

Bakteriální kmeny jako bioindikátory pro hodnocení potenciální toxicity chemických látek

Lucie Hofírková

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Lucie Hofírková
Osobní číslo:	T23204
Studijní program:	B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace:	Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Bakteriální kmeny jako bioindikátory pro hodnocení potenciální toxicity chemických látek

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši, která se bezprostředně týká zadaného tématu.
2. Na základě rešerše zvolte vhodné bakteriální kmeny a vyberte vhodnou skupinu chemických látek k testování.
3. V experimentální části práce využijte metod konvenčních mikrobiologických (kultivačních, mikroskopických) i klasických instrumentálních metod (spektrometrie).
4. Teorii, metodiku, výsledky experimentů a diskusi sepište do formy bakalářské práce.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

Shuhan, G.; Wanqing, T.; Ziyi, L.; Xiaoxiong, W.; Lin-Lan, Z.; Jian, Z. Long-term toxicity assessment of antibiotics against *Vibrio fischeri*: Test method optimization and mixture toxicity prediction. *Journal of Hazardous Materials* 2024, 469, 133933. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.133933.

Strotmann, U.; Pastor Flores, D.; Konrad, O.; Gendig, C. Bacterial Toxicity Testing: Modification and Evaluation of the Luminescent Bacteria Test and the Respiration Inhibition Test. *Processes* 2020, 8, 1349. DOI: 10.3390/pr8111349

Sumampouw O. J.; Risjani Y. Bacteria as Indicators of Environmental Pollution: Review. *International Journal of Ecosystem* 2014, 4(6): 251-258. DOI: 10.5923/j.ije.20140406.03

Viegas, C. A. Chapter Four – Microbial bioassays in environmental toxicity testing, Editor(s): Geoffrey Michael Gadd, Sima Sariaslani, *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, 2021, 115: 115–158. ISSN 0065-2164, ISBN 9780128245934. DOI: 10.1016/bs.aambs.2021.03.002.

Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB
(vědecké databáze /např. Web of Science, Scopus, PubMed/; vědecká a odborná literatura).

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Petra Jančová, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Vlivem lidské činnosti se antibiotika různými cestami dostávají do životního prostředí. Tam kontaminují odpadní, slané či sladké vody, což má pravděpodobně za následek ovlivňování vodních mikroorganismů a dalších společenstev. Bioluminiscenční testy s bakteriemi jsou díky své jednoduchosti a citlivosti využívány ke zjišťování akutní toxicity různých chemických látek a odpadů. Tato bakalářská práce hodnotí vliv čtrnácti vybraných antibiotik a jednoho léčivého přípravku s cílem zjistit jakou míru inhibice bioluminiscence u testovaných bakterií vykazují.

Byl sestaven vhodný testovací systém s bioluminiscenční bakterií *Photobacterium phosphoreum* CCM 3421, ve kterém probíhalo měření intenzity bioluminiscence v čase 15 a 30 minut po kontaktu s testovanou látkou. Významná inhibice bioluminiscence byla zaznamenána v případě polymyxinu B ($IC_{50} = 17,9 \text{ mg.l}^{-1}$). Sulfamethoxazol inhiboval bioluminiscenci v nejvyšší testované koncentraci 100 mg.l^{-1} z 55 % v čase 15 minut; u tetracyklinu došlo k nárůstu inhibice bioluminiscence na 72 % v čase 30 minut. U antibiotik jako spectinomycin, streptomycin, cykloheximid, nisin, chloramfenikol, erythromycin, vankomycin a nystatin nebyly zaznamenány inhibiční účinky přesahující 10 %. Hormetický účinek byl pozorován u tří antibiotik, kanamycinu a mupirocinu, v nižší míře pak u ampicilinu. V případě směsi sulfamethoxazolu a erythromycinu (v poměru 1:1), byl pozorován antagonistický účinek. Léčivý přípravek Tobrex vykazoval v koncentraci 100 mg.l^{-1} inhibici 100 %.

Klíčová slova: akutní toxicita, antibiotika, *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, biotest, bioluminiscence

ABSTRACT

As a result of human activity, antibiotics enter the environment through different ways. There, it contaminates wastewater, saltwater or freshwater, which probably has the further consequence of affecting aquatic microorganisms and other communities. Bioluminescence tests with bacteria are used to detect the acute toxicity of various chemicals and wastes, because of its simplicity and sensitivity. This bachelor thesis evaluates the effect of 14 selected antibiotics and one pharmaceutical product to determine the degree of inhibition of bioluminescence in the tested bacteria.

A suitable test system was set up with the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum* CCM 3421, in which measurements of bioluminescence intensity were made at 15 and 30 minutes after contact with the test substance. Significant inhibition of bioluminescence was observed for polymyxin B ($IC_{50} = 17.9 \text{ mg.l}^{-1}$). Sulfamethoxazole inhibited bioluminescence at the highest concentration tested, 100 mg.l^{-1} , by 55 % at 15 min; tetracycline showed an increase in inhibition of bioluminescence to 72 % at 30 min. No inhibitory effects exceeding 10 % were observed for antibiotics such as spectinomycin, streptomycin, nisin, chloramphenicol, cycloheximide, erythromycin, vancomycin and nystatin. Hormetic effects were observed for three antibiotics, kanamycin and mupirocin, and to a lesser extent for ampicillin. In the case of a mixture of sulfamethoxazole and erythromycin (1:1), an antagonistic effect was observed. Tobrex showed 100 % inhibition at a concentration of 100 mg.l^{-1} .

Keywords: acute toxicity, antibiotics, *Aliivibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, biotest, bioluminescence

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Petře Jančové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, pomoc a trpělivost při zpracování této práce. Poděkování patří i laborantkám za jejich ochotu poradit během práce v laboratoři a taky spolužačce, která mi vždy nabídla pomocnou ruku. Zároveň děkuji své rodině a příteli za podporu, povzbuzení a víru ve mě během celého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	13
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 ANTIBIOTIKA	15
1.1 HISTORIE ANTIBIOTIK	15
1.2 MECHANISMUS ÚČINKU	15
1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny	16
1.2.2 Poškození cytoplazmatické membrány	16
1.2.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin	17
1.2.4 Inhibice proteosyntézy	17
1.2.5 Inhibice metabolismu kyseliny listové	17
1.3 HLAVNÍ SKUPINY VYBRANÝCH ANTIBIOTIK	18
1.3.1 β -laktamová antibiotika	18
1.3.2 Makrolidová antibiotika	19
1.3.3 Aminoglykosidy	20
1.3.4 Tetracykliny	22
1.3.5 Amfenikolová antibiotika	22
1.3.6 Glykopeptidová antibiotika	23
1.3.7 Polypeptidová antibiotika	24
1.3.8 Sulfonamidy	24
1.3.9 Chinolony	25
1.4 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	26
1.5 ANTIBIOTIKA V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	27
1.5.1 Vliv na mikrobiální společenstva	28
2 TESTY TOXICITY NA BAKTERIÍCH	30
2.1 BIOLUMINISCENČNÍ BAKTERIE	30
2.1.1 <i>Aliivibrio fischeri</i>	30
2.1.2 <i>Photobacterium phosphoreum</i>	31
2.1.3 Bioluminiscence	31
2.1.4 Testy s luminiscenčními bakteriemi	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
3 CÍL PRÁCE	35
4 MATERIÁL A METODIKA	36
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL	36
4.1.1 Přístroje a pomůcky	36
4.1.2 Použité chemikálie	36
4.2 POSTUP PRÁCE	37
4.2.1 Příprava roztoků	37
4.2.2 Kultivace	38
4.2.3 Princip testu	39

4.2.4	Postup měření	39
4.3	ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ DAT	42
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1	TESTOVÁNÍ TOXICITY – „STANDARDNÍ JED“ (ZnSO_4)	45
5.2	TESTOVÁNÍ TOXICITY VYBRANÝCH ANTIBIOTIK	46
5.2.1	Antibiotika neinhibující bioluminiscenci	48
5.2.2	Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 50 %	50
5.2.3	Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 100 %	51
5.3	HORMETICKÉ ÚČINKY ANTIBIOTIK.....	52
5.4	TESTOVÁNÍ MOŽNÉ POTENCIACE ÚČINKŮ DVOU ANTIBIOTIK VE SMĚSI	54
5.5	TESTOVÁNÍ TOXICITY ANTIBIOTICKÝCH OČNÍCH KAPEK (TOBREX)	55
6	ZÁVĚR	57
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK.....	68
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	69
	SEZNAM PŘÍLOH.....	70

ÚVOD

Antibiotika patří k velmi významně používaným léčivům v moderní medicíně. Slouží k zabránění šíření bakteriální infekce jak u lidí, tak zvířat. Velmi diskutovaným tématem v současné době je vznik antibiotické rezistence. Antibiotika v nízkých koncentracích při chronické expozici vyvolávají u patogenních bakterií větší odolnost, což by mohlo v budoucnu mít zásadní dopad na způsob a možnosti léčby některých onemocnění. Antibiotická rezistence, vznikající v důsledku nadužívání, s sebou přináší i další problémy, jako například ekonomické náklady na vývoj nových antibiotik. Jednou z možných příčin, proč se více zvyšuje odolnost bakterií k těmto látkám, je přítomnost reziduí antibiotik v životním prostředí. Výskyt je způsoben přidavkem antibiotik do krmiv hospodářských zvířat, kdy dochází k vylučování a šíření těchto látek půdy a následně ke splavování do povrchových vod. Do vod se antibiotika také dostávají v důsledku léčby v nemocnicích anebo se mohou vyskytovat v okolí farmaceutických podniků. Uvolňování těchto látek do životního prostředí může mít negativní vliv na živé organismy a mikroorganismy osidlující vody a půdy.

O účincích léčiv na lidské zdraví má společnost díky klinickým studiím dostatek znalostí a informací, zatímco v případě hodnocení jejich vlivu na životní prostředí tomu tak často není. Pro hodnocení environmentálních rizik je nezbytné znát vlastnosti účinné látky, její metabolity a také degradační produkty. Těchto informací je omezené množství i kvůli tomu, že získávání informací o ekotoxicitě je časově i finančně náročný proces. Při testování ekotoxicity je využíváno řady organismů. Mezi ty nejznámější patří ryby *Brachydanio rerio*, perloočky *Daphnia magna* či řasy *Raphidocelis subcapitata*. K testování lze použít i bakterie. Tyto organismy jsou označovány jako bioindikátory. Na nich lze sledovat různé vlivy a působení různých látek, a to umožňuje monitorovat případné změny a zjišťovat celkový stav ekosystému.

Teoretická část této bakalářské práce je zaměřena na popis a vysvětlení účinku antibiotik. U této skupiny léčiv byla také na základě literární rešerše vytipována antibiotika, která bývají buďto často lékaři předepisována, nebo jsou nalézána v povrchových vodách a o jejichž potenciálním ekotoxickém účinku toho příliš známo není. Praktická část je zaměřena na testy akutní toxicity nám dostupných antibiotik na bakterii *Photobacterium phosphoreum*, která je podobně jako známější bakterie *Aliivibrio fischeri* využívána jako bioindikátor při zjišťování kvality vod, kdy přítomnost určitých chemických látek ovlivňuje její bioluminiscenci.

I TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou organické látky, které jsou hojně využívány ve zdravotnictví k léčbě bakteriálních infekcí. Svým působením zabraňují růstu a množení nežádoucích a patogenních mikroorganismů. Díky své účinnosti a dostupnosti dochází k nadužívání těchto léčiv, což vede ke vzniku bakteriální rezistence [1]. Antimikrobní látky jsou produkovány sekundárním metabolismem některých bakterií. Mohou být také získávány synteticky anebo se odvozují od přírodních látek. Zdrojem antibiotik jsou převážně vláknité bakterie (rod *Streptomyces*), vláknité houby, případně mohou být produkovány ostatními bakteriemi [2].

1.1 Historie antibiotik

Lidé už před více než 2000 lety ve starověkém Egyptě, Číně i Řecku využívali znalostí různých extraktů k léčbě infekcí, jako například pokládání ob vazů s chlebovou plísní na otevřené rány [2]. Přelom nastal v první polovině 20. století, v roce 1928, kdy došlo k jednomu z nejvýznamnějších objevů antibiotik. Alexander Fleming, skotský bakteriolog, objevil kontaminaci plísní *Penicillium notatum* (dnes *Penicillium chrysogenum*) na jedné ze svých misek, kde kultivoval kolonie *Staphylococcus aureus*. V blízkosti plísně došlo k inhibici narostlých kolonií. Toto zjištění vedlo k závěru, že plíseň vylučuje látku, která dokáže usmrcovat bakterie [3].

Později se na purifikaci penicilinu podíleli vědci z Oxfordu [1]. Po druhé světové válce došlo k několika dalším objevům antibiotik, což přineslo pozitivní posun v oblasti medicíny. Některá antibiotika jsou používána dodnes jako například streptomycin, chloramfenikol, tetracyklin, vankomycin a další [4].

Termín antibiotikum poprvé použil Selman Waksman, spoluobjevitel streptomycinu, a popsal ho jako skupinu nízkomolekulárních organických látek s baktericidním nebo bakteriostatickým účinkem [1].

1.2 Mechanismus účinku

Antibiotika mohou být na základě spektra účinku rozděleny na širokospektrální a specifická. Rozdíl spočívá v rozsahu působení [1]. Při zkoumání účinku v podmínkách *in vitro* jsou antimikrobiální látky rozdělovány do dvou skupin, a to na antibiotika s baktericidním a bakteriostatickým účinkem. Běžně se používá vysvětlení, že baktericidní látky způsobují

buněčnou smrt, zatímco bakteriostatické zastavují růst a množení bakterií [5]. Další mechanismy účinku závisí na chemické struktuře a na místě působení [1].

1.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna je obal bakterií, který chrání buňku před vnějšími vlivy [6]. Hlavní stavební jednotkou buněčné stěny je peptidoglykan, který je syntetizován v cytoplazmě [7]. Funkcí peptidoglykanu je mechanická ochrana a udržování tvaru buňky [8]. Peptidoglykan, jiným názvem murein, je tvořen ze sítě polysacharidových řetězců [7]. Síťování, které těmito řetězci vzniká, je ovlivněno transglykosidázami. Buněčná stěna je díky tomuto zesíťování pevnější a odolnější [9].

Prokaryotické organismy dělíme podle stavby buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní. U grampozitivních bakterií se vyskytuje peptidoglykan v silnější vrstvě a v jeho struktuře jsou zabudovány další látky jako kyselina teichoová a jiné polysacharidy. Stavba buněčné stěny gram negativních bakterií je složitější. Je složena z tenké vrstvy peptidoglykanu [10]. Nachází se zde i periplasma a vnější membrána, která obsahuje lipoproteiny, fosfolipidy a lipopolysacharidy [11].

Na buněčnou stěnu působí například β -laktamová antibiotika, cefalosporiny a glykopeptidy. Látky tohoto působení blokují anebo inhibují správnou syntézu peptidoglykanu, a tím znemožňují přežití dané buňky [9].

1.2.2 Poškození cytoplazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána je tvořena dvouvrstvou fosfolipidů a proteiny [12]. Funkce buněčné membrány je nejen bariérová, ale také zde probíhá buněčné dýchání. V dýchacím řetězci vzniká energie ve formě ATP [8]. Cytoplazmatickou membránu dokáží porušovat polypeptidová antibiotika [10]. Ta působí detergentně na gramnegativní bakterie. Nevýhodou těchto antibiotik je, že kvůli ne zcela selektivnímu účinku působení poškozují buněčnou membránu lidských buněk, mezi kterými jsou primárně poškozovány buňky ledvin [13]. Detergentní povaha je způsobena díky struktuře antibiotika, které má jednu část molekuly hydrofobní a druhou část hydrofilní. Díky tomu je umožněno vniknout do membrány hydrofobním koncem, a tak ji rozdělit na menší části. Dojde tak k vylití buněčného obsahu ven z buňky a tím je zapříčiněna buněčná smrt [8].

1.2.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Uchovávání a přenos genetické informace je hlavní funkcí nukleových kyselin. Genetická informace je kódována v RNA a DNA [8]. Jednou z hlavních skupin antibiotik působících na syntézu nukleových kyselin jsou chinolony. Tato antibiotika jsou syntetická, širokospektrální a jsou účinná proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Společným mechanismem chinolonů je inhibice DNA-gyrázy a topoizomerázy IV. Gyráza je cílem účinku chinolonů především v případě gramnegativních bakterií, u grampozitivů chinolony poškozují především topoizomerázu IV [14].

1.2.4 Inhibice proteosyntézy

Syntéza bílkovin neboli proteosyntéza probíhá na ribozomech. Na ribozomech probíhá translace mRNA do proteinů. Ribozom je složen z velké (50S) a malé (30S) ribozomální podjednotky [6]. Podjednotka 30S má za úkol číst z vlákna mRNA informaci a tím zajistit správné připojování tRNA. Podjednotka 50S spojuje jednotlivé aminokyseliny, které jsou nesené tRNA, do polypeptidového řetězce [8]. Skupiny antibiotik jako aminoglykosidy a tetracykliny cílí na malou podjednotku a tím zabraňují správnému čtení kodonů a tím narušují translaci. Na velkou ribozomální podjednotku působí makrolidová antibiotika a chloramfenikol. Ty blokují přenos aminokyselin a tím tvorbu polypeptidových řetězců [1].

1.2.5 Inhibice metabolismu kyseliny listové

Mechanismus účinku sulfonamidů a diaminopyrimidinů spočívá v inhibici syntézy kyseliny listové a jejích derivátů; pro bakterie nezbytné metabolické dráhy. Bakterie si vytvářejí kyselinu tetrahydrolistovou (aktivní formu kyseliny listové) ve více krocích. Nejdříve je spojen pterin a kyselina para-aminobenzoová (PABA) za vzniku kyseliny dihydropteroové. Tato reakce je katalyzována enzymem dihydropteorátsyntetázou. Následně je připojen glutamát a vznikne kyselina dihydrolistová. Ta je pak redukována na kyselinu tetrahydrolistovou pomocí enzymu dihydrofolátreduktázy.

Sulfonamidy se strukturně podobají molekule PABA a díky tomu se umí navázat do aktivního místa enzymu dihydropteorátsyntetázy a zabránit tak vzniku kyseliny dihydropteroové. Diaminopyrimidiny (např. trimethoprim) inhibují dihydrofolátreduktázu tím, že napodobují pterinovou část molekuly kys. tetrahydrolistové [14]. Kyselina listová je významným koenzymem a v buňkách je tedy potřebná pro správné fungování

metabolismu např. aminokyselin a nukleových kyselin. Tímto způsobem zmiňované skupiny antibiotik narušují syntézu nukleových kyselin a buněčné dělení [6].

1.3 Hlavní skupiny vybraných antibiotik

Kromě rozdělení antibiotik podle mechanismu účinku jsou antibiotika také rozlišována podle jejich chemické struktury. Na základě chemické struktury antimikrobiálních látek můžeme lépe popsat povahu a působení.

1.3.1 β -laktamová antibiotika

Jednou z nejstarších tříd antibiotik jsou β -laktamová antibiotika. Do této skupiny antibiotik spadají peniciliny, monobaktamy, karbapenemy a cefalosporiny. Všechny tyto látky mají ve své struktuře β -laktamový kruh, viz Obr. 1 [1]. Původní skupinou antibiotik byly peniciliny a od nich byly dále odvozovány třídy nové. Důvodem odvozování nových tříd bylo rozšíření spektra působení a také to, aby se předešlo rezistenci u bakterií, která je podmíněna schopností hydrolyzovat β -laktamový kruh pomocí enzymu β -laktamázy [15]. Cílem působení β -laktamových antibiotik jsou transpeptidázy – bakteriální enzymy, které mají na starost syntézu peptidoglykanu a zajišťují spojování peptidových řetězců. Na konci těchto peptidových řetězců je připojena sloučenina D-alanyl-D-alanin. Předpokládá se, že β -laktamový kruh je podobný právě této sloučenině a tímto se jeví jako substrát dostupný pro transpeptidázy. Tímto mechanismem dochází k inaktivaci transpeptidáz. Pro ně se díky tomuto mechanismu rozšířil název penicilin-binding proteins (PBPs) neboli penicilin-vázající protein [8].

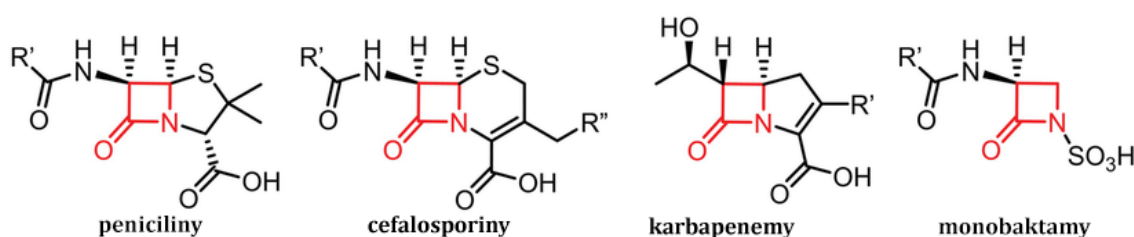
Peniciliny jsou antibiotika, u kterých je vysoká míra rezistence. Mezi peniciliny patří amoxicilin a ampicilin. Jsou to antibiotika podávaná při léčbě infekcí urogenitálního traktu, močových cest, respiračních infekcí či při zánětech kůže. Často bývají kombinovány se sulbaktamem či kyselinou klavulanovou. Tyto látky fungují jako inhibitory β -laktamáz a tím se rozšiřuje spektrum účinku [16].

Cefalosporiny zastavují syntézu peptidoglykanu. Jsou účinná proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím. V současnosti lze definovat pět generací cefalosporinů. Každá z nich se odlišuje spektrem aktivity a polohou β -laktamového kruhu [1]. Cefalosporiny třetí a čtvrté generace jsou nejčastěji využívány při léčbě infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi. Mezi ně se řadí ku příkladu cefotaxim, cefepim či ceftazidim [16]. V České republice je cefotaxim podáván novorozencům, cefepim je využíván proti infekcím

způsobeným rezistentními gramnegativními bakteriemi a ceftazidim slouží proti infekcím vyvolávaných bakterií *Pseudomonas aeruginosa* [17].

Cefalosporiny společně s peniciliny při výskytu v povrchových vodách podléhají hydrolýze. Mají však tendenci k adsorpci a v kalech a sedimentech mohou tvořit s volnými kationty komplexy[18].

