

## MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE ENDOKRINNĚ DISRUPTIVNÍCH LÁTEK

**ZDENA KŘESINOVÁ, KATEŘINA SVOBODOVÁ  
a TOMÁŠ CAJTHAML**

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142  
20 Praha 4  
cajthaml@biomed.cas.cz*

Došlo 16.1.08, přijato 10.4.08.

**Klíčová slova:** biodegradace, endokrinní disruptory, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, nonylfenol, bisfenol A

### Obsah

1. Úvod
2. Zástupci endokrinně aktivních látek a jejich vlastnosti
3. Mechanismus působení endokrinně disruptivních látek a testování jejich aktivity
4. Odbourávání endokrinních disruptorů
  - 4.1. Fyzikální a chemické odstraňování endokrinních disruptorů
  - 4.2. Degradace v čistírnách odpadních vod
  - 4.3. Bakteriální zpracování endokrinních disruptorů
  - 4.4. Plankton a degradace endokrinních disruptorů
  - 4.5. Degradace pomocí hub
  - 4.6. Zpracování fenolických endokrinních disruptorů enzymy degradujícími lignin
5. Závěr

### 1. Úvod

V posledních 40 letech se objevují četné důkazy o výskytu látek v životním prostředí, schopných negativně ovlivňovat hormonální systém živočichů i lidí. Po celém světě jsou nalézána ve vodě stopová množství lidských hormonů, léčiv a látek napodobujících aktivitu hormonů, což je v přímé souvislosti s nedostatečným zpracováním odpadních vod<sup>1–4</sup>. Řada studií přítomnosti farmak a lidských hormonů v životním prostředí byla prováděna během 70.–80. let<sup>5–7</sup>, avšak tehdy detegovaná stopová množství vzbuzovala malou pozornost, až do doby zjištění spojitosti mezi syntetickou antikoncepcí 17 $\alpha$ -ethynylestradiolem a vlivem na ryby<sup>8–11</sup>.

Americká organizace pro ochranu životního prostředí (US Environmental Protection Agency – Úřad pro ochranu životního prostředí) zřídila tzv. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) k vytvoření screeningových metod a strategie testů toxicity pro vymezení endokrinně

disruptivních látek (ED). Tento proces v současnosti není ještě zcela dokončen a dosud neexistuje konsenzus pro specifikaci této skupiny látek. Endokrinní disruptory jsou velkou skupinou látek původu antropogenního (některá farmaka, pesticidy, průmyslové chemikálie, produkty spalování) i přírodního (fytoestrogeny, hormony). Předmětem současných studií není pouze vliv ED na živočichy a znečištění životního prostředí, ale také jejich degradace a detoxikace chemickými, mikrobiologickými a enzymatickými metodami<sup>12–14</sup>.

Tato práce je zaměřena na možné odstranění fenolických endokrinně disruptivních chemikálií z kontaminovaného prostředí s důrazem na basidiomycetní druhy hub produkující enzymy degradující lignin.

### 2. Zástupci endokrinně aktivních látek a jejich vlastnosti

Důležitou vlastností ED je, že mohou ovlivňovat hormonální systém organismu dlouho po uvolnění do životního prostředí. Endokrinně disruptivní účinky byly potvrzeny např. u alkylfenolů, bisfenolu A a esterů kyseliny ftalové<sup>15–17</sup>.

Během posledních let je věnována značná pozornost přírodním (estron a 17 $\beta$ -estradiol) a syntetickým antikoncepčním steroidům (17 $\alpha$ -ethynylestradiol), především díky jejich výskytu v povrchových vodách po průchodu běžným procesem v čistírnách odpadních vod, a to pro jejich potencionální negativní efekt na vývoj a reprodukci ryb, zvířat a lidí<sup>18–21</sup>. Syntetické estrogeny, užívané jako orální antikoncepce, jsou v těle metabolizovány na jejich konjugáty s kyselinou glukuronovou a vyloučeny močí. Tyto konjugáty jsou následně, při zpracování splaškové vody aktivovaným kalem, hydrolyzovány glukoronidasou, produkovanou mikroorganismy (např. *Escherichia coli*), zpět na formy syntetických estrogenů a kyselinu glukuronovou<sup>20,22</sup>. Ternes a spol.<sup>23</sup> prokázali, že estron a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol jsou často detegovány ve výpustích brazilských, německých a kanadských čističek městských odpadních vod.

Další endokrinně aktivní látky – alkylfenoly, jako je např. nonylfenol a oktylfenol, se používají k průmyslové výrobě alkylfenol-polyethoxylátů sloužících jako neiontové detergenty a jako antioxidanty. Ačkoliv samotné detergenty nejsou estrogeny, zpracování jimi kontaminované vody v čistírnách odpadních vod rozkladem aktivovaným kalem vede ke vzniku perzistentních hydrofobních metabolitů s estrogenní aktivitou<sup>24,25</sup> kumulujících se v čistírenském kalu<sup>26,27</sup>. Nejproblematictější z alkylfenolů nonylfenol napodobuje přirozený hormon 17 $\beta$ -estradiol a je spojován s feminizací vodních organismů, poklesem rybí plodnosti a snížením množství přezívajících juvenilních jedinců.

ců<sup>28–30</sup>. Nonylfenol je za aerobních podmínek v čistíčkách odpadních vod (ČOV) jen obtížně degradovatelný<sup>31,32</sup>.

