

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 652

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C02F 3/34 (2006.01)
C02F 101/38 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-825**
(22) Přihlášeno: **21.12.2017**
(40) Zveřejněno: **30.01.2019**
(Věstník č. 5/2019)
(47) Uděleno: **19.12.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **30.01.2019**
(Věstník č. 5/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

LARCHER S. et al.: „Biodegradation of sulfamethoxazole: current knowledge and perspectives“, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 96, no. 2, 2012, str. 309 - 318, ISSN 0175-7598; YANG Ch-W. et al.: „Bacterial communities associated with sulfonamide antibiotics degradation in sludge-amended soil“, Environmental Science and Pollution Research International, vol. 23, no. 19, 2016, str. 19754 - 19763, ISSN 0944-1344; WANG L. et al.: „Rapid degradation of sulphamethoxazole and the further transformation of 3-amino-5-methylisoxazole in a microbial fuel cell“, Water Research, vol. 88, 2016, str. 322 - 328, ISSN 0043-1354.
CN 105 668 806; CN 105 645 598.

(73) Majitel patentu:

ENVISAN-GEM, a.s., Hůry, CZ
Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Praha 4, Krč,
CZ
MikroChem LKT spol.s r.o., Třeboň, CZ

sulfonamidů, jejichž přítomnost v odpadní vodě způsobuje trvalé následky pro životní prostředí.

(72) Původce:

Ing. Václav Filištein, Netolice, CZ
Ing. Jaroslav Novák, Protivín, CZ
RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D., Praha 4, Podolí,
CZ
Ing. Eva Kyslíková, CSc., Nupaky, CZ
RNDr. Helena Marešová, CSc., Praha 4, Krč, CZ
RNDr. Pavel Kyslík, CSc., Nupaky, CZ
Mgr. Zdeněk Kozlíček, Soběslav, Soběslav II, CZ

(74) Zástupce:

PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.
1847/5, 370 01 České Budějovice, České
Budějovice 3

(54) Název vynálezu:

**Způsob biodegradace farmaceuticky
aktivních látek na bázi sulfonamidů v
odpadní nebo v povrchové vodě, směsný
celobuněčný katalyzátor**

(57) Anotace:

Biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu, v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchové vodě probíhá použitím směsi bakteriálních kmenů, které se do odpadní vody přidávají ve formě metabolicky aktivní směsné kultury bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v poměru kmenů v rozmezí 1:4 až 4:1 v množství 0,01 až 20 hmotnostních % vlhké hmotnosti v živném médiu. Tato kombinace bakteriálních kmenů poskytuje schopnost účinně biodegradovat rozpuštěné perzistentní polutanty na bázi

CZ 307652 B6

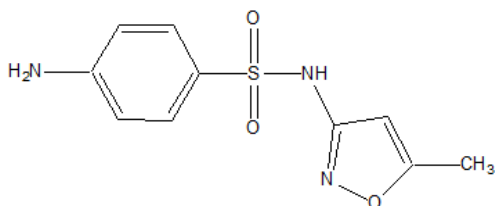
Způsob biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů v odpadní nebo v povrchové vodě, směsný celobuněčný katalyzátor

5 Oblast techniky

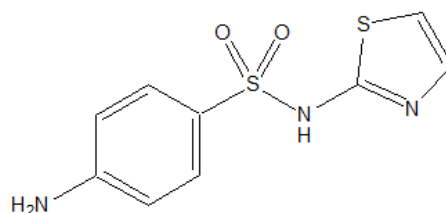
Vynález se týká oblasti čištění odpadních nebo povrchových vod, konkrétně způsobu biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní nebo povrchové vodě z čistíren odpadních vod a směsného celobuněčného katalyzátoru použitého tímto způsobem.