Karbapenemová antibiotika mají širokospektrální účinek a vykazují velkou účinnost proti multirezistentním kmenům grampozitivních a gramnegativních kmenů [1]. Půdní mikroorganismy *Streptomyces cattleya* produkují látku příbuznou penicilinům, thienamycin, od něhož jsou karbapenemy odvozeny. Prvním derivátem syntetizovaným z thienamycinu byl imipenem. Studie došly k závěru, že je třeba jej kombinovat s cilastinem sodným, který inhibuje enzym dehydropeptidázu, protože imipenem byl metabolizován v ledvinách tímto enzymem, což vedlo k tubulárnímu poškození a k nízkému vylučování této látky do moči. Meropenem je dalším antibiotikem z této třídy a v tomto případě již není nutno jej podávat s inhibitory těchto enzymů [19]. U obou zmíněných antibiotik je vysoká míra rezistence u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a některých *Acinetobacter* spp. [20]. Tato antibiotika jsou podávána při nitrobršních infekcích, zápalu plic vzniklého v nemocničním prostředí nebo při infekcích kůže [16]. V České republice jsou tato antibiotika podávána také proti nozokomiálním infekcím, včetně meningitidy [17].



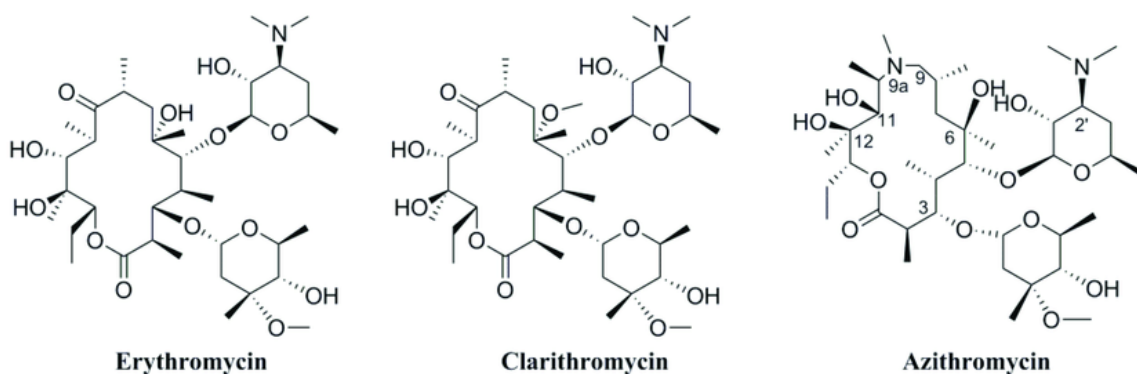
Obr. 1 Struktura β -laktamových antibiotik [21]

1.3.2 Makrolidová antibiotika

Makrolidy jsou skupina látek, která působí nejen jako antibiotika, ale i jako imunosupresiva, antimykotika a prokinetika. Jsou velmi účinná při léčbě infekcí dýchacích cest. Ve své struktuře nesou laktonové kruhy s deoxysacharidy. Inhibují ribozomální podjednotku 50S [1]. Tam blokuji posouvání tRNA a tím tvorbu polypeptidového řetězce. Svým působením patří mezi bakteriostatická antibiotika [14].

Nejznámější zástupce ze skupiny makrolidových antibiotik je erythromycin viz Obr. 2, který byl objeven v roce 1952. Je používán k léčbě respiračních onemocnění

a je také schválen pro léčbu kožních infekcí. Vzhledem k povaze působení této skupiny látek, je účinek erythromycinu bakteriostatický [22].

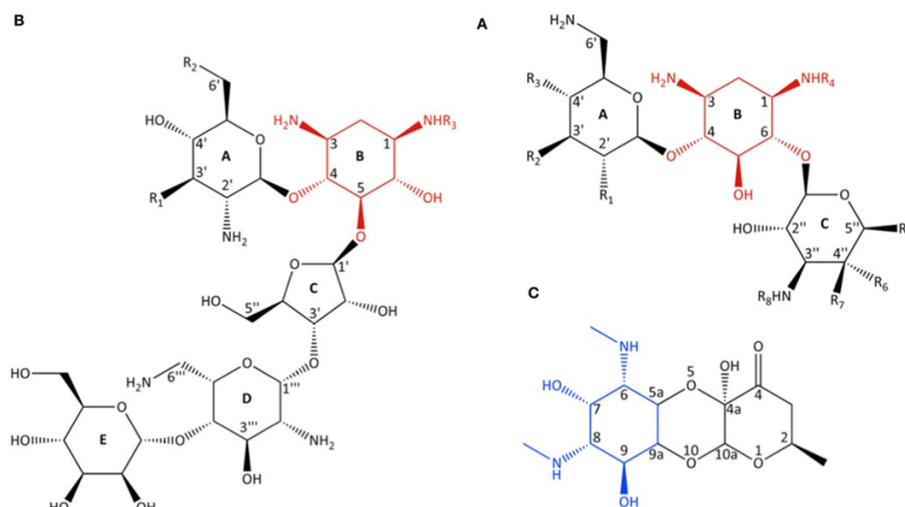


Obr. 2 Struktura makrolidů [23]

Od erythromycinu je odvozena látka azithromycin. Rozdíl spočívá v přidání methyl-substituovaného atomu dusíku do laktonového kruhu. Tímto dochází ke zlepšení stability. Tato látka je v posledních letech využívána k prevenci vzniku bakteriálních infekcí u kojenců a u osob s oslabenou imunitou. Další využití má při léčbě zánětů středního ucha, zápalu plic či při streptokokových angínách. Účinně zabírá i při nákaze sexuálně přenosnými chorobami [24]. Azithromycin je v ČR antibiotikum první volby pro léčbu černého kašle, pneumonie a chlamydiových infekcí u malých dětí [17].

1.3.3 Aminoglykosidy

Struktura aminoglykosidových antibiotik (viz Obr. 3) je tvořena aminocyklitolovým kruhem [14]. Jedná se o různorodou skupinu antibiotik s rozmanitou strukturou molekul a se širokým spektrem účinku [25].



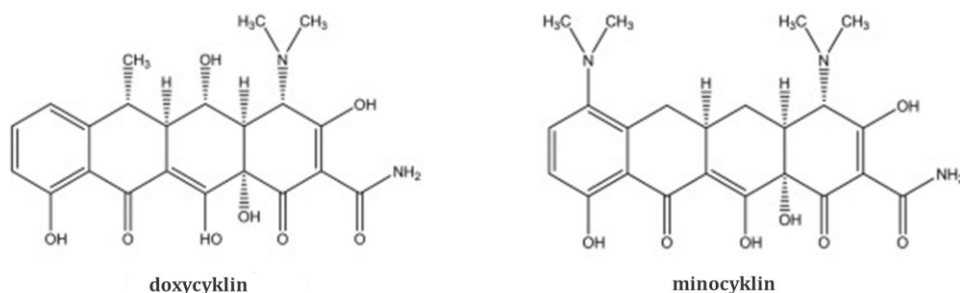
Obr. 3 Chemická struktura různých tříd aminoglykosidových antibiotik:
 (A) 4,6-disubstituované aminoglykosidy, (B) 4,5-disubstituované aminoglykosidy,
 (C) spectinomycin, atypický aminoglykosid [25]

Cílem působení této skupiny antibiotik je menší ribozomální podjednotka (30S) u gramnegativních bakterií [26]. Dochází k navázání na ribozomální místo A této podjednotky což vede k chybnému čtení kodonu a následně k nesprávné translaci proteinů [1]. Do buňky pronikají specifickým mechanismem, který spočívá ve vytváření pórů v buněčné membráně. Póry jsou vytvořeny díky rozdílnému náboji antibiotika s nábojem na membráně. Účinnost antibiotik se zvyšuje kombinací s antibiotiky, které primárně působí na buněčnou stěnu bakterií [9]. Mezi společné znaky toxicity těchto látek patří ototoxicita a nefrotoxicita [27]. Aminoglykosidy jsou produkovány bakteriemi rodu *Micromonospora* a *Streptomyces* [28]. Tyto látky jsou z těla ven vylučovány v nezměněné formě [13].

Prvním objeveným antibiotikem, patřící to této skupiny, byl streptomycin, izolován z vláknité bakterie *Streptomyces griseus*. Tato látka vedla k první zdárné léčbě tuberkulózy [26]. Dalšími antibiotiky ze skupiny aminoglykosidů jsou na příklad amikacin, gentamicin, neomycin a kanamycin [27]. V České republice je první volbou pro léčbu infekcí vyvolanou rezistentními gramnegativními aerobními bakteriemi amikacin. Gentamicin je první volbou v případě léčby vyvolané enterobakteriemi či grampozitivními aerobními mikroorganismy [17].

1.3.4 Tetracykliny

Tetracykliny jsou širokospektrální antibiotika s bakteriostatickým účinkem působící proti gramnegativním a grampozitivním bakteriím, některým prvokům a atypickým bakteriím (např. spirochetám a mykobakteriím) [13]. Vyvinuty byly ve 40. letech 20. století. Tyto látky v ribozomálním místě A brání navázání aminoacyl-tRNA-syntetázy, což zabraňuje navázání aminokyselin a tím znemožňuje růst polypeptidu. Používání těchto antibiotik ve velkém vedlo ke vzniku rezistentních bakterií [29]. Tetracykliny jsou využívány k léčbě zoonóz a infekcí, které jsou vyvolávány atypickými bakteriemi. K léčbě klasických infekcí nejsou využívány kvůli vysoké míře rezistence. Mezi nejčastější vedlejší účinky užívání těchto antibiotik patří zažívací obtíže a nauzea [13]. Při dlouhodobém podávání dochází k akumulaci tetracyklinů v kostech a zubech, což vede k narušení zubní skloviny a poruše tvorby kostí. Z tohoto důvodu je neužívají děti do věku 8 let [14].



Obr. 4 Struktura tetracyklinových antibiotik [30]

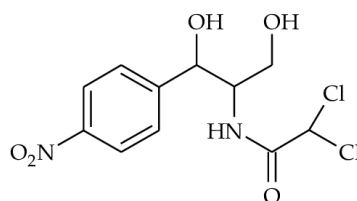
Mezi tetracyklinová antibiotika se řadí doxycyklin a minocyklin [13], viz Obr. 4. Doxycyklin je dostupný v ČR a je využíván k léčbě chlamydiových a mykoplasmových infekcí. Je také podáván jako antiparazitikum při léčbě malárie [17].

1.3.5 Amfenikolová antibiotika

Další skupinou antibiotik jsou amfenikolová antibiotika. Tyto látky na velké ribozomální podjednotce 50S inhibují enzym peptidyltransferázu, což má za následek blokaci navázání tRNA na ribozomální místo A. Tento mechanismus úspěšně inhibuje proteosyntézu [31].

Významným zástupcem této třídy je chloramfenikol, viz Obr. 5. Jedná se o širokospektrální antibiotikum s bakteriostatickým účinkem. Je produkován půdní bakterií *Streptomyces venezuelae* [13]. Díky nízkým nákladům na syntézu, je dnes tato látka získávána spíše chemicky [32]. Chloramfenikol má lipofilní povahu a je rozpustný v tucích, což umožňuje průchod bakteriálními membránami [1]. V minulosti bylo toto antibiotikum

v prodeji jako látka s vysokou účinností, jenže na počátku padesátých let došlo k popsání závažných nežádoucích účinků. Chloramfenikol působí hematotoxicky a způsobuje aplastickou anémii [13]. V České republice je používán k léčbě infekcí centrální nervové soustavy [17].

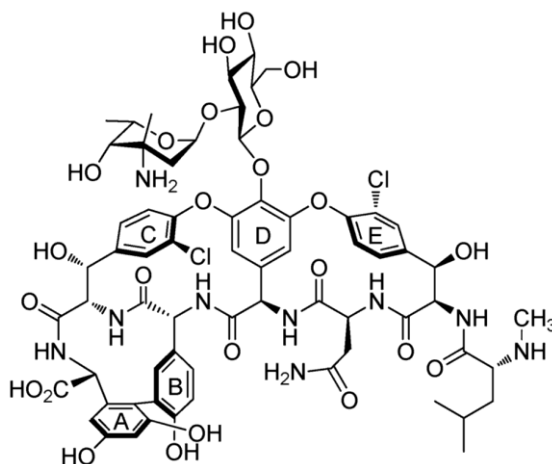


Obr. 5 Struktura chloramfenikolu [33]

1.3.6 Glykopeptidová antibiotika

Glykopeptidy patří mezi antibiotika s baktericidním účinkem a působí na aerobní i anaerobní grampozitivní bakterie [13]. Jsou alternativou k použití β -laktamových antibiotik. Mechanismus jejich účinku spočívá ve vazbě na D-alanyl-D-alanin, který slouží jako prekursor tvorby peptidoglykanu, tudíž znemožňuje síťování buněčné stěny bakterií [1]. Glykopeptidy jsou z organismu v nezměněné formě vylučovány močí [13].

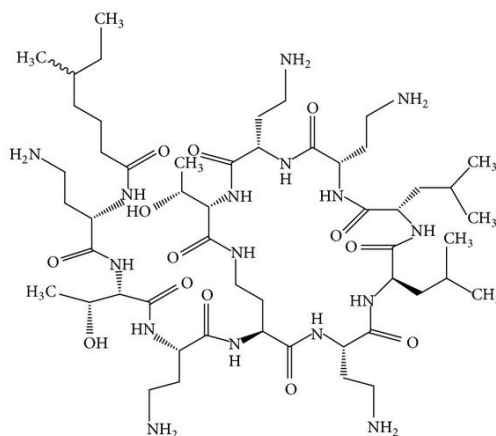
Prvním izolovaným antibiotikem ze skupiny glykopeptidů byl vankomycin [1]. Tato látka je produkována půdními bakteriemi *Streptomyces orientalis* (dnes *Amycolatopsis orientalis*). Ukázalo se, že vankomycin je účinný proti infekcím způsobených grampozitivními bakteriemi, včetně infekcí způsobených bakterií *Staphylococcus aureus*. Jako u většiny antibiotik i zde došlo v průběhu let ke vzniku rezistence u dříve citlivých kmenů, však rezistence u *Staphylococcus aureus* je ojedinělá [13].



Obr. 6 Struktura vankomycinu [34]

1.3.7 Polypeptidová antibiotika

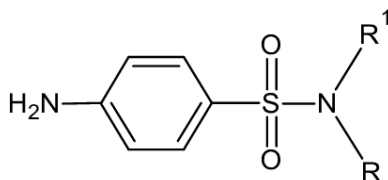
Mezi polypeptidová antibiotika jsou řazeny polymyxiny. Tyto látky mají schopnost se vázat na lipidovou část buněčné membrány [6]. Tímto dojde k narušení fosfolipidové dvojvrstvy a membrána se ztenčuje anebo dochází ke vzniku pórů. Toto narušení vede k zániku buňky. Polypeptidové látky, polymyxin B a kolistin (polymyxin E), jsou produkty sekundárního metabolismu bakterie *Bacillus polymyxa* (dnes *Paenibacillus polymyxa*). I přes nízký výskyt rezistentních bakterií jsou polymyxiny voleny jako krajní možnost při léčbě závažných a těžko léčitelných bakteriálních infekcí [35]. Důvodem jsou nefrotoxické a neurotoxické vlastnosti těchto látek [13]. V ČR je schválen kolistin, viz Obr. 7, který je podáván při léčbě infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi [17].



Obr. 7 Struktura kolistinu [36]

1.3.8 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou třídou širokospektrálních syntetických antibiotik. Ve své struktuře, jak již z názvu vyplývá, obsahují atom síry, na který jsou vázány dva kyslíky, atom dusíku a anilinová skupina, viz Obr. 8. Místem působení je syntéza kyseliny listové, která je esenciální při tvorbě DNA [37].



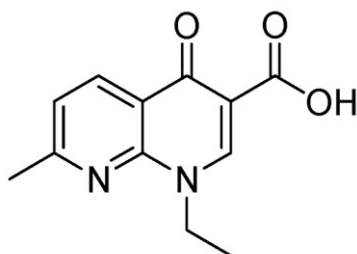
Obr. 8 Struktura sulfonamidů [38]

Nejznámějším antibiotikem je sulfamethoxazol, který vykazuje bakteriostatický účinek. Nejčastěji je kombinován s trimethoprimem, který spadá do skupiny pyrimidinových

antibiotik. Spojením těchto látek vzniká co-trimoxazol, jehož účinek je baktericidní. Obě tyto látky blokují syntézu kyseliny listové [13]. Kombinace těchto léčiv je v ČR používána k léčbě střevních infekcí, infekcí močových cest a k infekcím způsobeným gramnegativními bakteriemi [17].

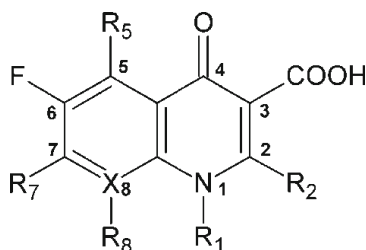
1.3.9 Chinolony

Chinolony patří mezi chemicky syntetizované antimikrobiální látky. Díky různým modifikacím chinolového jádra a přidavkem jiných substituentů je možno pomocí chinolonů cílit na specifické skupiny bakterií [39]. Cílem působení chinolonů jsou enzymy DNA gyráza a topoizomeráza IV, které jsou nezbytné pro replikaci DNA. Tímto inhibují syntézu nukleových kyselin [40] Chinolony lze klasifikovat do tří generací [13].



Obr. 9 Struktura kyseliny nalidixové [41]

Prvním syntetizovaným antibiotikem, spadajícím do první generace chinolonů, je kyselina nalidixová, viz Obr. 9. Ta byla využívána k léčbě infekcí močových cest [1]. Do této generace také spadá kyselina oxolinová. Chinolony první generace ve své struktuře nenesou atom fluoru, jak je tomu později u dalších látek [40].



Obr. 10 Struktura fluorochinolonů [42]

Po přidání molekuly fluoru do struktury antibiotik začala být celá skupina chinolonů označována jako fluorochinolony; jejich obecnou strukturu znázorňuje Obr. 10. Prvním fluorovaným antibiotikem byl norfloxacin a bylo tak rozšířeno i spektrum účinku. Společně s antibiotiky jako ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin a levofloxacin spadá do druhé generace fluorochinolonů [13].

U třetí generace fluorochinolonů došlo k dalším úpravám chemické struktury jako například přidání alkylovaných piperazinových a pyrrolidinových skupin na pozici R7 a nově se objevil atom chloru na pozici R8 (viz Obr. 10). To zlepšilo účinek proti grampozitivním bakteriím [43].

Fluorochinolony jsou účinné proti gramnegativním bakteriím, a to zejména na většinu enterobakterií. Ciprofloxacin a levofloxacin je využíván při léčbě onemocnění způsobených *Pseudomonas aeruginosa*. Rezistence na tuto skupinu antibiotik vzniká poměrně snadno. Většina fluorochinolonů je metabolizována v játrech a jsou vylučovány žlučí. Snášlivost těchto látek je dobrá, avšak nemělo by docházet k jejich použití při léčbě lehčích infekcí. Nežádoucí účinky jsou způsobeny schopností vázat důležité ionty, čímž dochází k oslabování pojivových tkání a mezibuněčné hmoty [13]. V ČR je používán ciprofloxacin k léčbě infekcí způsobených gramnegativními rezistentními bakteriemi, není-li jiná volba a levofloxacin je využíván jako antituberkulotikum [17].

1.4 Antibiotická rezistence

Velké množství bakteriálních kmenů si v průběhu let dokázalo vybudovat odolnost vůči dříve účinným antimikrobiálním látkám [44]. Existuje důkaz o souvislostech mezi používáním antibiotik a zvyšující se rezistencí bakterií. Pro tuto skutečnost byl zaveden pojem selekční tlak, který označuje selekci rezistentních bakteriálních kmenů [13]. Odolnost vůči působení antibiotik je také ovlivněna tím, zda se mikroorganismy vyskytují v biofilmu, kde je přirozeně zvýšena tolerance proti vnějším vlivům. Rezistence může vznikat mutacemi v genomu anebo také vychytáváním cizí DNA z vnějšího prostředí [44]. U některých druhů bakterií se vyskytuje přirozená rezistence. Ta vzniká na základě samotné stavby nebo metabolismu bakterie. Rezistence získaná se vyvinula až po setkání s antibiotikem [8].

Existuje více mechanismů, díky kterým je zajištěna rezistence. Prvním z nich je inaktivace antibiotika pomocí enzymů, které dokážou rozštěpit molekulu dané látky a tím ji zneškodnit. Příkladem jsou β -laktamázy a jejich působení na penicilinová antibiotika. Dalším účinným mechanismem je vytvoření bariéry kolem bakterie, což neumožňuje antibiotiku proniknout k požadovanému místu. Dále může docházet k aktivnímu transportu antibiotika z buňky ven. Tento proces je uskutečňován tzv. efluxními systémy. Tyto systémy fungují jako pumpy, díky kterým mohou z buňky odcházet nežádoucí látky, jedná se však o energeticky náročný proces. Získaná rezistence může také vznikat modifikací cílového

místa. Bakterie mohou např. mutací pozměnit strukturu daného místa, což má za následek ztrátu afinity k danému antibiotiku [8].

Pro bakterii znamená však vznik rezistence velký výdej energie, která je například využívána k vyšší činnosti efluxních pump nebo k využívání méně výhodných metabolických drah. Tento nadbytečný proces je pro bakterie z energetického hlediska znevýhodňující [8].

Genetická informace o antimikrobiální rezistenci je kódována buď na kruhových molekulách dvouvláknové DNA, které jsou označovány jako plazmidy anebo na transpozonech, což jsou geny, které se vyskytují v různých částech genomu [45]. Přenos může být uskutečněn klonálním šířením, při kterém je genetická informace přenášena z mateřské buňky na dceřinou. Anebo se uskutečňuje přenos horizontální, při kterém se geny mohou šířit mezi bakteriemi z různých generací nebo dokonce z různých rodů [8]. Způsoby horizontálního přenosu jsou konjugace, transdukce a transformace. Při konjugaci dojde k přímému kontaktu mezi buňkami a je přenesen plazmid. Při transdukci je přenos DNA zprostředkován bakteriofágem a při transformaci dochází k vychytávání volné DNA z okolního prostředí [45].

Rezistence na antimikrobiální látky má dopad nejen na ekonomiku, ale hlavně na zdraví lidské populace a přináší rizika ve formě neléčitelných infekcí [45].

1.5 Antibiotika v životním prostředí

Velké množství antibiotik je vylučováno do životního prostředí v pozměněné ale i nezměněné formě [46]. Kontaminace životního prostředí je způsobena v důsledku léčby lidí a zejména zvířat. Odtud se rezidua dostávají močí a stolicí do ekosystému. Nadměrné používání antibiotik při chovu hospodářských zvířat je nežádoucí, protože dochází ke kontaminaci půd ať už hnojením, nebo aplikací odpadních vod na zemědělskou půdu. Dalším zdrojem úniku antibiotik do prostředí je nesprávné zacházení s prošlými či nepoužitými léčivy [47]. Antibiotika se tedy vyskytují jak v půdě, tak ve vodních systémech [46].

