

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Environmentální vědy



Mgr. Lucie Linhartová

Endokrinně disruptivní účinky a degradabilita mikropolutantů
s antimikrobiální aktivitou

Endocrine-disrupting properties and degradability of micropollutants
with antimicrobial activity

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

Konzultant: Dr. Denis Habauzit, Ph.D., HDR.

Praha, 2021

Tato disertační práce byla vytvořena za podpory projektů Grantové agentury České republiky 17-15678Y a 20-14318Y.

Disertační práce byla vypracována ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem Akademie věd České republiky, v.v.i.

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D., DSc.

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova

Konzultant: Dr. Denis Habauzit, Ph.D., HDR.

Anses Laboratoire de Fougères, Bretagne, France

Prohlášení:

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

V Praze, červenec 2021

Mgr. Lucie Linhartová

Disertační práce byla sepsána na základě těchto publikací, které jsou součástí přílohy.

Publikace 1

Linhartová L, Costet N, Pakdel F, Cajthaml T, Habauzit D. Key parameter optimization and multivariable linear model evaluation of the *in vitro* estrogenic activity bioassay in T47D cell lines (CXCL-test). Cell Biology and Toxicology (odesláno ve formě manuskriptu)

Publikace 2

Michalíková K, Linhartová L, Ezechiáš M, Cajthaml T (2019). Assessment of agonistic and antagonistic properties of widely used oral care antimicrobial substances toward steroid estrogenic and androgenic receptors. Chemosphere 217: 534–541

Publikace 3

Linhartová L, Michalíková K, Šrédlová K, Cajthaml T (2020). Biodegradability of dental care antimicrobial agents chlorhexidine and octenidine by ligninolytic fungi. Molecules 25: 400

Publikace 4

Maryšková M, Linhartová L, Novotný V, Rysová M, Cajthaml T, Ševců A (2021). Laccase and horseradish peroxidase for green treatment of phenolic micropollutants in real drinking water and wastewater. Environmental Science and Pollution Research 28: 31566–31574

Deklarace spolupráce na odborných publikacích:

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Lucie Linhartová významně podílela na vzniku publikace 1 (její podíl 65 %). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Lucie Linhartová významně podílela na vzniku publikace 2 (její podíl 50 %). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Lucie Linhartová významně podílela na vzniku publikace 3 (její podíl 60 %). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Lucie Linhartová významně podílela na vzniku publikace 4 (její podíl 25 %). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Abstrakt

Vzrůstající antropogenní znečištění má negativní vliv na životní prostředí a je spojováno s rozvojem mnoha zdravotních problémů u člověka. Převážná většina chemických látek je do prostředí vypouštěna bez jakéhokoliv omezení a restrikce většinou přichází až ve chvíli, kdy se negativní důsledky jednoznačně projeví. Aktuálním tématem je výskyt tzv. mikropolutantů, které se v prostředí vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (ng– μ g/l) a vodním prostředím se šíří napříč celou planetou. Jsou mezi ně řazeny mimo jiné pesticidy, léčiva a látky používané v produktech osobní péče a péče o domácnost. Ukazuje se, že mnoho těchto látek má perzistentní charakter a i v takto nízkých koncentracích mohou mít vážné následky. Mikropolutanty mohou narušovat přirozené fungování hormonálního systému, což může být u lidí příčinou rozvoje některých typů rakoviny, snížení plodnosti či posunutí nástupu puberty. V životním prostředí může docházet vlivem endokrinních disruptorů dokonce až ke kolapsu populací.

Tato práce se zabývá endokrinně disruptivními účinky a degradabilitou velmi málo prostudované skupiny látek, které se pro své antimikrobiální účinky využívají mimo jiné v produktech ústní hygieny a bez jakéhokoliv omezení či kontroly jsou vypouštěny do životního prostředí. Z výsledků práce vyplývá, že žádná z devíti testovaných látek neimitovala funkci přirozených agonistů estrogenního a androgenního receptoru, avšak pět z nich působilo jako antiandrogen a/nebo antiestrogen. Dvě antimikrobiální látky byly zkoumány z hlediska degradability s využitím modelových mikroorganismů, které patří do skupiny ligninolytických hub. U obou byla detekována pouze částečná transformace. Již dříve prokázaly tyto organismy a jejich enzymatický aparát schopnost degradovat celé spektrum organických polutantů, a to i v reálných maticích. Můžeme tedy předpokládat perzistentní charakter této skupiny mikropolutantů.

Abstract

The increasing pollution caused by compounds of anthropogenic origin can lead to harmful effects on human health and the environment. The majority of produced chemicals are continuously released into the environment, and restrictions are usually not employed until negative effects have already manifested. Recently, micropollutants have been given a lot of attention among researchers. These compounds are present in the environment at very low concentrations (ng– μ g/l) and are transported over the globe through the hydrosphere. Micropollutants, including pesticides, pharmaceuticals, and personal care products, have a tendency to persist in the environment. Moreover, even trace concentrations of the compounds can have severe detrimental impacts. Many micropollutants can interfere with the natural functions of the endocrine system, which can result in the development of several types of cancer, decrease in fertility, or delayed puberty. The presence of endocrine disruptors in nature can eventually lead to the collapse of populations.

This thesis focuses on the study of the endocrine-disrupting effects and degradability of antimicrobial compounds, which are, besides other applications, widely used in oral care products. The emissions of these compounds are unregulated. The results demonstrated that none of nine tested compounds acted as an agonist of the estrogen and androgen receptors; nevertheless, five of the compounds exhibited antiandrogenic and/or antiestrogenic effects. The degradability of two selected antimicrobial compounds was studied using model ligninolytic fungi and their extracellular enzymatic apparatus. Only partial transformation of both compounds was detected. The limited degradation capability of this group of microorganisms, which were previously shown to transform a broad range of diverse chemicals, emphasizes the persistent nature of antimicrobial compounds.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam zkratek.....	9
1 Úvod.....	11
2 Organické polutanty životního prostředí.....	13
2.1 Mikropolutanty	13
2.2 PCP s antimikrobiálními účinky	17
3 Subletální toxicita a environmentální dopad antimikrobiálních látek.....	20
3.1 Endokrinní disrupce	22
3.1.1 Narušení syntézy steroidních hormonů	22
3.1.2 Toxicita zprostředkovaná přes nukleární receptory.....	23
3.1.3 Důsledky působení mikropolutantů na hormonální systém.....	24
3.2 Detekce endokrinních disruptorů v životním prostředí	25
3.3 Metody stanovení endokrinně disruptivní aktivity	26
3.3.1 <i>In vivo</i> testy.....	27
3.3.2 Detekce exprimovaných genů.....	28
3.3.3 <i>In vitro</i> testy.....	28
4 Výskyt a osud antimikrobiálních látek v životním prostředí	31
4.1 Triclosan	31
4.2 Chlorhexidin	32
4.3 Kvarterní aminy	32
4.4 Terpeny	33
5 Degradabilita antimikrobiálních látek.....	34
5.1 Fyzikálně-chemické metody.....	34
5.2 Biodegradační metody	34
5.3 Ligninolytické houby a jejich enzymy.....	36

5.3.1	Peroxidasy.....	36
5.3.2	Lakasa	38
5.4	Degradační potenciál ligninolytických hub a enzymů.....	39
5.4.1	Studie <i>in vivo</i>	39
5.4.2	Studie <i>in vitro</i>	39
5.4.3	Degradace mikropolutantů v reálných matricích.....	40
5.4.4	Degradabilita antimikrobiálních látek	41
6	Cíle disertační práce	42
7	Závěry.....	43
8	Literatura	45
	Poděkování	63
	Přílohy.....	65

Seznam zkratek

AF-1	aktivační funkce 1
AF-2	aktivační funkce 2
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky, z angl. aryl hydrocarbon receptor
AP1	aktivační protein 1
AR	androgenní receptor
CAR	konstitutivní androstanový receptor, z angl. constitutive androstane receptor
CXCL12	chemokin 12 s motivem C-X-C
CYP	cytochromy P450
ČOV	čistírna odpadních vod
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
E2	17 β -estradiol
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethynylestradiol
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky, z angl. European Chemicals Agency
ER	estrogenní receptor
ERE	estrogen-responsivní element
FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z angl. Food and Drug Administration
GMO	geneticky modifikovaný organismus
HRE	hormon-responsivní element
HSP	protein teplotního šoku, z angl. heat shock protein
LiP	ligninperoxidasa
MnP	mangan-dependentní peroxidasa
NR	nukleární receptor
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj, z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky

PCB	polychlorované bifenyly
PCP	látky používané v produktech osobní péče, z angl. personal care products
POP	perzistentní organický polutant
PPAR	receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem, z angl. peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	pregnanový X receptor
Sp1	specifický protein 1
TR	thyroidní receptor
T1, T2, T3	reakční centra lakasy
VP	versatilní peroxidasa

1 Úvod

Množství chemických látek antropogenního původu neustále roste a až 106 tisíc z nich je využíváno ke komerčním účelům. Ačkoliv se jejich výroba jen v zemích Evropské unie pohybuje ročně v řádech stovek milionů tun, osud v životním prostředí u většiny z nich není sledován (ECHA 2021; Eurostat 2021).

Rozvoj analytických metod umožňuje sledování stále nižších koncentrací chemických látek v prostředí a problém výskytu tzv. mikropolutantů v poslední době získává pozornost odborné i neodborné veřejnosti. Mikropolutanty se vyskytují nejčastěji v řádech ng–μg/l (ng–μg/g), jsou často rozpustné ve vodě a šíří se vodním prostředím napříč celou planetou. Ukazuje se, že i v takto nízkých koncentracích může mít celá řada látek negativní dopad na lidské zdraví a životní prostředí. Mezi mikropolutanty jsou řazeny mimo jiné pesticidy, průmyslové chemikálie, steroidní hormony, léčiva a také látky používané v produktech osobní péče označované v literatuře zkratkou PCP (z angl. personal care products), které se vyskytují převážně v kosmetice a úklidových prostředcích. Velmi málo sledovanou a z ekotoxikologického hlediska nedostatečně charakterizovanou skupinou mikropolutantů jsou antimikrobiální látky, které jsou běžnou součástí mýdel, dezinfekčních prostředků i produktů ústní hygieny.

Ačkoliv je vypouštění antimikrobiálních látek do životního prostředí každodenní rutinou všech domácností a nemocničních zařízení, o jejich možném negativním vlivu na lidské zdraví a životní prostředí není mnoho známo. Nejvíce je jejich výskyt diskutován v souvislosti se vznikem antimikrobiální rezistence (Shepherd *et al.* 2018; Mao *et al.* 2020). Mohou však, stejně jako mnoho jiných mikropolutantů, způsobovat celou řadu dalších toxických účinků. Všechny mikropolutanty jsou potenciálně rizikové mimo jiné z hlediska endokrinně disruptivních účinků. Hormonální systém je totiž právě na koncentrace biologicky aktivních molekul v řádu ng/l citlivý. U mnoha mikropolutantů byly tyto účinky již prokázány (Vandenberg *et al.* 2012; Karthikeyan *et al.* 2021).

Ke stanovení endokrinně disruptivních účinků slouží bioanalytické metody, které jsou využívány nejen jako nástroj pro určení aktivity čisté látky, ale také jako doplněk k analytickým metodám při sledování znečištění v prostředí. Na rozdíl od analytických metod totiž dokáží hodnotit celkovou míru znečištění odebraného vzorku a mají mnohdy o několik řádů vyšší citlivost (Conley *et al.* 2017; Toušová *et al.* 2017).

Povinnost sledovat osud antimikrobiálních látek v prostředí není stanoven žádným zákonem ani vyhláškou. Na jejich výskyt v prostředí se vědecké studie běžně

nezaměřují, avšak v rámci sledování jiných mikropolutantů vychází najevo, že se tyto látky v prostředí vyskytují (Shrivasa a Wu 2007; Ostman *et al.* 2017). V čistírnách odpadních vod (ČOV) nejsou účinně odbourávány (Lasek *et al.* 2019) a pokud jsou z odpadní vody přece jen odstraněny, často se tak děje pouze adsorpcí na čistírenský kal, a nikoliv degradací. Dosavadní studie naznačují, že tyto látky podléhají degradaci jen velmi obtížně (Keerthisinghe *et al.* 2019; Nguyen a Oh 2019).

Vynikajícím modelovým organismem pro studium biodegradace a degradability organických polutantů jsou ligninolytické houby a jejich extracelulární enzymy. Již dříve prokázaly vysoký potenciál při degradaci rekalitrantních polutantů, jako jsou polychlorované bifenyly (PCB) (Čvančarová *et al.* 2012) či polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) (Covino *et al.* 2010), a také některých mikropolutantů (Křesinová *et al.* 2012; Beck *et al.* 2018).

V rámci této disertační práce byly testovány endokrinně disruptivní účinky devíti látek používaných v ústních vodách a zubních pastách. Práce byla zaměřena na identifikaci (anti)estrogenních a (anti)androgenních účinků. U vybraných látek byla testována možnost jejich degradace houbami bílé hniloby (*in vivo*) a jejich extracelulárním enzymovým aparátem (*in vitro*). Součástí práce byla také optimalizace testu estrogenní aktivity (CXCL-test) a studium podmínek vhodných pro bioremediačně perspektivní enzymy při degradaci antimikrobiální látky triclosan a dalších mikropolutantů v reálných matricích.

