIGUEZ-RODA a G. BUTTIGLIERI. Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environmental Pollution* [online]. 2014, **185**, 202–212. ISSN 18736424. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2013.10.040
- [56] GROS, Meritxell, Sara RODRÍGUEZ-MOZAZ a Damià BARCELÓ. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1248**, 104–121. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.05.084
- [57] CRUZ-MORATÓ, Carles, Daniel LUCAS, Marta LLORCA, Sara RODRIGUEZ-MOZAZ, Marina GORGA, Mira PETROVIC, Damià BARCELÓ, Teresa VICENT, Montserrat SARRÀ a Ernest MARCO-URREA. Hospital wastewater treatment by fungal bioreactor: Removal efficiency for pharmaceuticals and endocrine disruptor compounds. *Science of the Total Environment* [online]. 2014, **493**, 365–376. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.117
- [58] *Web of Science [v.5.29] - Web of Science Core Collection Advanced Search* [online]. [vid. 2018-05-02]. Dostupné z: [http://apps.webofknowledge.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/WOS\\_AdvancedSearch\\_input.do?SID=E6IKkVmfksmwhsA1oKn&product=WOS&search\\_mode=AdvancedSearch](http://apps.webofknowledge.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/WOS_AdvancedSearch_input.do?SID=E6IKkVmfksmwhsA1oKn&product=WOS&search_mode=AdvancedSearch)
- [59] *ScienceDirect Search* [online]. [vid. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/search/advanced>
- [60] SEIFRTOVÁ, Marcela, Lucie NOVÁKOVÁ, Celeste LINO, Angelina PENA a Petr SOLICH. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **649**(2), 158–179. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.07.031
- [61] AGILENT. Fundamentals. *Agilent Presentation* [online]. 2014, **42**(11), 2555–2568. Dostupné z: doi:10.1515/9783110289169
- [62] PERRET, D., A. GENTILI, S. MARCHESI, A. GRECO a R. CURINI. Sulphonamide Residues in Italian Surface and Drinking Waters: A Small Scale Reconnaissance. *Chromatographia* [online]. 2006, **63**(5–6), 225–232. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-006-0737-6

- [63] TRAN, Ngoc Han, Martin REINHARD a Karina Yew Hoong GIN. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water Research* [online]. 2018, **133**, 182–207. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.12.029
- [64] YUDTHAVORASIT, Soparat, Chayada CHIAOCHAN a Natchanun LEEPIPATPIBOON. Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchimica Acta* [online]. 2011, **172**(1), 39–49. ISSN 00263672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-010-0454-6
- [65] CHANG, Hong, Jianying HU, Mari ASAMI a Shoichi KUNIKANE. Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1190**(1–2), 390–393. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.03.057
- [66] YE, Sai, Ziwei YAO, Guangshui NA, Juying WANG a Deyi MA. Rapid simultaneous determination of 14 sulfonamides in wastewater by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(15), 2360–2369 [vid. 2018-05-04]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600539
- [67] BALAKRISHNAN, Vimal K., Ken A. TERRY a John TOITO. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1131**(1–2), 1–10 [vid. 2018-05-04]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.07.011
- [68] LI, Ji-Dong, Ya-Qi CAI, Ya-Li SHI, Shi-Feng MOU a Gui-Bin JIANG. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography–spectrophotometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1139**(2), 178–184 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2006.11.023
- [69] MALINTAN, Nancy T. a Mustafa Ali MOHD. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1127**(1–2), 154–160 [vid. 2018-05-04]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2006.06.005
- [70] RAICH-MONTIU, J., J. FOLCH, R. COMPAÑÓ, M. GRANADOS a M. D. PRAT. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1172**(2), 186–193. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.10.010
- [71] CHIAVARINO, Barbara, Maria Elisa CRESTONI, Annito DI MARZIO a Simonetta FORNARINI. Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* [online]. 1998, **706**(2), 269–277. ISSN 15726495. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(97)00568-9



- [72] HOFF, Rodrigo, Tânia Mara PIZZOLATO a M. Silvia DIAZ-CRUZ. Trends in sulfonamides and their by-products analysis in environmental samples using mass spectrometry techniques. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2016, **9**, 24–36. ISSN 22141588. Dostupné z: doi:10.1016/j.teac.2016.02.002
- [73] KAHSAY, Getu, Huiying SONG, Ann VAN SCHEPDAEL, Deirdre CABOOTER a Erwin ADAMS. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **87**, 142–154. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2013.04.015
- [74] ZHENG, Ming Ming, Man Yu ZHANG, Guang Yu PENG a Yu Qi FENG. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, **625**(2), 160–172. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2008.07.033
- [75] ČOV Brno - Modřice | Brněnské vodárny a kanalizace, a.s. [online]. [vid. 2018-05-12]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cistení-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>
- [76] Mariánské Údolí, Hlubočky • Mapy.cz [online]. [vid. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=17.4011917&y=49.6057671&z=15&source=ward&id=6961&q=hlubočky mariánské údolí>
- [77] DADÁKOVÁ, Petra. *Sledování obsahu sulfonamidů v odpadních vodách z čistění odpadních vod s různými technologiemi čištění*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická 2014. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [78] MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI V HPLC [online]. [vid. 2018-05-12]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/lod\\_loq.htm](http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm)
- [79] Ascentis Express HILIC HPLC Columns | Sigma-Aldrich [online]. [vid. 2018-05-12]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=20356023&gclid=EAIaIQobChMIw537hdSA2wIVR53VCh28Cg4eEAAYASAAEgKJ9fD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=20356023&gclid=EAIaIQobChMIw537hdSA2wIVR53VCh28Cg4eEAAYASAAEgKJ9fD_BwE)
- [80] Fused-Core Columns Technology | Ascentis Express | Sigma-Aldrich | Sigma-Aldrich [online]. [vid. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express/fused-core-advantage.html>
- [81] Ascentis® Express C18, 2.7 Micron HPLC Column 2.7 µm particle size, L × I.D. 15 cm × 3 mm | Sigma-Aldrich [online]. [vid. 2018-05-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/53816u?lang=en&region=C>
- [82] Column Care and Optimization Notes [online]. nedatováno [vid. 2018-05-13]. Dostupné z: [http://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/il69770315\\_w\\_care.pdf](http://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/il69770315_w_care.pdf)
- [83] PRAKTICKÉ. Klinická farmacie [online]. 2014, **10**(1) [vid. 2018-05-14]. Dostupné z: <https://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2014/01/07.pdf>
- [84] Minden Pictures stock photos - Cross section through a dried Loofah (*Luffa aegyptiaca*) used as bath sponge, UK - Adrian Davies/ npl [online]. [vid. 2018-04-26]. Dostupné z: [https://www.mindenpictures.com/search/preview/cross-section-through-a-dried-loofah-luffa-aegyptiaca-used-as-bath-sponge-uk/0\\_90161838.html](https://www.mindenpictures.com/search/preview/cross-section-through-a-dried-loofah-luffa-aegyptiaca-used-as-bath-sponge-uk/0_90161838.html)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK - NEAKTUÁLNÍ