Silně hydrofilní bisfenol A [2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan] je další z řady endokrinních disruptorů<sup>33–35</sup>. Tvoří hlavní surovinu užívanou při chemických syntézách průmyslových polymerů, jako jsou polykarbonáty, epoxydové pryskyřice, fenolové pryskyřice, polyestery a polyakryláty. Bisfenol A se může uvolňovat z konzerv s vnitřním nátěrem epoxydových pryskyřic<sup>36</sup> a z polykarbonátových plastových obalů<sup>37</sup> a kontaminovat tak potraviny. Může se také uvolnit z materiálů používaných ve stomatologii (pryskyřice, plomby)<sup>38</sup>. Vzhledem k těmto expozičním cestám představuje bisfenol A v současné době nejvýznamnější endokrinně disruptivní kontaminaci pro člověka.

Dalšími identifikovanými ED jsou chemikálie užívané ve velkých objemech v průmyslu jako plasticizéry (benzylbutylftalát, dibutylftalát), aditivum kaučuku *p*-fenylnol, desinfekce *o*-fenylnol, antioxidant butylhydroxyanisol atd.

### 3. Mechanismus působení endokrinně disruptivních látek a testování jejich aktivity

Obecně je problematika endokrinního a reprodukčního efektu ED látek vztahována k několika úrovním jejich působení na hormonální systém organismu: napodobování účinků endogenních hormonů, působení proti účinkům endogenních hormonů, narušování transportu, syntézy a metabolismu endogenních hormonů, a narušování syntézy a metabolismu hormonálních receptorů<sup>16</sup>.

Estrogenní receptory regulující transkripci cílových genů po vazbě s estrogenem (17 $\beta$ -estradiol a estron) jsou tvořeny doménou vážící se na DNA, doménou vážící ligand (hormon) a několika trans-aktivačními doménami<sup>39</sup>. Lidské, stejně jako např. myší estrogenní receptory, existují ve dvou subtypech  $\alpha$  a  $\beta$ <sup>40,41</sup>. Srovnání specifických vazeb ligandů a analýza trojrozměrné struktury ukázaly, že oba estrogenní receptory  $\alpha$  i  $\beta$  mají shodnou selektivitu k ligandům<sup>42</sup>. Estrogenní receptor váže 17 $\beta$ -estradiol fenolickou částí, vazebné místo receptoru je však dvakrát větší než hydrofobní část 17 $\beta$ -estradiolu<sup>43</sup> a tato velká hydrofobní prohlubeň umožňuje alkylfenolům a bisfenolu A vazbu na receptor a vyvolání nesprávných hormonálních signálů.

Pro získání nástroje stanovení estrogenní aktivity látek vložili Routledge a Sumter<sup>44</sup> sekvence DNA kódující lidský estrogenní receptor ( $\alpha$ ) do genomu kvasinek, které obsahovaly také přepisovatelný plasmid se sekvencí kontrolovanou estrogenním receptorem a odpovědnou za přepis reportérového genu *Lac-Z* (kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidasu) umístěného také na daném plasmidu. Kvasinky tedy byly schopny syntetizovat  $\beta$ -galaktosidasu jako odpověď na přítomnost estrogenů. Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že alkylfenoly, obsahující 6–9 uhlíků v alkylových skupinách, mají  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  méně estrogenní aktivity ve srovnání s 17 $\beta$ -estradiolem<sup>35,45</sup>. Nishikawa

a spol.<sup>46</sup> vyvinul tzv. dvojhybridní kvasinkový test, využívající na ligandu závislé interakce s estrogenním receptorem, umožňující měřit estrogenní aktivitu nonylfenolu a bisfenolu A. Při monitoringu ED vypouštěných do vodního prostředí je používán jako bioindikátor vitellogenin<sup>47</sup>, bílkovinný prekurzor vaječného žloutku, jehož produkce je v játrech vejcorodých obratlovců regulována estrogény.

## 4. Odbourávání endokrinních disruptorů

### 4.1. Fyzikální a chemické odstraňování endokrinních disruptorů

Nonylfenol a bisfenol A lze rozkládat elektrochemicky využitím platinou pokryté titanové elektrody. Látky o počáteční koncentraci 1,0 mM byly rozloženy za 100 až 200 min (cit.<sup>48</sup>). Bisfenol A byl fotokatalyticky za pomoci TiO<sub>2</sub> pod UV zářením při počáteční koncentraci 175  $\mu$ M ve vodě zcela degradován na oxid uhličitý během 20 h (cit.<sup>49</sup>). Chen a spol.<sup>50</sup> publikovali degradaci bisfenolu A působením UV v kombinaci s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, při níž došlo k odstranění estrogenní aktivity bez vzniku meziproduktů s akutní toxicitou. Možnost degradace bisfenolu A, 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu a estradiolu pomocí UV v kombinaci s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> publikovali i Rosenfeldt a Linden<sup>51</sup>.

Pozornost je také věnována možnosti využití aktivního uhlí při odstranění ED. Chang a spol.<sup>52</sup> popsal odstranění estronu pomocí adsorpce na práškové aktivní uhlí. Odstraňovací kapacita aktivního uhlí je však limitována kontaktním časem, konkurencí s přírodním organickým materiálem, rozpustností kontaminantu a také použitým typem aktivního uhlí<sup>53,54</sup>. Četné studie z poslední doby zkoušejí odstranění mikropolutantů, jako jsou ED, za pomoci různých typů membrán a filtračních systémů<sup>55–57</sup>.