Dosavadní stav techniky

15 Léčiva masivně používaná ve veterinární i klinické praxi představují vážnou hrozbu pro životní prostředí, protože jejich aktivní látky se mohou akumulovat v životním prostředí v podobě perzistentních polutantů. Široké spektrum použití různých antibiotik navíc podporuje rozvoj a šíření rezistence vůči antibiotikům. Po β -laktamových antibiotikách jsou mezi nejčastěji používanou skupinou antibiotických látek sulfonamidy, díky své schopnosti inhibovat jak gram-
20 pozitivní tak gram-negativní bakterie. Sulfonamidy jsou širokospektrální syntetická antibiotika, která jako první byla úspěšně použita pro léčbu infekčních nemocí a nyní se používají k léčbě zápalu plic, střevních infekcí, infekcí sluchového ústrojí nebo močového traktu. Patří k nim např. sulfamethoxazol, sulfathiazol, sulfafurazol, sulfamoxol, sulfametrol, sulfadiazin. Z hlediska struktury jsou sulfonamidy N-substituované deriváty sulfanilamidu. Podstatou mechanismu jejich působení je inhibice růstu bakteriální buňky, díky kompetitivní inhibici syntézy dihydrolistové
25 kyseliny. Vzhledem k jejich povaze polárních látek, ve vodě rozpustných a špatně odbouratelných, snadno přecházejí do povrchových i podzemních vod, kde se kumulují. Účinnými látkami, které se řadí mezi sulfonamidy a vyskytují se v prostředí jako polutanty, nejvíce v odpadních vodách, a kvůli nedostatečnému odbourávání následně i vodních tocích a půdách, jsou sulfamethoxazol neboli SMX (látka 1) a sulfathiazol neboli STZ (látka 2). Požadavek účinné a šetrné likvidace takových polutantů ze životního prostředí je podložen
30 zařazováním těchto látek na seznamy nežádoucích polutantů, které je nutné monitorovat.



látka 1



látka 2

35 Ačkoli jsou v mnohých případech metabolity sulfonamidů farmakologicky méně aktivní a méně toxické než látky původní, některé z nich jsou stále bioaktivní, mobilní v životním prostředí a tedy i potenciálně více toxické. Sulfonamidy přijímají lidé ve formě léků, které jsou následně vyloučeny močí. Touto cestou se sulfonamidy dostávají do domácího odpadu a posléze do
40 čistíren odpadních vod. Protože v čistírnách odpadních vod nedochází ke stoprocentní eliminaci léčiv, antibiotika v podobě vyčištěné odpadní vody nebo čistírenského aktivovaného kalu pronikají do životního prostředí. Vzhledem k tomu jsou čistírny odpadních vod právem vnímány jako největší zdroj uvolňování sulfonamidů a jejich metabolitů do životního prostředí. To může
45 vést k antagonismu, synergismu nebo interaktivnímu efektu na suchozemské a vodní organismy, které tak mohou snižovat nebo zvyšovat vlivy sulfonamidů v ekosystému. Aplikace hnoje, pocházejících z léčených zvířat jako hnojivo na obdělávanou zem, je považována za jednu z dalších příčin kontaminace půdy a následně až podzemní vody antibiotiky, potažmo sulfonamidy.

Použitím hnoje nebo čistírenského kalu obsahujícího rezidua antibiotik jako hnojiva dochází k působení antibiotik na mikroorganismy obsažené v půdě, čímž může dojít ke vzniku bakteriální rezistence.

- 5 Multirezistence bakterií na běžně užívaná antibiotika představuje jeden z největších současných celosvětových problémů. Multirezistence způsobuje, že konvenčně používané antimikrobiální látky ztrácejí svou účinnost a léčba infekčních nemocí se tak stává komplikovanější a nákladnější. Jako hlavní příčinu vzniku rezistentních kmenů udává světová zdravotnická organizace nesprávné užívání a nadužívání antimikrobiálních léčiv neboli antibiotik. Neméně
- 10 důležitým aspektem v rozšíření těchto kmenů patří taky jejich výskyt a vývoj v prostředí odpadních vod. Patogenní bakterie jako např. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* či *Enterococcus faecalis* byly nalezeny v rezistentní formě už ve stokové síti a taky ve všech stupních čistírenských procesů na čistírnách odpadních vod až po odtok, kde následně vnikají do životního prostředí. Obecně lze říci, že výskyt antibiotik v odpadních vodách přispívá dvěma
- 15 způsoby k nárůstu populace multirezistentních bakterií. Nízká koncentrace těchto látek ve vodách způsobí selekci mezi kmeny bakterií. Kmeny, které obsahují gen rezistence, přežijí a nerezistentní zahynou. Růst přeživších kmenů pak už není limitován bojem o zdroje s nerezistentními bakteriemi a v důsledku vyšších zdrojů dochází k růstu populace rezistentních bakterií. Druhým faktorem je, že nízká, neletální, koncentrace antibiotika může spustit uvnitř
- 20 bakterie stresovou reakci, kdy může dojít k náhodným mutacím a k vytvoření rezistence.

Mikrobiální degradace sulfamethoxazolu byla popsána u bakteriálních kmenů v kombinaci s fotolýzou, jako jsou např. *Micrococcus luteus*, *Delftica acidovarasis* a *Oligotropha carboxidovorans*. Degradace maximálně dvaceti procent sulfamethoxazolu byla popsána

25 s čistými bakteriálními kulturami např. *Rhodococcus rhodochrous*. Za přítomnosti primárního zdroje uhlíku a energie glukózy byla zkoumána degradace sulfamethoxazolu u sedmi bakteriálních kmenů: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* a *Rhodococcus zopfii*. Dokumenty popisující obecně biodegradaci sulfonamidů použitím bakteriálních kmenů jsou např.