ACN	acetonitril
AChE	acetylcholinesteráza
AOP	pokročilé oxidační procesy
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATB	antibiotikum
ATC	anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace
CAS	konvenční způsob čištění odpadních vod aktivovaným kalem (Conventional Activated Sludge)
CEC	katexová kapacita (Cation Exchange Capacity)
ČOV	čistírna odpadních vod
DCM	dichlormethan
DHF	kyselina dihydrolistová
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EC	efektivní koncentrace
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EIC	extrahovaný iontový chromatogram
ESI	elektrosprej
FLD	fluorescenční detektor
G <sup>-</sup>	gramnegativní bakterie
G <sup>+</sup>	grampozitivní bakterie
GR	glutathion reductáza
HF-LPME	mikroextrakce využívající duté vlákno (Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HQ	index nebezpečnosti (Hazard Quotient)
IS	interní standard
IUPAC	Internation Union of Pure and Applied Chemistry
LC	kapalinová chromatografie
LC	letální koncentrace
LIP	lignin peroxidáza
LME	lignin modifikující enzym
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace

MF	mobilní fáze
MnP	manganová peroxidáza
MQ	Milli-Q voda
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
OV	odpadní voda
PABA	kyselina p-aminobenzoová
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
PhACs	farmaceuticky aktivní sloučeniny (Pharmaceutically Active Compounds)
PLA	kyselina polyléčná
PNEC	Predicted No Effect Concentration
RNA	kyselina ribonukleová
SA	sulfonamidová antibiotika
SDZ	sulfadiazin
SMR	sulfamerazin
SMX	sulfamethoxazol
SMX-d <sub>4</sub>	sulfamethoxazol deuterovaný
SMZ	sulfamethazin
SPE	extrakce tuhou fází
SPY	sulfapyridin
SRM	monitorování vybrané reakce
STZ	sulfathiazol
STZ-d <sub>4</sub>	sulfathiazol deuterovaný
THF	kyselina tetrahydrofurová
TIC	celkový iontový proud
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ÚCHTOŽP	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
UV	ultrafialové záření
WRF	houba bílé hniloby (white-rot fungi)
WWTP	wastewater treatment plant

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

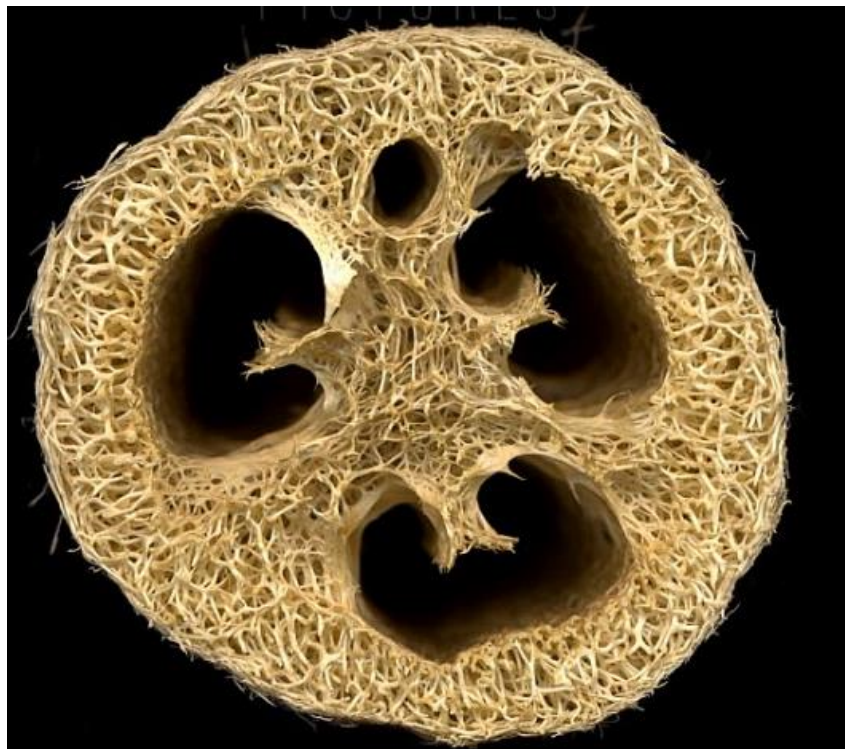
**Příloha č 1:** Skelet plodů rostliny *Luffa aegyptiaca*

**Příloha č 2:** Kalibrační závislosti standardů cílových analytů

**Příloha č 3:** Extrahované iontové chromatogramy sulfapyridinu a sulfamethoxazolu z odtoku nebo přítoku ČOV Brno-Modřice

**Příloha č 4:** Extrahované iontové chromatogramy sledovaných analytů z testů eliminace sulfonamidových antibiotik prostřednictvím *Trametes versicolor*