### 4.2. Degradace v čistírnách odpadních vod

Procesy používané běžně ve vodárenské úpravě, jako je koagulace, flokulace a precipitace se ukázaly neúčinnými pro odstranění rozpuštěných organických kontaminantů včetně ED látek<sup>53,58</sup>. Účinnost používaných oxidativních procesů, jako chlorace a ozonizace, závisí na struktuře kontaminantu a dávce oxidantu<sup>59,60</sup>. Naopak biologické procesy používané v ČOV, jako je aktivace, biofiltrace a půdní filtrace (soilaquifer), prokázaly schopnost značné redukce koncentrace ED. Studie uvádí odstranění více než 90 % bisfenolu A v ČOV, při srovnání jeho koncentrace v přítoku a odtoku<sup>61,62</sup>. Rovněž je popsána schopnost aktivovaného kalu odstranit nonylfenol<sup>63,64</sup>. Pokles jeho koncentrace při průchodu ČOV je vztahován, vzhledem k jeho hydrofobicitě, především k mechanismu sorpce na aktivovaný kal<sup>65</sup>. Dochází tedy pouze k přemístění do další environmentální matrice. K další eliminaci nonylfenolu z vodního prostředí může docházet sorpcí na částičky, sedimenty a akumulací v tkáních vodních organismů<sup>66–68</sup>.

Řada autorů popsala mechanismus degradace neiontových detergentů alkylfenol-polyethoxylátů při zpracování

odpadní vody<sup>24,25,63,69</sup>. Iničiální zkrácení ethoxylátového řetězce těchto molekul vede k tvorbě intermediátů jako je mono- a di-ethoxylát, alkylfenol a mono- a di-karboxylované alkylfenoly. Vzhledem k limitované rozpustnosti ve vodě a tím snížené biodostupnosti nastává konečná biodegradace těchto metabolitů mnohem pomaleji.

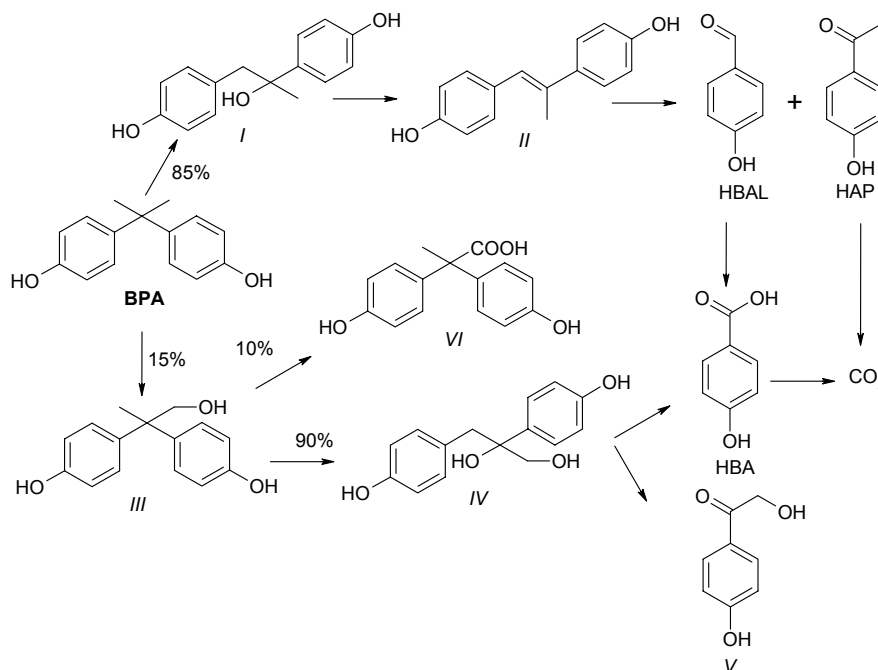
Značný zájem vyvolávají ve vodních tocích zjištěné estrogenní hormony (např. cit.<sup>4</sup>) 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, které byly detegovány všudypřítomně ve výpustích z ČOV a je jim přisuzována odpovědnost za většinu estrogenních efektů<sup>9,70</sup>. Přestože některé publikace tvrdí, že odstranění 17 $\beta$ -estradiolu aktivovaným kalem je především díky sorpci, nebo dalším faktorům nesouvisejícím s mikrobiální degradací<sup>71</sup>, byla publikována oxidace 17 $\beta$ -estradiolu zředěným aktivovaným kalem z ČOV na estron s další eliminací za aerobních podmínek<sup>72</sup>. Fujii a spol.<sup>73</sup> popsali degradaci 17 $\beta$ -estradiolu gramnegativní aerobní bakterií *Novosphingobium* sp. izolovanou z ČOV. O biodegradaci umělého hormonu 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu je zatím známo velmi málo<sup>72,73</sup>.

#### 4.3. Bakteriální zpracování endokrinních disruptorů

Několik bakteriálních druhů, *Sphingomonas xenophaga*, *Sphingomonas cloacae* a *Sphingobium amiense* bylo izolováno a popsáno, jako mikroorganismy odpovědné za degradaci nonylfenolu<sup>74–76</sup>. Tyto bakterie metabolizovaly aromatickou část nonylfenolu na odpovídající C9 alkoholy.