Do vody se antibiotika dostávají z čistíren odpadních vod, různých chemických výrobních závodů a nemocnic. Znečištěny jsou zejména sladké vody [48]. Ve vodě jsou antibiotika nacházena v nižších koncentracích než v půdách. Hodnoty koncentrací ve vodě

se vyskytují od několika nanogramů po mikrogramy na litr vody, zatímco koncentrace antibiotik v půdě se může pohybovat až v několika miligramech na kilogram půdy [49].

Antibiotika jako peniciliny podléhají degradaci, zatímco například tetracykliny nebo fluorochinolony jsou perzistentnější, tudíž setrvávají v životním prostředí déle a mohou se hromadit ve vyšších koncentracích. Tetracykliny vykazují fytotoxické účinky. Svým působením inhibují růst rostlin [18].

Chinolony, sulfonamidy a trimethoprim jsou antibiotika nejčastěji nacházena ve vodním prostředí [46]. Sulfonamidy představují ekotoxické riziko pro vodní organismy jako jsou řasy, ryby a koryši. Riziko nežádoucího vlivu se u sulfonamidů zvyšuje kvůli jejich perzistenci v životním prostředí [50]. Fluorochinolony patří mezi obtížně degradovatelná antibiotika kvůli své vysoké chemické stabilitě, proto se snadno přenáší vodou do půdy a sedimentů [18].

Ve vodním prostředí se nachází v nízkých koncentracích také makrolidy. Ale i přesto může při kontaminaci dojít k ovlivnění organismů obývajících vodní ekosystém [25]. Například u mikrořas mohou makrolidová antibiotika podpořit tvorbu reaktivní formy kyslíku, a tím může dojít k oxidačnímu stresu, který může mít za následek ovlivnění genové exprese v rámci fotosyntézy [51]. Antibiotika však nejsou jediné chemikálie, které se v životním prostředí vyskytují, což může vést mezi různými látkami k synergickému účinku a tím se toxicita může zvyšovat [46]. Účinky, působení a degradace antibiotik ve vodním prostředí a půdě závisí na mnoha faktorech. Těmito faktory mohou být sorpční kapacita půdy, skutečná koncentrace antibiotika, pH, přítomné minerální látky, doba expozice apod. [49].

Potenciální vliv mohou mít antibiotika i na mikrobiální společenstva, kdy může docházet ke změnám struktury daných společenstev, zejména těch v půdě [52].

1.5.1 Vliv na mikrobiální společenstva

Vodní a půdní mikroorganismy jsou antibiotikům vlivem jejich používání jako veterinárních a humánních léčiv chronicky vystavovány. Kvůli výskytu ve formě aktivních reziduí mohou tyto látky vykazovat toxický účinek [46]. Účinek látek závisí na druhu bakterií a také na přítomné koncentraci dané látky. Antibiotika mají účinek na patogenní bakterie, ale v ekosystému se nachází i bakterie, které nejsou cílovým objektem pro tyto látky. Ekosystémy jsou celkově komplikované a velmi rozmanité. Tato rozmanitost z části závisí právě na mikrobiální aktivitě [53].

Mikroorganismy v půdě jsou nezbytné pro transformaci živin a hrají velkou roli při odbourávání znečišťujících látek [49]. Kvůli výskytu antibiotik ve vyšších koncentracích může dojít k inhibici či vymizení určitých skupin bakterií. Prováděné studie ukazují, že výskyt antibiotik má za následek snižování mikrobiální biodiverzity. Také může docházet k omezení bakteriálních enzymatických procesů. Inhibice těchto procesů ovlivňuje produkci biomasy a přeměnu živin. Bylo zjištěno, že antimikrobiální látky jako fluorochinolony a sulfonamidy v environmentálně významných koncentracích mohou částečně blokovat denitrifikaci [46].

Mikrobiální společenstvo, které je vystaveno účinkům antibiotik a nevykazuje žádné změny či narušení je označováno jako rezistentní. Pokud je prokázán účinek reziduí antibiotik, tak se stanovuje tzv. odolnost komunity. Odolnost komunity je definována pomocí toho, za jak dlouho dojde k návratu do původního stavu daného společenstva [53].

Kromě rezistence dochází u mikroorganismů i ke vzniku tolerance vůči antibiotikům. Bakteriální populace jsou vystavovány selekčnímu tlaku což může vést ke změnám složení dané populace. Předpokládá se, že expozice antibiotikům má za následek nárůst počtu gramnegativních bakterií [48].

2 TESTY TOXICITY NA BAKTERIÍCH

Znečišťování životního prostředí chemickými látkami vedlo k nejistotám, zda tyto látky nemohou mít toxické účinky na živé organismy, které se pak v tomto prostředí vyskytují. Proto byla vyvinuta řada bioindikačních metod (testů), kdy jsou k hodnocení účinku využívány nejrůznější reakce živých systémů pro stanovení toxicity látek a prostředí. Např. v půdní ekotoxikologii patří mezi hlavní testovací organismy vedle hlístic, rousnic, žížal nebo chvostoskoků také mikroorganismy (mikrobiální společenstva). Mikrořasy, bakterie (např. *Aliivibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*) či prvoci jsou pak zástupci mikroorganismů jež jsou využívány v různých bioindikačních metodách ve vodním prostředí [54]. Posuzování toxicity látek vyskytujících se ve vodách předchází hodnocení negativního vlivu na organismy a hodnocení rizik, která by mohla v životním prostředí nastat. V biologických testech jsou upřednostňovány bakterie kvůli vyšší citlivosti, rychlejší reprodukci a ekonomické dostupnosti [55]. Velké pozornosti se dostalo testům s luminiscenčními bakteriemi při testování toxicity, ať už řady látek nebo odpadů [56]. Testy toxicity s použitím mikroorganismů mají důležitý význam i při zkoumání potenciální toxicity a vlivu antibiotik [53]. Mezi nejpoužívanější bakterie v bioluminiscenčních testech patří *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio qinghaiensis* a *Aliivibrio fischeri* [57].

2.1 Bioluminiscenční bakterie

Bioluminiscenční bakterie se v přírodě běžně vykytují a díky svému metabolismu mohou produkovat modrozelené světlo [58]. Díky své citlivosti jsou hojně využívány pro biologické testy při zjišťování přítomnosti látek znečišťujících životní prostředí [59].

2.1.1 *Aliivibrio fischeri*

Mikroorganismus *Aliivibrio fischeri*, z čeledi *Vibrionaceae*, je gramnegativní, tyčinkovitá bakterie obývající mořské prostředí v subtropických oblastech a mírném pásu [55]. Netvoří spory a nevykazuje známky patogenity [60]. Bakteriální buňky jsou planktonní povahy, nebo se vyskytují v symbióze s jinými organismy, a to zejména s rybami nebo olihněmi [61]. Nejvýznamnější symbiotický vztah je s havajskou olihní *Euprymna scolopes* [60]. Bakterie kolonizují světelný orgán v hostiteli, protože se jim dostává dostatek živin a jsou tam pro ně příznivé podmínky. Hostitel je zase díky emisi světla produkovaného bakteriemi chráněn před predátory. Symbióza vzniká již u mladých olihní a bioluminiscenci získávají již během osmi hodin po osídlení světelného orgánu bakteriemi [62]. U této bakterie byl také poprvé

objeven *quorum sensing*, což je označení popisující mezibuněčnou komunikaci, díky které dochází k ovlivňování chování v populaci. Tento mechanismus je založen na syntéze a uvolňování signálních molekul do okolí. Tyto molekuly jsou nazývány jako autoinduktory. Autoinduktory po dosažení určité koncentrace v biofilmu začnou spouštět určité buněčné reakce v celé populaci. *Quorum sensing* reguluje proces bioluminiscence, tvorbu biofilmu a podobně [63].

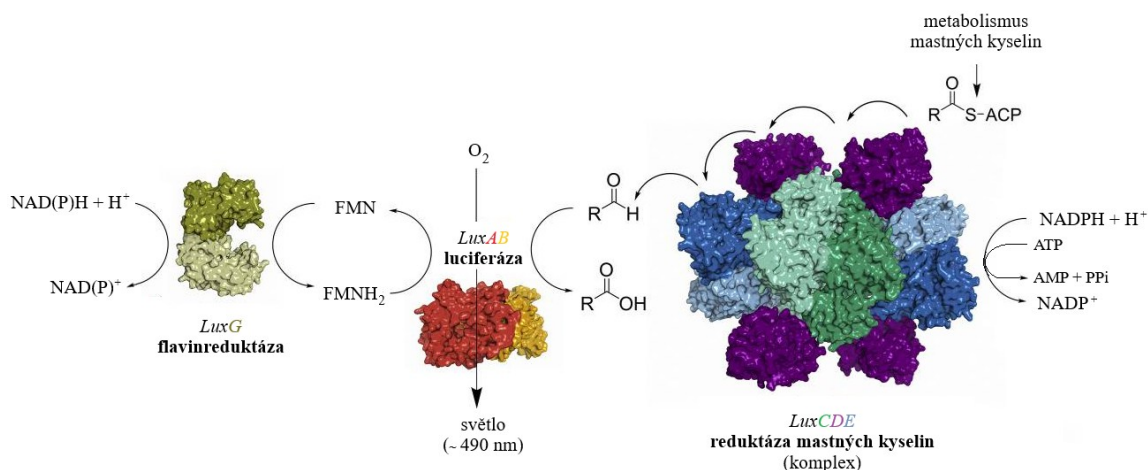
2.1.2 *Photobacterium phosphoreum*

Gramnegativní bakterie *Photobacterium phosphoreum*, z čeledi *Vibrionaceae*, byla izolována více než před 100 lety z kůže mořských ryb. Hojně se vyskytuje v mořích a oceánech. Stejně jako *A. fischeri* taktéž žije v symbióze s hlubokomořskými rybami [64]. Díky svým vlastnostem je *P. phosphoreum* vhodným nástrojem pro detekci těžkých kovů, organických látek a dalších kontaminantů vyskytujících se ve vodách a půdách [59].

2.1.3 Bioluminiscence

Zjednodušeně je bioluminiscence jev, při kterém dochází k vyzařování světla (světélkování) některými organismy v důsledku oxidace luciferinů za katalýzy enzymem luciferázou [68]. Proces bioluminiscence lze rozdělit do dvou kroků (viz Obr. 11). V prvním kroku je flavinmononukleotid (FMN) redukován pomocí enzymu FMN-oxidoreduktázy na FMNH₂ v přítomnosti redukováného nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NAD(P)H). Poté dochází k oxidaci substrátů (redukováného FMNH₂ a aldehydu s dlouhým alifatickým řetězcem), v přítomnosti kyslíku, pomocí bakteriálního enzymu luciferázy, kdy vzniká FMN, příslušná karboxylová kyselina a voda [56]. Tato reakce je navíc doprovázena emisí modrozeleného světla [65]. Světlo, které je vyzařováno, má vlnovou délku cca 490 nm [66].

Enzymy, které se podílejí na bioluminiscenci jsou kódovány v lux operonu (*luxCDABE(G)*). Geny *luxA* a *luxB* kódují enzym luciferázu; *luxG* kóduje FMN-oxidoreduktázu a zbylé geny mají na starost reduktázy mastných kyselin [67].



Obr. 11 Reakční mechanismus bakteriální bioluminiscence [67]

2.1.4 Testy s luminiscenčními bakteriemi

Testy ekotoxicity s bakteriemi patří mezi jednodruhové biologické testy. Tyto testy využívají mikroorganismus k hodnocení potenciálního rizika pocházejícího z odpadních vod, chemických látek a odpadů [68]. Test je založen na inhibici bioluminiscence. Je využíván pro sledování toxicity v environmentálních experimentech, protože disponuje různými výhodami jako například nižší časová náročnost, jednoduchá manipulace, optimální citlivost. Je také využitelný pro více druhů vzorků (anorganické i organické sloučeniny, těžké kovy, různé druhy vod, kaly z čistíren odpadních vod, vyčištěné odpadní vody apod.) [55].

Test toxicity Microtox® (luminiscenční inhibiční test) využívající luminiscenční bakterie, byl poprvé použit v USA v roce 1979 [69]. Tento biotest je možné využít pro hodnocení akutní toxicity nejen řady různých xenobiotik (pesticidů, kovů, léčiv ad.), ale také např. skládkových výluhů nebo vrtných výplachů. V tomto inhibičním testu jsou využívány luminiscenční bakterie z čeledi *Vibrionaceae*, a to např. různé kmeny *Aliivibrio fischeri* nebo *Photobacterium phosphoreum* [70].

Bakterie v těchto testech jsou používány jako bioindikátor. Bioindikátor je termín, který popisuje organismus, na kterém můžeme pozorovat změny v závislosti na kvalitě životního prostředí. Lze detekovat pomocí bioluminiscence různé biologické dopady, nebo sledovat škodlivé a toxické účinky látek [71].

Test je založen na měření intenzity luminiscenčního záření. Intenzita tohoto záření souvisí s metabolickým stavem bakterie, tudíž když je bakterie vystavena expozici toxické látky, dojde tím k inhibici enzymu luciferázy, a tím klesá intenzita bioluminiscence.

Tímto způsobem lze porovnat intenzitu záření u bakterií, které byly vystaveny toxickému působení s bakteriemi z kontrolních vzorků testu a na základě toho pak vypočítat procento inhibice. Při měření bioluminiscence může docházet také k zajímavému jevu, který vzniká při nižších testovaných koncentracích toxické látky. Tímto jevem je hormeze, tedy přirozená reakce organismu umožňující mu překonat nepříznivé podmínky a přežít. Nízká koncentrace toxikantu může působit na organismus stimulačně, a to i v případě, že látka ve vyšších koncentracích naopak vykazuje účinky toxické. Při hormezi je bioluminiscence u testovaných bakterií vyšší, než u těch z kontrolního vzorku [56].

Biologické testy založené na bioluminiscenci bakterií mají však také své nevýhody, a to například při testování vzorků s kontaminovanou půdou. Zákal ve vzorku neumožňuje přesné měření intenzity světla [72]. Další nevýhodou může být krátká doba expozice, za kterou se nestihne projevit vliv látek s opožděnou toxicitou [73].

II PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části bakalářské práce bylo optimalizovat experimentální metodu, otestovat a posoudit vliv vybraných antibiotik (ampicilinu, cykloheximidu, erythromycinu, chloramfenikolu, kanamycinu, mupirocinu, nisinu, nystatinu, polymyxinu B, spectinomycinu, streptomycinu, sulfamethoxazolu, tetracyklinu a vankomycinu) na luminiscenční bakterie *Photobacterium phosphoreum* CCM 3421.

Konkrétní cíle práce lze formulovat do následujících bodů:

- posoudit potenciální toxický účinek (akutní toxicitu) jednotlivých testovaných antibiotik na bioluminiscenční bakterie;
- posoudit případné hormetické účinky testovaných látek;
- na základě literární rešerše vytipovat antibiotika, která jsou nejčastěji nalézána v odpadních nebo pitných vodách, a budou-li v laboratoři k dispozici, otestovat toxicitu směsi těchto látek;
- otestovat účinky vybraného běžně používaného léčiva, antibiotických očních kapek (Tobrex), na testované bakterie.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Denver Instruments SI-64 A (Denver, Colorado, USA)
- Automatická pipeta Discovery comfort 100–1000 μl + špičky (BioTech, Praha, ČR)
- Automatická pipeta Discovery comfort 20–200 μl + špičky (BioTech, Praha, ČR)
- Automatická pipeta Gilson 2–20 μl + špičky (BioTech, Praha, ČR)
- Běžné laboratorní vybavení
- Laboratorní pH-metr, pH 50 Violab (Giorgio Bormac s.r.l., Capri, Itálie)
- Laboratorní váhy OHAUS Adventurer Pro (Nänikon, Švýcarsko)
- Orbitální třepačka Multi-Shaker PSU 20 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- pH sonda CHS Chemflex NTC30 (CHROMSERVIS s.r.o, ČR)
- Reverzní osmóza [demineralizovaná laboratorní voda] (AquaOsmotic, Tišnov, ČR)
- Třepačka Vortex mixer VX-200 (Biolab, Barcelona, Španělsko)
- Turner BioSystems 20/20 Luminometer, USA (Promega, California, USA)

4.1.2 Použité chemikálie

Pro přípravu kultivačního média byly použity následující chemikálie: NaCl (Lachema, ČR), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, glycerol (Penta, ČR), kvasničný extrakt a kasein (HiMedia, Indie).

Zásobní roztok chloridu sodného byl připraven z pevného NaCl (Lachema, ČR).

Zásobní roztok standartního jedu byl připraven pomocí $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a zásobního roztoku NaCl (Lachema, ČR).

Testovanými antibiotiky byly ampicilin, cykloheximid, erythromycin, chloramfenikol, nisin (pocházející z *Lactococcus lactis*), sulfamethoxazol, tetracyklin, vankomycin hydrochlorid od firmy Sigma Aldrich Fine Chemicals (St. Louis, USA). Dalšími látkami byly polymyxin B, spectinomycin dihydrochlorid pentahydrát, streptomycin sulfát od firmy HiMedia (Bombaj, Indie), kanamycin sulfát od firmy Serva (Heidelberg, Německo),

mupirocin od firmy Merck (Darmstadt, Německo) a nystatin (pocházející ze *Streptomyces noursei*) od firmy Calbiochem (San Diego, Kalifornie, USA).

Dále také bylo použito léčivo oční kapky Tobrex 3 mg/ml od firmy Novartis s.r.o. (Basilej, Švýcarsko).

Dalšími používanými chemikáliemi byl připravený roztok $0,1\text{mol.l}^{-1}$ NaOH a 96% ethanol (Penta, ČR).

Pro přípravu rekonstitučního pufru byla použita glukóza, NaCl (Lachema, ČR), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, a TRIS (Penta, ČR).

4.2 Postup práce

4.2.1 Příprava roztoků

Byly připraveny zásobní roztoky antibiotik o koncentracích cca 1 g.l^{-1} . Na analytických vahách bylo naváženo do plastových kónických zkumavek vždy cca 10 mg práškového antibiotika (viz Tabulka 1). Poté bylo do zkumavky přidáno 10 ml destilované vody a antibiotikum bylo rozpuštěno. Rozpuštění v destilované vodě probíhalo u všech antibiotik kromě tetracyklinu, sulfamethoxazolu a erythromycinu. Antibiotika erythromycin a tetracyklin byla rozpuštěna v 0,5 ml 96 % ethanolu a po rozpuštění doplněna destilovanou vodou do objemu 10 ml. Antibiotikum sulfamethoxazol bylo rozpuštěno v 0,2 ml $0,1\text{mol.l}^{-1}$ NaOH a následně taktéž doplněn destilovanou vodou do objemu 10 ml.

Tabulka 1 Testovaná antibiotika

antibiotikum	navážka [mg]	antibiotikum	navážka [mg]
Ampicilin	10,1	Nystatin	10,1
Cykloheximid	10,2	Polymyxin B	10,3
Erythromycin	10,2	Spectinomycin	10,2
Chloramfenikol	10,0	Streptomycin	10,7
Kanamycin	10,5	Sulfamethoxazol	10,6
Mupirocin	10,3	Tetracyklin	10,3
Nisin	10,1	Vankomycin	10,0

Připravené roztoky byly nabrány do stříkačky a následně přes sterilní stříkačkový $0,2\mu\text{m}$ filtr přefiltrovány do sterilních mikrozkušavek. Roztoky antibiotik byly připravovány postupně a poté byly uchovávány v mrazáku při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Rekonstituční pufr pro *P. phosphoreum* byl připraven podle tabulky 2.

Tabulka 2 Příprava rekonstitučního pufru

Rekonstituční pufr 100 ml	
látká	hmotnost [g]
glukóza	0,8
NaCl	2
MgSO₄·7H₂O	0,247
KCl	0,03
TRIS	0,553

Příprava zásobních roztoků NaCl (ředící roztok) a ZnSO₄ (standardní jed) byla provedena podle tabulek 3 a 4. Takto nachystané roztoky byly uchovávány v lednici a v případě potřeby znovu připravovány. Zásobní roztok Zn²⁺ iontů měl koncentraci 1 g.l⁻¹.

Tabulka 3 Příprava 2% roztoku NaCl

2 % NaCl 200 ml	
látká	hmotnost [g]
NaCl	4

Tabulka 4 Příprava roztoku „standardního jedu“ Zn²⁺

Roztok standardu Zn ²⁺ 50ml	
látká	množství
ZnSO₄·7H₂O	0,2199 g
2 % NaCl	50 ml

Z takto připraveného zásobního roztoku podle tabulky 4 o koncentraci 1 g.l⁻¹ bylo odpipetováno 5 ml a následně doplněno v odměrné baňce do objemu 50 ml. Výsledná koncentrace takto získaného roztoku byla 100 mg.l⁻¹.

4.2.2 Kultivace

Médium pro kultivaci bakterie *P. phosphoreum* bylo připraveno podle tabulky 5. Po sterilizaci v autoklávu proběhlo očkování. Objem byl rozdělen na části po 50 ml a do každého objemu bylo přidáno 500 µl bakteriální kultury. Kultivace probíhala na orbitální třepačce při rychlosti 160 RPM při pokojové teplotě po dobu 24 h. Bakteriální kultura byla smíchána v poměru 1:1 s 30% glycerolem. Takto připravená suspenze byla následně v mikrozkuřavkách zmrazena a uchovávána v mrazáku při -80 °C.

Tabulka 5 Příprava kultivačního média

Kultivační médium 500 ml	
látko	hmotnost [g]
NaCl	15
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,68
K ₂ HPO ₄	1,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,102
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25
glycerol	3,78
kasein	5
kvasničný extrakt	0,5

4.2.3 Princip testu

Principem testu je měření bioluminiscence (intenzity záření produkovaného bakteriemi) a stanovení inhibice tohoto záření toxickými látkami přítomnými v testovaném vzorku. Jedná se o testy akutní toxicity, kdy jsou testované bakterie vystaveny působení toxické látky (je připravena vhodná koncentrační řada); doba expozice se obvykle pohybuje mezi 5 – 30 minutami. Ze získaných výsledků je následně odečtena hodnota IC₅₀, která udává testovanou koncentraci, při níž je inhibováno 50 % testovaných jedinců.

4.2.4 Postup měření

Před zahájením experimentu byla připravená bakteriální kultura (viz kapitola 4.2.2) uchovávána při teplotě -80 °C. Po samovolném rozmrznutí alikvotního podílu kultur při pokojové teplotě bylo 600 µl této kultury smícháno s 900 µl rekonstitučního pufru připraveného podle tabulky 4. Po mírném promíchání byla suspenze ponechána v klidu po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí dané doby bylo provedeno ředění suspenze.