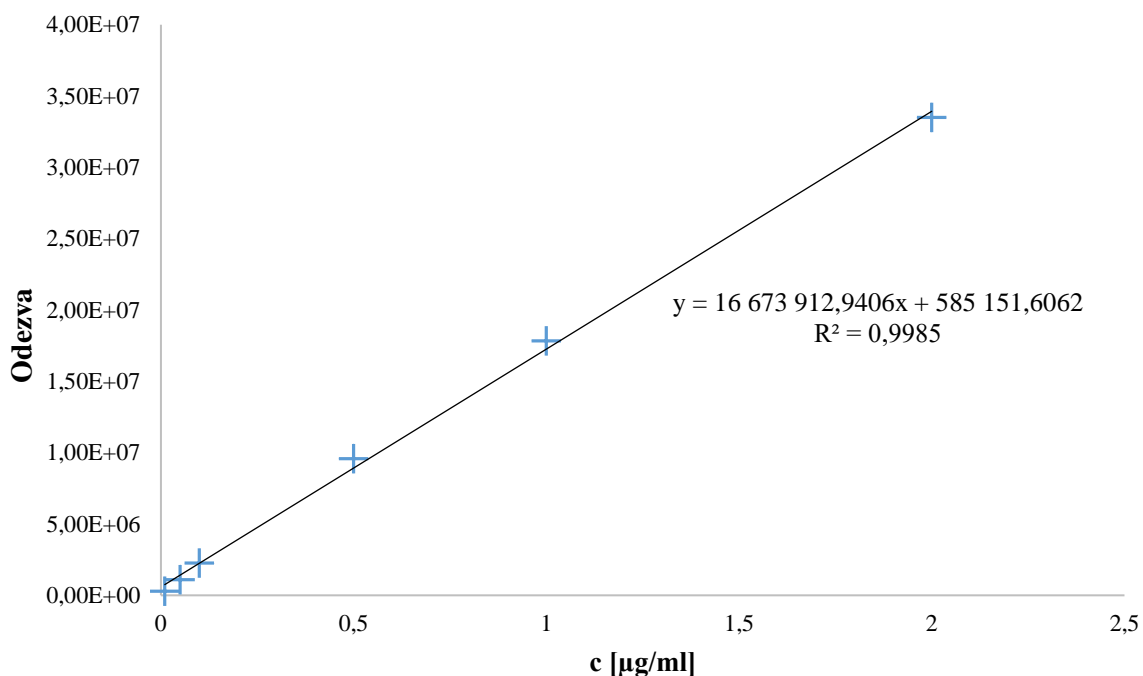
**Příloha č. 1:** Skelet plodů rostliny *Luffa aegyptiaca*



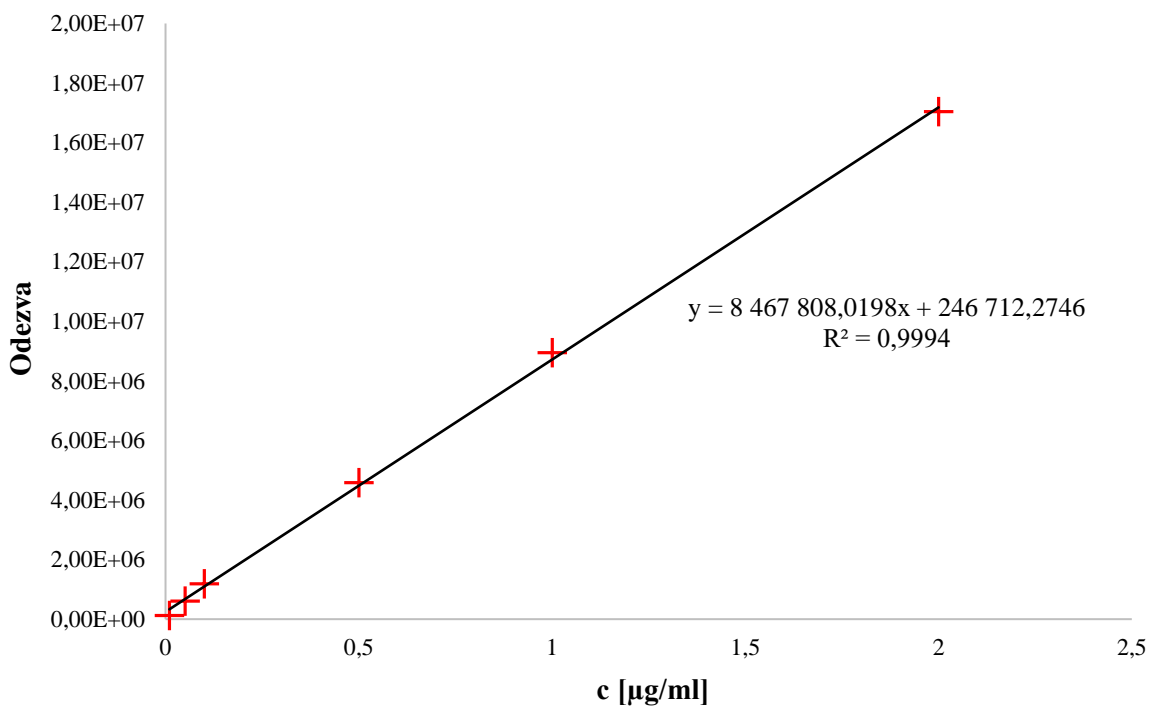
Obrázek 34: Skelet plodů rostliny *Luffa aegyptiaca* použitelný jako nosič mycelia WRF [84]

## Příloha č 2: Kalibrační závislosti výšky píku standardů na koncentraci

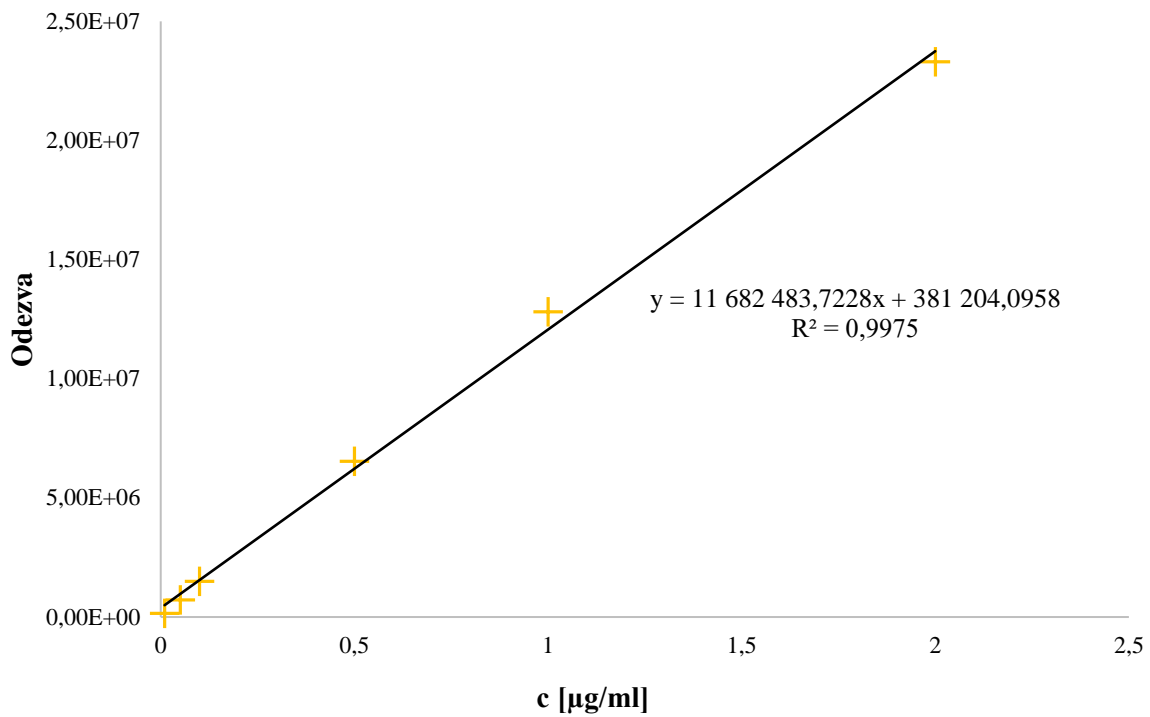
Tyto kalibrační závislosti byly použity pro vyhodnocení analytických parametrů stanovení LOD a LOQ