Řada bakterií schopných biodegradace bisfenolu A byla nalezena v půdě, říční vodě nebo aktivovaném kalu ČOV<sup>77–82</sup>. Patří sem *Sphingomonas* sp. AO1, *Pseudomonas paucimobilis* FJ-4, druhy rodu *Pseudomonas* sp. a *Streptomyces* sp. a několik neidentifikovaných gramnegativních bakterií zahrnujících izoláty z aktivovaného kalu a říčních sedimentů. Obecně je popsána metabolická cesta degradace bisfenolu A některými druhy bakterií za aerobních podmínek na 4-hydroxybenzoovou kyselinu a 4-hydroxyacetofenon<sup>78,80,81</sup>. Gramnegativní aerobní bakterie, kmen MV1 (NRRL-B-18737), byly schopny oxidace alifatické methylové skupiny bisfenolu A (BPA) za vzniku 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-2-olu (*I*; viz obr. 1) a 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1-olu (*III*). Oba meziproducty jsou dále degradovány pomocí oxidace, dehydratce a štěpení až na výsledné produkty 4-hydroxybenzoovou kyselinu (HBA), 2-hydroxy-1-(4'-hydroxyfenyl)ethanon (*V*) a 2,2-bis(hydroxyfenyl)propanovou kyselinu (*VI*)<sup>79,80</sup>.

Bakterie izolované z aktivovaného kalu a říčního ekosystému (*Arthrobacter*, *Pseudomonas*, a zástupci *Enterobacteriaceae*) byly schopny metabolizovat bisfenol A cestou podobnou jako výše zmíněný izolát MV1<sup>78</sup>. Zhang a spol.<sup>83</sup> studovali degradaci bisfenolu A bakterií *Achromobacter xylosoxidans* izolovanou z městského odpadu zpracovávaného kompostováním. Degradční produkty byly identifikovány jako *p*-hydroxybenzaldehyd, *p*-hydroxybenzoová kyselina a *p*-hydrochinon. V případě *Sphingomonas* sp. AO1 Sasaki a spol.<sup>77</sup> potvrdil účast cytochro-



Obr. 1. Metabolická dráha degradace bisfenolu A gramnegativní aerobní bakterie: kmen MV1 (NRRL-B-18737); BPA bisfenol A; *I* 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-2-ol; *II* 4,4'-dihydroxy- $\alpha$ -methylstilben; *III* 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1-ol; *IV* 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)propan-1,2-diol; *V* 2-hydroxy-1-(4'-hydroxyfenyl)ethanon; *VI* 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propanová kyselina; HBAL 4-hydroxybenzaldehyd; HAP 4-hydroxyacetofenon; HBA 4-hydroxybenzoová kyselina

mu P450 při tomto degradačním procesu. Ike a spol.<sup>84</sup> se ve své práci zabýval změnou estrogení aktivity degradačních produktů bisfenolu A, z nichž pouze 4-hydroxyacetofenon vykazoval slabou estrogení aktivitu ve srovnání s bisfenolem A.

V anaerobních podmínkách probíhá degradace bisfenolu A velmi obtížně<sup>85</sup>. Ronen a Abeliovich<sup>82</sup> prokázali, že bisfenol A v anaerobních podmínkách kalu nebyl degradován ani po třech měsících inkubace.

#### 4.4. Plankton a degradace endokrinních disruptorů

Schopnost odstraňovat různé polutanty je známa i u některých řas. Hirooka a spol.<sup>86</sup> popsali degradaci bisfenolu A a odstranění jeho estrogení aktivity zelenou řasou *Clorella fusca* var. *vacuolata*. Jako meziprodukt biodegradace byl identifikován monohydroxybisfenol A (cit.<sup>87</sup>). Ishihara a Nakajima<sup>88</sup> publikovali částečné odstranění bisfenolu A pomocí fytoplanktonických mořských jednobuněčných řas. Sethunathan a spol.<sup>89</sup> popsal vliv vysoké inokulační hustoty a biosorbce na degradaci alfa-endosulfanu (cyclodien insekticid) a jeho oxidačního produktu endosulfan sulfátu u řas *Chlorococcum* sp. a *Scenedesmus* sp.

#### 4.5. Degradace pomocí hub

Řada druhů hub je schopna degradace ED, avšak jen některé mají dostatečně vysoký degradační potenciál<sup>90</sup>. Mezi zvláště degradačně aktivní patří zástupci tvz. hub bílé hniloby, produkující nespecifické extracelulární ligninolytické enzymy: mangan peroxidasy (MnP), lignin peroxidasy (LiP) a lakasy (Lac). Díky těmto enzymům degradují lignin stejně dobře jako mnoho perzistentních environmentálních polutantů včetně ED látek jako např. nonylfenol<sup>91–93</sup>. Mnoho studií zabývajících se biodegradací ED pomocí těchto hub je zaměřeno především na aplikaci purifikovaných enzymů<sup>94–97</sup>.

Soares a spol.<sup>91</sup> studoval degradaci nonylfenolu čtyřmi zástupci ligninolytických hub (*Bjerkandera* sp., *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, a *Trametes versicolor*). Z počáteční koncentrace nonylfenolu 100 ppm, za přítomnosti glukosy jako kosubstrátu a statické kultivace, kultury *Bjerkandera* sp. a *T. versicolor* odstranily přibližně 96 % nonylfenolu během 15 dnů, kdežto úbytek nonylfenolu u kultur *P. ostreatus* a *P. chrysosporium* se pohyboval od 37 do 70 % a od 30 do 50 %. Ve studii zaměřené na vliv kultivačních podmínek během degradace bylo zjištěno, že *Bjerkandera* sp. BOL 13 odstraní v podmínkách třepané kultivace nonylfenol o koncentraci 50 ppm z 95 % během 5 dnů, zatímco při statické kultivaci její degradační rychlost dvaapůlkrát poklesne<sup>98</sup>. Naopak *T. versicolor* za třepané kultivace není schopen nonylfenol degradovat<sup>98</sup>.