Do 1,5ml mikrozkuvek bylo napipetováno 1485 µl 2% NaCl a bylo přidáno 15 µl připravené suspenze bakterií. Tímto způsobem bylo získáno ředění 100x.

Připravené mikrozkuvky s naředěnou kulturou byly v mezičase měření uchovávány v lednici při 15 °C.

V první části měření docházelo vždy k ověření funkčnosti daného bioindikátoru (bakteriální suspenze *P. phosphoreum*) pomocí standardu („standardního jedu“). Jako standard byl

zvolen roztok $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Zinečnaté ionty Zn^{2+} působí toxicky pro bakterii *P. phosphoreum*, takže tento standard lze označit jako pozitivní kontrolu.

Nejprve byla připravena koncentrační řada ($0,0061 - 100 \text{ mg.l}^{-1}$) „standardního jedu“, a to následujícím způsobem: Do stojánku na mikrozkušavky bylo vloženo 11 mikrozkušavek o objemu 2 ml. Do každé mikrozkušavky, kromě první, bylo napipetováno 1,5 ml 2% NaCl. Do první mikrozkušavky byly napipetovány 2 ml roztoku zinečnatých iontů o koncentraci 100 mg.l^{-1} . Z této první mikrozkušavky bylo poté odpipetováno 500 μl , které byly přeneseny do druhé mikrozkušavky s již obsaženým množstvím 2% NaCl. Po důkladném promíchání pomocí vortexu bylo opět odebráno 500 μl a tento objem byl opět přenesen do další mikrozkušavky s 2% roztokem NaCl. Postup byl opakován osmkrát, tedy až do získání poslední koncentrace $0,0061 \text{ mg.l}^{-1}$. Získanou koncentrační řadu testované látky (v tomto případě „standardního jedu“) shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6 Koncentrační řada pro Zn^{2+}

pořadí mikrozkušavek	koncentrace [mg.l^{-1}]	pořadí mikrozkušavek	koncentrace [mg.l^{-1}]
1	100	5	0,391
2	25	6	0,098
3	6,25	7	0,024
4	1,563	8	0,0061

Do zbylých tří mikrozkušavek bylo napipetováno 500 μl demineralizované vody a tyto mikrozkušavky sloužily jako blank. Následně bylo přistoupeno k měření bioluminiscence. Byla nachystána sada 11 prázdných mikrozkušavek o objemu 1,5 ml. Do každé z nich bylo napipetováno 50 μl 100x zředěné suspenze bakteriální kultury temperované na 15°C . Po dokončení pipetování ihned proběhlo proměření každé mikrozkušavky v luminometru. Hodnota bioluminiscence v každé mikrozkušavce byla zaznamenána jako čas 0. Po doměření luminiscence v čase 0 bylo do jednotlivých mikrozkušavek přidáno 450 μl roztoku buď testované látky nebo vody (tj. 8 koncentrací „standardního jedu“ a 3 blanky). Po prvním napipetování roztoku o nejvyšší koncentraci do první zkumavky byl stopován čas 15 minut. Po uplynutí 15 minut bylo započato další měření a zároveň bylo stopováno dalších 15 minut. Byla tedy zaznamenávána bioluminiscence v čase 15 a 30 minut. Experiment probíhal pro každou testovanou koncentraci v tripletu.

Po dokončení měření standardu a ověření, zda roztok Zn^{2+} vykazuje požadovanou toxicitu (zháší bioluminiscenci), proběhlo měření s předem připraveným antibiotikem.

Mikrozkumavka se zamraženým zásobním roztokem daného antibiotika (o koncentraci 1 g.l^{-1}) byla rozpuštěna při pokojové teplotě. Do řady bylo vedle sebe nachystáno 12 mikrozkumavek o objemu 2 ml. Pro jednotlivé antibiotikum byla zvolena nejvyšší testovaná koncentrace 100 mg.l^{-1} ; ředící řada obsahovala 9 zkumavek s testovanou látkou (ředění antibiotika vycházelo ze základního roztoku o koncentraci 400 mg.l^{-1}) a k ní taktéž náležely 3 blanky (demineralizovaná voda).

Do první mikrozkumavky bylo napipetováno množství $1200 \mu\text{l}$ 2% roztoku NaCl a do zbylých mikrozkumavek pak $1500 \mu\text{l}$. Do první zkumavky bylo přidáno $800 \mu\text{l}$ antibiotika o připravené koncentraci 1 g.l^{-1} . Tímto ředěním bylo dosaženo požadované koncentrace 400 mg.l^{-1} (základní roztok). Po důkladném promíchání na vortexu bylo odebráno $500 \mu\text{l}$ roztoku a toto množství bylo pipetováno do další mikrozkumavky. Způsob ředění byl opakován až do dosažení koncentrace $0,0061 \text{ mg.l}^{-1}$, tak jako u standardu. Koncentrace v mikrozkumavkách měly stejné hodnoty jako jsou uvedeny v tabulce 6 jen se lišily o přidanou koncentraci základního roztoku, čili 400 mg.l^{-1} .

U antibiotik rozpustných ve vodě byl jako blank opět použit 2% NaCl a destilovaná voda. Stejně, jako u měření se standardem, byly nachystány 3 řady mikrozkumavek o objemu 1,5 ml a do nich bylo napipetováno $50 \mu\text{l}$ 100x ředěné suspenze bakteriální kultury. Luminiscence byla opět zaznamenána v čase 0. Následně bylo do zkumavky se suspenzí přidáno $450 \mu\text{l}$ roztoku z koncentrační řady a byl stopován čas 15 minut. Takto byla napipetována celá řada. V časech 15 a 30 minut byla opět zaznamenávána hodnota luminiscence u každé z mikrozkumavek. Testování s antibiotiky probíhalo opět ve třech opakováních.

U antibiotik, která vyžadovala jiné rozpouštědlo, než destilovanou vodu bylo nutno upravit pH. Blanky k těmto antibiotikům byly sestaveny podle roztoku, ve kterém se antibiotikum rozpustilo a taktéž proběhla úprava pH na hodnoty mezi 6 – 8,5 (ISO 11348). Všechna antibiotika byla měřena postupně s bakteriální kulturou stejného data.

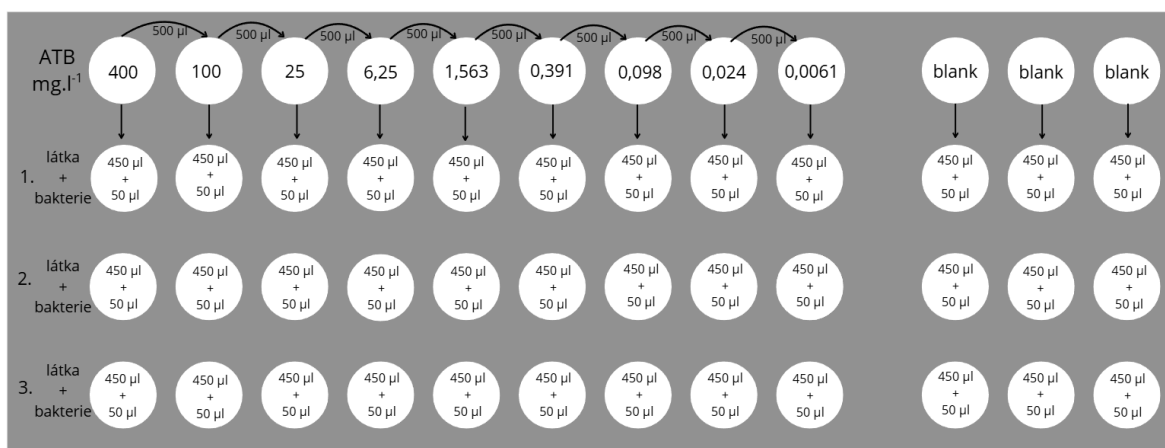
Hodnoty luminiscence byly zapisovány do programu MS Excel a následně byly vyhodnocovány.

U směsi antibiotik sulfamethoxazolu a erythromycinu byl smíchán poměr 1:1 odpipetováním $400 \mu\text{l}$ od každého roztoku antibiotika do mikrozkumavky s množstvím $1200 \mu\text{l}$ 2% NaCl a proběhlo ředění obdobným způsobem jako u ostatních antibiotik. Blank byl sestaven

z 1500 μl 2% NaCl a dvakrát 250 μl upravených roztoků s látkou, ve kterých byla daná antibiotika rozpuštěna.

Koncentrační řada léčiva Tobrex byla připravena přidáním 267 μl léčiva do 1733 μl 2% NaCl, tak aby výsledná koncentrace byla opět 400 mg.l^{-1} . Následně byl opakován stejný postup. Tobrex je léčivo, které neobsahuje pouze čisté antibiotikum, ale skládá se z řady aditiv a pomocných látek, které by v tomto případě měly být součástí blanku.

Kvůli nedostupnosti těchto látek v laboratoři nebylo možné realizovat přesné složení roztoku, a proto byly blanky zjednodušeny a doplněny demineralizovanou vodou. Schéma na Obr. 12 znázorňuje sestavení experimentu.



Obr. 12 Znázornění sestaveného experimentu (zdroj: vlastní)

4.3 Zpracování a vyhodnocení dat

Zpracování a vyhodnocování dat probíhalo v MS Excel.

Během měření byly zaznamenány hodnoty luminiscence v časech 0, 15 a 30 minut; jak pro testované koncentrace antibiotik, tak pro blank. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních.

Nejprve byly z průměrných hodnot luminiscencí blanků vypočítány korekční faktory CF_{15} a CF_{30} , podle vztahů (1) a (2). Kde L_{00} je průměrná luminiscence blanků v čase 0 a L_{015} (L_{030}) je průměrná luminiscence blanků v čase 15 (30) minut.

$$CF_{15} = \frac{L_{00}}{L_{015}} \quad (1)$$

$$CF_{30} = \frac{L_{00}}{L_{030}} \quad (2)$$

Pomocí korekčního faktoru byla následně spočítána pro každou hodnotu luminiscence testovaného vzorku v daném čase (15 a 30 minut) korigovaná hodnota luminiscence L_{corr} podle vztahu (3) a (4). Kde CF_{15} (CF_{30}) je korekční faktor a L_{15} (L_{30}) je hodnota luminiscence z každé koncentrace v čase 15 (30) minut.

$$L_{15corr} = CF_{15} \cdot L_{15} \quad (3)$$

$$L_{30corr} = CF_{30} \cdot L_{30} \quad (4)$$

Tímto přepočtem byl odstraněn vliv přirozeného úbytku luminiscence v průběhu měření, a také vliv ředění.

Pro každé ředění v koncentrační řadě v obou časech byla vypočítána podle vztahu (5) a (6) procenta inhibice, kde L_0 je luminiscence v čase 0 u každé koncentrace a L_{15corr} (L_{30corr}) je korigovaná hodnota luminiscence v čase 15 (30) minut od každé koncentrace.

$$I [\%] = \frac{(L_0 - L_{15corr}) \cdot 100}{L_0} \quad (5)$$

$$I [\%] = \frac{(L_0 - L_{30corr}) \cdot 100}{L_0} \quad (6)$$

Vypočtené hodnoty inhibicí byly zprůměrovány (rovněž byly vypočteny směrodatné odchylky měření) a následně byly sestaveny závislosti $\log(c)$, buď testovaného antibiotika nebo „standardního jedu“, na inhibici [%] v daný čas (15 a 30 min).

Kvůli přidání 50 μ l suspenze bakteriální kultury došlo v mikrozkušavkách ke zředění původně připravené koncentrační řady antibiotika nebo „standardního jedu“ ($ZnSO_4$). Přepočtené hodnoty (tj. finální koncentrace testované látky v reakční směsi) jsou uvedené v tabulce 7.

Tabulka 7 Hodnoty reálných koncentrací testované látky v reakční směsi

pořadí mikrozkušavek	koncentrace [mg.l ⁻¹]	pořadí mikrozkušavek	koncentrace [mg.l ⁻¹]
1	360	6	0,352
2	90	7	0,088
3	22,5	8	0,022
4	5,625	9	0,0055
5	1,406		

Pokud testovaná látka nevykazovala známky inhibice proběhlo přepočítání na procenta bioluminiscence; vztaženo k blanku, který by měl vykazovat 0 % inhibice čili

100 % bioluminiscence. Z naměřených dat (vždy pro daný čas a danou koncentraci) byla podle vzorce (7) a (8) spočítána bioluminiscence, kde L_{15} (L_{30}) je hodnota luminiscence od každé koncentrace v čase 15 (30) minut a L_{015} (L_{030}) je průměr blanků v čase 15 (30) minut.

$$B_i [\%] = \frac{L_{15}}{L_{015}} \cdot 100 \quad (7)$$

$$B_i [\%] = \frac{L_{30}}{L_{030}} \cdot 100 \quad (8)$$

Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a byly vypočteny směrodatné odchylky. Následně byly sestaveny závislosti $\log(c)$ testovaného antibiotika na bioluminiscenci (B [%]). V případě více řad testovaných látek v jednom grafu, byly hodnoty na ose x posunuty o hodnotu 0,1 kvůli větší přehlednosti.

Pokud testovaná látka vykazovala inhibiční účinek bylo stanovení znovu zopakováno; naměřená data byla následně vyhodnocena v programu MATLAB pomocí metody fitu sigmoidální funkce na ČVUT v Praze.

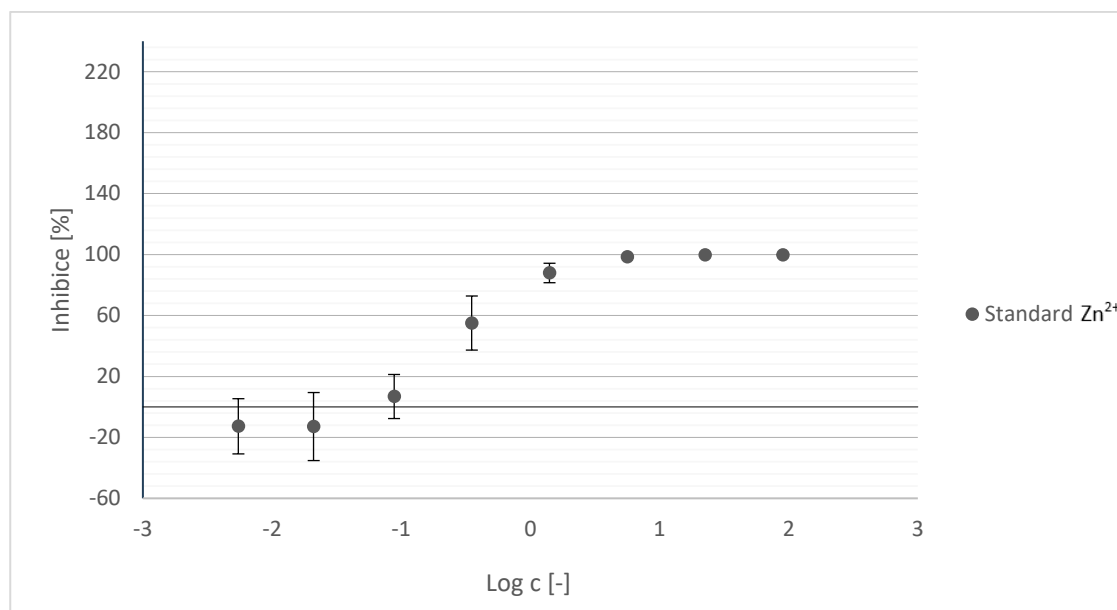
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na luminiscenční bakterii *Photobacterium phosphoreum* CCM 3421 byly testovány potenciální toxické/inhibiční účinky testovaných antibiotik, kterými byly jak antibiotika bakteriostatická (tetracyklin, sulfamethoxazol, erythromycin, chloramfenikol a mupirocin), tak baktericidní (spectinomycin, streptomycin, polymyxin B, vankomycin, ampicilin, nisin, nystatin a kanamycin). Jednalo se o testy akutní toxicity, kdy byl sledován vliv testovaných látek na inhibici luminiscence. Měření probíhalo v časech 15 a 30 minut. Jako pozitivní kontrola („standardní jed“) byl použit ZnSO_4 . Bylo také testováno léčivo Tobrex (oční kapky), které bývá často předepisováno dětem např. v případě zánětu spojivek. U dvou nejčastěji nacházených léčiv v povrchových vodách (sulfamethoxazol a erythromycin [80]) byla otestována případná potenciace účinku.

Na následujících grafech v jednotlivých podkapitolách je znázorněn vliv testovaných látek na bioluminiscenci bakterie *Photobacterium phosphoreum*. Výsledek je vyjádřený jako procentuální inhibice vynesena v grafu v závislosti na koncentraci látky (logaritmicky převedená koncentrace). Hodnoty inhibice jsou doplněny o směrodatné odchylky. V grafech jsou hodnoty z měření v čase 15 minut, grafy v čase 30 minut jsou uvedeny v příloze I.

5.1 Testování toxicity – „standardní jed“ (ZnSO_4)

Pro ověření funkčnosti testu byl použit roztok síranu zinečnatého (ZnSO_4), který je v testech toxicity na bakteriích běžně používán jako pozitivní kontrola („standardní jed“) (ISO 11348). Z grafu na Obr. 13 je patrné, že s rostoucí koncentrací Zn^{2+} iontů dochází k inhibici luminiscence. Z inhibiční křivky (MATLAB) byla odečtena hodnota IC_{50} , tedy koncentrace, při níž je inhibováno 50 % testovaných bakterií (viz Příloha II a III). Hodnota IC_{50} byla pro ZnSO_4 stanovena jako $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Tato hodnota je v porovnání s hodnotami uváděných ve studii, ve které však autoři testovali toxicitu ZnSO_4 na bakterii *Aliivibrio fischeri* [74] nižší ($3 - 10 \text{ mg.l}^{-1}$), což může poukazovat na vyšší citlivost bakterie *P. phosphoreum*.



Obr. 13 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (zdroj: vlastní)

V nižších koncentracích testované látky lze pozorovat hormetický účinek, kdy nedochází k inhibici, ale naopak se intenzita bioluminiscence zvyšuje (testovaná látka působí na bakterie evidentně „stimulačně“). Tyto výsledky měření odpovídají očekávaným výsledkům. Z tohoto vyplývá správné nastavení a funkčnost testu. Pozitivní kontrola tak slouží jako kontrola toho, že testované mikroorganismy jsou v dobré/přijatelné kondici, a že pokud získáme za daných podmínek výsledek negativní (I [%] blíží se nule), nemá neznámá testovaná látka (v našem případě různá antibiotika) na testovaný systém potenciální toxický účinek.

5.2 Testování toxicity vybraných antibiotik

Při určování toxicity neznámého vzorku (neznámé látky) je doporučována sekvence následujících testů:

- limitní test* – je to předběžný test, jehož cílem je zjistit, zda testovaná látka vykazuje toxické účinky na testované organismy;
- ověřovací test* – ověřuje negativní výsledek předběžného testu ve více paralelních nasazeních; v případě, že je odpověď testovaného systému nižší než 50 % (ve srovnání s kontrolou), je tato skutečnost zaznamenána a další testování již není prováděno;

- c) orientační test – jehož cílem je určit rozmezí, ve kterém lze očekávat hodnotu EC_{50} (IC_{50}) testované látky;
- d) základní test – určení hodnoty EC_{50} (IC_{50}) testované látky [75].

V tomto případě bylo při testování toxicity vybraných antibiotik na bakterii *P. phosphoreum* postupováno tak, že nejprve byla testována všechna antibiotika v koncentraci 100 mg.l⁻¹. Podle výsledku tohoto (limitního) testu byla antibiotika rozdělena do tří skupin:

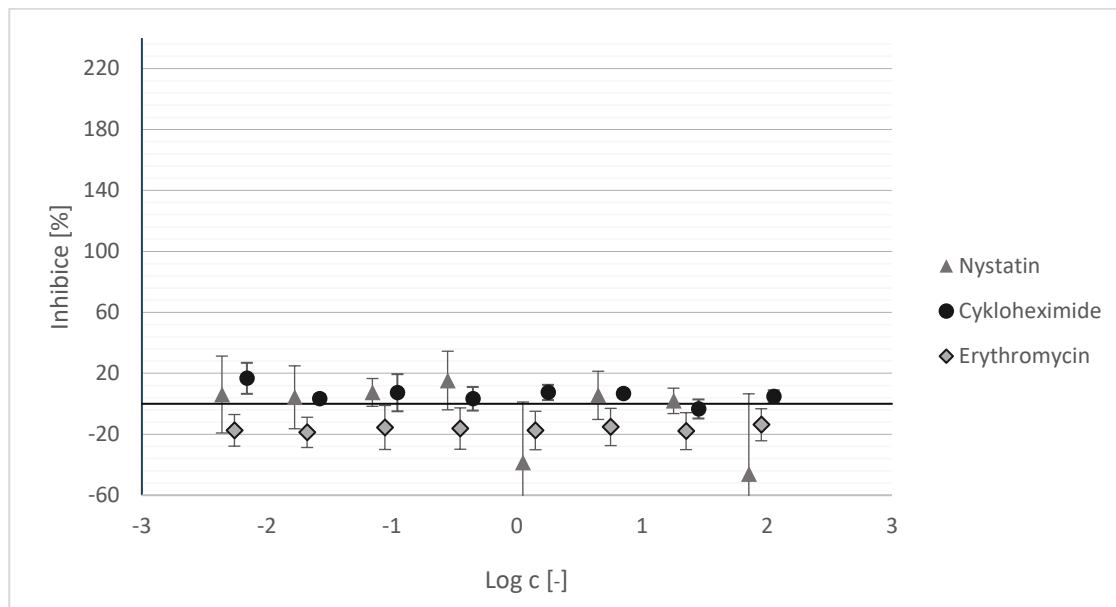
1. Antibiotika neinhibující bioluminiscenci (v nejvyšší testované koncentraci 100 mg.l⁻¹);
2. Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 50 % (v nejvyšší testované koncentraci 100 mg.l⁻¹);
3. Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 100 % (v nejvyšší testované koncentraci 100 mg.l⁻¹).

Ve všech případech (u všech antibiotik) bylo, zejména z časových důvodů, dále postupováno tak, že byl testován vliv celé koncentrační řady antibiotika (tj. od 0,0061 do 100 (popř. 400) mg.l⁻¹) na bioluminiscenci testovaných bakterií. Naměřená data byla zaznamenána a výsledky zpracovány formou grafů.

Vzhledem k tomu, že literatura je zaměřena především na bakterii *Aliivibrio fischeri* byly hodnoty porovnávány s dostupnými výsledky právě z těchto studií.

5.2.1 Antibiotika neinhibující bioluminiscenci

Na Obr. 14 je znázorněn vliv tří různých antibiotik – nystatinu, cykloheximidu a erythromycinu. Z grafu vyplývá, že testovaná antibiotika neměla v testovaných koncentracích nějak významný toxický účinek na bakterii *P. phosphoreum*.