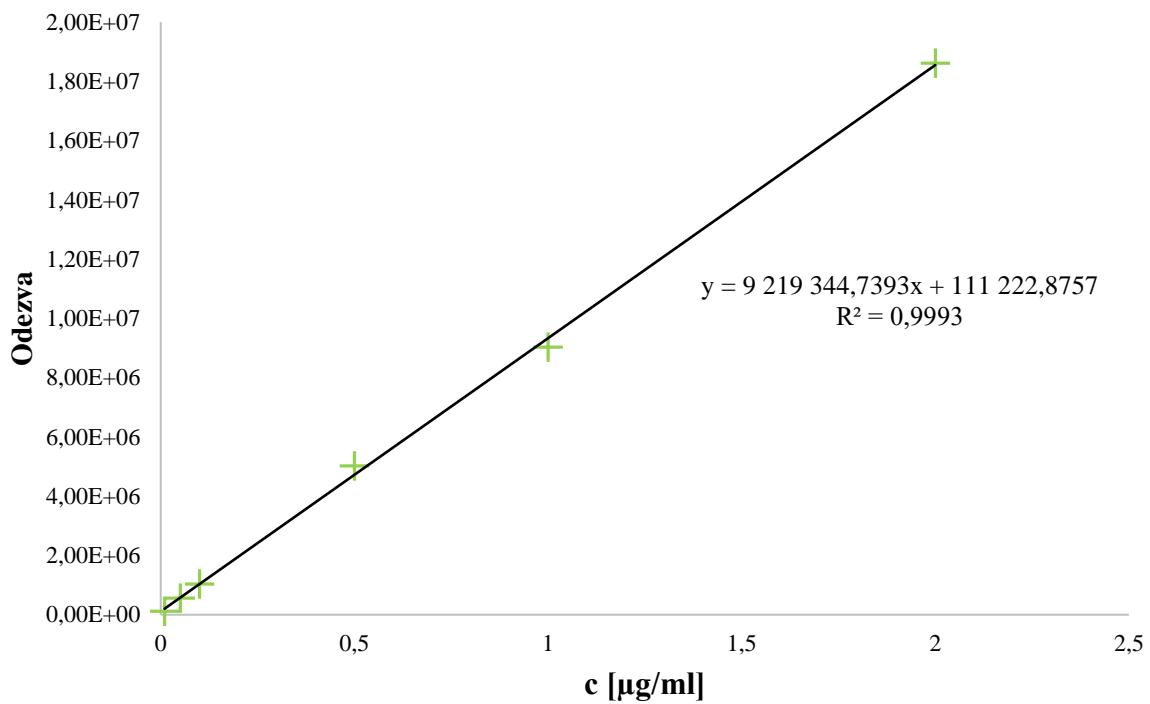
Obrázek 35: Kalibrační závislost sulfapyridinu (250 m/z)



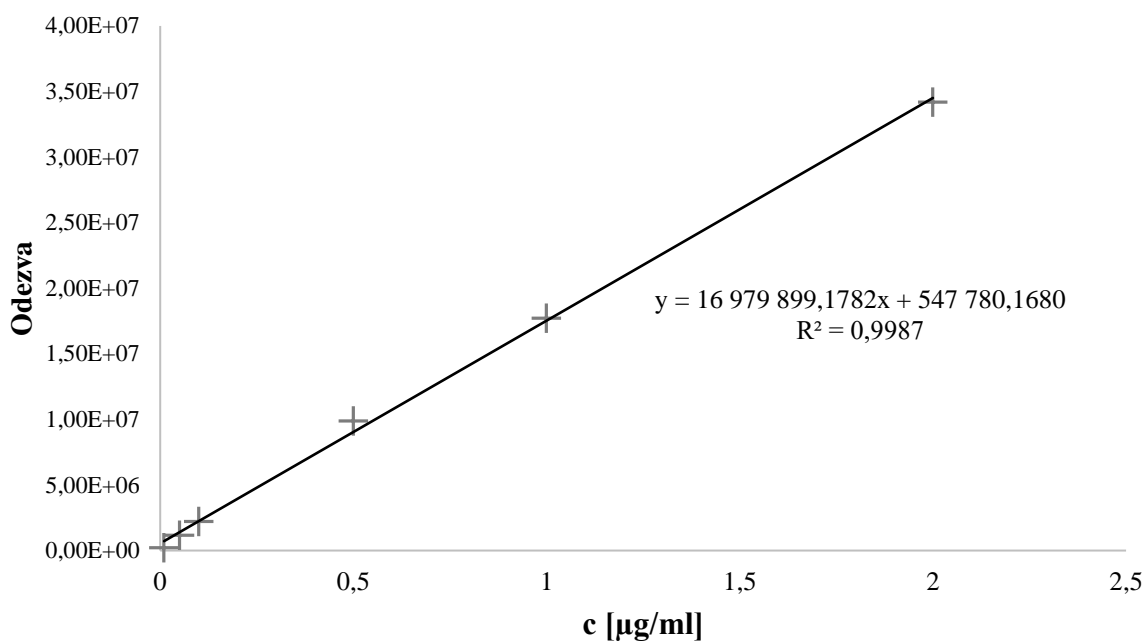
Obrázek 36: Kalibrační závislost sulfadiazinu (251 m/z)