30 CN 105645598 a CN 102952767. Studie týkající se biodegradace sulfamethoxazolu jako nejběžněji používaného sulfonamidu naznačují, že jednotlivé bakteriální druhy a houby mohou hrát významnou roli při biodegradaci těchto látek v průběhu procesu na čistírnách odpadních vod a v životním prostředí. Nevýhody těchto řešení spočívají zejména v nízkém stupni konverze sulfonamidů použitím uvedených bakteriálních kmenů, čímž není zajištěno dostatečné odstranění

35 antibiotik z odpadní vody, které se v ní vyskytují jako perzistentní polutanty, a nutnost přídavku externího zdroje uhlíku a energie pro bakterie degradující sulfonamidy, zejména glukózy.

Úkolem vynálezu je proto vytvoření způsobu biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu z odpadní vody v čistírnách

40 odpadních vod použitím rostoucí směsné populace bakterií a/nebo směsného celobuněčného katalyzátoru, které by odstraňovaly výše uvedené nedostatky, které by účinně a rychle odbourávaly antibiotika na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a sulfathiazolu z odpadní vody, a které by zároveň byly schopny využívat antibiotika na bázi sulfonamidů jako druhotný zdroj uhlíku a energie.

45

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje způsob biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi

50 sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchových vodách podle tohoto vynálezu, při kterém se do čištěné vody přidá směs bakteriálních kmenů schopných degradace sulfonamidů. Podstata vynálezu spočívá v tom, že jako směs bakteriálních kmenů se přidá metabolicky aktivní směsná kultura bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v poměru kmenů v rozmezí 1:4 až 4:1, a to

55 v koncentraci 0,01 až 20 % hmotn. vlhké hmotnosti.

Tato kombinace metabolicky aktivní směsné kultury bakteriálních kmenů poskytuje schopnost účinně metabolizovat, resp. biotransformovat rozpuštěné perzistentní polutanty na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazol a/nebo sulfathiazol ve vodném prostředí.

5

Ve výhodném provedení se bakteriální kmeny před vytvořením metabolicky aktivní směsné kultury izolují z aktivovaného kalu čistíren odpadních vod nebo z kontaminované půdy. Jedná se tedy o přírodní izolované bakteriální kmeny běžně se vyskytující v přirozeném prostředí.

10

Metabolicky aktivní směsná kultura se s výhodou kultivuje v přítomnosti sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu sloužících jako sekundární zdroj energie při teplotě 20 až 40 °C a pH 6 až 8. Metabolicky aktivní směsná kultura efektivně využívá tyto polutanty odpadní vody nebo povrchové vody jednotlivě nebo ve směsi jako zdroj uhlíku a energie anebo je jednotlivě nebo ve směsi biotransformuje na látky méně škodlivé pro životní prostředí.

15

Předmětem vynálezu je rovněž směsný celobuněčný katalyzátor pro biodegradaci farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchové vodě výše popsáním způsobem. Podstata směsného celobuněčného katalyzátoru podle tohoto vynálezu spočívá v tom, že je tvořen živným médiem s metabolicky aktivní směsnou kulturou bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v poměru kmenů v rozmezí 1:4 až 4:1 v množství 0,01 až 20 % hmotn., kde živné médium slouží k zajištění biologické aktivity bakteriálních kmenů. Množství 0,1 % hmotn. bakteriálních kmenů by mělo představovat přidání, resp. inokulaci aktivovaných kalů malým množstvím směsi obou kmenů v 1000 mL na 1 m³, a 20 % hmotn. by mělo obsáhnout použití směsného celobuněčného katalyzátoru.

20

25

Směs bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v metabolicky aktivní směsné kultuře je s výhodou v poměru 1:1. Tím jsou využity schopnosti účinné biodegradace sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu oběma bakteriálními kmeny a efektivita biodegradace je maximální.

30

Pro přípravu směsného katalyzátoru je živné médium ve výhodném provedení vybráno komplexní LB médium, nutričně bohaté, užívané především pro růst bakterií nebo minerální médium M9 vytvořené pouze z anorganických komponent obohacené o stopové prvky a organický zdroj uhlíku. Organický zdroj uhlíku může být vybrán ze skupiny látek: hydrolyzát kaseinu, glycerol, kvasničný autolyzát či jejich vzájemné kombinace.

35

Výhody způsobu biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchové vodě podle tohoto vynálezu spočívají zejména v tom, že směsný celobuněčný katalyzátor účinně a rychle biodegraduje perzistentní antibiotické polutanty na bázi sulfonamidů z odpadní vody v průběhu čištění odpadních vod nebo z povrchové vody, navíc je schopen tyto polutanty využívat jako sekundární zdroj uhlíku a energie a zároveň je biotransformovat.