Lee a spol.<sup>99</sup> publikovali 99% degradaci styrenu během 24 h ligninolytickým houbami *P. chrysosporium*, *T. versicolor* a *Daldinia concentrica*. Hlavními metabolity po degradaci *P. chrysosporium* byly 2-fenylethanol, kyse-

lina benzoová, cyclohexadien-1,4-dion, butanol a kyselina jantarová. Tyto metabolity již nevykazovaly estrogení efekt. Houba *Stereum hirsutum* byla použita při degradaci látky methoxychlor [2,2,2-trichloro-1,1-bis(4-methoxyfenyl)ethan]<sup>100</sup>. Při otestování bylo zjištěno výrazné snížení estrogení aktivity degradačních produktů identifikovaných jako mono- a dichloro deriváty 4-methoxyfenylethanu a 4-methoxyfenylethylenu. Majoritním produktem biodegradace bisfenolu A za pomoci basidiomycetů *S. hirsutum* a *Heterobasidium insulare*<sup>100</sup> byla 2-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina. Obě houby degradovaly bisfenol A o počáteční koncentraci 100 ppm z 99 % v průběhu 7–14 dnů.

Další houby s kapacitou degradovat ED patří mezi zygomycety. Chai a spol.<sup>101</sup> izoloval 4 druhy, *Fusarium moniliforme* 2-2, *Fusarium sporotrichioides* NFRI-1012, *Aspergillus terreus* MT-13 a *Emmericella nidulans* MT-98, schopné vysoce efektivní degradace bisfenolu A. Dalšími studovanými houbovými mikroorganismy jsou mikroizoláty z povrchových vod, jako např. *Clavariopsis aquatica* patřící mezi askomycety rodu *Massarina* a neidentifikovaný mitosporický houbový izolát označený jako UHH 1-6-18-4 (cit.<sup>102</sup>). Tyto organismy byly schopny degradovat technickou směs nonylfenolů stejně dobře jako 4-nonylfenol (4nNP).

Degradace nonylfenolu byla publikována i u kvasinkového izolátu druhu *Candida aquatextoris* původně izolovaného z kalu odpadní vody továrny textilního průmyslu. U tohoto mikroorganismu byl publikován dosud ojediněle růst na 4nNP o počáteční koncentraci 100 ppm za podmínek absence dalšího zdroje uhlíku<sup>103</sup>. 4nNP byl kompletně degradován během 14 dnů, což bylo doprovázeno vznikem 4-acetylfenolu a růstem mikroorganismu<sup>104</sup>.

#### 4.6. Zpracování fenolických endokrinních disruptorů enzymy degradujícími lignin

Mezi nejlépe známé a nejčastěji produkované oxidační enzymy ligninolytických hub spojované s degradací polutantů patří dva typy peroxidas: lignin peroxidasa (diarylpropan:hydrogen-peroxid oxidoreduktasa, EC 1.11.1.14) a mangan dependentní peroxidasa (MnP, Mn (II):hydrogen-peroxid oxidoreduktasa, EC 1.11.1.13). Tyto glykosylované hemové enzymy katalyzují jednoelektronovou oxidaci nefenolických aromatických látek za využití peroxidu vodíku jako oxidantu<sup>105</sup>. Dalším typem oxidačních enzymů hub je lakasa (benzenediol:oxygen oxidoreduktasa, EC 1.10.3.2), která náleží do rodiny polyfenol oxidas<sup>106</sup>. Výhodou lakasy oproti peroxidasám v její aplikaci při biodegradacích je schopnost oxidovat bez potřeby peroxidu vodíku či vysoké koncentrace iontů manganu<sup>106</sup>. Produkce těchto enzymů i jejich katalytické vlastnosti byly již předmětem mnoha přehledných článků<sup>107–110</sup> a jejich použití k detoxikaci endokrinně disruptivních chemikálií je zájmem mnoha studií posledních let<sup>92,111–113</sup>.

Hirano a spol.<sup>111</sup> prokázali, že bisfenol A je degradován kulturou houby *P. ostreatus* a její mangan peroxidasou na fenol, 4-isopropenylfenol, 4-isopropylfenol a hexestrol.

Degradace bisfenolu A mangan peroxidase je iniciována odnětím jednoho elektronu ze substrátu a výsledný radikál projde dále náhodným štěpením na aromatickém kruhu a C-C vazbách do formy směsi fenolických výše popsaných látek. Mangan peroxidasa kultury *P. chrysosporium* je schopná degradovat nonylfenol a bisfenol A (cit.<sup>97</sup>). Estrogenní aktivita příslušných vzorků, vyhodnocená dvou-hybridním kvasinkovým testem, byla použitou mangan peroxidase odstraněna, ačkoli této aktivity stále zbylo 40 % v čase, kdy bisfenol A zcela zmizel. Studována byla také oxidace nonylfenolu a bisfenolu A lakasou kultury *T. versicolor* s použitím redox mediátoru, 1-hydroxybenzotriazolu (HBT). 80 % estrogenní aktivity 17 $\beta$ -estradiolu a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu bylo odstraněno během hodinového zpracování pomocí jak houbové MnP, tak lakasy<sup>113</sup>.