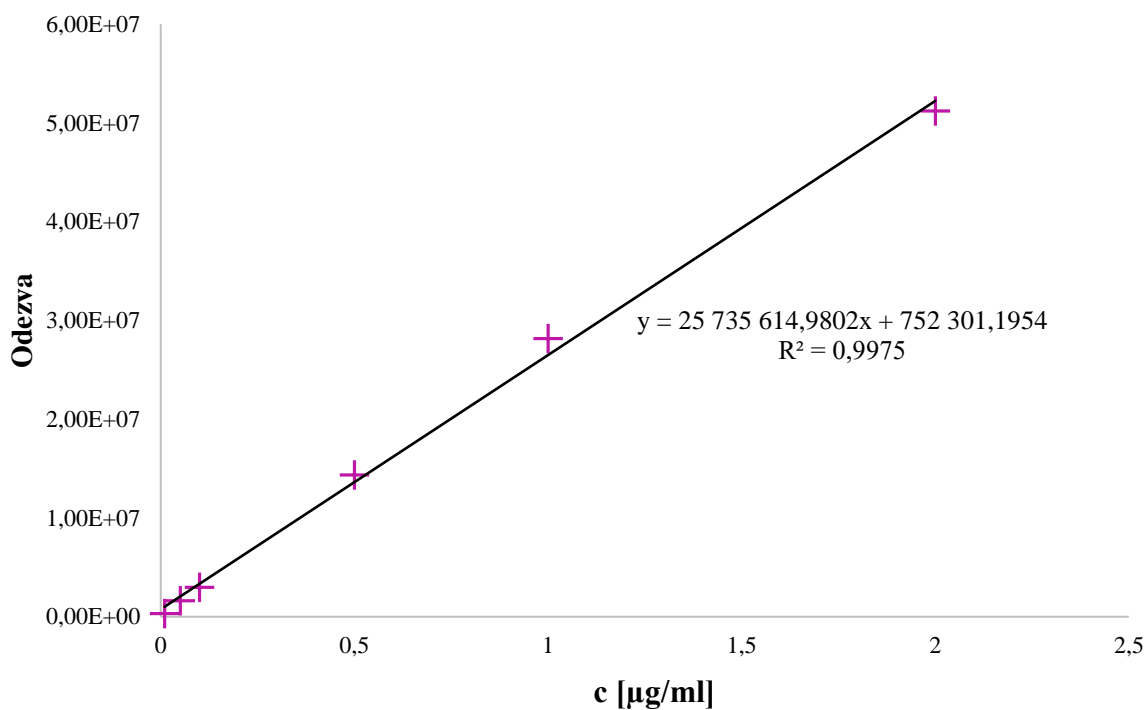
Obrázek 37: Kalibrační závislost sulfamethoxazolu (254 m/z)



Obrázek 38: Kalibrační závislost sulfathiazolu (256 m/z)

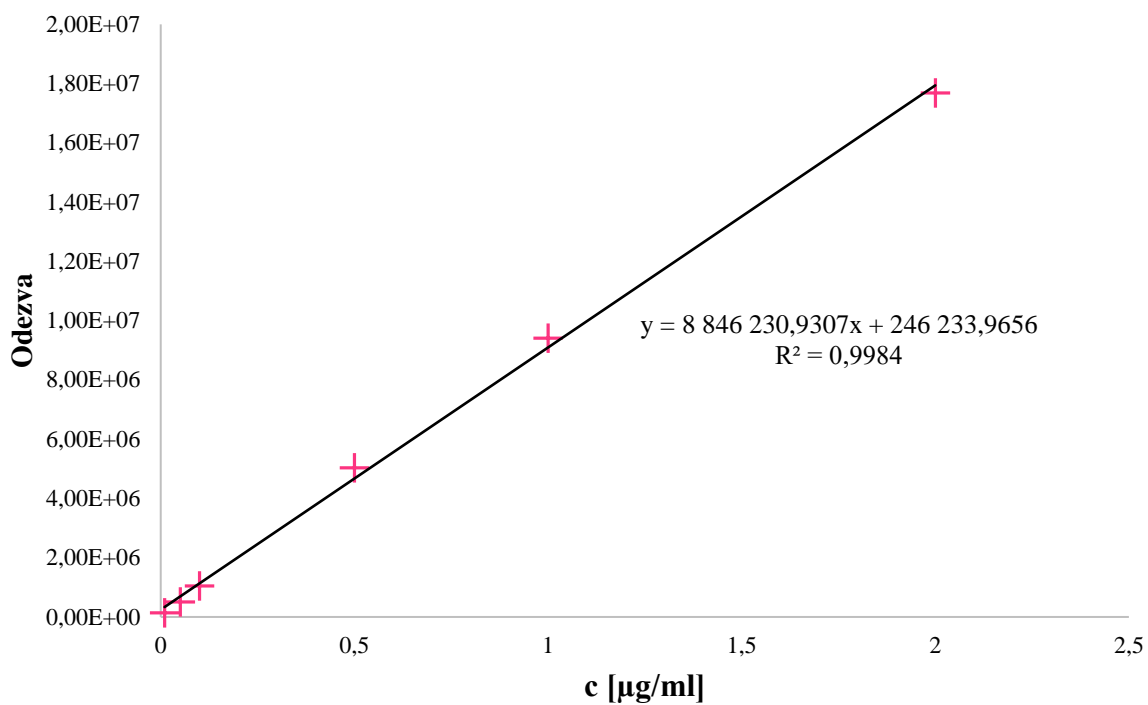


Obrázek 39: Kalibrační závislost sulfamerazinu (265 m/z)