2 Organické polutanty životního prostředí

Převážná většina polutantů životního prostředí vznikala a vzniká činností člověka. K dnešnímu dni je známo více než 182 milionů chemických látek (CAS 2021). Více než 106 tisíc z nich je pak dle Evropské agentury pro chemické látky (ECHA, z angl. European Chemicals Agency) využíváno ke komerčním účelům (ECHA 2021) a jejich výroba, spotřeba a následný únik do životního prostředí je enormní. Eurostat uvádí, že jen za poslední desetiletí bylo v zemích Evropské unie ročně vyrobeno v průměru 281 milionů tun chemických látek, z nichž přibližně 70 % je řazeno mezi látky ohrožující lidské zdraví a téměř 30 % škodí životnímu prostředí (Eurostat 2021).

Významným krokem k plošnému omezování toxických chemických látek bylo podepsání Stockholmské úmluvy v roce 2001. Tato právně závazná mezinárodní dohoda ukládá signatářským státům povinnost omezovat produkci a použití a zároveň odstraňovat tzv. perzistentní organické polutanty (POP), toxické látky, které se v přírodě obtížně rozkládají a mají tendenci se bioakumulovat a biomagnifikovat. K dodržování Stockholmské úmluvy se zavázalo 181 zemí světa včetně České republiky. Původně Stockholmská úmluva zahrnovala 12 POP (některé pesticidy, PCB, polychlorované dibenzodioxiny a polychlorované dibenzofurany). Seznam látek uvedených ve Stockholmské úmluvě se však stále rozšiřuje a k dnešnímu dni se restrikce týkají dalších 16 látek z řad pesticidů, perfluorovaných látek a bromovaných zpomalovačů hoření a další chemické látky jsou posuzovány (Stockholmská úmluva 2021).

Stále častěji však vědecké práce upozorňují na problematiku tzv. mikropolutantů, které i přes nízké koncentrace v prostředí mohou vykazovat prvky chronické toxicity u člověka a negativně ovlivňovat volně žijící populace. Jejich únik do životního prostředí však není nijak omezen a ukazuje se, že odstraňování mikropolutantů z prostředí je velmi problematické.

2.1 Mikropolutanty

Mikropolutanty, v literatuře označované také jako nově se objevující polutanty či stopové organické sloučeniny (v anglické literatuře pod pojmy „micropollutants“, „contaminants of emerging concern“, „emerging pollutants“, „trace organic pollutants“), jsou velmi početnou a chemicky různorodou skupinou polutantů. Jedná se o látky antropogenního i přírodního původu, jejichž společným znakem je alespoň částečná rozpustnost ve vodě, která umožňuje šíření těchto látek vodním prostředím. Způsobují

tak kontaminaci ve velmi nízkých koncentracích, a to v řádech ng–µg/l (Thomaidis *et al.* 2012). Americká výzkumná vládní agentura United States Geological Survey definuje mikropolutanty jako syntetické látky, látky přírodního původu či mikroorganismy, které se běžně vyskytují v životním prostředí a mají potenciál působit škodlivě na životní prostředí a/nebo lidské zdraví (USGS 2017; Rout *et al.* 2021). Do skupiny mikropolutantů jsou mimo jiné řazeny pesticidy, průmyslové chemikálie, steroidní hormony, léčiva a PCP, tedy látky obsažené jak v kosmetických přípravcích, tak v produktech určených k péči o domácnost (Thomaidis *et al.* 2012; Luo *et al.* 2014).

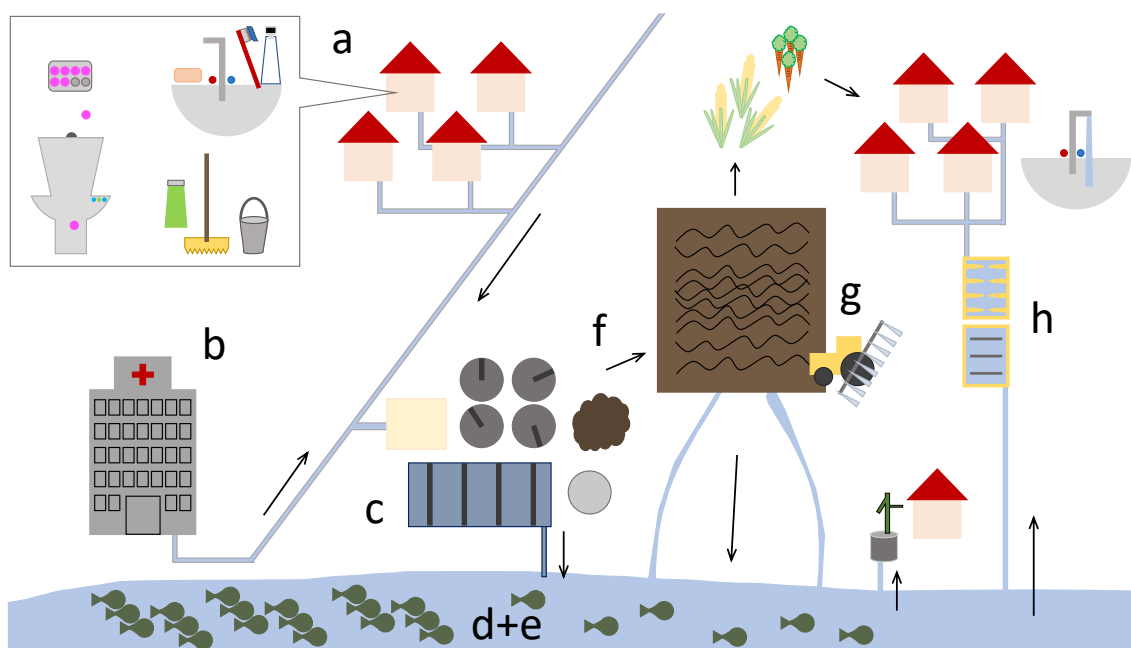
Mikropolutanty dlouhou dobu nezbuzovaly velkou pozornost, jelikož citlivost analytických metod neumožňovala koncentrace v řádech ng/l detekovat (Noguera-Oviedo a Aga 2016). Stejně tak nebyly studovány jejich toxické účinky na člověka ani dopad na životní prostředí. Teprve rozvoj stále citlivějších analytických a bioanalytických metod v nedávné minulosti spolu s rostoucí spotřebou léčiv i PCP umožnil sledovat ve větším rozsahu výskyt a osud mikropolutantů v prostředí, což dokládá také nárůst vědeckých publikací zaměřených na problematiku mikropolutantů za poslední dekádu (Venegas *et al.* 2021).

Mikropolutanty se do životního prostředí dostávají nepřetržitě mnoha způsoby. Jejich vstup do životního prostředí a osud v něm ilustruje obrázek 1 (str. 16). Odpadní voda z domácností a nemocnic nejvíce přispívá ke znečištění léčivy a PCP vč. dezinfekčních prostředků. Technologie ČOV však na tento druh znečištění většinou nejsou přizpůsobeny, a mikropolutanty jsou tím pádem z odpadních vod v ČOV odstraňovány jen částečně (Luo *et al.* 2014; Gavrilescu *et al.* 2015; Yang *et al.* 2017; Angeles *et al.* 2020; Kosek *et al.* 2020). Studie z poslední doby ukazují, že běžnými technologiemi zahrnujícími primární a sekundární čištění nejsou látky ze skupiny léčiv a PCP odstraňovány dostatečně (Rout *et al.* 2021). Nedostatečně přečištěná voda je z ČOV vypouštěna do povrchových vod a mikropolutanty se pak dostávají dále do prostředí.

Mikropolutanty mohou být v ČOV ve druhém stupni čištění odstraňovány biologickou degradací, výrazně se však také adsorbují na čistírenský kal. Ten je pak ve velké míře, vzhledem k vysokému obsahu živin, aplikován na zemědělskou půdu k jejímu obohacení. Toto využití čistírenského kalu je limitováno pouze obsahem těžkých kovů, PCB, PAU a patogenních bakterií (Zákon č. 541/2020 Sb.), mikropolutanty přítomné v kalu však sledovány nejsou a mohou se tak touto cestou vracet do životního prostředí

(Butler *et al.* 2012; Fijalkowski *et al.* 2017; Moško *et al.* 2021). Zemědělská půda je nicméně kontaminována především v důsledku používání pesticidů. Všechny tyto látky, ať už jsou na zemědělskou půdu aplikovány záměrně či nikoliv, se pak dostávají do povrchových i podzemních vod, které mimo jiné slouží jako zdroje pro úpravny pitné vody. Vodním prostředím se mikropolutanty mohou šířit dále. Ačkoliv jsou na kvalitu pitné vody kladeny vysoké nároky, i v ní byly detekovány látky z řad hormonů, léčiv i PCP (Benotti *et al.* 2009; Luo *et al.* 2014; Padhye *et al.* 2014; Gavrilesco *et al.* 2015; Tiedeken *et al.* 2017; Riva *et al.* 2018; Datel a Hrabánková 2020).

Kontrola kvality vody v zemích Evropské unie se řídí rámcovou směrnicí o vodách, která byla implementována do zákonů členských států (Directive 2008/105/EC 2008; Decision 2018/840/EU 2018). Tato směrnice uvádí seznam 45 tzv. prioritních látek, jejichž průměrné prahové koncentrace a nejvyšší přípustné koncentrace nesmí být překročeny, aby byly splněny podmínky dobrého chemického stavu vody. Na původní seznam 33 prioritních látek byly v roce 2008 zařazeny některé pesticidy, změkčovadla plastů, průmyslové chemikálie, PAU či bromované zpomalovače hoření. O deset let později byl seznam rozšířen a přibyli na něm také zástupci antibiotik a hormonálně aktivních látek vč. syntetického ženského pohlavního hormonu 17 α -ethynylestradiolu (EE2).



Obrázek 1: Ilustrativní znázornění hlavních vstupů mikropolutantů do životního prostředí a jejich dalšího osudu. Mikropolutanty vstupují do životního prostředí z (a) domácností, a to ve formě vyloučených léčiv či nesprávně zlikvidovaných léčivých přípravků, dezinfekčních prostředků určených k úklidu či z produktů osobní hygieny (mýdla, zubní pasty, ústní vody aj.); (b) nemocničních zařízení ve formě vyloučených léčiv a dezinfekčních přípravků určených pro udržení sterilního prostředí. Kanalizačním systémem se pak znečištěné odpadní vody dostávají do (c) čistírny odpadních vod (ČOV), kde však technologie nejsou přizpůsobeny na tento druh kontaminace. Mikropolutanty v ČOV nejsou zcela odstraňovány a do životního prostředí se dostávají jednak vypouštěním nedostatečně přečištěné vody z ČOV do (d) povrchové vody a jednak prostřednictvím adsorpce na (f) čistírenský kal, který je dále využíván v zemědělství. Dalším významným zdrojem mikropolutantů v životním prostředí jsou (g) pesticidy. Ty se pak vodním prostředím šíří a mohou kontaminovat (e) podzemní či povrchovou vodu. Podzemní i povrchová voda pak slouží jako zdroj pro (h) úpravnu pitné vody.

2.2 PCP s antimikrobiálními účinky

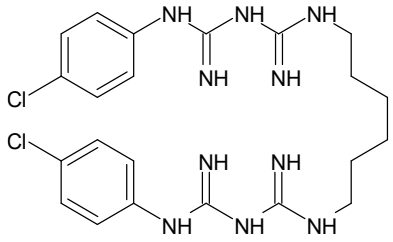
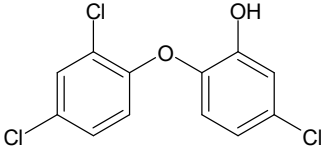
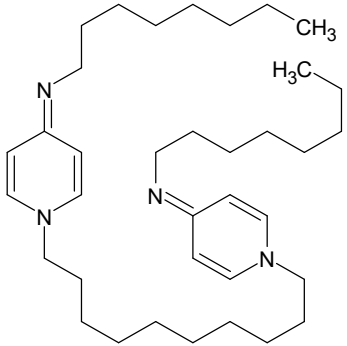
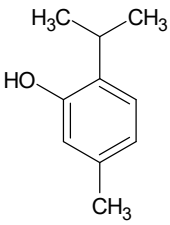
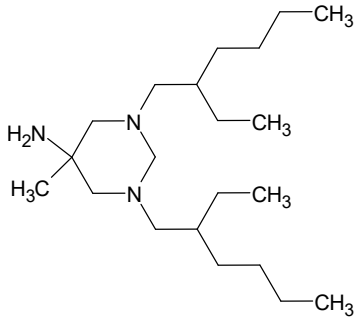
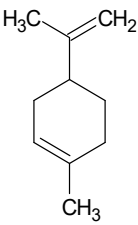
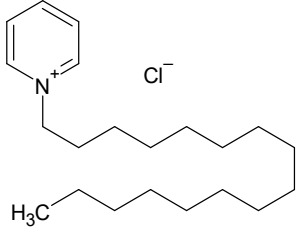
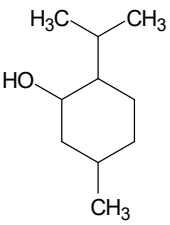
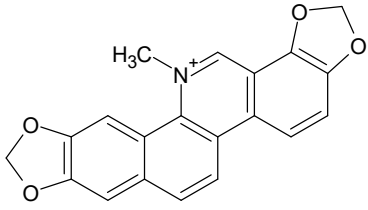
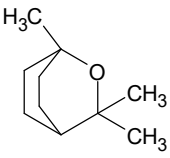
Z hlediska toxicity a výskytu v životním prostředí jsou velmi opomíjenou skupinou PCP látky s antimikrobiálními účinky. Antimikrobiální, biocidní či dezinfekční látky jsou součástí volně dostupných přípravků, které slouží k prevenci infekce. Nejedná se tedy o antibiotika jakožto léčivé látky používané k léčbě bakteriálních infekcí. Pro ty je v rámci této práce používán výhradně termín antibiotika. Antimikrobiální látky jsou využívány především v přípravcích určených k dezinfekci kůže a sterilizaci nemocničních ploch. V domácnostech jsou pak antimikrobiální látky běžnou součástí úklidových prostředků a jsou také hojně zastoupeny v produktech ústní hygieny.