Degradace bisfenolu A lakasou kultury *T. villosa* probíhá oxidativní reakcí na dva produkty<sup>92</sup>, u nichž hlavním je vysokomolekulární dimer bisfenolu A (5,5'-bis-[1-(4-hydroxyfenyl)-1-methyl-ethyl]-bifenyl-2,2'-diol). Během oxidace bisfenolu A pomocí lakasy mohou být také formovány oligomery obsahující až 3–6 jednotek bisfenolu a 0–3 jednotky fenolu. Polymerizace bisfenolu A pokračuje buď připojením fenylových zbytků nebo transformací oligomeru za uvolnění 4-isopropenylfenolu<sup>92,114</sup>.

Pro zvýšení účinnosti bioremediačních procesů využívající purifikovaných enzymů byl vyvinut rotační reaktor na kontaminovanou půdu<sup>94</sup>. Lakasa kultury *Trametes* sp. byla takto použita pro degradaci nonylfenolu, oktylfenolu, bisfenolu A, a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu o počáteční koncentraci 60  $\mu$ M (cit.<sup>64</sup>). Dalším možným řešením zvýšení účinnosti těchto procesů by mohla být fixace enzymů na nosič. Okazaki a spol.<sup>115</sup> a Michizoe a spol.<sup>116</sup> publikovali oxidace bisfenolu A lakasou zachycenou v reverzních micelách z bis(2-ethylhexyl)sulfosukcinát sodné soli.

## 5. Závěr

Endokrinní disruptory, látky s různou strukturou a schopností ovlivňovat hormonální systém, se díky nedostatečným čistícím mechanismům běžně vyskytují v životním prostředí. K částečným mikrobiálním degradačním endokrinních disruptorů může docházet jak v aktivovaném kalu ČOV, tak působením některých bakterií, řas a hub. Z hlediska širokého spektra působení se jako perspektivní nástroj při dekontaminacích znečištěných oblastí ukazují houby bílé hniloby, produkující velké množství extracelulárních enzymů schopných účastnit se biodegradačních procesů endokrinně aktivních látek. V tomto článku jsou popsány metody využívající purifikovaných enzymů a metody, které vzhledem ke schopnosti těchto hub tolerovat i větší množství toxických látek, využívají celé houbové kultury.

Práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury Akademie věd ČR KJB600200613, projektu Ministerstva

školy, mládeže a tělovýchovy ČR: Centrum environmentální mikrobiologie LC06066, Biorem 2B06156 a výzkumného záměru č. AV0Z50200510.

## LITERATURA

- Halling-Sorensen B., Nielsen S. N., Lanzky P. F., Ingerslev F., Lutzhoft H. C. H., Jorgensen S. E.: *Chemosphere* 36, 357 (1998).
- Routledge E. J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G. C., Waldock M., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559 (1998).
- Snyder S. A., Westerhoff P., Yoon Y., Sedlak D. L.: *Environ. Eng. Sci.* 20, 449 (2003).
- Kujalová H., Sýkora V., Pitter P.: *Chem. Listy* 101, 706 (2007).
- Hignite C., Azarnoff D. L.: *Life Sci.* 20, 337 (1977).
- Aherne G. W., English J., Marks V.: *Ecotox. Environ. Safe.* 9, 79 (1985).
- Aherne G. W., Briggs R.: *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 735 (1989).
- Mitsumori K., Furukawa F., Sato M., Yoshimura H., Imazawa T., Nishikawa A., Takahashi M.: *J. Cancer Res. Clin.* 120, 131 (1994).
- Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549 (1998).
- Jobling S., Nolan M., Tyler C. R., Brighty G., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498 (1998).
- Snyder M. J., Mulder E. P.: *Aquat. Toxicol.* 55, 177 (2001).
- Soares A., Jonasson K., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 719 (2005).
- Tanaka T., Taniguchi M., v knize: *Wastewater Treatment Using Enzymes* (Sakurai A., ed.), kap. 6. Research Signpost, 2003.
- Kang J. H., Katayama Y., Kondo F.: *Toxicology* 217, 81 (2006).
- Colborn T., Myers J. P., Dumanoski D.: *Nat. Hist.* 105, 42 (1996).
- Sonnenschein C., Soto A. M.: *J. Steroid Biochem.* 65, 143 (1998).
- Guenther K., Kleist E., Thiele B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 542 (2006).
- Van den Belt K., Verheyen R., Witters H.: *Sci. Total Environ.* 309, 127 (2003).
- Quinn B., Gagne F., Costello M., McKenzie C., Wilson J., Mothersill C.: *Aquat. Toxicol.* 66, 279 (2004).
- Larsson D. G. J., Dolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A. H., Olsson P. E., Forlin L.: *Aquat. Toxicol.* 45, 91 (1999).
- Pelley J.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 313A (2003).
- Tyler C. R., Jobling S., Sumpter J. P.: *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319 (1998).
- Ternes T. A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R. D., Servos M.: *Sci. Total Environ.* 225, 81 (1999).