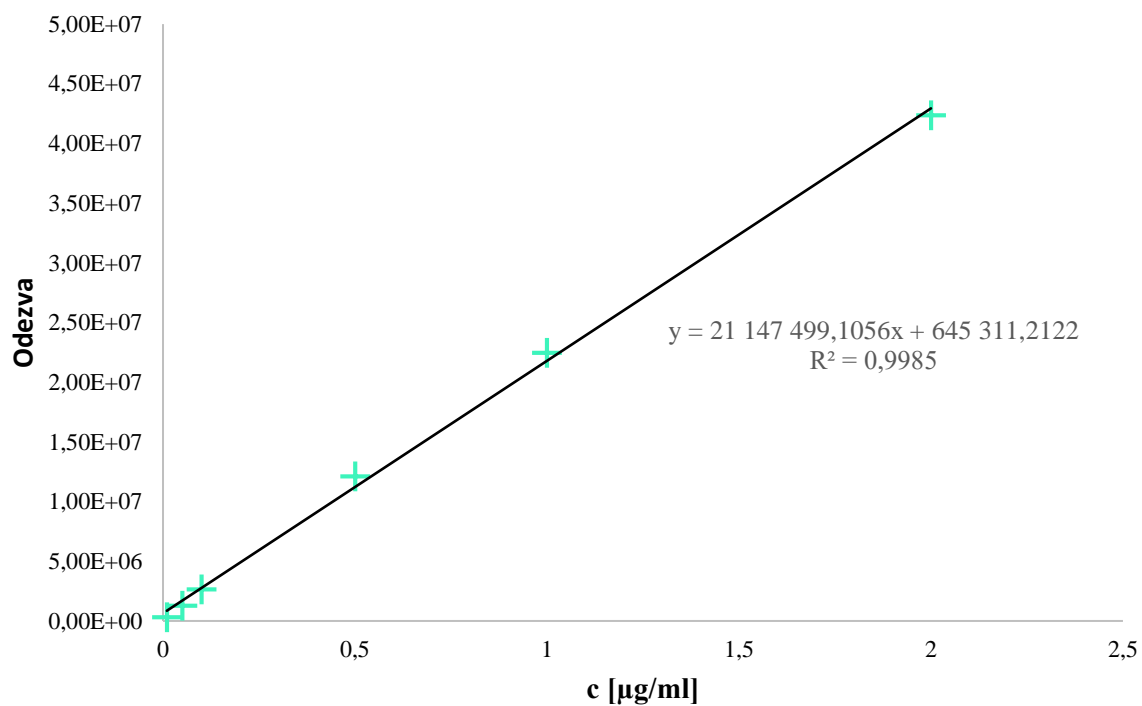


Obrázek 40: Kalibrační závislost sulfamethazinu (279 m/z)



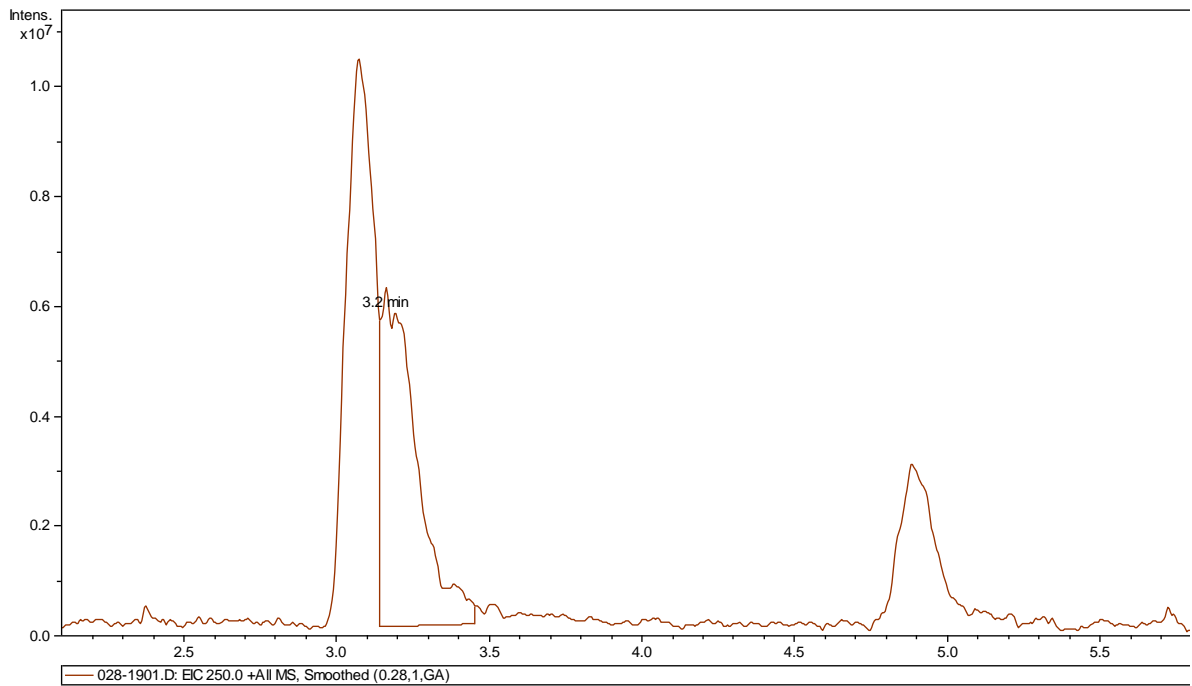


Obrázek 41: Kalibrační závislost interního standardu sulfamethoxazolu-d4 (258 m/z)