Použití antimikrobiálních látek v zubních pastách a ústních vodách výrazně redukuje množství patogenů v ústech, což snižuje výskyt zubního plaku, chronického zánětu dásní či zubního kazu a redukuje zápach z úst (Claffey 2003; Latimer *et al.* 2015; Malhotra *et al.* 2016; Takenaka *et al.* 2019). Péče o hygienu ústní dutiny celosvětově vzrůstá, což dokládají také prodejní statistiky uvádějící rostoucí trend v užívání zubních past a ústních vod. Dle americké agentury Grand View Research bude spotřeba těchto produktů i dále narůstat, a to až o 6 % v období let 2021–2028 (Grand View Research 2021).

V zubních pastách a ústních vodách jsou nejčastěji používány antimikrobiální látky z řad fenolických sloučenin a jejich derivátů, kvarterních aminů, biguanidů a terpenů (Tan *et al.* 2002; Claffey 2003). Již v roce 1945 byl pro své baktericidní účinky do ústních vod přidáván cetylpyridin, v literatuře uváděný také jako cetylpyridinium chlorid či hexadecylpyridinium chlorid (Huyck 1945), a v 70. letech pak biguanid chlorhexidin, hexetidín a éterické oleje obsahující terpeny thymol, limonen, mentol a 1,8-cineol známý také jako eukalyptol (Schiott *et al.* 1970; Bergenholtz a Hanstrom 1974; Fornell *et al.* 1975). V 80. letech se pak v produktech ústní hygieny začínají používat octenidin, sanguinarin a triclosan, označovaný též komerčním názvem irgasan (Slee a Oconnor 1983; Dzink a Socransky 1985; Gilbert a Williams 1987). Z výše uvedených látek se v současnosti používají všechny. Triclosan, jehož používání v zubních pastách ještě není zakázáno, je ale v produktech ústní hygieny již nahrazován (FDA 2016; Colgate-Palmolive 2019). Na rozdíl od antibiotik, jejichž efektivní koncentrace jsou díky specifickým účinkům v léčivých přípravcích nízké, je obsah antimikrobiálních látek v dezinfekčních preparátech značně vyšší než minimální inhibiční koncentrace pro cílový organismus (White a McDermott 2001; Tezel a Pavlostathis 2015). Struktury těchto látek

a koncentrace, ve kterých jsou běžně zastoupeny v produktech ústní hygieny, jsou uvedeny v tabulce 1 (str. 19).

Tabulka 1: Přehled struktur a typických koncentrací antimikrobiálních látek používaných v produktech ústní hygieny, vč. triclosanu, jehož použití je v současné době omezováno.

Chlorované aromatické sloučeniny:	
	<p>Chlorhexidin</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,1–1 % (w/v)</p>
	<p>Triclosan</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,1–0,3 %*</p>
Kvarterní aminy:	Terpeny:
	
<p>Octenidin</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,1–2 % (w/v)</p>	<p>Thymol</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,06 % (w/v)</p>
	
<p>Hexetidín</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,1 % (w/v)</p>	<p>Limonen</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>2,5–15 % (w/v)</p>
	
<p>Cetylpyridin</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,07 % (w/v)</p>	<p>Mentol</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,04 % (w/v)</p>
	
<p>Sanguinarin</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,01 % (w/v)</p>	<p>Eukalyptol</p> <p>Typická koncentrace</p> <p>0,09 % (w/v)</p>

* od 2019 nahrazen

3 Subletální toxicita a environmentální dopad antimikrobiálních látek

Akutní toxicita antimikrobiálních látek používaných v produktech ústní hygieny je v literatuře velmi dobře popsána, neboť je vzhledem k oblastem jejich použití klíčová (Koburger *et al.* 2010; Welk *et al.* 2016; Abe *et al.* 2020). Velmi málo je však známo o subletální toxicitě těchto látek a také o jejich dopadu na životní prostředí.

Škodlivé účinky dezinfekčních látek jsou v poslední době nejvíce diskutovány v souvislosti s problematikou vzniku rezistentních kmenů bakterií, především z důvodu používání a nadužíváním antibiotik (Birošová *et al.* 2014; Pazda *et al.* 2019). Světová zdravotnická organizace a Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí dokonce označují vznik rezistentních kmenů bakterií a přenos genů pro rezistenci za hrozbu pro 21. století v oblasti veřejného zdraví (Versporten *et al.* 2014). V posledních letech se ukazuje, že přítomnost dezinfekčních látek v životním prostředí k tomuto problému přispívá také (Kampf 2018). Vznik rezistence na antimikrobiální látky spojené s rezistencí na antibiotika byl již prokázán u kvarterních aminů, chlorhexidinu i triclosanu (Russell 2003; Braoudaki a Hilton 2004; Tezel a Pavlostathis 2015; Cieplik *et al.* 2019; Mao *et al.* 2020). Studie Shepherd *et al.* (2018) poukázala na fakt, že v nemocničním prostředí se mohou bakteriální kmeny na antimikrobiální látky adaptovat a zvyšovat tak toleranci nejen vůči nim, ale také vůči dalším antimikrobiálním látkám. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* izolované z nemocničního prostředí se ve více než polovině případů adaptovaly na běžnou aplikační dávku octenidinu. Po několika dnech zvyšování jeho koncentrace v laboratorních podmínkách byly izolovány kmeny, u kterých byla prokázána vyšší tolerance nejen vůči octenidinu, ale také vůči chlorhexidinu a dalším biocidním přípravkům.

Vznik rezistence a příspěvek ke vzniku rezistence na antibiotika však není jediným problémem, který je v souvislosti s používáním antimikrobiálních látek uváděn. Subletální toxické účinky antimikrobiálních látek byly prozatím nejlépe popsány v případě triclosanu. Bylo prokázáno, že má neurotoxické, genotoxické, imunotoxické a karcinogenní účinky (Wang a Liang 2021) a působí také jako endokrinní disruptor (ED). Veldhoen *et al.* (2006) prokázali, že triclosan ovlivňuje expresi thyroïdního receptoru (TR), čímž způsobuje změny v procesech řízených thyroïdními hormony. Triclosan se také váže na transportní protein transthyretin, kompetuje tak s thyroxinem, a tím opět

narušuje přirozené fungování thyrooidní dráhy (Cavanagh *et al.* 2018). Triclosan zasahuje i do fungování pohlavních hormonů. Popsány byly jeho androgenní, antiandrogenní, estrogenní i antiestrogenní účinky. Detekovaná aktivita se ve studiích lišila v závislosti na biologickém druhu, tkáni či typu buněk. Endokrinně disruptivní účinky triclosanu však byly jasně prokázány (Foran *et al.* 2000; Gee *et al.* 2008; Yueh a Tukey 2016). Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z angl. Food and Drug Administration) z důvodu perzistentního charakteru triclosanu a jeho četných škodlivých účinků na lidské zdraví a životní prostředí zakázal jeho používání v mýdlech, z trhu však zcela nezmizel (FDA 2016).

Endokrinně disruptivní účinky antimikrobiálních látek z řad kvarterních aminů, biguanidů a terpenů jsou popsány jen velmi málo. Endokrinně disruptivní účinky chlorhexidinu byly testovány na kvasinkových modelech v rámci několika studií, avšak ani v jedné nebyla jeho interakce s hormonálním systémem potvrzena (Nishihara *et al.* 2000; Eguchi *et al.* 2003). Antiandrogenní vlastnosti byly pozorovány u thymolu (Chen *et al.* 2007) a v práci Datta *et al.* (2017) byla prokázána antiestrogenní aktivita cetylpyridinu. V rámci studia esenciálních olejů obsažených v koření byl thymol identifikován jako parciální agonista receptoru pro aromatické uhlovodíky (AhR, z angl. aryl hydrocarbon receptor) (Bartoňková a Dvořák 2018). Interakce s AhR nebyla potvrzena u sanguinarinu (Dvořák *et al.* 2006a), avšak jeho schopnost vázat se na glukokortikoidový receptor prokázala práce Dvořák *et al.* (2006b). Z výše uvedených dat je evidentní, že tato skupina látek má potenciál interagovat s hormonálním systémem, ucelená data o endokrinně disruptivních účincích většiny antimikrobiálních látek v produktech ústní hygieny však chybí.

V rámci předkládané publikace 2 (Michalíková *et al.* 2019) byla testována (anti)estrogenní a (anti)androgenní aktivita devíti látek používaných v zubních pastách či ústních vodách (chlorhexidin, octenidin, hexetidin, cetylpyridin, sanguinarin, thymol, limonen, mentol, eukalyptol). Tyto aktivity byly testovány na vhodných lidských buněčných liniích i na upravených kvasinkových modelech. Bylo prokázáno, že ani jedna z testovaných látek není agonistou estrogenního ani androgenního receptoru (ER, AR), avšak pět z nich (chlorhexidin, octenidin, cetylpyridin, thymol, mentol) blokovalo funkci přirozených agonistů 17 β -estradiolu (E2) a/nebo dihydrotestosteronu, z čehož vyplývá, že mají antiestrogenní a antiandrogenní účinky.

3.1 Endokrinní disrupce

ED jsou definovány jako exogenní látky, které ovlivňují syntézu, uvolňování, transport, metabolismus, vazbu na receptor, působení či eliminaci přirozených hormonů, které jsou zodpovědné za udržování homeostázy, reprodukci, vývoj a chování (Kavlock *et al.* 1996; EPA 1997). V současné době jsou endokrinně disruptivní účinky popsány u téměř 800 látek (Karthikeyan *et al.* 2021) a převážná většina z nich je do životního prostředí nepřetržitě uvolňována, či v něm přetrvává jako pozůstatek dřívější kontaminace. Ačkoliv se mikropolutanty v prostředí vyskytují v řádu ng–μg/l, mohou být škodlivé z hlediska endokrinní disrupce, protože hormonální systém je právě na takové koncentrace biologicky aktivních molekul nastaven (Vandenberg *et al.* 2012).

ED mohou do přirozeného fungování hormonů zasahovat hned na několika úrovních. Mohou narušovat biosyntézu a biodegradaci hormonů, nejčastěji však imitují či blokují endogenní hormony, jejichž funkce je zprostředkovávána jadernými neboli nukleárními receptory (NR).