24. Ejlerstsson J., Nilsson M. L., Kylin H., Bergman A., Karlson L., Oquist M., Svensson B. H.: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 301 (1999).
25. Maki H., Masuda N., Fujiwara Y., Ike M., Fujita M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2265 (1994).
26. Giger W., Brunner P. H., Schaffner C.: *Science* **225**, 623 (1984).
27. Ahel M., Molnar E., Ibric S., Giger W.: *Water Sci. Technol.* **42**, 15 (2000).
28. Ahel M., Giger W., Schaffner C.: *Water Res.* **28**, 1143 (1994).
29. White R., Jobling S., Hoare S. A., Sumpter J. P., Parker M. G.: *Endocrinology* **135**, 175 (1994).
30. Lavado R., Thibaut R., Raldua D., Martin R., Porte C.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **196**, 247 (2004).
31. Staples C. A., Naylor C. G., Williams J. B., Gledhill W. E.: *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2450 (2001).
32. Ying G. G., Williams B., Kookana R.: *Environ. Int.* **28**, 215 (2002).
33. Laws S. C., Carey S. A., Ferrell J. M., Bodman G. J., Cooper R. L.: *Toxicol. Sci.* **54**, 154 (2000).
34. Perez P., Pulgar R., Olea-Serrano M. F., Rivas A., Pazos P., Pedraza V., Olea N.: *J. Dent. Res.* **77**, 1209 (1998).
35. Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A., Higashitani T., Komori K.: *Water Sci. Technol.* **43**, 125 (2001).
36. Brotons J. A., Oleaserrano M. F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N.: *Environ. Health Perspect.* **103**, 608 (1995).
37. Biles J. E., Mcneal T. P., Begley T. H., Hollifield H. C.: *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3541 (1997).
38. Olea N., Pulgar R., Perez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A., Pedraza V., Soto A. M., Sonnenschein C.: *Environ. Health Perspect.* **104**, 298 (1996).
39. Beato M., Truss M., Chavez S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **784**, 93 (1996).
40. Kuiper G. G. J. M., Enmark E., Peltola-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5925 (1996).
41. Tremblay G. B., Tremblay A., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Labrie F., Giguere V.: *Mol. Endocrinol.* **11**, 353 (1997).
42. Kuiper G. G. J. M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J. A.: *Endocrinology* **138**, 863 (1997).
43. Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., Carlquist M.: *Nature* **389**, 753 (1997).
44. Routledge E. J., Sumpter J. P.: *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 241 (1996).
45. Routledge E. J., Sumpter J. P.: *J. Biol. Chem.* **272**, 3280 (1997).
46. Nishikawa J., Saito K., Goto J., Daikayama F., Matsuo M., Nishihara T.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 76 (1999).
47. U.S. Environmental Protection Agency: Comparative evaluation of vitellogenin methods for medaka and zebra fish, EPA 68-W-01-023 (U.S. EPA 2003).
48. Tanaka S., Nakata Y., Kuramitz H., Kawasaki M.: *Chem. Lett.* **943** (1999).
49. Ohko Y., Ando I., Niwa C., Tatsuma T., Yamamura T., Nakashima T., Kubota Y., Fujishima A.: *Environ. Sci. Technol.* **35**, 2365 (2001).
50. Chen P. J., Linden K. G., Hinton D. E., Kashiwada S., Rosenfeldt E. J., Kullman S. W.: *Chemosphere* **65**, 1094 (2006).
51. Rosenfeldt E. J., Linden K. G.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 5476 (2004).
52. Chang S., Waite T. D., Ong P. E. A., Schafer A. I., Fane A. G.: *J. Environ. Eng. - Asce* **130**, 736 (2004).
53. Ternes T. A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H. J., Gulde B. H., Preuss G., Wilme U., Seibert N. Z.: *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3855 (2002).
54. Yoon Y. M., Westerhoff P., Snyder S. A., Esparza M.: *Water Res.* **37**, 3530 (2003).
55. Nghiem L. D., Manis A., Soldenhoff K., Schafer A. I.: *J. Membr. Sci.* **242**, 37 (2004).
56. Schafer A. I., Nghiem L. D., Waite T. D.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 182 (2003).
57. Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S. A., Wert E. C.: *J. Membr. Sci.* **270**, 88 (2006).
58. Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S., Wert E.: *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6649 (2005).
59. Zwiener C., Frimmel F. H.: *Water Res.* **34**, 1881 (2000).
60. Pinkston K. E., Sedlak D. L.: *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4019 (2004).
61. Furhacker M., Scharf S., Weber H.: *Chemosphere* **41**, 751 (2000).
62. Staples C. A., Dorn P. B., Klecka G. M., O'Block S. T., Harris L. R.: *Chemosphere* **36**, 2149 (1998).
63. Tanghe T., Devriese G., Verstraete W.: *Water Res.* **32**, 2889 (1998).
64. Banat F. A., Prechtel S. B., Bischof F.: *Chemosphere* **41**, 297 (2000).
65. Ahel M., Giger W., Koch M.: *Water Res.* **28**, 1131 (1994).
66. Alcock R. E., Sweetman A., Jones K. C.: *Chemosphere* **38**, 2247 (1999).
67. Joss A.: *Water Res.* **39**, 4585 (2005).
68. Uguz C., Togan I., Eroglu Y., Tabak I., Zengin M., Iscan M.: *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **14**, 87 (2003).
69. Manzano M. A., Perales J. A., Sales D., Quiroga J. M.: *Water Res.* **33**, 2593 (1999).
70. Harries J. E., Sheahan D. A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E. J., Rycroft R., Sumpter J. P., Tylor T.: *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1993 (1996).
71. Routledge E. J., Waldock M., Sumpter J. P.: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 371 (1999).
72. Ternes T. A., Kreckel P., Mueller J.: *Sci. Total Environ.* **225**, 91 (1999).