45

Příklady uskutečnění vynálezu

Přehled použitých médií a roztoků

50

Komplexní médium Luria-Bertani (LB):

trypton	10 g/l
kvasničný extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
destilovaná voda	1000 ml

55

počáteční pH 7,2 až 7,5

Komplexní médium LBTE:

Komplexní LB médium bylo doplněno roztoky stopových prvků $MgSO_4$, $CaCl_2$ a $FeSO_4$

5	Stopové prvky (TE) v mg/L média:	
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	50
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	67
10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,7
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	48
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	47
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	45
15	Minerální médium M9:	
	Na_2HPO_4	14,6 g/l
	KH_2PO_4	3,0 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	NH_4Cl	1,0 g/l
20	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g/l
	destilovaná voda	1000 ml
	počáteční pH: 6,9 až 7,2	

Minerální médium MTE

25	Minerální médium M9 doplněné stopovými prvky TE
----	---

Médium MTECHGly

	Minerální médium M9 doplněné stopovými prvky TE	
	hydrolyzát kaseinu (CH)	5 g/L
30	glycerol	10 g/L
	pH	6,9 až 7,2

Médium MTEYEGly

	Minerální médium M9 doplněné stopovými prvky TE	
35	Kvasničný autolyzát (YE)	5 g/L
	Glycerol	10 g/L
	pH	6,9 až 7,2

Účinné látky: sulfamethoxazol neboli SMX a sulfathiazol neboli STZ

40	zásobní roztok SMX:	50 mg SMX v 1 ml DMSO, 1 g farmakologicky aktivní látky neboli FAL obsahuje 0,99 g čisté látky
	zásobní roztok STZ:	50 mg v 1 ml DMSO, 1 g FAL obsahuje 0,98 g čisté látky

45	Příklad 1 - Izolace bakteriálních kmenů degradujících SMX pomocí cílené selekce z čistíren odpadních vod
----	--

50	Výchozí směsná mikrobiální populace byla získána z aktivovaného kalu čistíren odpadních vod neboli ČOV. 5 g - vlhká hmotnost vzorku kalu bylo resuspendováno ve 100 ml komplexního LB média a třepáno na rotačním třepacím stroji (200 otáček/min, 28 °C) po dobu 24 h. Narostlá kultura na komplexním LB médiu byla naředěna v poměru 1:3 minerálním médiem M9 obohaceným stopovými prvky neboli TE (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+}), kvasničným autolyzátem - YE (5 g/l) a zásobním roztokem sulfamethoxazolu na finální koncentraci 0,5 g/l. Médium můžeme označit jako MTEYESMX. Směsná mikrobiální populace byla kultivována po
55	dobu 24 h na rotační třepače (200 otáček/min, 28 °C). Získaná suspenze byla naředěna

čerstvým MTEYESMX médiem v poměru 1:3 obsahujícím SMX v koncentraci 0,5 g/L a kultivace probíhala za stejných kultivačních podmínek (24 h, 200 otáček/min, 28 °C). Tato kultura byla opět naředěna čerstvým MTEYESMX médiem v poměru 1:3 obsahujícím SMX v koncentraci 0,5 g/L a kultivována za stejných kultivačních podmínek (24 h, 200 otáček/min, 28 °C). Připravená autochtonní kultura je označena jako kultura A.

Příklad 2 - Izolace bakteriálních kmenů degradujících SMX pomocí cílené selekce z kontaminované půdy

Výchozí směsná mikrobiální populace byla získána z kontaminované půdy z okolí bývalé farmaceutické firmy v severozápadních Čechách. 5 g - vlhká hmotnost vzorku půdy bylo resuspendováno ve 100 ml komplexního LB média a třepáno na rotačním třepacím stroji (200 otáček/min, 28 °C) po dobu 24 h. Narostlá kultura na komplexním LB médiu byla podrobena třem následným obohacovacím kultivacím v přítomnosti SMX dle příkladu 1. Připravená autochtonní kultura je označena jako kultura B.