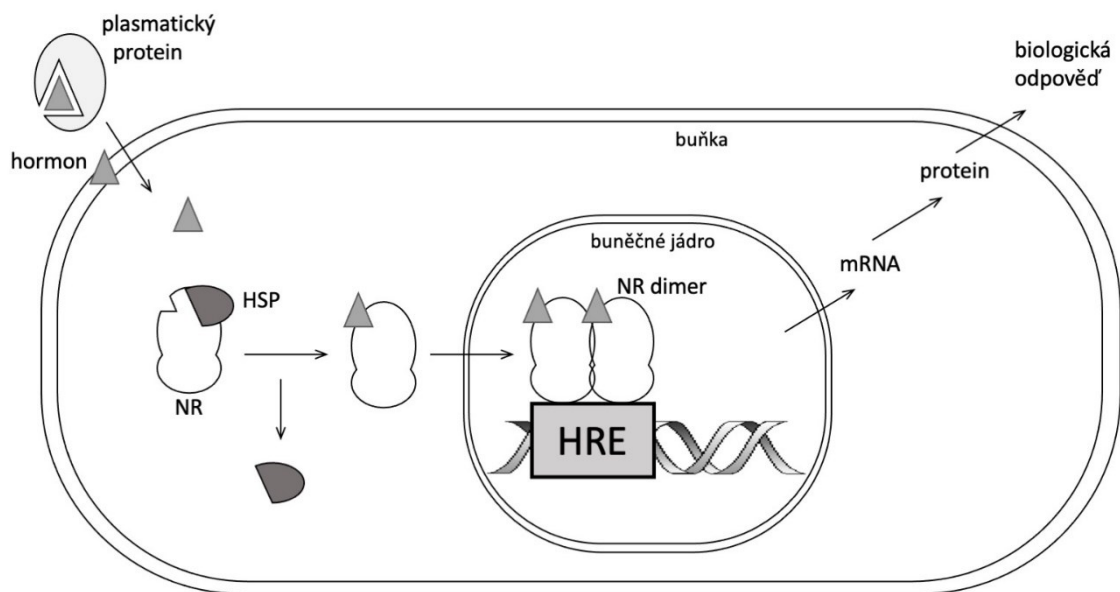
3.1.1 Narušení syntézy steroidních hormonů

Ve steroidogenezi je zapojeno mnoho enzymů ze superrodiny cytochromů P450 (CYP), a to steroidní hydroxylasy a steroidní dehydrogenasy a reduktasy, jejichž míra exprese a aktivita mohou být ovlivněny působením cizorodých látek a celý proces biosyntézy a působení steroidních hormonů tak může být narušen (Sanderson *et al.* 2002; Hilscherová *et al.* 2004; Bláha *et al.* 2006; Nielsen *et al.* 2012). Endokrinní disruptci tedy může způsobit i xenobiotikum, které přímo nenapodobuje účinky hormonů, ale zasahuje do jejich biosyntézy. Narušením funkce aromatasy (CYP19), klíčového enzymu biosyntézy estrogenů, může například docházet k (de)feminizaci, či (de)maskulinizaci u mnoha druhů živočichů (Sanderson 2006) nebo k iniciaci estrogen-dependentního nádorového bujení (Williams a Darbre 2019).

3.1.2 Toxicita zprostředkovaná přes nukleární receptory

ED nejčastěji působí přes NR (Toporova a Balaguer 2020), proteiny z rodiny tzv. ligandem aktivovaných transkripčních faktorů. Jedná se o receptory specializované na malé lipofilní ligandy, které přirozeně zprostředkovávají funkci endogenních hormonů (např. TR, ER, AR), jsou zapojeny do metabolismu xenobiotik (např. konstitutivní androstanový receptor, CAR, z angl. constitutive androstane receptor; pregnanový X receptor, PXR) nebo se podílí na metabolismu lipidů (např. receptory aktivované peroxisomovým proliferátorem, PPAR, z angl. peroxisome proliferator-activated receptor). V lidském genomu bylo identifikováno 48 NR, z nichž polovina je ligand-dependentní (Germain *et al.* 2006). NR jsou proteiny složené z několika strukturně i funkčně odlišných domén, které jsou zodpovědné za aktivační funkci receptoru, a to v závislosti na ligandu (AF-2) či nikoliv (AF-1), translokaci do jádra a vazbu na DNA (DNA-vazebná doména) (Weikum *et al.* 2018).

Mechanismus působení hormonu (ligandu) přes NR je schematicky znázorněn na obrázku 2 (str. 24). Hormon je dopraven k cílové buňce krevním řečištěm vázán na plasmatický protein, do buňky však vzhledem k lipofilní povaze vstupuje volně přes buněčnou membránu. NR jsou v neaktivním stavu buď vázány v cytoplasmě na tzv. proteiny teplotního šoku (HSP, z angl. heat shock protein), nebo jsou lokalizovány v buněčném jádře s navázaným korepresorem. Vazba ligandu na NR způsobí uvolnění HSP či výměnu korepresoru za koaktivátor. Aktivní forma receptoru se pak v buněčném jádře váže jako transkripční faktor ve formě homo- či heterodimeru (v závislosti na typu NR) na hormon-responsivní element (HRE) DNA a spolu s dalšími koregulačními faktory spouští transkripci cílových genů, což vede ke spuštění biologické odpovědi (Grimaldi *et al.* 2015; Weikum *et al.* 2018; Fischer a Smiesko 2019). Tímto tzv. genetickým mechanismem jsou řízeny mnohé procesy v regulaci růstu, reprodukce či metabolismu. Některé proteiny z rodiny NR však mohou regulovat buněčné procesy také přímo v cytoplasmě, a to aktivací kaskády kinas. NR se nacházejí buď volně v cytoplasmě nebo vázány na buněčnou membránu. Tento mechanismus přímo nespouští genovou expresi, jedná se tak o velmi rychlý způsob regulace buněčných procesů prostřednictvím NR. Byl popsán např. u ER a je uplatňován při syntéze oxidu dusnatého při regulaci krevního tlaku či migraci buněk (Fu a Simoncini 2008; Wu *et al.* 2011; Kerdivel *et al.* 2013).



Obrázek 2: Schéma mechanismu působení hormonu přes jaderný receptor. Hormon je krevním řečištěm transportován k buňce navázaný na plasmatický protein. Přes membránu vstupuje volně do buňky. Nukleární receptor (NR) je do té doby v klidovém stavu vázán v komplexu s tzv. proteinem teplotního šoku (HSP). Po vazbě hormonu na NR dochází ke konformační změně a dimerizaci NR. V regulační oblasti cílového genu se pak dimer váže na hormon-responsivní element (HRE) a dochází k jeho transkripci, následné syntéze proteinu a zahájení biologické odpovědi.

3.1.3 Důsledky působení mikropolutantů na hormonální systém

Narušování výše uvedených molekulárních mechanismů xenobiotiky může v konečném důsledku způsobovat mnoho závažných zdravotních problémů u lidí, může mít ale také fatální důsledky pro populace exponovaných živočichů.

3.1.3.1 Endokrinní disruptory a lidské zdraví

ED jsou spojovány se vznikem celé řady chronických onemocnění (Gore *et al.* 2015). Bylo prokázáno, že estrogenní účinky bisfenolu A, který je používán při výrobě plastů, či některých pesticidů, mohou způsobit rakovinu prsu (Shafei *et al.* 2018; Calaf *et al.* 2020). Souvislost mezi zvýšeným rizikem vzniku rakoviny varlat, prostaty a močového měchýře a některými ED z řad pesticidů, PCB a bisfenolů je v mnoha studiích také diskutována (Cargnelutti *et al.* 2021; Pellerin *et al.* 2021). ED (např. ftaláty, triclosan, bisfenol A) také významně snižují plodnost u mužů (Sharma *et al.* 2020) a jsou spojovány s pozdějším nástupem puberty u chlapců (Cargnelutti *et al.* 2021). Naopak

u dívek je nástup puberty v důsledku expozice ED urychlen (Lucaccioni *et al.* 2020). Děti jsou zvláště citlivé vůči nadměrnému působení ED. Nejenže tyto biologicky aktivní molekuly zasahují do procesu pohlavního dospívání, ale zvýšená expozice může u dětí souviset také s rozvojem obezity v pozdějším věku (Iughetti *et al.* 2020). U dospělých jsou účinky ED spojovány s obezitou i vznikem diabetu 2. typu (Chevalier a Fenichel 2015; Darbre 2017) a ukazuje se, že mohou být zapojeny také do rozvoje diabetu 1. typu (Predieri *et al.* 2020).

3.1.3.2 Ekotoxicita endokrinních disruptorů

Endokrinně disruptivní účinky některých pesticidů v minulosti vedly k ohrožení některých druhů ptáků či krokodýlů. Kontaminace insekticidem DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan) a jeho rozkladnými produkty vedla v zasažených oblastech např. ke snížení populace krokodýla amerického. Kromě deformace pohlavních orgánů a narušení spermatogeneze byla narušena také hormonálně řízená syntéza vaječné skořápky, což v konečné důsledku vedlo k jejímu snadnému porušení a úhynu nevyvinutých mláďat (Semenza *et al.* 1997; Guillette *et al.* 2000; Finger a Gogal 2013). Stejné problémy byly pozorovány i u ptáků. Snížení populace orla bělohlavého v oblasti Velkých jezer na pomezí Spojených států a Kanady bylo například spojováno s výskytem metabolitů DDT a PCB a jejich endokrinně disruptivními účinky (Bowerman *et al.* 2000).

Nejen predátoři na vrcholu potravního řetězce jsou ohroženi působením ED. Mikropolutanty ve vodním prostředí mohou ovlivňovat reprodukční schopnosti ryb, žab či měkkýšů. Nejčastěji jsou s výskytem ED v kontaminovaných lokalitách dávány do souvislosti změny poměru mezi samci a samicemi či vývoj pohlavních znaků opačného pohlaví vedoucí ke sterilitě (McAllister a Kime 2003; Orrego *et al.* 2005; Bláha *et al.* 2006; LeBlanc 2007; Mazurová *et al.* 2008). Kidd *et al.* prokázali, že přítomnost syntetického ženského pohlavního hormonu EE2 v koncentraci 5 ng/l způsobila kolaps rybí populace (Kidd *et al.* 2007).

3.2 Detekce endokrinních disruptorů v životním prostředí

Jak již bylo zmíněno, mikropolutanty, označované také termínem „nově se objevující polutanty“, jsou ve větší míře v prostředí detekovány až v posledních dvou dekádách. To však neznamená, že se v životním prostředí nevyskytovaly již dříve, nicméně stanovení nízkých koncentrací, v nichž se typicky vyskytují, umožnily teprve pokroky v instrumentaci analytické chemie, především v oboru kapalinové

chromatografie s hmotnostní detekcí (Noguera-Oviedo a Aga 2016). Přesto je analytický přístup ve většině případů stále zaměřen pouze na kvantifikaci několika předem vybraných chemických látek, a neposkytuje tím pádem celkovou informaci o míře kontaminace v dané lokalitě. Environmentální matrice totiž mohou obsahovat stovky chemických individuí, na které se analýza nezaměřuje, nebo jsou pod hranicí detekčních limitů daných metod. I takové však mohou způsobit nežádoucí toxický efekt. K tomuto účelu mohou lépe posloužit tzv. bioanalytické metody, které sice neposkytnou informaci o přesném zastoupení konkrétních chemických látek, dokáží ale zhodnotit toxické účinky celé směsi v příslušném vzorku.

Studie, které porovnávaly analytické a bioanalytické přístupy, ukazují, že detekční limity bioanalytických metod mohou být až o tři řády nižší než detekční limity analytických metod (Conley *et al.* 2017; Toušová *et al.* 2017). Někteří autoři navíc poukazují na to, že na základě výsledků kvantitativní analýzy v některých případech není možné vysvětlit estrogenní aktivitu detekovanou bioanalytickými nástroji ve vzorcích odtoků z ČOV (Valitalo *et al.* 2016).

Bioanalytické metody také velmi dobře slouží při hodnocení účinnosti odstraňování endokrinních disruptorů či jiných biologicky aktivních látek. Pouhý úbytek chemické látky totiž ještě nedokládá, že byla toxicita snížena. Na příkladu DDT bylo prokázáno, že jeho transformační produkty jsou srovnatelně perzistentní a vykazují stejnou, nebo dokonce vyšší antiandrogenní aktivitu (Kelce *et al.* 1995). Vyšší thyroïdní aktivita transformačního produktu v porovnání s původním polutantem byla detekována také u methyltriclosanu (Hinther *et al.* 2011), který vzniká aerobní transformací triclosanu například v ČOV (Lozano *et al.* 2013).

Ve studiích, které se zabývají odstraňováním polutantů, je pak kombinace analytického přístupu a hodnocení toxického efektu pomocí bioanalytických metod více vypovídací a stále častěji jsou ve studiích uplatňovány oba přístupy (Křesinová *et al.* 2018; Saggiaro *et al.* 2019; Angeles *et al.* 2020). Tato kombinace byla aplikována i v publikaci 4 (Maryšková *et al.* 2021).

3.3 Metody stanovení endokrinně disruptivní aktivity

K detekci endokrinně disruptivních účinků jsou využívány biologické metody, které umožňují sledovat působení ED na celý organismus (*in vivo*) či sledují konkrétní mechanismy působení studované chemické látky na buněčné úrovni (*in vitro*).

Tyto metody mohou sloužit ke sledování aktivity způsobené jednotlivými chemickými látkami nebo definovanou směsí chemických látek, nebo pro detekci aktivity v environmentálních vzorcích, kde není přesné chemické složení známo. Výsledky aktivity v prostředí jsou nejčastěji uváděny formou ekvivalentní koncentrace přirozeného hormonu, který sledovanou aktivitu vyvolává. Proto se například při testování estrogenní aktivity v prostředí můžeme setkat s termínem estradiol ekvivalent, který vyjadřuje, jaké koncentraci E2 detekovaný účinek odpovídá.