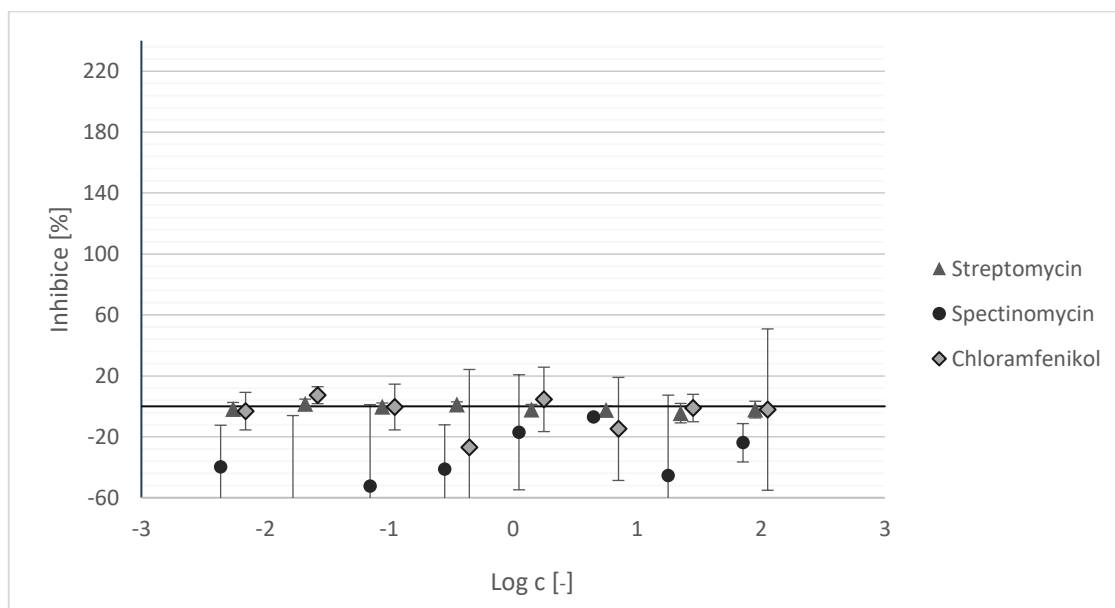


Obr. 14 Graf inhibice bioluminiscence pro nystatin, cykloheximid a erythromycin, čas 15 minut (zdroj: vlastní)

V testovaných koncentracích byla zaznamenána inhibice bioluminiscence ~10 %. Cykloheximid a erythromycin vykazovaly podobné účinky. V nižších koncentracích u cykloheximidu došlo k minimálnímu nárůstu bioluminiscence, což by spíše odpovídalo možné stimulaci bakterií než inhibici. U nystatinu došlo k mírnému rozptylu hodnot, což mohlo být způsobeno přirozenou variabilitou testu, poněvadž dochází k měření s živým, tudíž měnícím se systémem. Žádná z těchto tří látek nevykazovala akutní toxický účinek během doby expozice 15 minut (a ani 30 minut, viz Příloha I).

V dostupné odborné literatuře se konkrétní studie hodnotící vliv nystatinu a cykloheximidu na bioluminiscenci *Aliivibrio fischeri* nevyskytují, nebo jen velmi omezeně. V porovnání s článkem [76], ve kterém byl erythromycin testován obdobným způsobem, taktéž nedošlo k inhibici a látka byla označena za netoxickou. Stanovená hodnota EC_{50} pro erythromycin ve studii byla $>100 \text{ mg.l}^{-1}$. Na konferenci Vitatox v roce 2023 byl odprezentován výstup ohledně výskytu léčiv v odpadních vodách a potenciálním dopadu na vody pitné. V pitných vodách za rok 2022 v České republice byl výskyt erythromycinu o koncentraci

0,025 – 0,035 $\mu\text{g.l}^{-1}$ [77]. I toto zjištění poukazuje na důležitost znalosti potenciálních ekotoxických účinků antibiotik.



Obr. 15 Graf inhibice bioluminiscence pro streptomycin, spectinomycin a chloramfenikol, čas 15 minut (zdroj: vlastní)

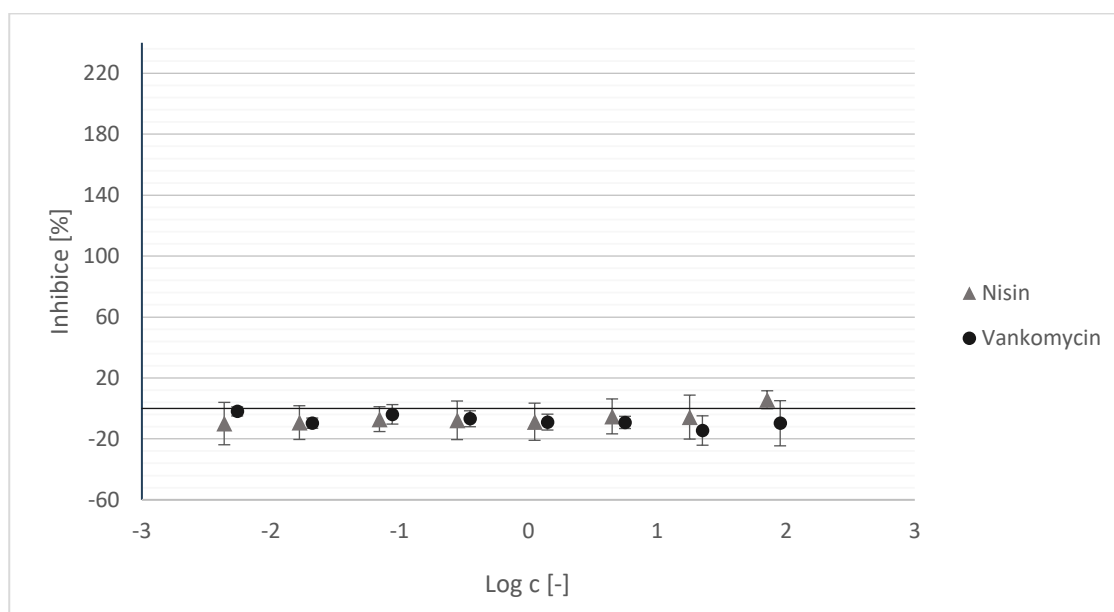
V grafu na Obr. 15 jsou znázorněny účinky antibiotik streptomycinu, spectinomycinu a chloramfenikolu. Ve všech případech byla v nejvyšší koncentraci 100 mg.l^{-1} zaznamenána nulová inhibice. Spectinomycin vykazoval mírný rozptyl hodnot, ten mohl být způsoben důsledkem metabolické aktivity bakterií a celkovou reakcí na tuto látku. U streptomycinu a chloramfenikolu jsou výsledky velmi podobné. Chloramfenikol svým mechanismem účinku blokuje proteosyntézu, tudíž se inhibice v dané době expozice nemusela projevit. Ačkoli je streptomycin antibiotikum s bakteriostatickým účinkem proti gramnegativním bakteriím, bakterie *P. phosphoreum* na něj nereagovala žádnou změnou bioluminiscence. Z výsledků měření vyplývá, že antibiotika streptomycin, spectinomycin a chloramfenikol nevykazují měřitelný akutní toxický účinek na bakterii *P. phosphoreum*.

V dostupných studiích byla hodnota EC_{50} i po 30 minutách pro chloramfenikol 4000 mg.l^{-1} [78], což naznačuje velmi nízkou akutní toxicitu této látky vůči bakterii *Aliivibrio fischeri*. Pro streptomycin byl sledovaný parametr EC_{50} v čase 30 minut vyhodnocen jako bez účinku testované látky [78]. Naměřená data se tedy s těmito výsledky shodují. To však nevylučuje případnou toxicitu pro jiné vodní organismy.

U spectinomycinu v dostupných odborných zdrojích nebyla dohledána informace o interakci mezi touto látkou a bakterií *Aliivibrio fischeri*.

V grafu na Obr. 16 jsou zaznačena data pro nisin a vankomycin. U těchto antibiotik taktéž nebyla prokázána akutní toxicita.

U vankomycinu v literatuře [79] byla v testu akutní toxicity vyloučena toxicita dané látky. Nisin je bakteriocin, který působí zejména na grampozitivní bakterie. Testovaná bakterie *P. phosphoreum* patří mezi bakterie gramnegativní, čímž by se mohl vysvětlit negativní (netoxický) účinek nisinu na tuto bakterii. Nisin je schválen jako netoxická látka [80], a to se i potvrdilo.



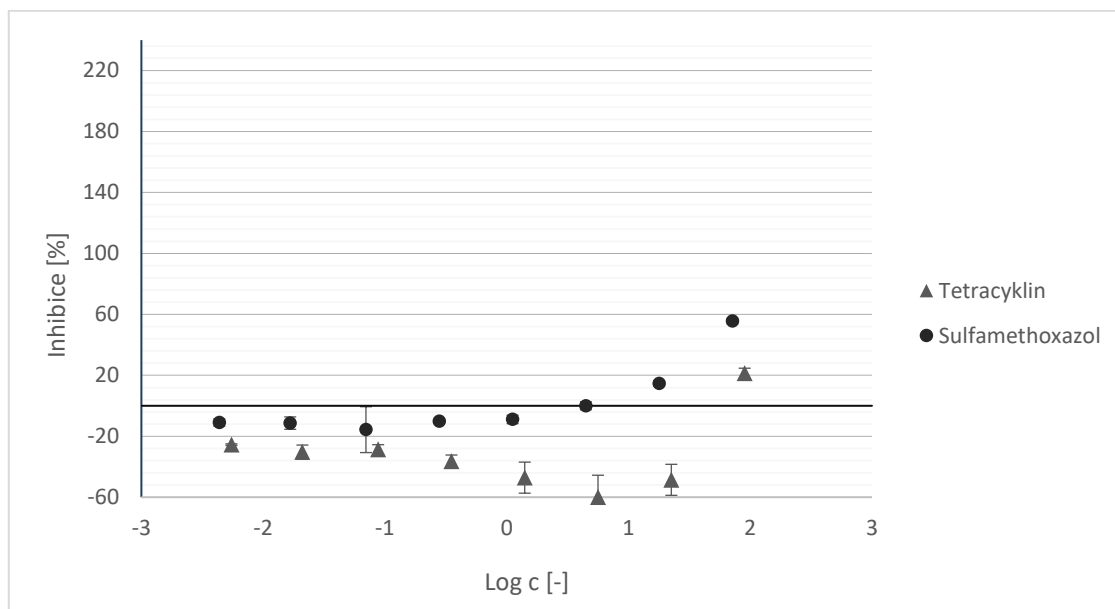
Obr. 16 Graf inhibice bioluminiscence pro nisin a vankomycin, čas 15 minut (zdroj: vlastní)

5.2.2 Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 50 %

V grafu na Obr. 17 je znázorněna inhibice bioluminiscence testovanými antibiotiky, tetracyklinem a sulfamethoxazolem. Nejvýraznější inhibice byla naměřena u sulfamethoxazolu, kde byla u nejvyšší testované koncentrace 100 mg.l^{-1} zjištěna inhibice 55 %.

Ve studii [79] popisují její autoři inhibiční vliv tetracyklinu, kdy stanovili EC_{50} v čase 15 minut na $17,58 \text{ mg.l}^{-1}$ a v čase 30 min $6,4 \text{ mg.l}^{-1}$. To ukazuje na postupně se projevující toxický účinek. Výsledky našich experimentů ukazují, že tetracyklin v čase 15 minut vykazoval v nejvyšší testované koncentraci inhibici okolo 20 %, v čase 30 minut však došlo k nárůstu inhibice na 72 % (viz Obr. 26 v příloze I). Postupná toxicita se tedy potvrdila i v našem případě. Možné odchylky výsledků našeho testování mohou být způsobeny celkovou variabilitou testu při používání živého systému, nebo také citlivostí konkrétní šarže

použité bakteriální suspenze. V dalším literárním zdroji byla toxicita tetracyklinu testována společně s těžkými kovy, kvůli jeho schopnosti tvořit komplexy [80]. To značí, že v praxi by v životním prostředí mohlo docházet k vyšší toxicitě na vodní společenstva kvůli kombinovanému účinku látek v reálných podmínkách.



Obr. 17 Graf inhibice bioluminiscence pro tetracyklin a sulfamethoxazol, čas 15 minut
(zdroj: vlastní)

Sulfamethoxazol je antibiotikum ze skupiny sulfonamidů s bakteriostatickým účinkem. Při testu akutní toxicity vykazoval 55% inhibici v čase 15 minut. Tato látka patří k významným léčivům vyskytujícím se v životním prostředí. Jedná se o antibiotikum, které je i v České republice nacházené v odpadních vodách a odpadních vodách ze zdravotnických zařízení [77]. V Evropě toto antibiotikum i celá skupina sulfonamidů patří k nejrizikovějším antimikrobním látkám v životním prostředí [81]. Ve studii [82] jsou shrnuty poznatky z více studií, které se neshodují ve svých závěrech. Uvádí, že sulfamethoxazol v některých případech toxicitu v čase 30 minut vykazoval v jiných případech se toxicky neprojevoval.

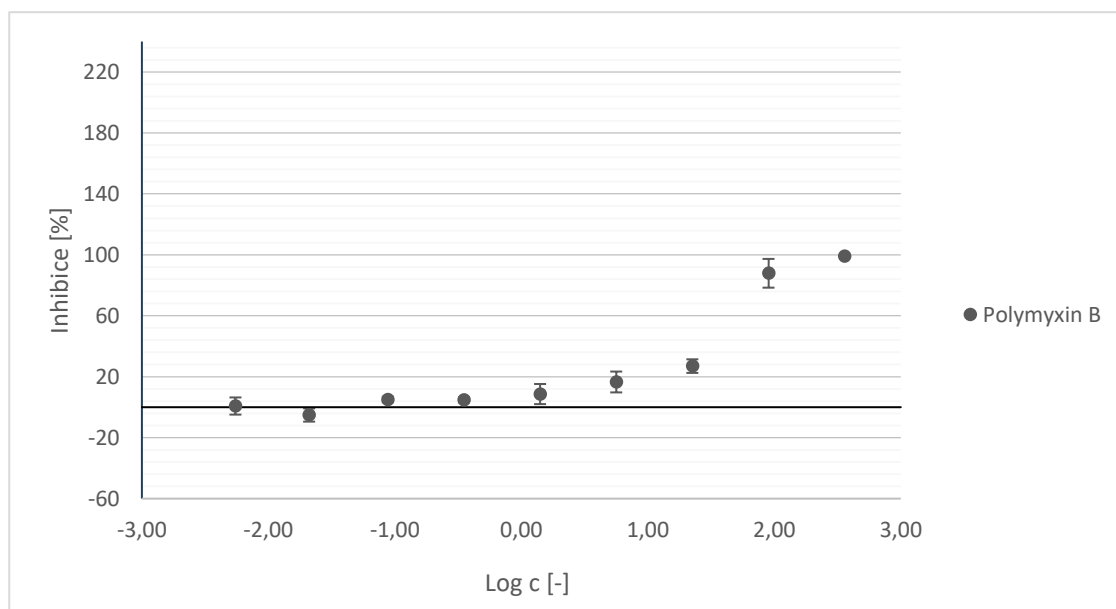
5.2.3 Antibiotika inhibující bioluminiscenci okolo 100 %

V grafu na Obr. 18 je znázorněn účinek polymyxinu B. Protože se inhibice při nejvyšší testované koncentraci tohoto antibiotika (100 mg.l^{-1}) blížila 100 %, byla testovaná koncentrační řada doplněna o další testovaný roztok o koncentraci 400 mg.l^{-1} (z důvodu vykreslení inhibiční křivky, a pak následného vyhodnocení IC_{50}).

Polymyxin B cílí proti gramnegativním bakteriím, takže potenciální toxický účinek se dal u gramnegativní bakterie *P. phosphoreum* očekávat. I přesto, že je toto antibiotikum

využíváno jako poslední obranná možnost proti multirezistentním gramnegativním bakteriím [37], čím dál více dochází k výskytu genů rezistence u různých mikroorganismů [83]

Polymyxin B vykazoval inhibici 87 % v koncentraci 100 mg.l⁻¹. Hodnota IC₅₀ pro polymyxin B byla stanovena jako 17,9 mg.l⁻¹ (viz Obr. 33 v Příloze II). Významný inhibiční vliv této látky na bakterii *A. fischeri* pozorovali autoři studie [84] kdy stanovili hodnotu IC₅₀ = 0,63 mg.l⁻¹. Tyto hodnoty se od sebe výrazně liší. Tento rozdíl může být pravděpodobně způsobem rozdílnou citlivostí jednotlivých kmenů (*P. phosphoreum* vs. *A. fischeri*) k testovanému antibiotiku.



Obr. 18 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (zdroj: vlastní)

5.3 Hormetické účinky antibiotik

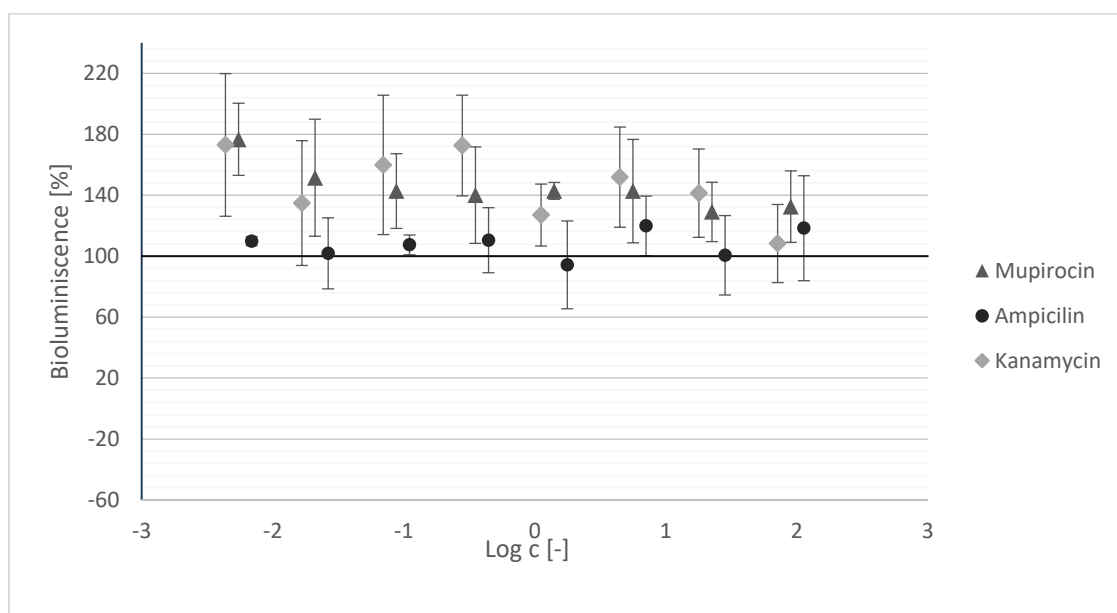
U antibiotik, u kterých nebyl pozorován inhibiční účinek, bylo naopak z grafů patrné, že při nižších koncentracích testované látky dochází k nárůstu bioluminiscence v testovaném systému. Z těchto důvodů byl ve vybraných případech sledován nikoliv inhibiční účinek, ale naopak nárůst bioluminiscence ve srovnání s blankem (kontrolou), v němž žádné testované antibiotikum přítomno nebylo.

V grafu na Obr. 19 je znázorněna závislost bioluminiscence na koncentraci testovaných antibiotik, konkrétně mupirocinu, ampicilinu a kanamycinu.

Mupirocin při nižších koncentracích nevykazoval žádný inhibiční účinek, nýbrž byl pozorován nárůst bioluminiscence o 40 – 80 %. Došlo tedy k hormetickému efektu, kdy určité koncentrace některých látek nevedou k buněčné smrti nebo k zastavení růstu, ale stimulují metabolismus bakterie, a to se může v našem případě projevit zvýšenou produkcí světla.

U ampicilinu došlo k mírnému zvýšení bioluminiscence zhruba o 20 %. V literatuře je uváděno, že *Aliivibrio fischeri* je na ampicilin rezistentní [85]. Náš experiment ukázal, že ampicilin není toxický ani pro *P. phosphoreum*, námi testovanou bakterii. Naopak, přítomnost tohoto antibiotika poukazuje na mírně hormetický účinek.

U kanamycinu byl zaznamenán výrazný nárůst bioluminiscence. Nejvyšší zaznamenaná hodnota bioluminiscence byla cca 170 % v 15 minutách, 190 % pak v 30 minutách (viz Obr. 28 v příloze I).



Obr. 19 Graf bioluminiscence pro mupirocin, ampicilin a kanamycin, čas 15 minut
(zdroj: vlastní)

V dostupné literatuře nejsou informace o interakci mupirocinu s bakterií *Aliivibrio fischeri*. Vzhledem k výskytu tohoto antibiotika v životním prostředí je sledovaným problémem spíše rezistence bakterií na toto antibiotikum [86], než potenciální toxicita antibiotika.

Kanamycin je celosvětově hojně používán jako veterinární léčivo, které je ve vodě špatně hydrolyzováno. Dostupná literatura uvádí, že při testování akutní toxicity kanamycinu byla vypočtena v čase 15 minut hodnota IC_{50} jako $5,11 \text{ g.l}^{-1}$ [87]. Autoři výše uvedené studie stanovily IC_{50} v koncentraci cca 50x vyšší, než byla námi testovaná koncentrace. Vzhledem

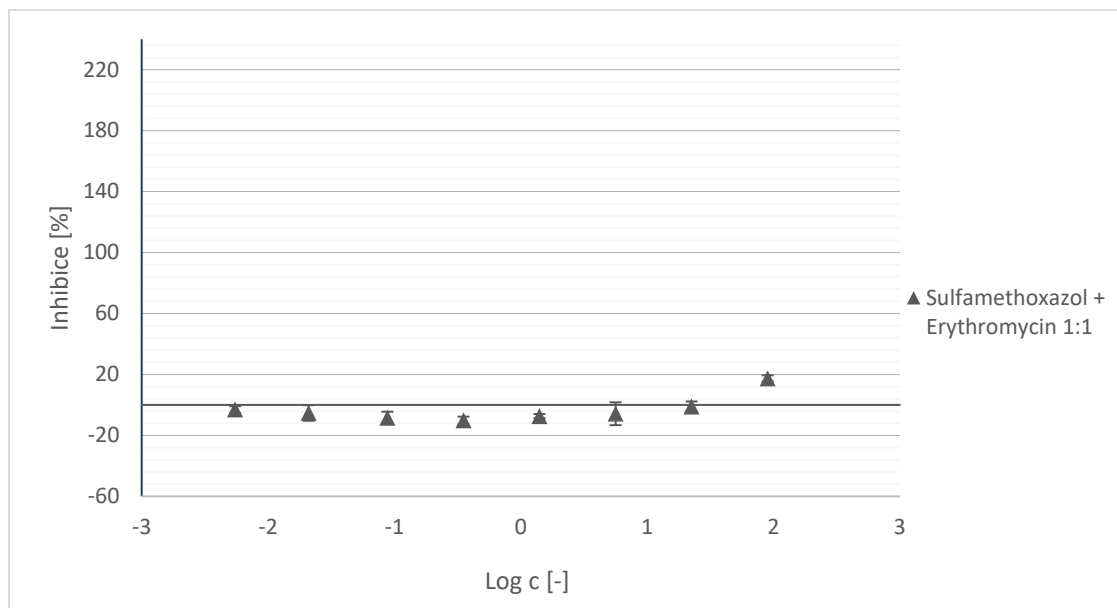
k tomu, že námi nejvyšší testovaná koncentrace kanamycinu 100 mg.l^{-1} nevykazovala žádné inhibiční/toxické účinky, nebylo našim cílem dále u tohoto antibiotika hodnotu IC_{50} stanovovat.