Příklad 3 - Izolace kmenů rodů *Acinetobacter* a *Kocuria*

Výsledné kultury A a B byly každá naředěna fyziologickým roztokem a vyseta na pevné půdy komplexního LB média obsahující SMX v koncentraci 0,5 g/l. Jednotlivé morfologicky odlišné kolonie narostlé po 72 h při teplotě 28 °C, byly přeneseny na čerstvé Petriho misky s MTEYE půdou obsahující SMX (0,5 g/l). Po 150 koloniích získaných z kultur A a B bylo kultivováno v tekutém MTEYE médiu doplněném SMX (0,5 g/l): 20 ml média ve 100ml kultivační baňce bylo inokulováno vždy jednou kolonií a baňky byly inkubovány na rotačním třepacím stroji (200 otáček/min, 28 °C) po dobu 48 až 120 h. Z celkem 300 testovaných kolonií kultivovaných v tekuté půdě MTEYE obsahující SMX bylo získáno 45 izolátů, které byly za těchto podmínek schopné růstu, tedy vykazující schopnost růstu v přítomnosti SMX. Izoláty byly rozděleny do tří skupin podle rychlosti nárůstu biomasy a u deseti izolátů z každé z kultur byla ověřena degradace SMX pomocí spektrofotometrie, jak je uvedeno v příkladu 4. Šest z deseti získaných dobře rostoucích izolátů z kultury A v přítomnosti 0,5 g/L SMX bylo taxonomicky zařazeno podle fylogenetické analýzy genu kódujícího 16S rRNA jako *Acinetobacter* sp.. U tří z deseti dobře rostoucích izolátů kultury B vedla analýza genu kódujícího 16S rRNA k zařazení mikroorganismu do rodu *Kocuria* sp. Vždy jeden zástupce obou rodů byl vybrán pro přípravu glycerinových zásobních kultur a pro další práci uchováván při - 80 °C pod označením *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp.

Příklad 4 - Degradace SMX rostoucí směsnou bakteriální kulturou kmenů *Acinetobacter/Kocuria*

Kmeny *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. byly kultivovány ve směsi, dále označované jako A/K v tekutém komplexním LB médiu doplněném SMX (0,5 g/L): 20 ml média ve 100ml kultivační baňce bylo inokulováno jednou kolonií bakteriálního kmene *Acinetobacter* a následně jednou kolonií bakteriálního kmene *Kocuria* narostlých na agarových Petriho miskách. Inokulované kultury byly inkubovány na rotačním třepacím stroji (200 otáček/min, 28 °C) po dobu 72 h. Ze vzorků kultur (1 mL) odebraných po 24 h, 48 h a 72 h kultivace byla oddělena biomasa centrifugací a pelet i supernatant byl zpracován následujícím způsobem: ke vzorkům byl přidán 1 mL tert-butylmethyletheru (TBME) a směs byla extrahována po dobu 20 minut za intenzivního třepání na vortexu. Po odstředění (14 000 x g, 10 min) byla organická fáze použita pro spektrofotometrické kvantitativní stanovení zbytkové koncentrace SMX (látka 1) za následujících podmínek:

Detekce při vlnové délce 265 nm v jednorázových UV kyvetách
Teplota 28 °C

Extrakt rozpuštěn v MilliQ H₂O

Koncentraci SMX v jednotlivých vzorcích v závislosti na době kultivace dokumentuje následující tabulka 1.

5

Tab. 1 Stanovení zbytkové koncentrace SMX v supernatantu směsných kultur A/K

Doba kultivace (h)	Zbytková koncentrace SMX (mg/L)		
	pelet	supernatant	celkem
0	0	476	476
24	28	87	115
48	35	56	91
72	30	43	73

10

Příklad 5 - Růst směsné kultury mikroorganismů A/K na minerálním médiu MTE doplněném různými zdroji C a energie

Médium MTE bylo doplněno vždy jedním z následujících zdrojů uhlíku a energie (v g/L): etanol 10; metanol 10; glycerol 20; sacharóza 20. Po inokulaci 200 μ L směsné kultury připravené smísením 100 μ L čisté kultury A ($A_{600} = 5,5$) a 100 μ L čisté kultury K ($A_{600} = 34$) narostlých na LB médiu byly baňky obsahující 10 mL sterilního komplexního LB média třepány ve dvou paralelách (200 otáček/min, 28 °C) v rotačním inkubátoru a v průběhu 144 h byly odebírány vzorky kultury a stanoveny hodnoty A_{600} a pH. Výsledky uvádí tabulka 2.

20

Tab. 2 Nárůst směsné kultury A/K v minerálním médiu doplněném různými zdroji uhlíku a energie

Zdroj C a energie	A_{600}		pH	
	0 h	144 h	0 h	144 h
etanol	0,21	6,0	6,96	6,45
metanol	0,21	0,56	6,96	6,93
glycerol	0,21	0,6	6,96	6,97
sacharóza	0,21	0,2	6,96	6,90

25

Příklad 6 - Růst směsné kultury mikroorganismů A/K na minerálním médiu doplněném komplexním zdrojem uhlíku a glycerolem