3.3.1 *In vivo* testy

Při *in vivo* testech jsou modelové organismy exponovány studované chemické látky, směsí či extraktu environmentálního vzorku v laboratorních podmínkách, nebo jsou studovány organismy exponované přímo na kontaminovaných lokalitách, například u výpusti odtoku z ČOV. Výsledky *in vivo* testů zahrnují komplexní odpověď daného organismu a zohledňují veškeré interakce organismu se studovanou látkou a naopak. Tato skutečnost však může interpretaci sledovaných účinků současně komplikovat. K monitorování endokrinně disruptivních účinků *in vivo* je využíváno několika biomarkerů či vnějších znaků, které se v důsledku expozice ED mění. U vodních živočichů mohou být sledovány změny v sekundárních pohlavních znacích podmíněné (anti)estrogeny či (anti)androgeny. Nejčastěji je pozorován současný výskyt samčích i samičích pohlavních znaků u jednoho jedince. Tento jev byl sledován např. po expozici ryb EE2 (Jackson *et al.* 2019) či plžů bisfenolem A (Oehlmann *et al.* 2007). U samic může být působením estrogenů způsoben také jev tzv. supersamice, který se projevuje nadměrně zvětšenými pohlavními žlázami či malformací vejcovodů (Oehlmann *et al.* 2006). V konečném důsledku všechny tyto poruchy vedou k neplodnosti a následnému ohrožení celé populace.

Biologickým markerem při sledování estrogenní aktivity u ryb *in vivo* může být hladina vitellogeninu, prekursoru proteinu vaječného žloutku. U samců není tento protein syntetizován, avšak v případě, že jsou vystaveni působení estrogenních látek, dochází i u nich k jeho biosyntéze. U samic je míra jeho produkce závislá na době páření, což je nutné při hodnocení zohlednit. Nadměrná syntéza vitellogeninu pak může být kvantifikována buď jako koncentrace proteinu v plasmě (Hansen *et al.* 1998; Nilsen *et al.* 2004), nebo míra exprese mRNA v játrech (Garcia-Reyero *et al.* 2004; Rehberger *et al.* 2020).

Překážky pro testování *in vivo* mohou představovat časová a finanční náročnost těchto studií, poměrně velké nároky na instrumentaci a dále etické aspekty. Testování na zvířatech je totiž stále větším společenským tématem.

3.3.2 Detekce exprimovaných genů

Na pomezí *in vivo* a *in vitro* testů je sledování indukce, nebo naopak represe genové exprese genů zapojených do přirozeného fungování hormonálního systému, či drah energetického metabolismu. Transkripci je možné po expozici kvantifikovat jak na vhodné tkáňové linii, tedy při studiích *in vitro*, tak z tkání živočichů exponovaných v laboratoři či odebraných přímo v prostředí (*in vivo*) (Garcia-Reyero *et al.* 2004). Je tak stanovována například míra indukce či represe transkripce genů pro enzymy steroidogeneze (Hilscherová *et al.* 2004; Bláha *et al.* 2006) nebo již zmiňovaného vitellogeninu. Vliv xenobiotik na metabolismus lipidů je možné sledovat např. změnou exprese genů pro PPAR (Dimastrogiovanni *et al.* 2015).

3.3.3 *In vitro* testy

In vitro toxikologické testy splňují náročné požadavky moderní toxikologie, která klade důraz na rychlost, vysokou kapacitu a finanční efektivitu testů. Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development) vytvořila koncept tzv. drah škodlivých účinků, který v online databázi propojuje toxikologická data s poznatky z biologie. Tento koncept se zaměřuje především na využití testů *in vitro* a *in silico*, které přináší klíčové informace o interakci chemické látky s biologickým systémem. Databáze za sebou pak řadí jednotlivé události, které vedou až ke škodlivému účinku. Pokud je u nové chemické látky detekován stejný způsob interakce s biologickým systémem (*in vitro*, *in silico*) jako u látky, jejíž dráha škodlivého účinku je již charakterizována, lze se domnívat, že působení nové látky povede ke stejnému škodlivému účinku. Databáze má sloužit především jako podklad pro efektivnější a rychlejší rozhodování o restrikcích používání nových chemických látek (Villeneuve *et al.* 2014). Je tedy patrné, že využívání a vývoj *in vitro* testů má v toxikologii své nezastupitelné místo.

In vitro testy využívají několik principů, které je dělí do tří základních kategorií – proliferační testy, testy vazby ligandu na receptor a testy s reportérovými geny (Leusch *et al.* 2017; Li *et al.* 2020).

3.3.3.1 Proliferační testy

Proliferační testy kvantifikují hormonem stimulovanou proliferaci buněk. Je tak možné sledovat např. na buňkách závislých na estrogeneru (linie izolované z karcinomu prsu T47D, MCF-7) estrogenní aktivitu (E-screen) (Soto *et al.* 1995) nebo na nádorových buňkách izolovaných z hypofýzy thyroideální aktivitu (T-screen) (Gutleb *et al.* 2005). Obdoba pro detekci androgenní aktivity (A-screen) naopak sleduje inhibici proliferace v přítomnosti androgenu u linie MCF-7 transfekované androgenním receptorem (Szelei *et al.* 1997). Při porovnání citlivosti jednotlivých testů jsou proliferační testy řazeny mezi ty s nejnižším limitem detekce (Leusch *et al.* 2017).

3.3.3.2 Testy vazby ligandu na receptor

Testy vazby ligandu na receptor jsou založeny na principu sledování vazby radioaktivně značeného ligandu na příslušný receptor. Ten je nejčastěji izolován z tkání obratlovců, ve kterých byla dříve potvrzena aktivita *in vivo* (Leusch *et al.* 2005). Studovaná látka kompetuje s radioaktivně značeným přirozeným ligandem daného receptoru, což umožňuje míru vazby kvantifikovat. Test není limitován vstupem testované látky do buňky a je tak možné sledovat čistě afinitu k receptoru. Nevýhodou však je, že z testu není patrné, jakou odpověď by v organismu látka vyvolala. Agonisty nelze v testu rozeznat od antagonistů, neboť v testu vyvolávají shodnou, pozitivní odpověď (Murk *et al.* 2002). Tyto testy byly vyvinuty např. pro sledování vazby na estrogenní a androgenní receptor (Leusch *et al.* 2006).

3.3.3.3 Testy s reportérovými geny

Významnou část *in vitro* testů tvoří testy s reportérovými geny, které umožňují sledovat hormonální účinky zprostředkované NR. Tyto testy využívají geneticky modifikované organismy (GMO), např. kvasinky či savčí buňky. Pokud buňka stabilně neexprimuje příslušný NR, je do buňky vnesen gen pro jeho expresi. Buňky jsou transfekovány plasmidem s HRE řízeným reportérovým genem, který umožňuje buněčnou odpověď kvantifikovat. Mezi nejvíce používané reportérové geny patří gen pro luciferasu (Legler *et al.* 1999; Wilson *et al.* 2004; Leskinen *et al.* 2005; Sonneveld *et al.* 2005; Bartoňková *et al.* 2015), β -galaktosidasu (Routledge a Sumpter 1996; Gaido *et al.* 1997; Sohoni a Sumpter 1998) či fluorescenční protein (Bovee *et al.* 2011).

Za jednu z nejcitlivějších *in vitro* metod je považována metoda známá jako GeneBLAzer® (Leusch *et al.* 2017). Geneticky modifikované buněčné linie využívané

při této metodě mají namísto NR fúzní protein skládající se pouze z ligand-vazebné domény a DNA-vazebné domény. Po vazbě ligandu se fúzní protein váže na regulační oblast genu pro β -laktamasu, čímž dochází ke spuštění její syntézy. β -laktamasa následně katalyzuje přeměnu zeleně fluoreskujícího substrátu na modře fluoreskující produkt.

GMO kvasinkové testy jsou sice robustnější, ale jejich detekční limity jsou v porovnání s analogickými testy na savčích buňkách řádově vyšší (Bovee *et al.* 2011). Citlivost testů na savčích buněčných liniích s reportérovými geny se naopak citlivostí vyrovnává proliferačním testům (Leusch *et al.* 2017; Cevenini *et al.* 2018). Nutno však podotknout, že testy s reportérovými geny jsou zaměřeny pouze na jeden mechanismus působení ED.

3.3.3.4 CXCL-test

Poznatky o působení hormonů na buněčné úrovni jsou využívány při vývoji nových metod pro detekci ED. Jako alternativa k proliferačnímu testu estrogenní aktivity E-screen byl vyvinut CXCL-test, který detekuje estrogen-dependentní produkci cytokinu CXCL12 u buněčných linií MCF7 a T47D odvozených od karcinomu prsu (Habauzit *et al.* 2010). Tento cytokin je produkován extracelulárně, což umožňuje jeho detekci přímo v kultivačním médiu. Jedná se o test na buněčné linii, který splňuje podmínky vysoké citlivosti a časové i finanční úspory, a přitom není zaměřen pouze na jeden mechanismus působení estrogenů, jako je tomu u testů s reportérovými geny. Estrogenní aktivita byla tímto testem prokázána u bisfenolu AF (Li *et al.* 2015) a u řady benzofenonů, které jsou v kosmetice používány jako ochrana před UV zářením (Habauzit *et al.* 2017). CXCL-testem byla detekována také antiestrogenní aktivita některých léčiv (Ezechiáš *et al.* 2016) a antimikrobiálních látek používaných v produktech ústní hygieny, což je podrobně popsáno v příložené publikaci 2 (Michalíková *et al.* 2019).

CXCL-test je považován za komplexnější metodu stanovení estrogenní aktivity, než jsou metody s reportérovými geny. Ty totiž sledují jen jeden mechanismus působení estrogenu – klasický mechanismus přes regulační oblast ERE (estrogenní HRE). Exprese cytokinu CXCL12 však nemusí být v buňce řízena pouze tímto mechanismem. Existují také mechanismy řízené jinými transkripčními faktory a regulačními oblastmi genu (např. Sp1, AP1) (Boudot *et al.* 2011; Kerdivel *et al.* 2013; Haldosen *et al.* 2014). Pokud by potenciální estrogen narušoval právě tyto regulační mechanismy, nebyl by metodami s reportérovými geny regulovanými ERE vůbec detekován.

Využití neupravené linie však přináší několik nevýhod. Především jde o variabilitu odpovědi buněčné linie, ve které není genetickou úpravou vnesen selekční marker (rezistence na antibiotika), a její stálost tedy nemůže být udržována řízenou selekcí. Stabilita buněčné linie tak může být proměnlivá a reakce buněk na estrogenní látku se může měnit v závislosti na zdroji linie či dalších faktorech. V rámci předkládané publikace 1 byla provedena optimalizace metody CXCL-test, kde byl sledován vliv běžné variability materiálu a způsob provedení testu na jeho výsledek.

4 Výskyt a osud antimikrobiálních látek v životním prostředí

Sledování výskytu antimikrobiálních látek v životním prostředí neukládá žádný zákon, direktiva, vyhláška ani již zmíněný seznam 45 prioritních látek sledovaných dle rámcové směrnice o vodách (Directive 2008/105/EC 2008; Decision 2018/840/EU 2018). Stejně tak pro ně nejsou stanoveny limity v čistírenských kalech, které mohou být aplikovány na zemědělskou půdu (Zákon č. 541/2020 Sb.).

Některé vědecké skupiny však v rámci svých výzkumných projektů mikropolutanty sledují ve větším rozsahu a upozorňují tak na problémy spojené s jejich výskytem. V životním prostředí je nejčastěji sledovaným zástupcem dezinfekčních agens triclosan, jehož toxické účinky a dopad na životní prostředí byly již dříve jasně prokázány (viz kapitola 3). Jsou však publikovány i práce poukazující na výskyt ostatních antimikrobiálních látek, především z řad kvarterních aminů a biguanidů.

4.1 Triclosan

Koncentrace triclosanu v odpadních vodách dosahuje až desetitisíců ng/l (Luo *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2015; Mohan a Balakrishnan 2019) a míra jeho odstranění v ČOV se celosvětově pohybuje mezi 71 a 99 % (Luo *et al.* 2014). Množství odstraněného triclosanu však může také souviset s ročním obdobím – v létě bylo v průběhu čistírenského procesu odstraněno pouhých 31 % triclosanu (Biel-Maeso *et al.* 2019). V kořenové čistírně v České republice byla efektivita čištění na úrovni 62–91 % (Chen *et al.* 2016). Z těchto studií vyplývá, že míra odstranění triclosanu je relativně vysoká a v porovnání s jinými mikropolutanty se dá označit za nadprůměrnou. Přesto však v odtoku z ČOV bývají detekovány až tisíce ng/l triclosanu (Lishman *et al.* 2006; Loos *et al.* 2013; Luo *et al.* 2014; Oliveira *et al.* 2015; Mohan a Balakrishnan 2019).

Mechanismů, kterými je triclosan z životního prostředí zčásti odstraňován, je několik. Bylo prokázáno, že částečně podléhá fotodegradaci (Nakada *et al.* 2008)

a mikrobiální degradaci (Wang *et al.* 2018). V ČOV však dominantně dochází k adsorpci triclosanu (ale i jiných mikropolutantů) na čistírenský kal. Koncentrace triclosanu běžně dosahují tisíců až desetitisíců ng/g kalu (Biel-Maeso *et al.* 2019; Abbott *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2021). Ve studii Butler *et al.* (2012) byl po dobu jednoho roku sledován osud triclosanu přítomného v kalu (22 mg/kg) po jeho aplikaci na několik typů zemědělských půd. Ve všech půdách byl triclosan i jeho transformační produkt methyltriclosan detekován i v nejhlubší sledované vrstvě (20–30 cm). Navíc většina odstraněného triclosanu byla přeměněna právě na methyltriclosan, který v půdě i nadále perzistoval.