5.4 Testování možné potenciace účinků dvou antibiotik ve směsi

V experimentální části této bakalářské práce byl testován i vliv směsi dvou antibiotik na testované luminiskující bakterie. Vybranými antibiotiky byly erythromycin a sulfamethoxazol. Důvodem tohoto výběru byla skutečnost, že se jedná o antibiotika, která jsou nejčastěji nacházena v odpadních vodách [80], a také to že byly dostupné v naší laboratoři.

V případě dvou toxikantů ve směsi může nastat několik modelových případů toxického působení. Účinky mohou být shodné (kategorie působení aditivní, kumulativní, synergické či potenciování), neutrální (indiferentní) nebo opačné/inhibiční (antagonismus) [56].

Když byla testována jednotlivá antibiotika v nejvyšší testované koncentraci 100 mg.l^{-1} , vykazoval erythromycin na testované bakterie inhibici bioluminiscence 0 % (viz Obr. 14) a sulfamethoxazol 55 % (viz Obr. 17). V případě, že byla tato antibiotika testována ve směsi, v poměru 1:1 (obě v koncentraci 100 mg.l^{-1}), objevil se „zajímavý“ výsledek. Nedošlo k potenciaci (tedy zvýšení toxického účinku látky /sulfamethoxazolu v našem případě/, která je ve směsi s látkou, která nemá žádný toxický/inhibiční účinek /erythromycin v našem případě/), ale naopak k antagonismu. Došlo k zeslabení toxického působení sulfamethoxazolu na *Phobacterium phosphoreum*. Inhibice luminiscence v tomto případě dosáhla pouhých 17 % (viz Obr. 20). Dostupná literatura neposkytuje informace o kombinaci těchto antibiotik na luminiscenční bakterie, což může být do budoucna podnětem pro další testování.



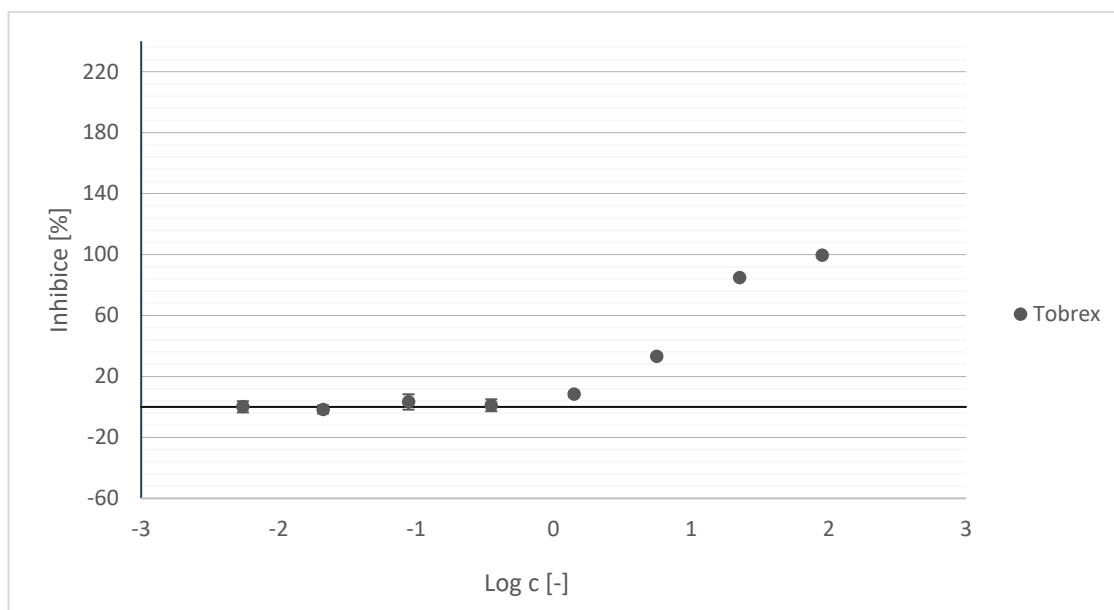
Obr. 20 Graf závislosti koncentrace směsi dvou antibiotik na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (*zdroj: vlastní*)

5.5 Testování toxicity antibiotických očních kapek (Tobrex)

Pro experiment se podařilo získat antibiotické oční kapky Tobrex, které jsou používány k léčbě zevních bakteriálních infekcí očí a přilehlých tkání u dospělých a dětí od 1 roku [88].

Roztok je složen z následujících pomocných látek: benzalkonium-chlorid, kyselina boritá, síran sodný, chlorid sodný, tyloxapol, hydroxid sodný a/nebo kyselina sírová (k úpravě pH), čištěná voda. Antibiotickou složkou u očních kapek je baktericidní tobramycin, který patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik a jeho mechanismus účinku je blokování proteosyntézy [88].

Při nejvyšší testované koncentraci tobramycinu (100 mg.l^{-1}) vykazovaly tyto kapky téměř 100% inhibici bioluminiscence u testovaných bakterií, viz Obr. 21. Test byl opakován a pro lepší vykreslení a vyhodnocení inhibiční křivky byla přidána testovaná koncentrace 400 mg.l^{-1} . Z inhibičních křivek byla odečtena hodnota $\text{IC}_{50} = 8,4 \text{ mg.l}^{-1}$ v čase 15 minut. Protože tyto oční kapky obsahují vedle antibiotika i řadu aditiv (uvedených výše) a nebyl použit odpovídající blank (pouze demineralizovaná voda), není možné přesně určit, zda inhibiční vliv mělo samotné antibiotikum (tobramycin) nebo případná aditiva, jako např. surfaktant tyloxapol [89].



Obr. 21 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (*zdroj: vlastní*)

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zhodnotit vliv z hlediska akutní toxicity čtrnácti vybraných antibiotik (ampicilinu, cykloheximidu, erythromycinu, chloramfenikolu, kanamycinu, mupirocinu, nisinu, nystatinu, polymyxinu B, spectinomycinu, streptomycinu, sulfamethoxazolu, tetracyklinu a vankomycinu), směsi dvou antibiotik (sulfamethoxazolu a erythromycinu, v poměru 1:1) a léčiva Tobrex na bioluminiscenci bakterie *Photobacterium phosphoreum* CCM 3421.

Výsledky jsou následující:

- Byla prokázána akutní toxicita polymyxinu B na testovaný kmen *P. phosphoreum*; stanovená hodnota IC_{50} byla 17,9 mg.l⁻¹ (pro 15 minut) a 36,3 mg.l⁻¹ (pro 30 min).
- Sulfamethoxazol (v testované koncentraci 100 mg.l⁻¹) inhiboval po 15 minutách bioluminiscenci okolo 55 %; tetracyklin (100 mg.l⁻¹) vykazoval inhibici po 15 minutách 20 %, avšak po 30 minutách již 72 %.
- Osm z celkového počtu čtrnácti testovaných antibiotik nevykazovalo k testovanému systému významné inhibiční účinky (inhibice bioluminiscence mezi 0 – 10 %).
- Významný hormetický účinek (nárůst bioluminiscence při nižších koncentracích testované látky) byl pozorován u dvou antibiotik, mupirocinu a kanamycinu. U těchto dvou antibiotik bylo pozorováno zvýšení bioluminiscence až o 70 %. Nižší nárůst bioluminiscence byl pak pozorován u ampicilinu, kde bioluminiscence vzrostla nejvýše o 20 %.
- V případě směsi antibiotik sulfamethoxazolu (inhibiční účinek ~55 %) a erythromycinu (inhibiční účinek 0 %) v poměru 1:1 došlo k antagonickému působení a výsledná inhibice bioluminiscence dosáhla v 15 minutách 17 %.
- U antibiotických očních kapek Tobrex byla získána hodnota IC_{50} 8,4 mg.l⁻¹ v čase 15 minut a 6,1 mg.l⁻¹ v čase 30 minut. V tomto případě by bylo potřeba další testování k bližšímu určení, zda inhibiční vliv má v kapkách obsažené antibiotikum nebo přítomná aditiva.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SAIKIA, Shyamalima a CHETIA, Pankaj. Antibiotics: From Mechanism of Action to Resistance and Beyond. Online. *Indian Journal of Microbiology*. 2024, roč. 64, č. 3, s. 821-845. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01285-8>. [cit. 2025-01-15].
- [2] HUTCHINGS, Matthew I; TRUMAN, Andrew W a WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. Online. *Current Opinion in Microbiology*. 2019, roč. 51, s. 72-80. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>. [cit. 2025-01-15].
- [3] NICOLAOU, Kyriacos C a RIGOL, Stephan. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. Online. *The Journal of Antibiotics*. 2018, roč. 71, č. 2, s. 153-184. ISSN 0021-8820. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>. [cit. 2025-01-15].
- [4] MUTEEB, Ghazala; REHMAN, Md Tabish; SHAHWAN, Moayad a AATIF, Mohammad. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. Online. *Pharmaceuticals*. 2023, roč. 16, č. 11. ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph16111615>. [cit. 2025-01-15].
- [5] PANKEY, G. A. a SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. Online. *Clinical Infectious Diseases*. 2004, roč. 38, č. 6, s. 864-870. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/381972>. [cit. 2025-01-15].
- [6] ADENIYI ADEFEGHA, Stephen. Antibiotics and Drug Pharmacology. Online. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 2019, roč. 3, č. 11, s. 43-49. ISSN 25815423. Dostupné z: <https://doi.org/10.31080/ASPS.2019.03.0424>. [cit. 2025-01-15].
- [7] DÖRR, Tobias; MOYNIHAN, Patrick J. a MAYER, Christoph. Editorial: Bacterial Cell Wall Structure and Dynamics. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2019, roč. 10. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02051>. [cit. 2025-01-16].
- [8] BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
- [9] KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh a ELONGAVAN, Ashok. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Online. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 2017, roč. 33, č. 3. ISSN 0970-9185. Dostupné z: https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15. [cit. 2025-01-16].
- [10] BARON, Samuel (ed.). *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.
- [11] BEVERIDGE, Terry J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. Online. *Journal of Bacteriology*. 1999, roč. 181, č. 16, s. 4725-4733. ISSN 1098-5530. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999>. [cit. 2025-01-16].
- [12] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., 1. v Victorii Publishing. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.

- [13] MAREK, Štefan. *Antibiotika v klinické praxi: Třetí, přepracované a rozšířené vydání*. Galén, 2024. ISBN 978-80-7492-722-5. Dostupné také z: <https://www.bookport.cz/kniha/antibiotika-v-klinicke-praxi-12799/>.
- [14] PAPOUŠKOVÁ, Aneta; MASAŘÍKOVÁ, Martina a ČÍŽEK, Alois. *VYBRANÉ KAPITOLY Z VETERINÁRNÍ BAKTERIOLOGIE II*. Online, skripta. BRNO: VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO, 2020. Dostupné z: https://www.vetuni.cz/files/upload/prorektor%20pro%20strategii%20a%20rozvoj/12_40_05_v%20c3%bdstup_Vybran%20c3%a9%20kapitoly%20z%20veterin%20c3%a1rn%20c3%ad%20bakteriologie%20II%202020.pdf. [cit. 2025-04-17].
- [15] SHARIFZADEH, Shabnam; DEMPWOLFF, Felix; KEARNS, Daniel B. a CARLSON, Erin E. Harnessing β -Lactam Antibiotics for Illumination of the Activity of Penicillin-Binding Proteins in *Bacillus subtilis*. Online. *ACS Chemical Biology*. 2020, roč. 15, č. 5, s. 1242-1251. ISSN 1554-8929. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00977>. [cit. 2025-01-16].
- [16] EYLER, Rachel F. a SHVETS, Kristina. Clinical Pharmacology of Antibiotics. Online. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2019, roč. 14, č. 7, s. 1080-1090. ISSN 1555-9041. Dostupné z: <https://doi.org/10.2215/CJN.08140718>. [cit. 2025-01-16].
- [17] *Seznam esenciálních antiinfektiv pro ČR 2024*. 2024. 2024. Dostupné také z: <https://mzd.gov.cz/vestniky/>.
- [18] POLIANCIUC, Svetlana Iuliana; GURZĂU, Anca Elena; KISS, Bela; ȘTEFAN, Maria Georgia a LOGHIN, Felicia. Antibiotics in the environment: causes and consequences. Online. *Medicine and Pharmacy Reports*. 2015. ISSN 2668-0572. Dostupné z: <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>. [cit. 2025-02-11].
- [19] KNAPP, Katherine M. a ENGLISH, B.Keith. Carbapenems. Online. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2001, roč. 12, č. 3, s. 175-185. ISSN 10451870. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/spid.2001.24093>. [cit. 2025-01-17].
- [20] EL-GAMAL, Mohammed I.; BRAHIM, Imen; HISHAM, Noorhan; ALADDIN, Rand; MOHAMMED, Haneen et al. Recent updates of carbapenem antibiotics. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, roč. 131, s. 185-195. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>. [cit. 2025-01-17].
- [21] FISHER, Jed F. a MOBASHERY, Shahriar. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. Online. *Protein Science*. 2020, roč. 29, č. 3, s. 629-646. ISSN 0961-8368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pro.3737>. [cit. 2025-04-17].
- [22] FARZAM, Khashayar; A. NESSEL, Trevor a QUICK, Judy. Erythromycin. Online. *Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532249/>. [cit. 2025-01-17].
- [23] WANG, Chao-Ming; ZHAO, Feng-Lan; ZHANG, Lei; CHAI, Xiao-Yun a MENG, Qing-Guo. Synthesis and Antibacterial Evaluation of a Series of 11,12-Cyclic Carbonate Azithromycin-3-O-descladinosyl-3-O-carbamoyl Glycosyl Derivatives. Online. *Molecules*. 2017, roč. 22, č. 12. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22122146>. [cit. 2025-04-17].
- [24] BAKHEIT, Ahmed H.H.; AL-HADIYA, Badraddin M.H. a ABD-ELGALIL, Ahmed A. Azithromycin. Online. In: . Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Elsevier, 2014, s. 1-40. ISBN 9780128001738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00001-5>. [cit. 2025-01-17].

- [25] SHI, Kun; CALDWELL, Shane J.; FONG, Desiree H. a BERGHUIS, Albert M. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. Online. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013, roč. 3. ISSN 2235-2988. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00022>. [cit. 2025-04-17].
- [26] BECKER, Bernd a COOPER, Matthew A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. Online. *ACS Chemical Biology*. 2013, roč. 8, č. 1, s. 105-115. ISSN 1554-8929. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cb3005116>. [cit. 2025-01-17].
- [27] RAMIREZ, Maria a TOLMASKY, Marcelo. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. Online. *Molecules*. 2017, roč. 22, č. 12. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>. [cit. 2025-01-17].
- [28] FAROUK, Faten; AZZAZY, Hassan M.E. a NIESSEN, Wilfried M.A. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2015, roč. 890, s. 21-43. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.038>. [cit. 2025-01-17].
- [29] CHOPRA, Ian a ROBERTS, Marilyn. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Online. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, roč. 65, č. 2, s. 232-260. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>. [cit. 2025-01-17].
- [30] LI, Jiayu; QIN, Yuan; ZHAO, Chenhao; ZHANG, Zhi a ZHOU, Zhiruo. Tetracycline antibiotics: Potential anticancer drugs. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2023, roč. 956. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175949>. [cit. 2025-04-17].
- [31] HALAWA, Esraa M.; FADEL, Mohamed; AL-RABIA, Mohammed W.; BEHAIRY, Ali; NOUH, Nehal A. et al. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2024, roč. 14. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1305294>. [cit. 2025-01-16].
- [32] DAVID, Iulia Gabriela; BULEANDRA, Mihaela; POPA, Dana Elena; CHEREGI, Mihaela Carmen a IORGULESCU, Emilia Elena. Past and Present of Electrochemical Sensors and Methods for Amphenicol Antibiotic Analysis. Online. *Micromachines*. 2022, roč. 13, č. 5. ISSN 2072-666X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/mi13050677>. [cit. 2025-01-18].
- [33] MEHLHORN, Asol; RAHIMI, Parvaneh a JOSEPH, Yvonne. Aptamer-Based Biosensors for Antibiotic Detection: A Review. Online. *Biosensors*. 2018, roč. 8, č. 2. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/bios8020054>. [cit. 2025-04-17].
- [34] ASHFORD, Polly-Anna a BEW, Sean P. Recent advances in the synthesis of new glycopeptide antibiotics. Online. *Chem. Soc. Rev.* 2012, roč. 41, č. 3, s. 957-978. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C1CS15125H>. [cit. 2025-04-17].
- [35] VELKOV, Tony; THOMPSON, Philip E.; NATION, Roger L. a LI, Jian. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010, roč. 53, č. 5, s. 1898-1916. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jm900999h>. [cit. 2025-01-16].
- [36] MUTASIM ELIMAM, Mohammed; WAGIEALLA SHANTIER, Shaza; AHMED GADKARIEM, Elrasheed a AWADALLA MOHAMED, Magdi. Derivative Spectrophotometric Methods for the Analysis and Stability Studies of Colistin Sulphate. Online. *Journal of Chemistry*. 2015, roč. 2015, s. 1-5. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2015/624316>. [cit. 2025-04-17].

- [37] OVUNG, Aben a BHATTACHARYYA, Jhimli. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. Online. *Biophysical Reviews*. 2021, roč. 13, č. 2, s. 259-272. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>. [cit. 2025-01-18].
- [38] OBASI, Lawrence; ORUMA, Uchechukwu; AL-SWAIDAN, Ibrahim; RAMASAMI, Ponnadurai; EZEORAH, Chigozie et al. Synthesis, Characterization and Antibacterial Studies of N-(Benzothiazol-2-yl)-4-chlorobenzenesulphonamide and Its Neodymium(III) and Thallium(III) Complexes. Online. *Molecules*. 2017, roč. 22, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22020153>. [cit. 2025-04-17].
- [39] ANDRIOLE, Vincent T. The Quinolones: Past, Present, and Future. Online. *Clinical Infectious Diseases*. 2005, roč. 41, č. Supplement 2, s. S113-S119. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/428051>. [cit. 2025-01-18].
- [40] ROBINSON, April A.; BELDEN, Jason B. a LYDY, Michael J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. Online. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005, roč. 24, č. 2, s. 423-430. ISSN 0730-7268. Dostupné z: <https://doi.org/10.1897/04-210R.1>. [cit. 2025-01-18].
- [41] NAEEM, Abdul; BADSHAH, Syed; MUSKA, Mairman; AHMAD, Nasir a KHAN, Khalid. The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. Online. *Molecules*. 2016, roč. 21, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules21040268>. [cit. 2025-04-18].
- [42] SOUSA, Joana; ALVES, Gilberto; FORTUNA, Ana a FALCÃO, Amílcar. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, roč. 403, č. 1, s. 93-129. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5706-8>. [cit. 2025-04-18].
- [43] PHAM, Thu D. M.; ZIORA, Zyta M. a BLASKOVICH, Mark A. T. Quinolone antibiotics. Online. *MedChemComm*. 2019, roč. 10, č. 10, s. 1719-1739. ISSN 2040-2503. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>. [cit. 2025-04-18].
- [44] LARSSON, D. G. Joakim a FLACH, Carl-Fredrik. Antibiotic resistance in the environment. Online. *Nature Reviews Microbiology*. 2022, roč. 20, č. 5, s. 257-269. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>. [cit. 2025-01-18].
- [45] MACGOWAN, Alasdair a MACNAUGHTON, Emily. Antibiotic resistance. Online. *Medicine*. 2017, roč. 45, č. 10, s. 622-628. ISSN 13573039. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>. [cit. 2025-01-26].
- [46] GRENNI, Paola; ANCONA, Valeria a BARRA CARACCIOLO, Anna. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Online. *Microchemical Journal*. 2018, roč. 136, s. 25-39. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.02.006>. [cit. 2025-01-30].
- [47] POLIANCIUC, Svetlana Iuliana; GURZĂU, Anca Elena; KISS, Bela; ȘTEFAN, Maria Georgia a LOGHIN, Felicia. Antibiotics in the environment: causes and consequences. Online. *Medicine and Pharmacy Reports*. 2015. ISSN 2668-0572. Dostupné z: <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>. [cit. 2025-01-30].
- [48] DANNER, Marie-Claire; ROBERTSON, Anne; BEHRENDTS, Volker a REISS, Julia. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. Online. *Science of The Total Environment*. 2019, roč. 664, s. 793-804. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406>. [cit. 2025-01-30].