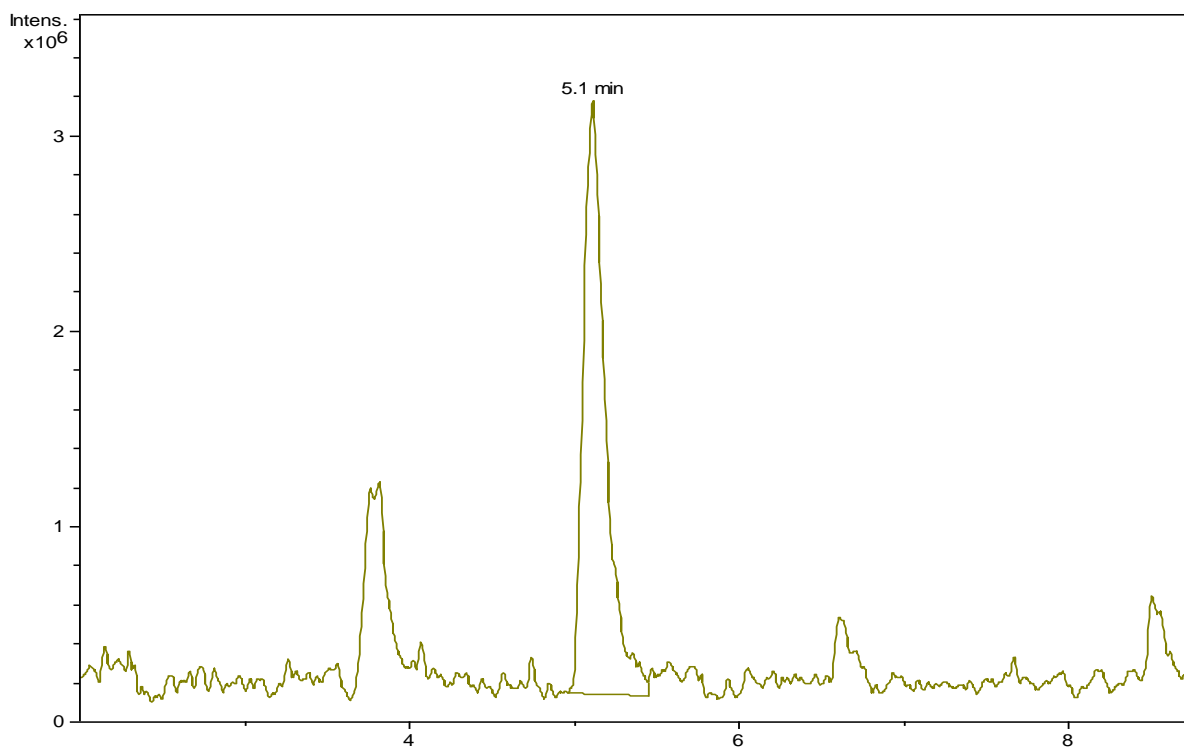


Obrázek 42: Kalibrační závislost interního standardu sulfathiazolu-d4 (260 m/z)

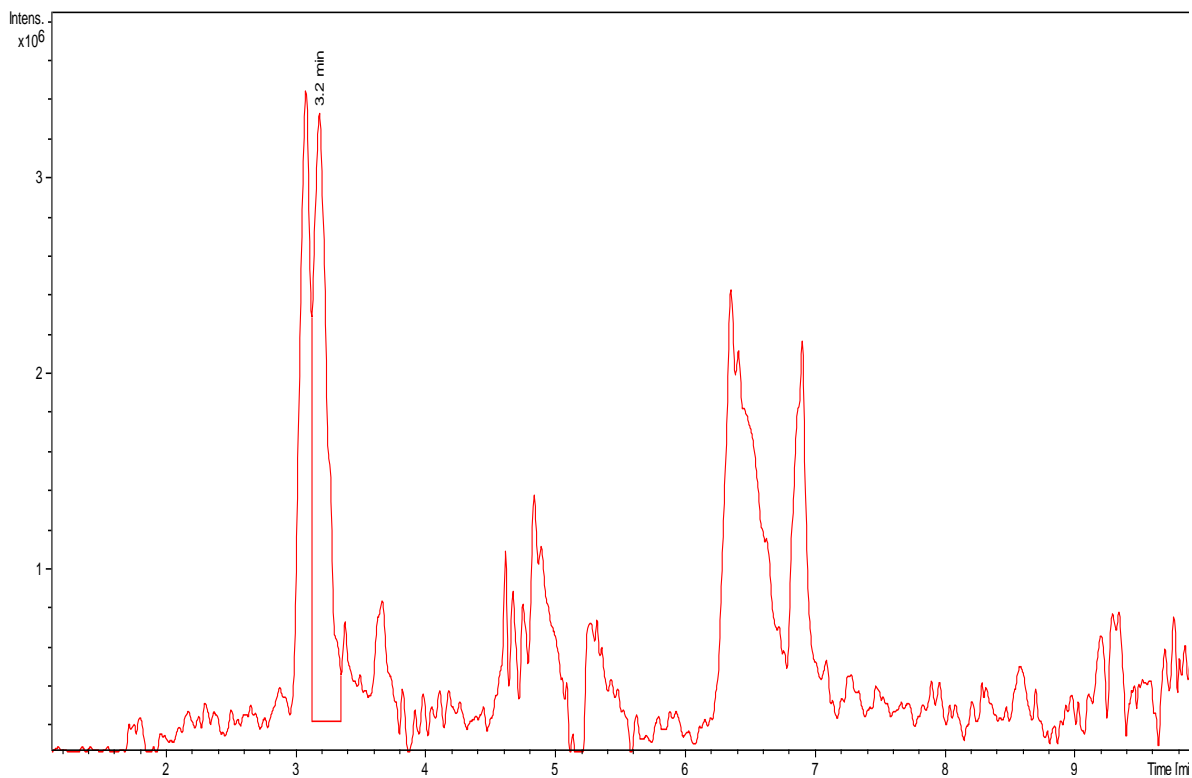
**Příloha 3:** Extrahované iontové chromatogramy sulfapyridinu a sulfamethoxazolu z odtoku nebo přítoku ČOV Brno-Modřice