4.2 Chlorhexidin

Významným zdrojem chlorhexidinu v prostředí jsou odpadní vody z nemocničních zařízení, kde je až 25 % všech používaných dezinfekčních přípravků právě na bázi tohoto biguanidu (Ioannou *et al.* 2017). Již v 80. letech byla jeho koncentrace v nemocniční odpadní vodě až dvojnásobná (10,3 mg/l) v porovnání s vodou z domácností (4,5 mg/l) (Kodama *et al.* 1988). Novější švédské studie ukazují, že se chlorhexidin vyskytoval ve všech analyzovaných odpadních vodách, a to až v množství 2 368 ng/l (Ostman *et al.* 2017). Tato studie zároveň uvádí, že maximální detekované množství v odtoku z ČOV bylo pouze 33 ng/l. Chlorhexidin byl však z vody odstraněn pouze adsorpcí na čistírenský kal, ve kterém bylo detekováno až 19 000 ng/g. Adsorpci, jako způsob odstranění chlorhexidinu z vody v ČOV, dokládá i další práce (Ostman *et al.* 2018). Na výskyt tohoto mikropolutantu v odpadních i přečištěných vodách se také zaměřila studie Lasek *et al.* (2019). Ve vodě přitékající do ČOV z nemocničního areálu bylo detekováno až 97 000 ng/l. Autoři však v tomto případě nezaznamenali výrazný úbytek chlorhexidinu, neboť koncentrace ve vodě odtékající z čistírny dosahovala i 60 000 ng/l.

4.3 Kvarterní aminy

Výskyt cetylpyridinu v odpadních vodách, ale také v říční vodě, byl potvrzen ve studii Shrivasa a Wu (2007). Detekované koncentrace cetylpyridinu dosahovaly v odpadní vodě 88 000 ng/l a v povrchové vodě 52 000 ng/l. Ostman *et al.* (2017) uvádí o několik řádů nižší koncentrace ve vodách přitékajících do ČOV (max. 374 ng/l) a koncentrace v odtoku z ČOV nepřesahující 5 ng/l, avšak koncentrace v kalu dosahovala až 2 500 ng/g. Cetylpyridin je v ČOV odstraňován částečně mikrobiální degradací, ale především pak adsorpcí na kal (Ostman *et al.* 2017; Ostman *et al.* 2018). Podobné závěry přináší také

modelová studie Nguyen a Oh (2019), ve které byl v laboratorních podmínkách sledován úbytek cetylpyridinu po aplikaci na aktivovaný kal. Úbytek byl sledován u dvou iniciačních koncentrací, 50 000 a 500 000 ng/l. Po 42 dnech bylo odstraněno > 60 %. V práci je sice uvažována částečná biodegradace cetylpyridinu, za hlavní mechanismus odstranění z vody je však považována adsorpce na aktivovaný kal. Ta je diskutována i v souvislosti s jinými antimikrobiálními agens ze skupiny kvarterních aminů (DeLeo *et al.* 2020).

Výskyt a osud octenidinu v životním prostředí prozatím nebyl monitorován, nebo při nejmenším nebyl detekován, ačkoliv práce Ioannou *et al.* (2017) uvádí, že dezinfekčních přípravků na bázi octenidinu je v nemocničním prostředí využíváno až z 82 %.

4.4 Terpeny

Terpeny používané jako dezinfekční agens jsou do skupiny sledovaných mikropolutantů v odpadních vodách v některých studiích zahrnuty také. Výskyt thymolu byl zaznamenán v odpadních vodách v koncentraci desítek až stovek ng/l (Nakada *et al.* 2006; Nakada *et al.* 2007; Nakada *et al.* 2008). Další studie prokázala, že v ČOV bylo odstraněno průměrně 95 % thymolu, převážně prostřednictvím mikrobiální degradace (Nakada *et al.* 2006). Autoři zároveň uvádí, že adsorpce na částice kalu je zanedbatelná, svou úlohu navíc sehrává také vysoká těkavost tohoto terpenu. Allinson *et al.* (2012) v odtoku z ČOV detekovali thymol v jednotkách, ve výjimečných případech až desítkách ng/l.

Mentol byl analyzován v rámci kampaně sledující vonné látky v odpadních vodách v Německu, přičemž byla zaznamenána koncentrace přesahující 15 000 ng/l, přečištěná voda pak obsahovala < 37 ng/l (Klaschka *et al.* 2013). Jiné studie uvádí v odpadních vodách o něco nižší koncentrace, konkrétně 5 400 ng/l (Escalas *et al.* 2003) a 1 400 ng/l (Lee a Rasmussen 2006). Escalas *et al.* (2003) sledovali větší skupinu těkavých organických látek ve vodách na přítoku do ČOV, z nichž 23 % patřilo mezi terpeny. Eukalyptolu bylo v odpadní vodě detekováno 2 800 ng/l a koncentrace limonenu dosahovala až 4 000 ng/l. Godayol *et al.* (2015) poukazují na to, že primárním čištěním limonen sice nebyl odstraněn, avšak po sekundárním čištění ho již nebylo možné ve vodě detekovat. V několika studiích byla prokázána přítomnost limonenu v čistírenském kalu (Lehtinen a Veijanen 2011; Kotowska *et al.* 2012; Fisher *et al.* 2017) a také v povrchové vodě, kde se koncentrace pohybovaly maximálně v desítkách ng/l (Alvarez *et al.* 2014).

5 Degradabilita antimikrobiálních látek

Jak je patrné z předchozí kapitoly, míra odstraňování antimikrobiálních látek ze životního prostředí není vyhovující. Detekci těchto látek se věnuje jen málo studií. Pokud je však jejich výskyt v životním prostředí sledován, je ve většině případů také potvrzen.

5.1 Fyzikálně-chemické metody

Aktuální přehledný článek Rout *et al.* (2021), který shrnuje míru odstranění široké škály mikropolutantů (hormonální látky, ED, biocidy, léčiva), uvádí, že se míra odstranění mikropolutantů při sekundárním čištění pohybuje v rozmezí 30–70 %. Jelikož je účinnost odstraňování mikropolutantů pomocí aktivovaného kalu v rámci druhého stupně čištění odpadních vod nevyhovující, jsou intenzivně studovány možné způsoby terciálního kroku dočištění. V současné době se jedná především o možnosti využití aktivního uhlí či pokročilých oxidačních metod (Margot *et al.* 2013; Angeles *et al.* 2020; Kosek *et al.* 2020). Jen výjimečně se ale vyskytují práce, které by do skupiny sledovaných mikropolutantů zařadily kromě triclosanu i jinou antimikrobiální látku. Neves *et al.* (2020) se zabývali porovnáním účinnosti odstranění cetylpyridinu z vody při použití oxidu grafenu a jiných adsorpčních materiálů vč. aktivního uhlí, přičemž poukázali na výrazně vyšší sorpční kapacitu oxidu grafenu.

Při odstraňování mikropolutantů z pevných matric jsou testovány například metody biosušení či pyrolýza, u kterých efektivita v případě kontaminovaného kalu činí až 100 % (Bean *et al.* 2016; Pilnáček *et al.* 2019; Moško *et al.* 2021). Jen výjimečně se ale vyskytují studie, které by do skupiny sledovaných mikropolutantů zařadily antimikrobiální látky. Ukázalo se, že účinnost odstranění triclosanu v řádu jednotek mg/kg při 300 °C byla po 60 minutách 100 % a během pěti minut při teplotě 500 °C bylo odstraněno > 90 % (Ross *et al.* 2016). Cetylpyridin vázaný v organojílu byl stabilní až do teploty 400 °C (Koh *et al.* 2005), samostatně však testován nebyl, stejně jako ostatní antimikrobiální látky, jimiž se tato práce zabývá.

5.2 Biodegradační metody

Intenzivně studované jsou také biodegradační metody, které jsou šetrnější k životnímu prostředí a v porovnání s fyzikálními metodami bývá jejich finanční náročnost obvykle výrazně nižší. Navíc bylo již v mnoha studiích prokázáno, že některé

mikroorganismy dokáží v rámci svého metabolismu, či kometabolicky odstraňovat velkou škálu polutantů a v některých případech jsou polutanty schopny i mineralizovat.

Ze skupiny antimikrobiálních látek je nejlépe popsána mikrobiální biodegradace triclosanu. Když byl v degradačním experimentu pro inokulaci použit aktivovaný kal, byl triclosan odstraněn v rámci desítek hodin, zároveň ale vznikal problematický transformační produkt methyltriclosan (Armstrong *et al.* 2018). Zhou *et al.* (2013) sledovali degradační schopnosti bakterií izolovaných z čistírenského kalu a ukázali, že se jejich účinnost při degradaci triclosanu velmi liší. Charakterizovali sice kmeny, které odstranily 100 % triclosanu, některé ale nebyly schopny tento polutant odstranit vůbec. Podobný přístup, tedy využití čistírenského kalu, byl zvolen i při studiu biodegradace cetylpyridinu. Nguyen a Oh (2019) ukázali, že nejvýznamnější podíl na odstranění měla adsorpce, zaznamenali však i částečnou biologickou degradaci, a to především v přítomnosti bakterií rodu *Rhodobacter* a *Asticcacaulis*. Velmi podobné výsledky byly pozorovány při degradaci chlorhexidinu, kdy ubylo až 81 % počátečního množství, avšak více než 70 % z odstraněného chlorhexidinu autoři přičítají adsorpci na kalové částice. Na samotné biodegradaci se pak podílely nejvíce bakterie čeledí Comamonadaceae a Flavobacteriaceae (Keerthisinghe *et al.* 2019). Biodegradační potenciál byl také zaznamenán u bakterie rodu *Pseudomonas* sp. kmen A-3 izolované přímo z čistírenského kalu. Degradace nebyla v daných studiích kvantifikována, autoři však charakterizovali dva degradační produkty chlorhexidinu (Uyeda *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 2005; Tanaka *et al.* 2006). Pokud měla tato bakterie chlorhexidin jako jediný zdroj dusíku, došlo dle autorů k jeho kompletní degradaci (Kido *et al.* 1988). Při studiu vlivu chlorhexidinu na bakteriální komunity ve vzorcích říční vody nebyla jeho mineralizace vůbec pozorována (Dynes *et al.* 2006; Lawrence *et al.* 2008).

5.3 Ligninolytické houby a jejich enzymy

Významným modelovým organismem při studiu biodegradability polutantů jsou ligninolytické houby, označované také jako houby bílé hniloby. Toto označení pochází ze vzhladu houbou napadeného dřeva. Ligninolytické houby totiž rozkládají tmavý lignin a zbývající celulóza dává napadenému dřevu bílou barvu. Lignin je polymer skládající se z několika typů aromatických monomerních jednotek, které se ve struktuře nepravidelně střídají. Z těchto důvodů mají extracelulárně produkované ligninolytické enzymy, jimiž houby lignin rozkládají, velmi širokou substrátovou specifitu a mohou účinně rozkládat i jiné aromatické struktury. Patří mezi ně některé peroxidasy a fenoloxidas lakasa, jimž budou věnovány samostatné kapitoly (5.3.1 a 5.3.2). Glyoxaloxidasa (EC 1.2.3.5) a arylalkoholoxidasa (EC 1.1.3.7) jsou pak spolu s dalšími enzymy produkovány ligninolytickými houbami jako pomocné enzymy, které generují H_2O_2 nutný pro funkci peroxidasy (Tuor *et al.* 1995; Janusz *et al.* 2017).

5.3.1 Peroxidasy

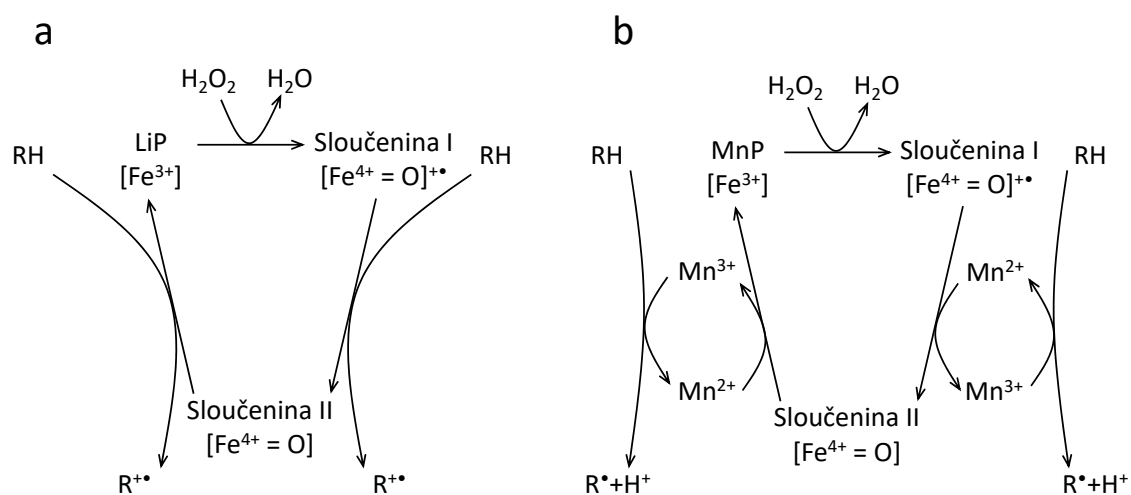
Ligninperoxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidasa (MnP; 1.11.1.13) a versatilní peroxidasa (VP; 1.11.1.16) jsou peroxidasy ligninolytických hub, které se přímo účastní rozkladu ligninu a všechny patří do superrodiny tzv. hemových peroxidasy.