73. Fujii K., Kikuchi S., Satomi M., Ushio-Sata N., Morita N.: *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2057 (2002).
74. Gabriel F. L. P., Heidlberger A., Rentsch D., Giger W., Guenther K., Kohler H. P. E.: *J. Biol. Chem.* **280**, 15526 (2005).
75. Tanghe T., Dhooze V., Verstraete W.: *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 746 (1999).
76. Ushiba Y., Takahara Y., Ohta H.: *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **53**, 2045 (2003).
77. Sasaki M., Maki J., Oshiman K., Matsumura Y., Tsuchido T.: *Biodegradation* **16**, 449 (2005).
78. Ike M., Jin C. S., Fujita M.: *Water Sci. Technol.* **42**, 31 (2000).
79. Kang J. H., Kondo F.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 265 (2002).
80. Spivack J., Leib T. K., Lobos J. H.: *J. Biol. Chem.* **269**, 7323 (1994).
81. Lobos J. H., Leib T. K., Su T. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1823 (1992).
82. Ronen Z., Abeliovich A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2372 (2000).
83. Zhang C., Zeng G. M., Yuan L., Yu J., Li J. B., Huang G. H., Xi B. D., Liu H. L.: *Chemosphere* **68**, 181 (2007).
84. Ike M., Chen M. Y., Jin C. S., Fujita M.: *Environ. Toxicol.* **17**, 457 (2002).
85. Voordeckers J. W., Fennell D. E., Jones K., Hagblom M. M.: *Environ. Sci. Technol.* **36**, 696 (2002).
86. Hirooka T., Akiyama Y., Tsuji N., Nakamura T., Nagase H., Hirata K., Miyamoto K.: *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 200 (2003).
87. Hirooka T., Nagase H., Uchida K., Hiroshige Y., Ehara Y., Nishikawa J., Nishihara T., Miyamoto K., Hirata Z.: *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 1896 (2005).
88. Ishihara K., Nakajima N.: *J. Mol. Catal.: B Enzym.* **23**, 419 (2003).
89. Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z. L., Williams B. D., Lewis G., Naidu R.: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3030 (2004).
90. Yim S. H., Kim H. J., Lee I. S.: *Arch. Pharmacol. Res.* **26**, 805 (2003).
91. Soares A., Jonasson K., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 719 (2005).
92. Fukuda T., Uchida H., Takashima Y., Uwajima T., Kawabata T., Suzuki M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 704 (2001).
93. Lee S. M., Koo B. W., Lee S. S., Kim M. K., Choi D. H., Hong E. J., Jeung E. B., Choi I. G.: *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 417 (2004).
94. Tanaka T., Tonosaki T., Nose M., Tomidokoro N., Kadomura N., Fujii T., Taniguchi M.: *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 312 (2001).
95. Saito T., Kato K., Yokogawa Y., Nishida M., Yamashita N.: *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 64 (2004).
96. Kimura M., Michizoe J., Oakazaki S., Furusaki S., Goto M., Tanaka H., Wariishi H.: *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 495 (2004).
97. Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.: *Chemosphere* **42**, 271 (2001).
98. Lee S. M., Koo B. W., Choi J. W., Choi D. H., An B. S., Jeung E. B., Choi I. G.: *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 201 (2005).
99. Soares A., Guieysse B., Mattiasson B.: *Biotechnol. Lett.* **28**, 139 (2006).
100. Lee J. W., Lee S. M., Hong E. J., Jeung E. B., Kang H. Y., Kim M. K., Choi I. G.: *J. Microbiol.* **44**, 177 (2006).
101. Chai W., Handa Y., Suzuki M., Saito M., Kato N., Horiuchi C. A.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **120**, 175 (2005).
102. Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D.: *Microbiology - Sgm* **151**, 45 (2005).
103. Vallini G., Frassinetti S., Scorzetti G.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 336 (1997).
104. Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G., Agnolucci M.: *Int. Biodeter. Biodegr.* **47**, 133 (2001).
105. Reddy C. A.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 320 (1995).
106. Leonowicz A., Cho N. S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtas-Wasilewska M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J.: *J. Basic Microbiol.* **41**, 185 (2001).
107. Hatakka A.: *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125 (1994).
108. Hofrichter M.: *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 454 (2002).
109. Baldrian P.: *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 215 (2006).
110. Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N.: *Biotechnol. Adv.* **22**, 161 (2003).
111. Hirano T., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **64**, 1958 (2000).
112. Sakurai A., Toyoda S., Sakakibara M.: *Biotechnol. Lett.* **23**, 995 (2001).
113. Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T.: *Water Res.* **37**, 1972 (2003).
114. Uchida H., Fukuda T., Miyamoto H., Kawabata T., Suzuki M., Uwajima T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 355 (2001).
115. Okazaki S. Y., Michizoe J., Goto M., Furusaki S., Wariishi H., Tanaka H.: *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 227 (2002).
116. Michizoe J., Goto M., Furusaki S.: *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 67 (2001).

**Z. Křesinová, K. Svobodová, and T. Cajthaml**  
*(Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague): Microbial Degradation of Endocrine Disruptors*

Recently, alkylphenols, bisphenols and several synthetic estrogens have been recognized as endocrine disruptors (ED). They can interfere with hormones and thus disrupt development of animals. Investigation of environmental pollution by these chemicals, studies of their toxicity and the ability of various microorganisms to decompose such compounds are now in progress. This work

summarizes findings on microbial degradation of ED in the last three decades with a special respect to the promising bioremediation agents – white rot fungi and degradation capacity of their ligninolytic enzymes. Most of the studies are focused on the degradation of ED by purified enzymes although these methods are technically demand-

ing and costly. On the other hand, the ED degradation with fungal cultures are also feasible. The work is aimed at identification of intermediates from ED degradation and their endocrine activities, which is important for better understanding of microbial degradation.