Médium M9 se stopovými prvky bylo doplněno glycerolem (10 g/L) a hydrolyzátem caseinu (5 g/L; médium MCHGly) nebo kvasničným lyzátem (5 g/L; MYEGly). Po 2% inokulaci směsnou kulturou připravenou smísením čistých kultur obou kmenů narostlých v komplexním LB médiu za 20 h při teplotě 28 °C (A_{600} inokula K bylo 30,32, pH 8,64; A_{600} inokula A bylo 6,2, pH 8,58) v poměru 300 μ L (A) : 100 μ L (K) byly kultivační baňky obsahující 20 mL média MCHGly nebo MYEGly třepány ve dvou paralelách (200 otáček/min, 28 °C) na rotačním inkubátoru a v průběhu 48 h byly odebírány vzorky kultury pro stanovení hodnot A_{600} , pH, a zbytkového glycerolu. Výsledky jako průměr dvou měření uvádí tabulka 3a a 3b.

35

Tab. 3a Růst směsné kultury A/K na médiu MYEGly

Doba kultivace (h)	24	48
A ₆₀₀	15	21
pH	6,7	6,3
Zbytková koncentrace Glycerolu (g/L)	7,6	0,05

5 Tab. 3b Růst směsné kultury A/K na médiu MCHGly

Doba kultivace (h)	24	48
A ₆₀₀	16	23
pH	6,74	6,20
Zbytková koncentrace Glycerolu (g/L)	10	0,9

Příklad 7 - Koncentrační vliv STZ na růst směsné kultury A/K

10

Směsi obou kmenů byly kultivovány ve dvou paralelách v tekutém komplexním LB médiu doplněném třemi koncentracemi STZ: 0,05, 0,1 a 0,5 g/L. 20 ml média ve 100ml kultivační baňce bylo inokulováno 250 μ L inokulační kultury připravené smísením čistých kultur kmenů narostlých na komplexním LB médiu v poměru A/K = 200 μ L/50 μ L. Baňky byly inkubovány na rotačním třepacím stroji (200 otáček/min, 28 °C) po dobu 48 h. Biomasa byla oddělena centrifugací a supernatant i pelet byly ze vzorků odebraných po 24 h a 48 h kultivace zpracovány následujícím způsobem: k 1 mL vzorkům kultury obsahujících STZ byl přidán 1 mL TBME a směs byla extrahována po dobu 20 minut na vortexu. Po odstředění (14 000 x g, 10 min) byla organická fáze použita pro kvantitativní stanovení STZ (látko 2).

15

Podmínky spektrofotometrického stanovení STZ:

Detekce při vlnové délce 258 a 284 nm v jednorázových UV kyvetách

Teplota 28 °C

Extrakt rozpuštěn v MilliQ H₂O

20

Vliv počáteční koncentrace STZ na růst směsi kmenů je uveden v tab. 4.

25 Tab. 4 Koncentrační efekt STZ na nárůst směsné kultury A/K v komplexním LB médiu inokulovaném směsí kmenů A/K v poměru 200 μ L/50 μ L

30

FAL	Koncentrace (mg/l)	A ₆₀₀		pH	
		24. h	48. h	24. h	48. h
STZ	50	13	14	-	8,83
	100	12,5	12,5	-	8,87
	500	10	10	-	9,02

35 Příklad 8 - Biodegradace SMX směsným celobuněčným katalyzátorem A/K při reakčních teplotách 20, 28 a 37 °C

Biomasa z čistých kultur obou kmenů narostlých na komplexních LB médiích (200 otáček/min, 28 °C) byla oddělena centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a resuspendována do čerstvého

- sterilního komplexního LBTE média tak, aby její výsledná koncentrace byla 10 % hmotn. (vlhká hmotnost) a obsahovala kmen A v množství 7 % hmotn. a K 3 % hmotn. Biodegradace SMX probíhala ve 100ml kultivačních baňkách s 2,8 g vlhké biomasy a 25,5 ml komplexního LB média na rotačním stroji (200 otáček/min; reakční teploty 20, 28 a 37 °C) po dobu 72 h. SMX byl do reakční směsi přidán v čase $t = 0$ a jeho výchozí koncentrace byla 0,5 g/L. Koncentrace SMX byla stanovena spektrofotometricky a HPLC. Procento degradace SMX vypočítané po změření odebraných a v TBME extrahovaných vzorků peletů dokumentuje tabulka 5. Procento degradace vypočítané po změření odebraných a v TBME extrahovaných vzorků supernatantu dokumentuje tabulka 6. Tabulky ukazují rozdíl v degradaci mezi vzorky supernatantu a peletu.
- Podmínky spektrofotometrického stanovení dle příkladu 4.