LiP byla poprvé objevena u houby *Phanerochaete chrysosporium* (Tien a Kirk 1983), je však produkována celou řadou dalších ligninolytických hub a byla detekována také u některých bakterií (Janusz *et al.* 2017). Vyznačuje se neobvykle nízkým pH optimum (pH 3) (Wong 2009) a má vysoký oxidačně-redukční potenciál, což jí umožňuje oxidovat i substráty, které nemohou být oxidovány jinými peroxidasami (Sigoillot *et al.* 2012). Katalytický cyklus je naznačen na obrázku 3a (str. 37). Nativní stav LiP je oxidován peroxidem vodíku za vzniku kation radikálového meziprojektu, tzv. sloučeniny I, a vody. Sloučenina I je následně ve dvou krocích přes sloučeninu II redukována zpět do nativního stavu enzymu, přičemž postupně v každém kroku oxiduje jednu molekulu substrátu za vzniku kation radikálového produktu (Wong 2009).

MnP byla detekována u *P. chrysosporium* (Glenn a Gold 1985) a produkuje ji mnoho dalších ligninolytických hub či některé bakterie (Janusz *et al.* 2017). Katalytický cyklus MnP (obrázek 3b, str. 37) je velmi podobný LiP, avšak MnP využívá kation Mn^{2+} jakožto redukční substrát, jehož prostřednictvím následně dochází k přeměně

organického substrátu. V prvním kroku je nativní MnP oxidována peroxidem vodíku na sloučeninu I, která je následně ve dvou krocích redukována přes sloučeninu II zpět do nativního stavu, jako je tomu u LiP. Jako donor elektronu však v každém zmíněném kroku slouží kation Mn^{2+} . Vzniká tak vysoce reaktivní Mn^{3+} , který je následně v komplexu se stabilizujícími karboxylovými kyselinami z enzymu disociován, difunduje do lignocelulosové struktury a působí jako nízkomolekulární mediátor schopný oxidovat širokou škálu organických substrátů. Radikál substrátu, který takto vznikne, podléhá dalším, již neenzymatickým, reakcím (Hofrichter 2002; Wong 2009; Janusz *et al.* 2017).

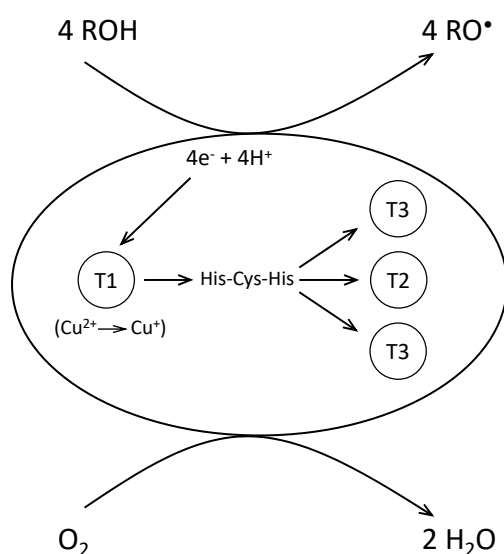
VP je hybridem mezi LiP a MnP. V proteinové struktuře se nachází vazebné místo jak pro aromatický substrát (podobnost s LiP), tak vazebné místo pro Mn^{2+} (podobnost s MnP). VP je tak schopna jednak oxidovat aromatické substráty za vzniku příslušných radikálů, a jednak dokáže v přítomnosti Mn^{2+} generovat reaktivní Mn^{3+} (Ruiz-Duenas *et al.* 1999).



Obrázek 3: Katalytický cyklus (a) ligninperoxidasy (LiP) a (b) mangan-dependentní peroxidasy (MnP). Oba enzymy jsou v nativním stavu oxidovány peroxidem vodíku za vzniku kation radikálu, tzv. sloučeniny I. Ta je v prvním kroku redukována na sloučeninu II, přičemž dochází k (a) oxidaci substrátu (RH) a vzniku příslušného kation radikálu ($R^{••}$), nebo (b) oxidaci Mn^{2+} na Mn^{3+} , který je z enzymu v chelatované formě uvolněn a oxiduje substrát RH na příslušný radikál (R^{\bullet}). V druhém kroku sloučenina II oxiduje (a) druhou molekulu RH či (b) druhý kation Mn^{2+} a vrací se tak do nativního stavu. Upraveno dle Abdel-Hamid *et al.* (2013).

5.3.2 Lakasa

Fenoloxidasa lakasa (EC 1.10.3.2) byla poprvé popsána již na konci 19. století u japonského stromu *Rhus vernicifera* (Yoshida 1883) a až následně byla objevena u hub (Bertrand 1896) a bakterií (Suzuki *et al.* 2003). Pro lakasy je charakteristická přítomnost dvoumocných iontů mědi v reakčním centru, což je řadí do rodiny tzv. multi-copper oxidas. Čtyři ionty Cu^{2+} jsou rozděleny do dvou reakčních center (obrázek 4). V prvním centru (místo T1) je vázán jeden ion Cu^{2+} (typ-1). Druhé centrum T2/T3 se skládá z vazebného místa T2 (váže jeden Cu^{2+} typ-2) a dvou vazebných míst T3 (váží po jednom Cu^{2+} typ-3). Jednotlivé typy Cu^{2+} se liší svými spektroskopickými vlastnostmi. Na reakčním centru T1 dochází postupně k oxidaci 4 molekul fenolického substrátu za vzniku jejich příslušných radikálů. Elektrony jsou následně distribuovány prostřednictvím aminokyselin His-Cys-His na T2/T3 klastr. Cu^{2+} jsou tak na všech čtyřech vazebných místech redukovány na Cu^+ a enzym se tak dostává do plně redukované formy. Následně je na centrum T2/T3 vázán molekulární kyslík a ve dvou krocích vnikají postupně dvě molekuly vody (Baldrian 2006; Wong 2009; Mot a Silaghi-Dumitrescu 2012).



Obrázek 4: Katalytický cyklus lakasy. Lakasa na prvním reakčním centru (T1) postupně oxiduje čtyři molekuly fenolického substrátu (ROH) za vzniku příslušných radikálů. Získané elektrony jsou postupně distribuovány prostřednictvím aminokyselinové sekvence His-Cys-His i na druhé reakční centrum T2/T3, čímž jsou všechny čtyři Cu^{2+} kationty redukovány na Cu^+ . Plně redukováný enzym následně váže molekulový kyslík, dochází k jeho čtyřelektronové redukci za vzniku dvou molekul vody a návratu enzymu zpět do nativního stavu. Upraveno dle Baldrian (2006).

5.4 Degradální potenciál ligninolytických hub a enzymů

U ligninolytických hub a jejich enzymů bylo již mnohokrát prokázáno, že mají schopnost degradovat velmi širokou škálu organických polutantů. Jak bude rozvedeno v následujících kapitolách, v experimentech s houbovými kulturami (*in vivo*) a také *in vitro* s izolovanými enzymy byla sledována účinná degradace i těch nejvíce rekalcitrantních polutantů. Z tohoto důvodu jsou houby bílé hniloby považovány za vynikající modelový organismus biodegradálních studií.

5.4.1 Studie *in vivo*

Ve studii Čvančarová *et al.* (2012) byl testován potenciál osmi hub bílé hniloby degradovat komerční směs PCB Delor 103. Po šesti týdnech inkubace *in vivo* byly PCB degradovány všemi vybranými zástupci ligninolytických hub. Nejlepších výsledků (úbytek 99,6 % PCB) bylo dosaženo v případě inkubace s houbou *Pleurotus ostreatus*, jejíž schopnost efektivně odstraňovat PCB byla potvrzena i v pilotní studii s reálně kontaminovanou vodou (Šrédlová *et al.* 2020) či půdou (Siracusa *et al.* 2017). V dalších degradačních studiích bylo prokázáno, že houba *P. chrysosporium* mineralizuje výbušninu hexanitrohexaazaisowurtzitan, známou také jako CL-20 (Karakaya *et al.* 2009). Vysoký potenciál degradovat chlorbenzoové kyseliny byl pozorován u hub *Irpex lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus* a *Dichomitus squalens*, které byly schopny některé chlorbenzoové kyseliny zcela eliminovat již po sedmi dnech inkubace (Muzikář *et al.* 2011). Houby bílé hniloby degradovaly *in vivo* také PAU (Covino *et al.* 2010), EE2 (Křesinová *et al.* 2012), plastifikátory (Cajthaml *et al.* 2009), syntetická barviva (Novotný *et al.* 2004) či nejtoxičtější organický polutant 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (Dao *et al.* 2019).

5.4.2 Studie *in vitro*

Studie *in vitro* ukazují, že mnohá xenobiotika mohou být degradována ligninolytickými enzymy. MnP izolované z hub *Lentinus tigrinus* či *I. lacteus* efektivně transformovaly vybrané PAU (Baborová *et al.* 2006; Covino *et al.* 2010). VP izolovaná z houby *Bjerkandera adusta* zcela odstranila ze směsi estrogenů a léčiv během několika minut estrogeny a diclofenac, 80% odstranění bylo dosaženo u sulfamethoxazolu a naproxenu, některá další léčiva byla však degradována jen velmi málo a carbamazepin nebyl degradován vůbec (Eibes *et al.* 2011). Úplného odstranění EE2 bylo dosaženo v *in vitro* studii s koncentrovanou extracelulární tekutinou získanou z kultury *P. ostreatus*

(Křesinová *et al.* 2012). Detekcí transformačních produktů estrogenních hormonů vč. syntetického EE2 byla potvrzena také účinnost lakasy získané z *Trametes versicolor* při degradaci mikropolutantů (EE2, bisfenoly A a S) (Beck *et al.* 2018).

5.4.3 Degradace mikropolutantů v reálných matricích

Účinnost ligninolytických enzymů při odstraňování směsí mikropolutantů byla prokázána i v reálných matricích a pilotních studiích. Až 95 % přítomných ED bylo odstraněno z vody získané na odtoku z ČOV, když byla 24 hodin v laboratorních podmínkách zadržována v reaktoru inokulovaném vyplozeným substrátem *P. ostreatus* s vysokou lakasovou aktivitou. Zároveň byla sledována úplná eliminace estrogenní aktivity. V poloprovozním reaktoru na lokalitě došlo až k 76% degradaci ED (Křesinová *et al.* 2018). ED byly také efektivně odstraněny (27–99 %) z reálné odpadní vody při použití tzv. enzymového membránového reaktoru naplněného VP (Taboada-Puig *et al.* 2015). Rovněž byly při eliminaci ED z reálných vod testovány technologie umožňující imobilizaci enzymů na nanovláčkové membrány. Jejich částečná účinnost (18–74 %) byla prokázána při imobilizaci lakasy na polyamid/polyethylenimin ve studii Maryšková *et al.* (2020).

Při posuzování, zda jsou ligninolytické enzymy potenciálně vhodné pro degradaci xenobiotik, je také důležité uvažovat jejich stabilitu a aktivitu v reálných podmínkách. Jednou z důležitých výhod ligninolytických enzymů je jejich relativně vysoká stabilita. V mnoha degradačních studiích *in vitro* bylo ukázáno, že i po několika dnech při laboratorní teplotě jsou ligninolytické enzymy stabilní a stále aktivní (Covino *et al.* 2010; Šrédlová *et al.* 2021), což bylo potvrzeno také v publikaci 3 (Linhartová *et al.* 2020). V předkládané publikaci 4 (Maryšková *et al.* 2021) byla kromě teplotní a časové stability testována aktivita enzymů s vysokým biodegradačním potenciálem (lakasa z *T. versicolor* a peroxidasa z *Armoracia rusticana* – křenové peroxidasy) v různých matricích (pufry lišící se hodnotou pH, deionizovaná voda, kohoutková voda a odpadní voda po druhém stupni čištění v ČOV). Navíc byl sledován vliv podmínek nejen na samotnou aktivitu enzymů, ale také na jejich degradační potenciál. V testu byly sledovány čtyři ED vč. antimikrobiálního triclosanu. Ukázalo se, že ačkoliv jsou některé matrice pro aktivitu enzymu nevýhodné, dané enzymy jsou i přesto schopné odstraňovat sledované ED velmi efektivně. Pouze u odpadní vody efektivita odstranění ED výrazně vzrostla (na 93 %) teprve po přidavku 2,5% fosfát-citrátového pufru.

5.4.4 Degradabilita antimikrobiálních látek

V rámci degradačních studií je do skupiny ED často řazena i antimikrobiální látka triclosan. Ligninolytické houby prokázaly schopnost triclosan degradovat, což dokládají jak výsledky *in vivo* degradačních testů, tak mnoho *in vitro* studií s izolovanými ligninolytickými enzymy.