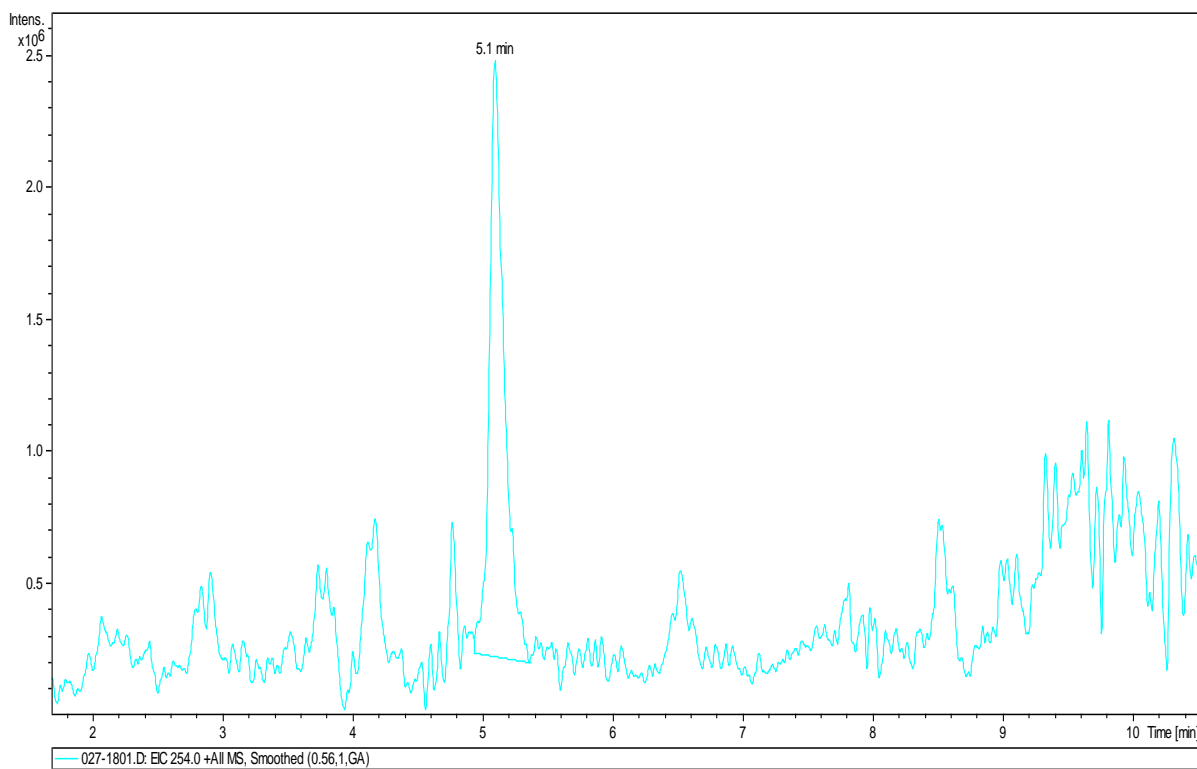
Obrázek 43: Extrahovaný iontový chromatograf sulfapyridinu z odtoku ČOV Brno-Modřice ze dne 17. 4. 2018



Obrázek 44: Extrahovaný iontový chromatograf sulfamethoxazolu z odtoku ČOV Brno-Modřice ze dne 17. 4. 2018

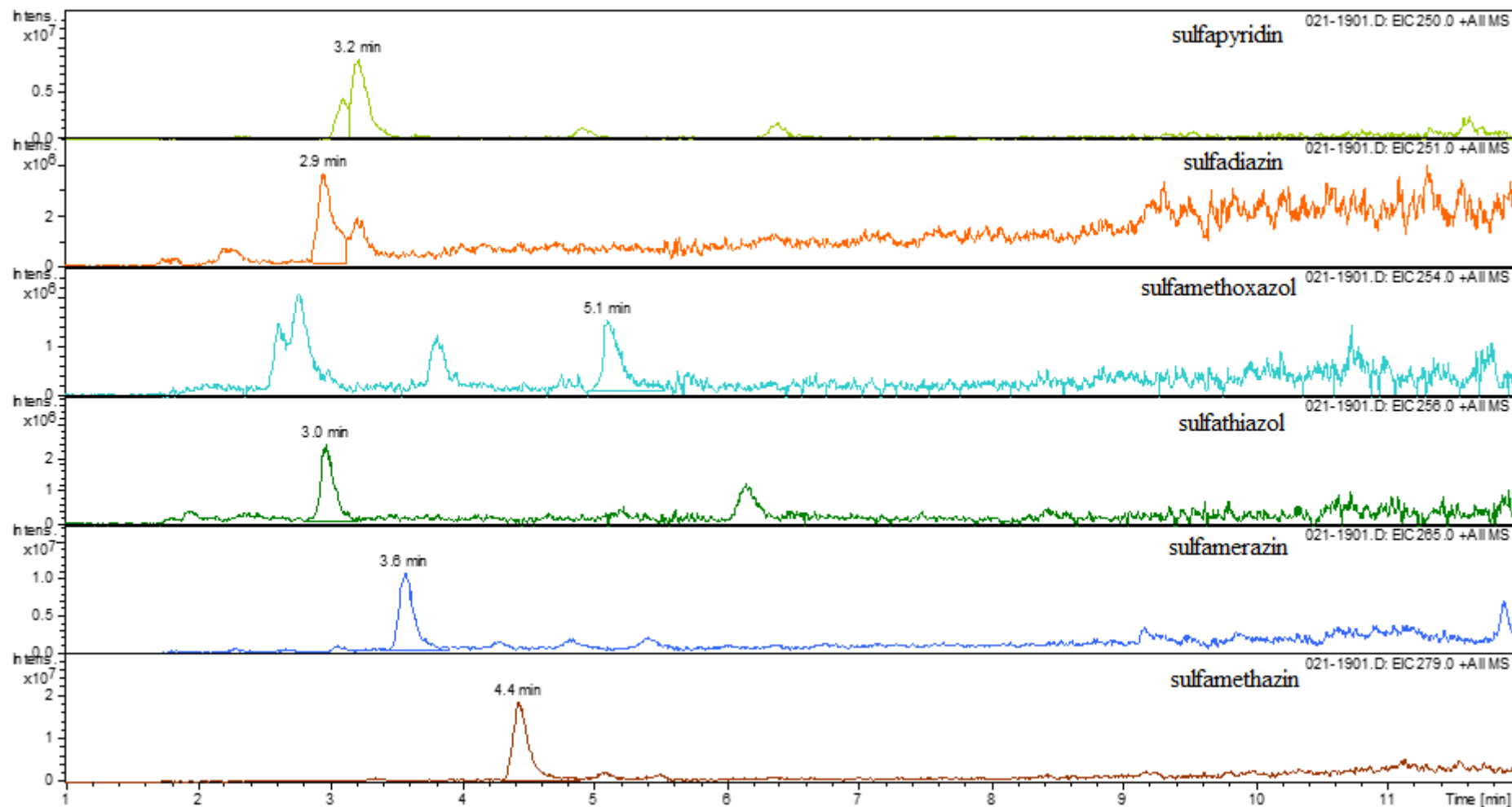


Obrázek 45: Extrahovaný iontový chromatograf sulfapyridinu z přítoku ČOV Brno-Modřice ze dne 17. 4. 2018



Obrázek 46: Extrahovaný iontový chromatograf sulfamethoxazolu z přítoku ČOV Brno-Modřice ze dne 17. 4. 2018

**Příloha 4:** Extrahované iontové chromatogramy sledovaných analytů z testů eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí enzymatického aparátu *Trametes versicolor*



Obrázek 47: Extrahované iontové chromatogramy vzorku odpadní vody po procesu testování účinnosti eliminace sulfonamidových antibiotik pomocí *Trametes versicolor* z počáteční koncentrace 20 µg/l.