Podmínky HPLC:

Kolona: RP C18-Lichroprep Waters

Eluční směs: 70 % voda MilliQ: 29 % MeOH + 1 % kyselina octová (pH 2,5)

Průtok: 0,8 ml/min

Nanášený objem: 0,01 ml

Detekce při vlnové délce 265 a 280 nm

Teplota kolony: 30 °C

Čas analýzy: 10 min

Retenční čas: Látka 1. sulfamethoxazol 3,9 min

Tab. 5 Časový průběh sorpce SMX smíšeným celobuněčným katalyzátorem A/K v peletu reakční směsi

Reakční teplota (°C)	sorpce (%)			
	5 h	24 h	48 h	72 h
20	0	2	2	2
28	22	11	16	10
37	11	12	6	6

Tab. 6 Časový průběh degradace SMX v supernatantu smíšeným celobuněčným katalyzátorem A/K v supernatantu reakční směsi

Reakční teplota (°C)	degradace (%)			
	5 h	24 h	48 h	72 h
20	6	66	80	90
28	66	71	78	89
37	72	76	82	86

Příklad 9 - Biodegradace STZ smíšeným celobuněčným katalyzátorem A/K při reakční teplotě 20 °C

- Biomasa z čistých kultur obou kmenů narostlých na komplexních LB médiích (200 otáček/min, 28 °C) byla oddělena centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a resuspendována do čerstvého sterilního komplexního LBTE média tak, aby její výsledná koncentrace byla 10 % hmotn. (vlhká hmotnost) a obsahovala kmen A v množství 5 % hmotn. a K 5 % hmotn. Biodegradace STZ probíhala ve 100ml kultivačních baňkách s 2,8 g vlhké biomasy a 25,5 ml LBTE média na rotačním stroji (200 otáček/min; reakční teplota 20 °C) po dobu 72 h. STZ byl do reakční směsi přidán v čase $t = 0$ a jeho výchozí koncentrace byla 0,5 mg/L. Koncentrace STZ byla stanovena spektrofotometricky a HPLC. Procento degradace STZ stanovené v jednotlivých vzorcích (v supernatantu a peletu) dokumentuje tabulka 7 a 8.

Podmínky spektrofotometrického stanovení dle příkladu 7.

Podmínky HPLC:

Kolona: RP C18-Lichroprep Waters

5 Eluční směs: 70 % voda MilliQ: 29 % MeOH + 1 % kys. octová (pH 2,5)

Průtok: 0,8 ml/min

Nanášený objem: 0,01 ml

Detekce při vlnové délce 260 a 285 nm

Teplota kolony: 30 °C

10 Čas analýzy: 10 min

Retenční čas: Látka 2. sulfathiazol 7,0 min

15 Tab. 7 Časový průběh degradace látky STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v supernatantu reakční směsi

FAL	počáteční koncentrace (g/l)	degradace (%)		
		24 h	48 h	72 h
STZ	0,5	58	69	75

20 Tab. 8 Časový průběh sorpce látky STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v peletu reakční směsi

FAL	počáteční koncentrace (g/l)	sorpce (%)		
		24 h	48 h	72 h
STZ	0,5	7	4	2

25 Příklad 10 - Biodegradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K (poměr 3/7) při reakční teplotě 20 °C

30 Biomasy z čisté kultury kmene A narostlé na komplexním LB médiu a čisté kultury kmene K narostlé na MYEGly (200 otáček/min, 28 °C) byly odděleny centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a resuspendovány do čerstvého sterilního komplexního LBTE média tak, aby výsledná koncentrace byla 10 % hmotn. (vlhká hmotnost) a obsahovala kmen A v množství 3 % hmotn. a K 7 % hmotn. Biodegradace směsi SMX a STZ probíhala ve 100ml kultivačních baňkách s 2,8 g vlhké biomasy a 25,5 ml komplexního LBTE média na rotačním stroji (200 otáček/min; reakční teplota 20 °C) po dobu 72 h. Směs látek (250 mg STZ/L a 250 mg SMX/L) byla do reakční směsi přidána v čase t = 0. Procento degradace a sorpce směsi FAL stanovené v jednotlivých vzorcích
35 supernatantu a peletu dokumentuje tabulka 9 a tabulka 10, respektive.

40 Tab. 9 Časový průběh degradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v supernatantu reakční směsi

počáteční koncentrace směsi (g/l)		degradace (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,25	0,25	61	58	81	74	92	81

Tab. 10 Časový průběh sorpce směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v peletu reakční směsi

počáteční koncentrace směsi (g/l)		sorpce (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,25	0,25	4	7	3	5	3	4

5

Příklad 11- Biodegradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K (poměr 12/3) při reakční teplotě 20 °C

10 Biomasa z čistých kultur obou kmenů narostlých na komplexních LB médiích (200 otáček/min, 28 °C) byla oddělena centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a resuspendována do čerstvého sterilního MTEYEGly média tak, aby její výsledná koncentrace byla 15 % hmotn. (vlhká hmotnost) a obsahovala kmen A v množství 12 % hmotn. a K 3 % hmotn. Biodegradace směsi STZ a SMX probíhala ve 100ml kultivačních baňkách s 4,3 g vlhké biomasy a 24,0 ml MTEYEGly média na rotačním stroji (200 otáček/min; reakční teplota 20 °C) po dobu 72 h.