- [49] DING, Chang a HE, Jianzhong. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 87, č. 3, s. 925-941. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5>. [cit. 2025-01-30].
- [50] DUAN, Weiyan; CUI, Hongwu; JIA, Xinyu a HUANG, Xiao. Occurrence and ecotoxicity of sulfonamides in the aquatic environment: A review. Online. *Science of The Total Environment*. 2022, roč. 820. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153178>. [cit. 2025-02-11].
- [51] LI, Jiping; LI, Wei; LIU, Kai; GUO, Yanhui; DING, Chun et al. Global review of macrolide antibiotics in the aquatic environment: Sources, occurrence, fate, ecotoxicity, and risk assessment. Online. *Journal of Hazardous Materials*. 2022, roč. 439. ISSN 03043894. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129628>. [cit. 2025-04-17].
- [52] DING, Chang a HE, Jianzhong. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, roč. 87, č. 3, s. 925-941. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2649-5>. [cit. 2025-04-18].
- [53] BRANDT, Kristian K.; AMÉZQUITA, Alejandro; BACKHAUS, Thomas; BOXALL, Alistair; COORS, Anja et al. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms. Online. *Environment International*. 2015, roč. 85, s. 189-205. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.013>. [cit. 2025-01-30].
- [54] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.
- [55] ABBAS, Mazhar; ADIL, Muhammad; EHTISHAM-UL-HAQUE, Syed; MUNIR, Bushra; YAMEEN, Muhammad et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. Online. *Science of The Total Environment*. 2018, roč. 626, s. 1295-1309. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066>. [cit. 2025-02-02].
- [56] MA, Xiaoyan Y.; WANG, Xiaochang C.; NGO, Huu Hao; GUO, Wenshan; WU, Maoni N. et al. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. Online. *Science of The Total Environment*. 2014, roč. 468-469, s. 1-11. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028>. [cit. 2025-02-04].
- [57] ZHANG, Kai; LIU, Meng; SONG, Xinlong a WANG, Dongyu. Application of Luminescent Bacteria Bioassay in the Detection of Pollutants in Soil. Online. *Sustainability*. 2023, roč. 15, č. 9, s. 13. ISSN 2071-1050. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/su15097351>. [cit. 2025-04-28].
- [58] MA, Xiaoyan Y.; WANG, Xiaochang C.; NGO, Huu Hao; GUO, Wenshan; WU, Maoni N. et al. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. Online. *Science of The Total Environment*. 2014, roč. 468-469, s. 1-11. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.028>. [cit. 2025-04-29].
- [59] ZHANG, Kai; LIU, Meng; SONG, Xinlong a WANG, Dongyu. Application of Luminescent Bacteria Bioassay in the Detection of Pollutants in Soil. Online. *Sustainability*. 2023, roč. 15, č. 9. ISSN 2071-1050. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/su15097351>. [cit. 2025-04-29].

- [60] CHRISTENSEN, David G. a VISICK, Karen L. *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and Common Phenotypic Assays. Online. *Current Protocols in Microbiology*. 2020, roč. 57, č. 1. ISSN 1934-8525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cpmc.103>. [cit. 2025-02-05].
- [61] SCHEERER, Stefanie; GOMEZ, Francisco a LLOYD, David. Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. Online. *Journal of Microbiological Methods*. 2006, roč. 67, č. 2, s. 321-329. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.010>. [cit. 2025-02-05].
- [62] DONNELLY, Aidan R.; GIACOBÉ, Elizabeth J.; COOK, Rachel A.; FRANCIS, Gareth M.; BUDDLE, Grace K. et al. Quantification of the capacity of *Vibrio fischeri* to establish symbiosis with *Euprymna scolopes*. Online. *PLOS ONE*. 2023, roč. 18, č. 7. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287519>. [cit. 2025-02-05].
- [63] VERMA, Subhash a MIYASHIRO, Tim. Quorum Sensing in the Squid-*Vibrio* Symbiosis. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, roč. 14, č. 8, s. 16386-16401. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms140816386>. [cit. 2025-02-06].
- [64] AST, Jennifer C. a DUNLAP, Paul V. Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. Online. *Environmental Microbiology*. 2005, roč. 7, č. 10, s. 1641-1654. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00859.x>. [cit. 2025-04-29].
- [65] PARVEZ, Shahid; VENKATARAMAN, Chandra a MUKHERJI, Suparna. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. Online. *Environment International*. 2006, roč. 32, č. 2, s. 265-268. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.022>. [cit. 2025-02-10].
- [66] LI, Yaohua; HE, Xinyu; ZHU, Weinan; LI, Haoran a WANG, Wei. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022, roč. 414, č. 1, s. 75-83. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03695-9>. [cit. 2025-02-10].
- [67] BRODL, Eveline; WINKLER, Andreas a MACHEROUX, Peter. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. Online. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018, roč. 16, s. 551-564. ISSN 20010370. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.003>. [cit. 2025-02-10].
- [68] VIEGAS, Cristina A. Microbial bioassays in environmental toxicity testing. Online. In: . *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2021, s. 115-158. ISBN 9780128245934. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2021.03.002>. [cit. 2025-02-02].
- [69] NIEMIRYCZ, Elżbieta; NICHTHAUSER, Joanna; STANISZEWSKA, Marta; NAŁĘCZ-JAWECKI, Grzegorz a BOLAŁEK, Jerzy. The Microtox® biological test: Application in toxicity evaluation of surface waters and sediments in Poland. Online. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 2007, roč. 36, č. 4, s. 151-163. ISSN 1897-3191. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/v10009-007-0030-5>. [cit. 2025-04-29].
- [70] KAFKA, Zdeněk a PUNČOCHÁŘOVÁ, Jana. BIOTESTY A JEJICH APLIKACE V ANALYTICE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. Online. *Chemické listy*. 1999, roč. 93, s.

- 604-606. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_10_604-606.pdf. [cit. 2025-04-29].
- [71] PARMAR, Trishala K.; RAWTANI, Deepak a AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. Online. *Frontiers in Life Science*. 2016, roč. 9, č. 2, s. 110-118. ISSN 2155-3769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>. [cit. 2025-02-02].
- [72] ZHANG, Kai; LIU, Meng; SONG, Xinlong a WANG, Dongyu. Application of Luminescent Bacteria Bioassay in the Detection of Pollutants in Soil. Online. *Sustainability*. 2023, roč. 15, č. 9. ISSN 2071-1050. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/su15097351>. [cit. 2025-02-04].
- [73] MENZ, J.; SCHNEIDER, M. a KÜMMERER, K. Toxicity testing with luminescent bacteria – Characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects. Online. *Chemosphere*. 2013, roč. 93, č. 6, s. 990-996. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.067>. [cit. 2025-02-04].
- [74] WESTLUND, Paul; NASUHOGLU, Deniz; ISAZADEH, Siavash a YARGEAU, Viviane. Investigation of Acute and Chronic Toxicity Trends of Pesticides Using High-Throughput Bioluminescence Assay Based on the Test Organism *Vibrio fischeri*. Online. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2018, roč. 74, č. 4, s. 557-567. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0483-9>. [cit. 2025-04-28].
- [75] KOČÍ, Vladimír a MOCOŮÁ, Klára. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080699-9.
- [76] HERNANDO, M.D.; DE VETTORI, S.; MARTÍNEZ BUENO, M.J. a FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. Online. *Chemosphere*. 2007, roč. 68, č. 4, s. 724-730. ISSN 00456535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.097>. [cit. 2025-04-08].
- [77] HALEŠOVÁ, Taťána. *Konference VITATOX 2023: Výskyt léčiv v odpadních vodách a potenciální dopad na pitné vod.* Online. In: LabRulez. 2023. Dostupné z: [https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/VITATOX_Vyskyt_leciv_v_odpadnich_vodach_a_potencialni_dopad_na_pitne_vody_Tatana_Halesova_f4137b3d40/VITATOX-Vyskyt-leciv-v-odpadnich-vodach-a-potencialni-dopad-na-pitne-vody-\(Tatana-Halesova\).pdf](https://gcms.cz/labrulez-bucket-strapi-h3hsga3/VITATOX_Vyskyt_leciv_v_odpadnich_vodach_a_potencialni_dopad_na_pitne_vody_Tatana_Halesova_f4137b3d40/VITATOX-Vyskyt-leciv-v-odpadnich-vodach-a-potencialni-dopad-na-pitne-vody-(Tatana-Halesova).pdf). [cit. 2025-04-09].
- [78] FROEHNER, K.; BACKHAUS, T. a GRIMME, L.H. Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. Online. *Chemosphere*. 2000, roč. 40, č. 8, s. 821-828. ISSN 00456535. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00274-X). [cit. 2025-04-08].
- [79] HAVELKOVA, Barbora; BEKLOVA, Miroslava; KOVACOVA, Veronika; HLAVKOVA, Daniela a PIKULA, Jiri. *Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems*. Online. 2016. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Barbora-Havelkova-2/publication/314278553_Ecotoxicity_of_selected_antibiotics_for_organisms_of_aquatic_and_terrestrial_ecosystems/links/5910cf860f7e9bfa06a65933/Ecotoxicity-of-selected-antibiotics-for-organisms-of-aquatic-and-terrestrial-ecosystems.pdf. [cit. 2025-05-13].
- [80] SHIN, J.M.; GWAK, J.W.; KAMARAJAN, P.; FENNO, J.C.; RICKARD, A.H. et al. Biomedical applications of nisin. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2016, roč.

- 120, č. 6, s. 1449-1465. ISSN 1364-5072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13033>. [cit. 2025-04-08].
- [81] SZYMAŃSKA, Urszula; WIERGOWSKI, Marek; SOŁTYSZEWSKI, Ireneusz; KUZEMKO, Jarosław; WIERGOWSKA, Gabriela et al. Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives. Online. *Microchemical Journal*. 2019, roč. 147, s. 729-740. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.003>. [cit. 2025-04-10].
- [82] DIOGO, Bárbara S.; RODRIGUES, Sara; GOLOVKO, Oksana a ANTUNES, Sara C. From bacteria to fish: ecotoxicological insights into sulfamethoxazole and trimethoprim. Online. *Environmental Science and Pollution Research*. 2024, roč. 31, č. 39, s. 52233-52252. ISSN 1614-7499. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34659-y>. [cit. 2025-05-08].
- [83] LI, Lyu; ZHU, Dong; YI, Xingyun; SU, Jianqiang; DUAN, Guilan et al. Combined pollution of arsenic and Polymyxin B enhanced arsenic toxicity and enriched ARG abundance in soil and earthworm gut microbiotas. Online. *Journal of Environmental Sciences*. 2021, roč. 109, s. 171-180. ISSN 10010742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.004>. [cit. 2025-05-09].
- [84] MONTIEL-MORA, José R.; MÉNDEZ-RIVERA, Michael; RAMÍREZ-MORALES, Didier; CAMBRONERO-HEINRICHS, Juan Carlos a RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Carlos E. Toxicity of selected pharmaceuticals and their mixtures to the aquatic indicators *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. Online. *Ecotoxicology*. 2024, roč. 33, č. 9, s. 1047-1061. ISSN 0963-9292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02798-0>. [cit. 2025-04-29].
- [85] WENG, Shu-Fen; CHAO, Yuh-Fen a LIN, Juey-Wen. Identification and characteristic analysis of the *ampC* gene encoding β -lactamase from *Vibrio fischeri*. Online. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, roč. 314, č. 3, s. 838-843. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.171>. [cit. 2025-04-10].
- [86] TUCALIUC, Alexandra; BLAGA, Alexandra Cristina; GALACTION, Anca Irina a CASCAVAL, Dan. Mupirocin: applications and production. Online. *Biotechnology Letters*. 2019, roč. 41, č. 4-5, s. 495-502. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02670-w>. [cit. 2025-04-10].
- [87] TANG, Mei; LI, Fan; YANG, Min a ZHANG, Yu. Degradation of kanamycin from production wastewater with high-concentration organic matrices by hydrothermal treatment. Online. *Journal of Environmental Sciences*. 2020, roč. 97, s. 11-18. ISSN 10010742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.04.032>. [cit. 2025-04-10].
- [88] *Tobrex 3mg/ml oční kapky, roztok: Alcon a Novartis company*. Online. In: Lékárna Bella. 2024. Dostupné z: <https://www.lekarna-bella.cz/zbozi/3512077/tobrex-3mg-ml-oph-gtt-sol-1x5ml#letak>. [cit. 2025-04-28].
- [89] KUO, Jung-hua Steven; JAN, Ming-shiou a CHIU, Hsuan Wen. Cytotoxic Properties of Tyloxapol. Online. *Pharmaceutical Research*. 2006, roč. 23, č. 7, s. 1509-1516. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11095-006-0281-y>. [cit. 2025-05-09].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura beta-laktamových antibiotik [21]	19
Obr. 2 Struktura makrolidů [24]	20
Obr. 3 Chemická struktura různých tříd aminoglykosidových antibiotik: (A) 4,6-disubstituované aminoglykosidy, (B) 4,5-disubstituované aminoglykosidy, (C) spectinomycin, atypický aminoglykosid [27]	21
Obr. 4 Struktura tetracyklinových antibiotik [32]	22
Obr. 5 Struktura chloramfenikolu [35]	23
Obr. 6 Struktura vankomycinu [36]	23
Obr. 7 Struktura kolistinu [38]	24
Obr. 8 Struktura sulfonamidů [40]	24
Obr. 9 Struktura kyseliny nalidixové [44]	25
Obr. 10 Struktura fluorochinolonů [45]	25
Obr. 11 Reakční mechanismus bakteriální bioluminiscence [71]	32
Obr. 12 Znázornění sestaveného experimentu (<i>zdroj: vlastní</i>)	42
Obr. 13 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	46
Obr. 14 Graf inhibice bioluminiscence pro nystatin, cykloheximid a erythromycin, čas 15 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	48
Obr. 15 Graf inhibice bioluminiscence pro streptomycin, spectinomycin a chloramfenikol, čas 15 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	49
Obr. 16 Graf inhibice bioluminiscence pro nisin a vankomycin, čas 15 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	50
Obr. 17 Graf inhibice bioluminiscence pro tetracyklin a sulfamethoxazol, čas 15 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	51
Obr. 18 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	52
Obr. 19 Graf bioluminiscence pro mupirocin, ampicilin a kanamycin, čas 15 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	53
Obr. 20 Graf závislosti koncentrace směsi dvou antibiotik na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	55
Obr. 21 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 15 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	56
Obr. 22 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	71
Obr. 23 Graf inhibice bioluminiscence pro nystatin, cykloheximid a erythromycin, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	71
Obr. 24 Graf inhibice bioluminiscence pro streptomycin, spectinomycin a chloramfenikol, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	72

Obr. 25 Graf inhibice bioluminiscence pro nisin a vankomycin, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	72
Obr. 26 Graf inhibice bioluminiscence pro tetracyklin a sulfamethoxazol, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>).....	73
Obr. 27 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	73
Obr. 28 Graf bioluminiscence pro mupirocin, ampicilin a kanamycin, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	74
Obr. 29 Graf závislosti koncentrace směsi antibiotik na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (<i>zdroj: vlastní</i>)	74
Obr. 30 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 minut (<i>zdroj: vlastní</i>)	75
Obr. 31 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB).....	76
Obr. 32 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB).....	76
Obr. 33 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB).....	77
Obr. 34 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence, čas 30 minut (MATLAB).....	78
Obr. 35 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence, čas 30 minut (MATLAB).....	78
Obr. 36 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB).....	79

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Testovaná antibiotika	37
Tabulka 2 Příprava rekonstitučního pufru	38
Tabulka 3 Příprava 2% roztoku NaCl	38
Tabulka 4 Příprava roztoku „standardního jedu“ Zn^{2+}	38
Tabulka 5 Příprava kultivačního média	39
Tabulka 6 Koncentrační řada pro Zn^{2+}	40
Tabulka 7 Hodnoty reálných koncentrací testované látky v reakční směsi	43

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

30S	Sedimentační koeficient
50S	Sedimentační koeficient
ATP	Adenosintrifosfát
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FMN	Flavinmononukleotid
FMNH ₂	Redukovaný flavinmononukleotid
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NAD(P)H	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
tRNA	Transférová ribonukleová kyselina

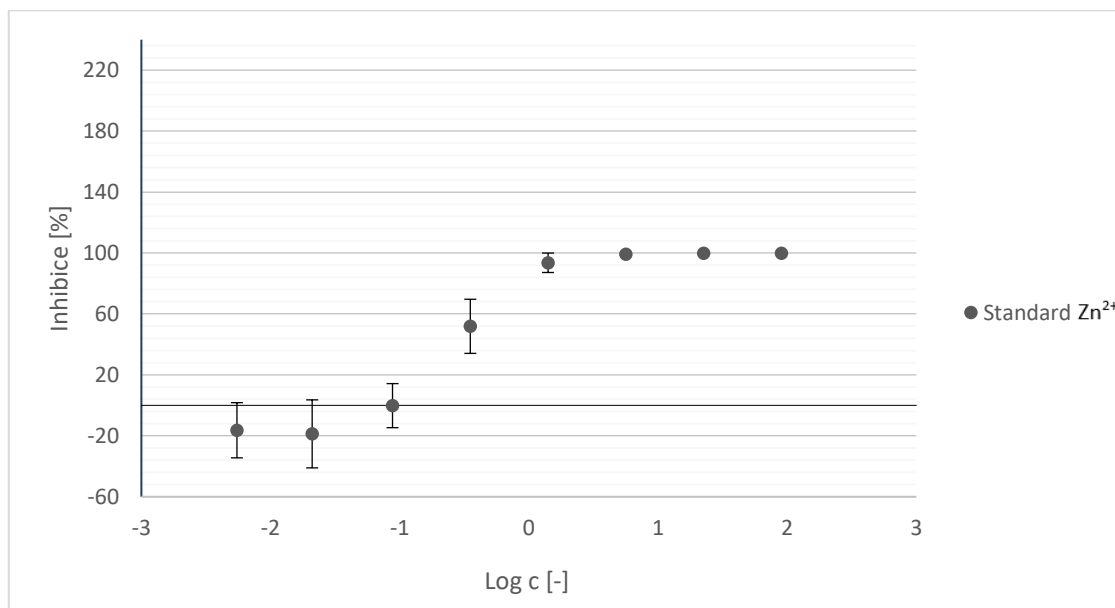
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Grafy v čase 30 minut

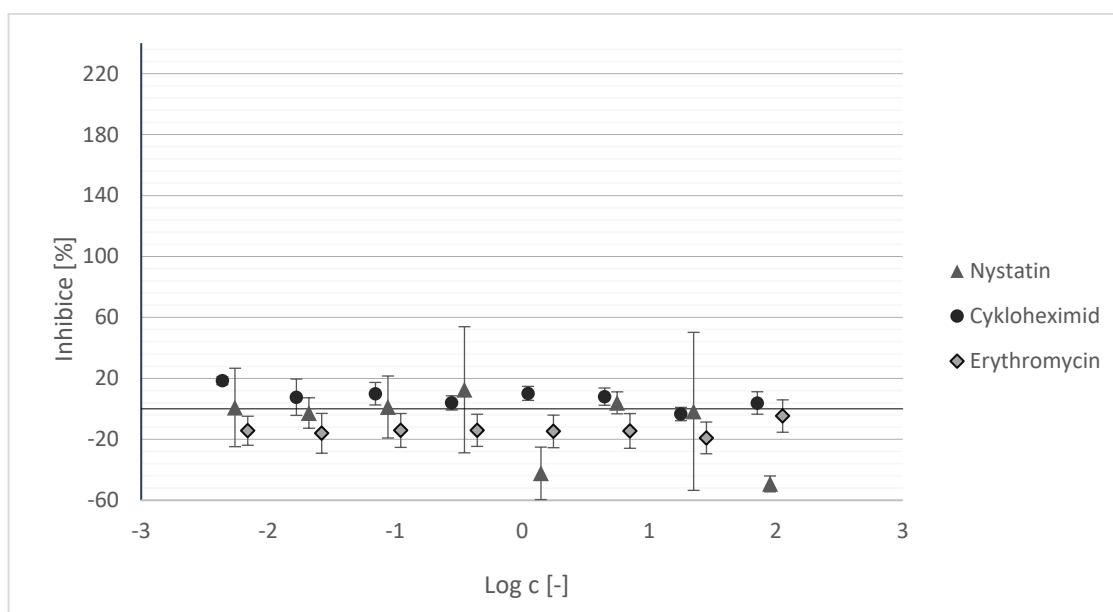
Příloha P II: Vyhodnocené Křivky IC_{50} v čase 15 minut

Příloha P III: Vyhodnocené Křivky IC_{50} v čase 30 minut

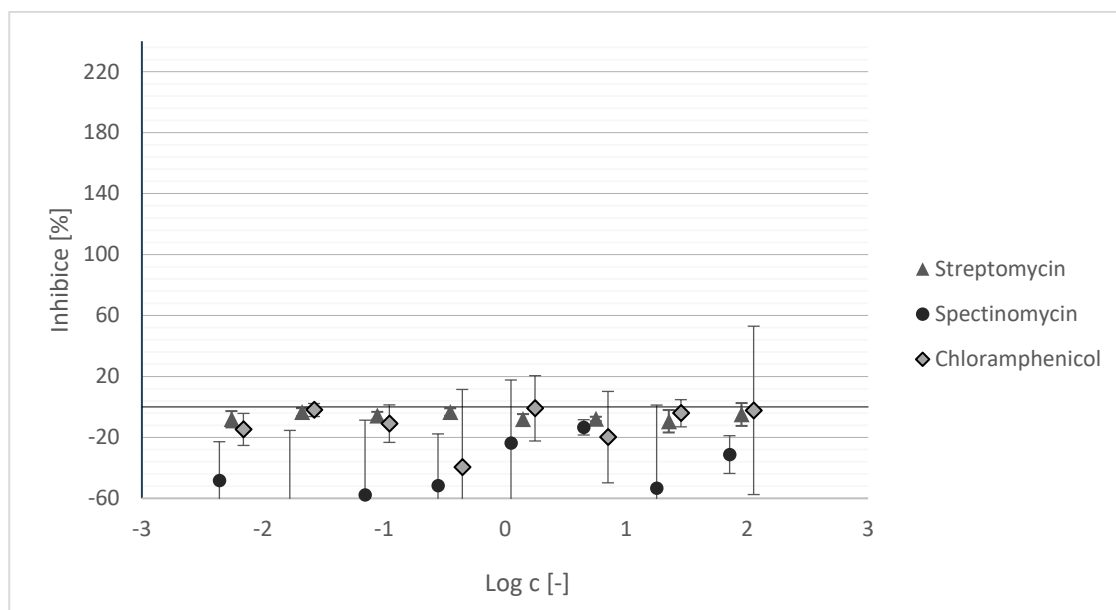
PŘÍLOHA P I: GRAFY V ČASE 30 MINUT



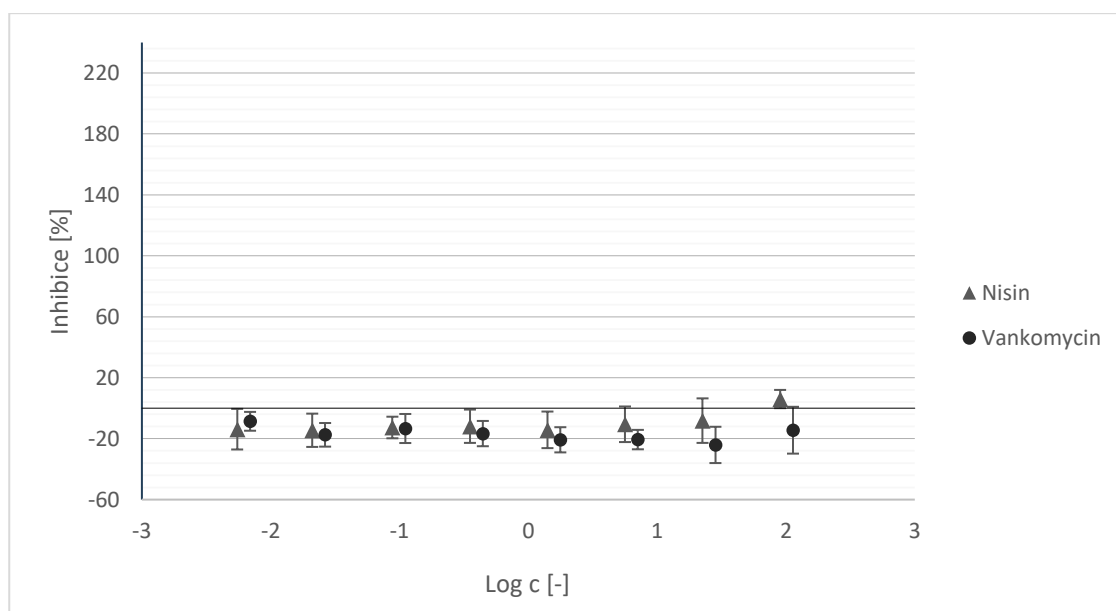
Obr. 22 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (zdroj: vlastní)