15 Směs látek (250 mg STZ/L a 500 mg SMX/L) byla do reakční směsi přidán v čase t = 0. Procento degradace a sorpce směsi FAL stanovené v jednotlivých vzorcích supernatantu a peletu dokumentuje tabulka 11 a tabulka 12, respektive.

20 Tab. 11 Časový průběh degradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v supernatantu reakční směsi

počáteční koncentrace (g/l)		degradace (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,5	0,25	72	69	95	90	100	96

25 Tab. 12 Časový průběh sorpce směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v peletu reakční směsi

počáteční koncentrace (g/l)		sorpce (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,5	0,25	10	12	5	10	0	4

30 Příklad 12 - Biodegradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K (poměr 3/12) při reakční teplotě 20 °C

35 Biomasa z čistých kultur obou kmenů narostlých na komplexních LB médiích (200 otáček/min, 28 °C) byla oddělena centrifugací (12 000 x g, 10 min, 4 °C) a resuspendována do čerstvého sterilního LBTE média tak, aby její výsledná koncentrace byla 20 % hmotn. (vlhká hmotnost) a obsahovala kmen A v množství 4 % hmotn. a K 16 % hmotn. Biodegradace směsi STZ a SMX probíhala ve 100ml kultivačních baňkách s 5,6 g vlhké biomasy a 22,4 ml LBTE média na rotačním stroji (200 otáček/min; reakční teplota 20 °C) po dobu 72 h. Směs látek (400 mg STZ/L a 400 mg SMX/L) byla do reakční směsi přidána v čase t = 0. Procento degradace směsi FAL stanovené v jednotlivých vzorcích supernatantu a peletu dokumentuje tabulka 13 a tabulka 14, respektive.

40

Tab. 13 Časový průběh degradace směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v supernatantu reakční směsi

počáteční koncentrace (g/l)		degradace (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,4	0,4	80	78	94	81	100	93

5

Tab. 14 Časový průběh sorpce směsi látek SMX a STZ směsným celobuněčným katalyzátorem A/K v peletu reakční směsi

počáteční koncentrace (g/l)		sorpce (%)					
		24 h		48 h		72 h	
SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ	SMX	STZ
0,4	0,4	11	12	6	10	0	7

10

Průmyslová využitelnost

Způsob biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní nebo povrchové vodě podle tohoto vynálezu lze využít zejména v čistírnách odpadních vod pro odstranění těchto farmakologicky aktivních látek.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20

1. Způsob biodegradace farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchové vodě, při kterém se do odpadní vody nebo do povrchové vody přidá směs bakteriálních kmenů schopných degradace sulfonamidů, **vyznačující se tím**, že jako směs bakteriálních kmenů se přidá metabolicky aktivní směsná kultura bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v poměru kmenů v rozmezí 1:4 až 4:1 v množství 0,01 až 20 % hmotn.

25

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že bakteriální kmeny se před vytvořením metabolicky aktivní směsné kultury izolují z aktivovaného kalu čistíren odpadních vod nebo z kontaminované půdy.

30

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že metabolicky aktivní směsná kultura se kultivuje v přítomnosti sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu sloužících jako sekundární zdroj energie při teplotě 20 až 40 °C a pH 6 až 8.

35

4. Směsný celobuněčný katalyzátor pro biodegradaci farmaceuticky aktivních látek na bázi sulfonamidů, zejména sulfamethoxazolu a/nebo sulfathiazolu v odpadní vodě v čistírnách odpadních vod nebo v povrchové vodě způsobem podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že je tvořen živným médiem s metabolicky aktivní směsnou kulturou bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v poměru kmenů v rozmezí 1:4 až 4:1 v množství 0,01 až 20 % hmotn.

40

5. Směsný celobuněčný katalyzátor podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že směs bakteriálních kmenů *Acinetobacter* sp. a *Kocuria* sp. v metabolicky aktivní směsné kultuře je v poměru 1:1.
- 5 6. Směsný celobuněčný katalyzátor podle nároku 4 nebo 5, **vyznačující se tím**, že živné médium je komplexní LB médium nebo minerální médium M9 obohacené o stopové prvky a organický zdroj uhlíku.