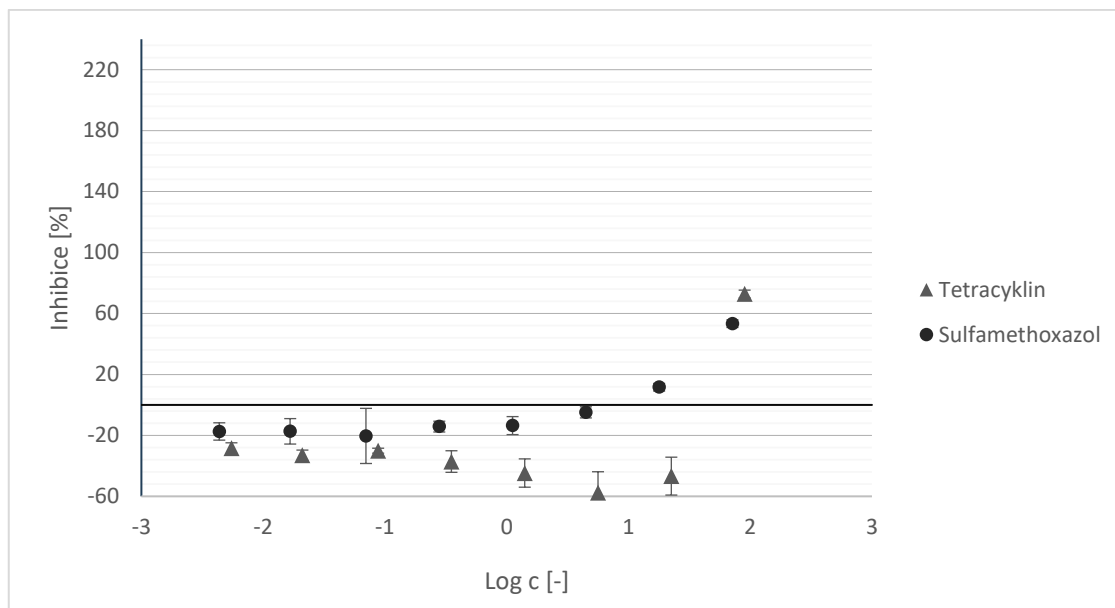
Obr. 23 Graf inhibice bioluminiscence pro nystatin, cykloheximid a erythromycin, čas 30 minut (zdroj: vlastní)



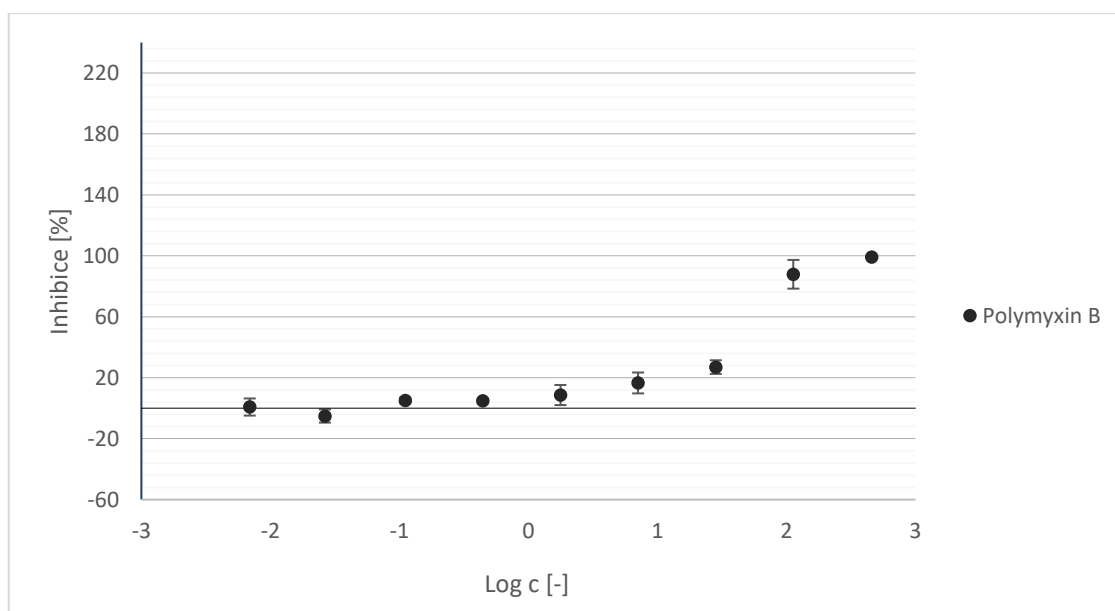
Obr. 24 Graf inhibice bioluminiscence pro streptomycin, spectinomycin a chloramfenikol, čas 30 minut (zdroj: vlastní)



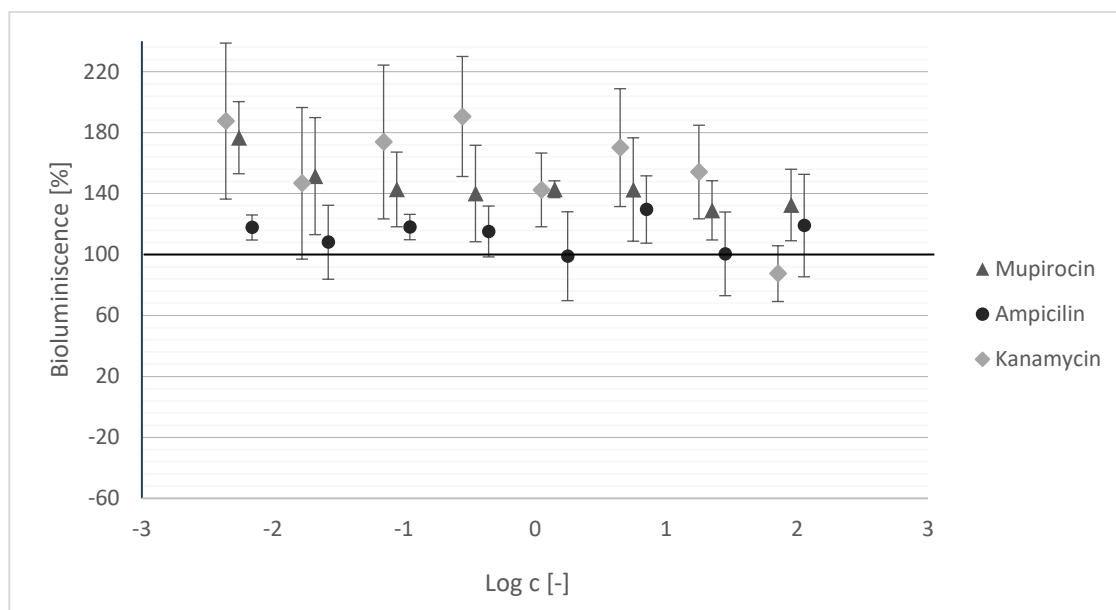
Obr. 25 Graf inhibice bioluminiscence pro nisin a vankomycin, čas 30 minut (zdroj: vlastní)



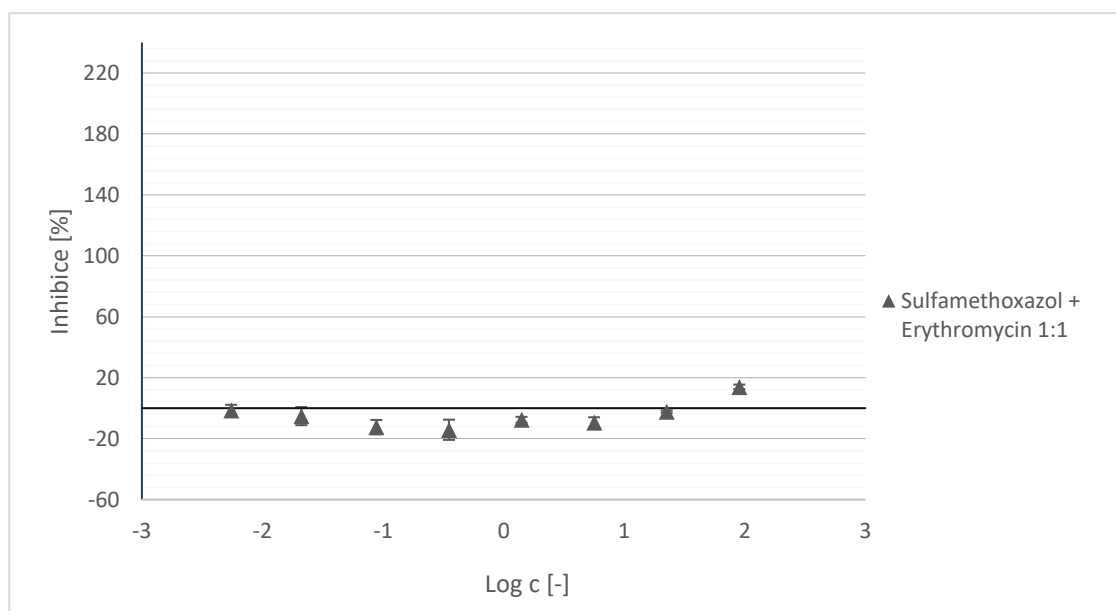
Obr. 26 Graf inhibice bioluminiscence pro tetracyklin a sulfamethoxazol, čas 30 minut
(zdroj: vlastní)



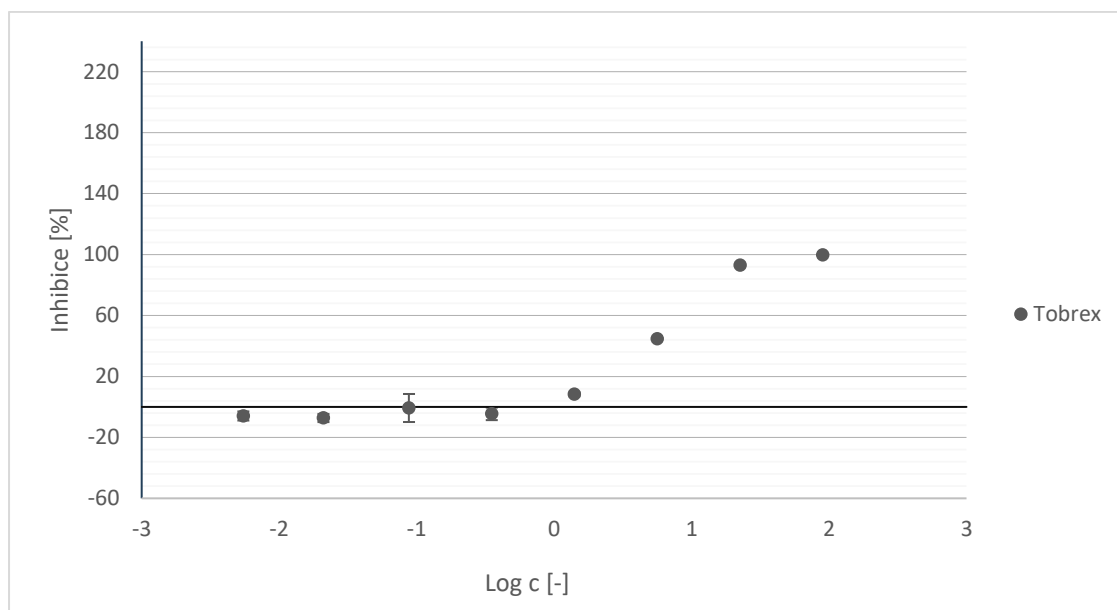
Obr. 27 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (zdroj: vlastní)



Obr. 28 Graf bioluminiscence pro mupirocin, ampicilin a kanamycin, čas 30 minut (*zdroj: vlastní*)

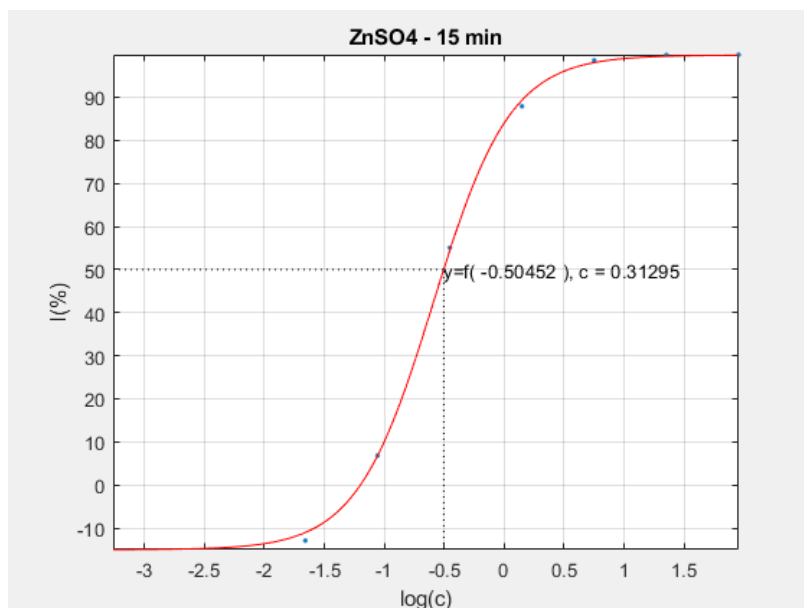


Obr. 29 Graf závislosti koncentrace směsi antibiotik na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 min (*zdroj: vlastní*)

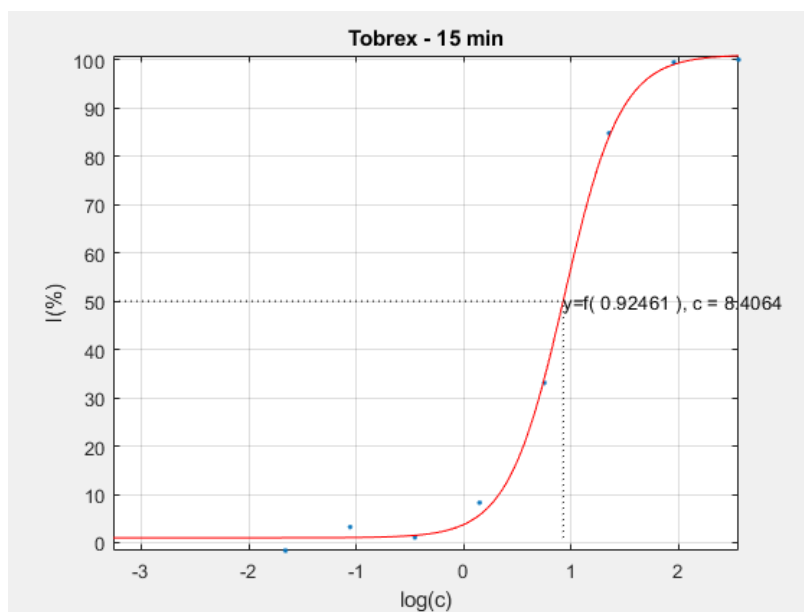


Obr. 30 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence testovaného systému, čas 30 minut (*zdroj: vlastní*)

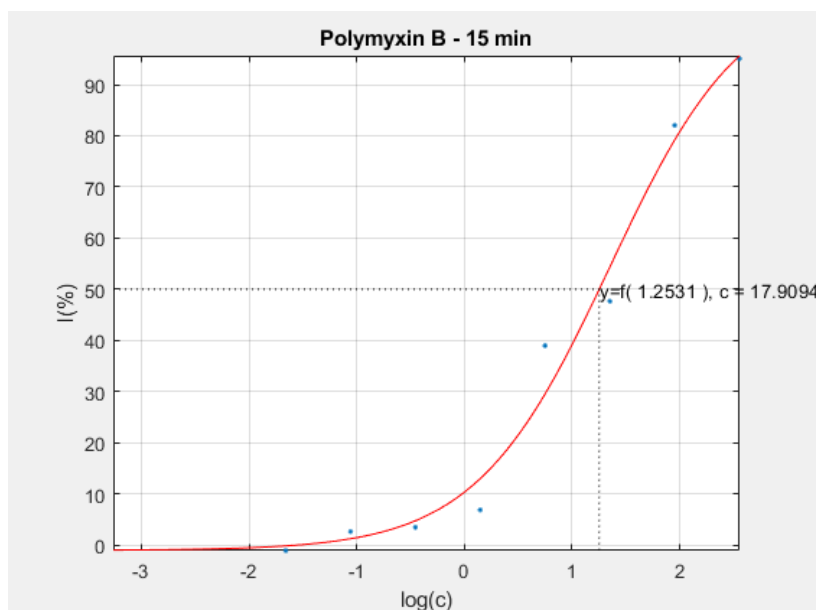
PŘÍLOHA P II: VYHODNOCENÉ KŘIVKY IC_{50} V ČASE 15 MINUT



Obr. 32 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB)

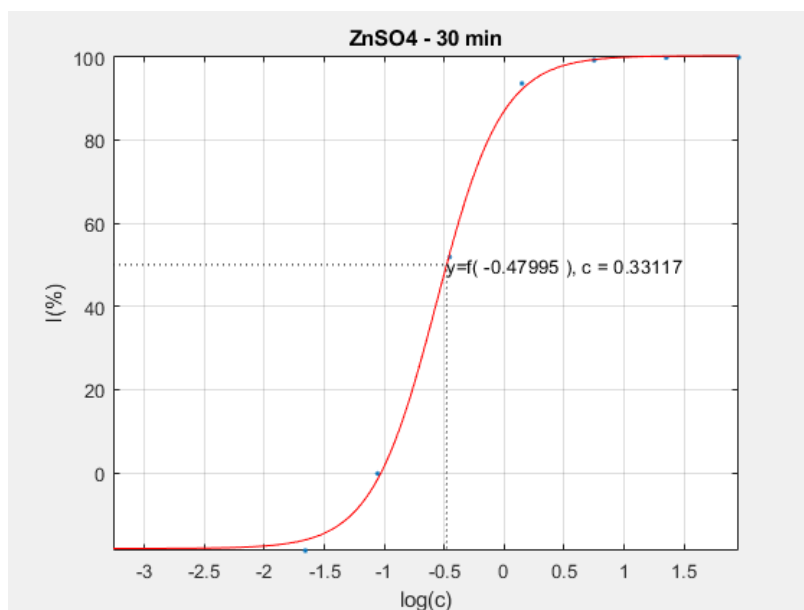


Obr. 31 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB)

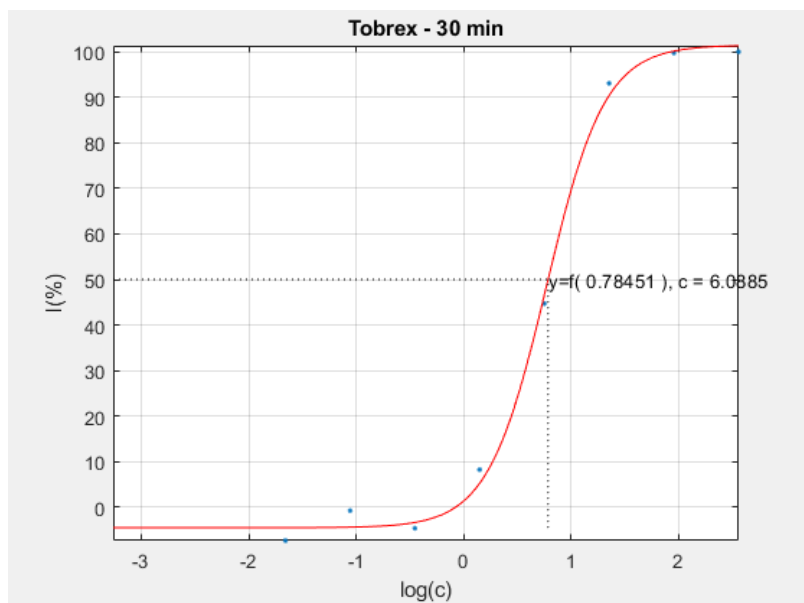


Obr. 33 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB)

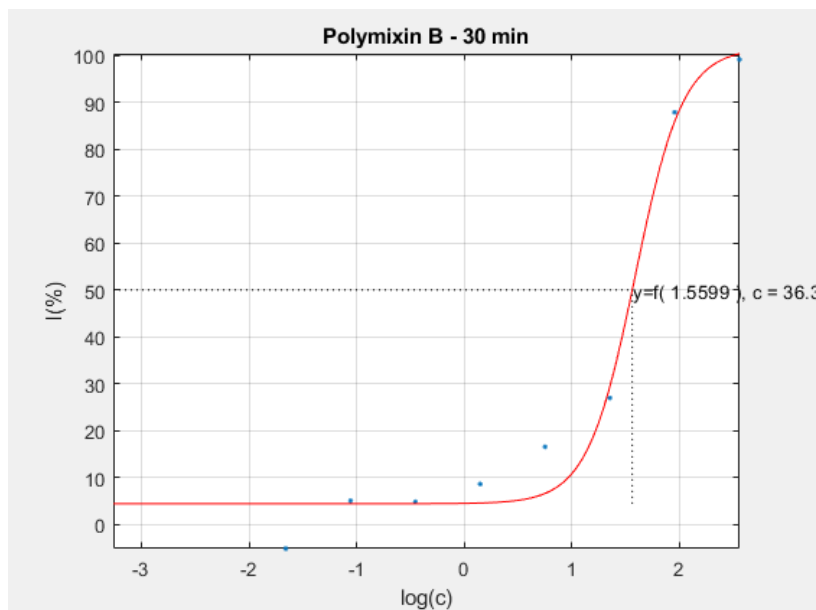
PŘÍLOHA PIII: VYHODNOCENÉ KŘIVKY IC_{50} V ČASE 30 MINUT



Obr. 34 Graf závislosti koncentrace Zn^{2+} na inhibici bioluminiscence, čas 30 minut (MATLAB)



Obr. 35 Graf závislosti koncentrace léčiva Tobrex na inhibici bioluminiscence, čas 30 minut (MATLAB)



Obr. 36 Graf závislosti koncentrace polymyxinu B na inhibici bioluminiscence, čas 15 minut (MATLAB)