Po inkubaci triclosanu s *T. versicolor* a *P. cinnabarinus* byly identifikovány jeho transformační produkty a zároveň bylo sledováno snížení akutní toxicity (Hundt *et al.* 2000). Triclosan byl také během čtrnáctidenní kultivace zcela odstraněn sedmi houbami bílé hniloby a současně bylo sledováno snížení estrogenní aktivity (Cajthaml *et al.* 2009). Ve studii *in vivo* však musely být zohledněny jeho antimikrobiální vlastnosti a experimentální koncentrace musela být oproti jiným látkám snížena. Cytotoxickým působením studovaných látek však nejsou omezeny *in vitro* experimenty s izolovanými enzymy. V rámci publikace 4 (Maryšková *et al.* 2021) a v mnoha dalších bylo prokázáno, že je triclosan ligninolytickými enzymy velmi efektivně odstraňován již během několika hodin (Cabana *et al.* 2007; Asgher *et al.* 2016). Některé studie dokládají, že je míra jeho odstranění ligninolytickými enzymy vyšší než 95 % (Ramirez-Cavazos *et al.* 2014; Melo *et al.* 2016).

Degradabilita chlorhexidinu a octenidinu byla studována v rámci předkládané publikace 3 (Linhartová *et al.* 2020). V *in vivo* experimentech s houbou *I. lacteus* bylo původní množství chlorhexidinu (3 µg/ml) sníženo během 21 dnů až o 70 %, maximální úbytek octenidinu (původní koncentrace 2 µg/ml) byl 48 %. V případě octenidinu však byla pozorována výrazná sorpce na mycelium, která musela být při interpretaci výsledků zohledněna. *In vitro* bylo izolovanými enzymy odstraněno maximálně 41 % chlorhexidinu (původní koncentrace 5 µg/ml) a 23 % octenidinu (původní koncentrace 5 µg/ml). V případě *in vitro* inkubace s lakasou nebyl octenidin odstraněn vůbec. Schopnost ligninolytických hub transformovat chlorhexidin a octenidin však byla prokázána identifikací transformačních produktů obou sledovaných látek. Jen částečné odstranění těmito efektivními biodegradačními nástroji svědčí o silně rekalcitrantním charakteru octenidinu a chlorhexidinu.

6 Cíle disertační práce

Tato disertační práce se zabývá málo prozkoumanou skupinou látek, které se ve velké míře využívají pro své antimikrobiální účinky v produktech osobní péče a péče o domácnost. Do životního prostředí jsou však vypouštěny bez jakéhokoliv omezení, není zde sledován jejich osud a jejich subletální toxicita téměř není popsána. Výběr antimikrobiálních látek v této práci byl úzce zaměřen na účinné látky používané v produktech ústní hygieny, tedy především v zubních pastách a ústních vodách. Tato disertační práce se zaměřila na studium jejich endokrinně disruptivní účinků a jejich degradability.

Dílčí cíle práce byly:

1. Optimalizace metody CXCL-test vhodné pro hodnocení estrogenních a antiestrogenních vlastností xenobiotik (publikace 1).
2. Hodnocení (anti)estrogenní a (anti)androgenní aktivity devíti antimikrobiálních látek běžně používaných v produktech ústní hygieny, a to s využitím testů *in vitro* na kvasinkových modelech (*Saccharomyces cerevisiae* BMAERE_{luc}/ER α a *S. cerevisiae* BMAERE/AR) a testů využívajících vhodné lidské buněčné linie (T47D v metodě CXCL-test, AIZ-AR) (publikace 2).
3. Studium degradability dvou vybraných antimikrobiálních látek obsažených v zubních pastách, u kterých byly v rámci publikace 2 prokázány endokrinně disruptivní účinky. V experimentech *in vivo* a *in vitro* byly jako modelové organismy použity ligninolytické houby (*I. lacteus* a *P. ostreatus*) a jejich enzymy (MnP a lakasa), u nichž byl již dříve prokázán vynikající degradační potenciál (publikace 3).
4. Studium vhodných podmínek pro aktivitu a stabilitu biotechnologicky perspektivních enzymů lakasy z *T. versicolor* a peroxidasy z *A. rusticana* a jejich účinnost při degradaci antimikrobiální látky triclosan a dalších endokrinně disruptivních látek v reálných matricích (publikace 4).

7 Závěry

Disertační práce byla zaměřena na hodnocení endokrinně disruptivních vlastností a degradability skupiny devíti antimikrobiálních látek, které jsou používány v produktech ústní hygieny.

V publikaci 1 byl optimalizován CXCL-test, který je založen na estrogen-dependentní sekreci cytokinu CXCL12 buňkami karcinomu prsu (T47D) a je používán pro identifikaci a detekci estrogenních látek. Vzhledem k tomu, že tento test využívá neupravenou buněčnou linii, je citlivý na variabilitu použitého materiálu či změny v provedení testu v rámci mezilaboratorního srovnání. Bylo prokázáno, že nejen buňky stejné linie získané z jiného zdroje, ale také další materiál (médiu, sérum aj.) či způsob provedení testu signifikantně ovlivňují množství sekretovaného cytokinu, a mají tak vliv na výsledek testu. Podrobně jsou aspekty ovlivňující citlivost testu diskutovány v publikaci 1.

U látek cetylpyridin, octenidin a thymol byly identifikovány antiestrogenní účinky prostřednictvím kvasinkového testu (*S. cerevisiae* BMAERE_{luc}/ER α). Tyto výsledky byly potvrzeny také na lidské tkáňové linii (T47D, CXCL-test), přičemž byl k těmto látkám jako antiestrogen zařazen také chlorhexidin. U octenidinu a cetylpyridinu byly prokázány také antiandrogenní účinky na upravené lidské tkáňové linii (AIZ-AR), na kvasinkovém testu (*S. cerevisiae* BMAERE/AR) byly kromě nich jako antiandrogeny identifikovány také thymol a mentol. Žádná ze zmíněných látek nebyla agonistou ER či AR. U hexetidinu, limonenu, sanguinarinu a eukalyptolu nebyly detekovány žádné (anti)estrogenní ani (anti)androgenní vlastnosti. Nakonec tedy byly endokrinně disruptivní vlastnosti prokázány u pěti z devíti testovaných látek. Výsledky jsou podrobně diskutovány v publikaci 2.

Degradabilita chlorhexidinu a octenidinu byla studována s využitím modelových organismů (ligninolytických hub *I. lacteus* a *P. ostreatus*) v podmínkách *in vivo* nebo s jejich extracelulárními enzymy (MnP a lakasa) *in vitro*. Experimenty s houbovými kulturami poukázaly na podstatnou sorpci octenidinu na mycelium, ve studii s extracelulárními enzymy již tento fenomén sledován nebyl. V *in vivo* experimentech s houbami *P. ostreatus* a *I. lacteus* byl po 21 dnech pozorován 57–70% úbytek chlorhexidinu a 35–48% úbytek octenidinu. Po 8 dnech *in vitro* inkubace s koncentrovanými extracelulárními enzymy bylo odstraněno pouze 28–41% chlorhexidinu a octenidin byl odstraněn z 23 %, či vůbec. Zapojení extracelulárních

enzymů ligninolytických hub do transformace těchto dvou antimikrobiálních látek však bylo potvrzeno identifikací transformačních produktů. Skutečnost, že byly antimikrobiální látky chlorhexidin a octenidin těmito modelovými organismy odstraněny jen částečně, či vůbec, však ukazuje na jejich recalcitrantní charakter. Výsledky jsou podrobně presentovány a diskutovány v publikaci 3.

Následně byl studován vliv matrice a reakčních podmínek na aktivitu dvou enzymů s vysokým bioremediačním potenciálem (lakasa z *T. versicolor* a peroxidasa z *A. rusticana*) spolu s jejich schopností degradovat antimikrobiální látku triclosan a několik dalších ED (EE2, bisfenol A, diclofenac). Bylo prokázáno, že ačkoliv nebyly enzymy v různých matricích (pufry, deionizovaná voda, kohoutková voda a odpadní voda po druhém stupni čištění v ČOV) vystaveny ideálním podmínkám, byly přesto schopny velmi efektivně odstranit sledované ED. Pouze u odpadní vody efektivita výrazně vzrostla až po přidavku 2,5% fosfát-citrátového pufru. Tyto výsledky jen potvrzují vysoký bioremediační potenciál těchto dvou enzymů a podrobně jsou uvedeny v publikaci 4.

8 Literatura

- Abbott T, Kor-Bicakci G, Islam MS, Eskicioglu C (2020) A Review on the Fate of Legacy and Alternative Antimicrobials and Their Metabolites during Wastewater and Sludge Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 9241 doi: 10.3390/ijms21239241
- Abdel-Hamid AM, Solbiati JO, Cann IKO (2013) Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82: 1–28 doi: 10.1016/b978-0-12-407679-2.00001-6
- Abe Y, Okazaki Y, Dainobu K, Matsuo K, Ishida H, Tsuga K (2020) Antimicrobial effects of viscous mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and isopropyl methylphenol. *American Journal of Dentistry* 33: 235–238
- Allinson M, Kageyama S, Nakajima D, Kamata R, Shiraishi F, Goto S, Salzman SA, Allinson G (2012) A pilot survey of 39 Victorian WWTP effluents using a high speed luminescent umu test in conjunction with a novel GC-MS-database technique for automatic identification of micropollutants. *Water Science and Technology* 66: 768–774 doi: 10.2166/wst.2012.242
- Alvarez DA, Maruya KA, Dodder NG, Lao WJ, Furlong ET, Smalling KL (2014) Occurrence of contaminants of emerging concern along the California coast (2009-10) using passive sampling devices. *Marine Pollution Bulletin* 81: 347–354 doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.04.022
- Angeles LF, Mullen RA, Huang IJ, Wilson C, Khuniar W, Sirotkin HI, McElroy AE, Aga DS (2020) Assessing pharmaceutical removal and reduction in toxicity provided by advanced wastewater treatment systems. *Environmental Science-Water Research & Technology* 6: 62–77 doi: 10.1039/c9ew00559e
- Armstrong DL, Lozano N, Rice CP, Ramirez M, Torrents A (2018) Degradation of triclosan and triclocarban and formation of transformation products in activated sludge using benchtop bioreactors. *Environmental Research* 161: 17–25 doi: 10.1016/j.envres.2017.10.048
- Asgher M, Ramzan M, Bilal M (2016) Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL-04. *Chinese Journal of Catalysis* 37: 561–570 doi: 10.1016/s1872-2067(15)61044-0
- Baborová P, Möder M, Baldrian P, Cajthamlová K, Cajthaml T (2006) Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology* 157: 248–253 doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.001
- Baldrian P (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews* 30: 215–242 doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Bartoňková I, Dvořák Z (2018) Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology* 111: 374–384 doi: 10.1016/j.fct.2017.11.049
- Bartoňková I, Novotná A, Dvořák Z (2015) Novel Stably Transfected Human Reporter Cell Line AIZ-AR as a Tool for an Assessment of Human Androgen Receptor Transcriptional Activity. *Plos One* 10: e0121316 doi: 10.1371/journal.pone.0121316
- Bean TG, Bergstrom E, Thomas-Oates J, Wolff A, Bartl P, Eaton B, Boxall ABA (2016) Evaluation of a Novel Approach for Reducing Emissions of Pharmaceuticals to

- the Environment. *Environmental Management* 58: 707–720 doi: 10.1007/s00267-016-0728-9
- Beck S, Berry E, Duke S, Milliken A, Patterson H, Prewett DL, Rae TC, Sridhar V, Wendland N, Gregory BW, Johnson CM (2018) Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. *International Biodeterioration & Biodegradation* 127: 146–159 doi: 10.1016/j.ibiod.2017.11.020
- Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA (2009) Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in US Drinking Water. *Environmental Science & Technology* 43: 597–603 doi: 10.1021/es801845a
- Bergenholtz A, Hanstrom L (1974) Plaque-inhibiting effect of hexetidine (oraldene)-mouthwash compared to that of chlorhexidine. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2: 70–74
- Bertrand G (1896) Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 123: 463–465
- Biel-Maeso M, Corada-Fernandez C, Lara-Martin PA (2019) Removal of personal care products (PCPs) in wastewater and sludge treatment and their occurrence in receiving soils. *Water Research* 150: 129–139 doi: 10.1016/j.watres.2018.11.045
- Birošová L, Mackuľak T, Bodík I, Ryba J, Škubák J, Grabic R (2014) Pilot study of seasonal occurrence and distribution of antibiotics and drug resistant bacteria in wastewater treatment plants in Slovakia. *Science of the Total Environment* 490: 440–444 doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.030
- Bláha L, Hilscherová K, Mazurová E, Hecker M, Jones PD, Newsted JL, Bradley PW, Gracia T, Ďuriš Z, Horká I, Holoubek I, Giesy JP (2006) Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects. *Environment International* 32: 749–757 doi: 10.1016/j.envint.2006.03.011
- Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M, Pakdel F (2011) Differential Estrogen-Regulation of CXCL12 Chemokine Receptors, CXCR4 and CXCR7, Contributes to the Growth Effect of Estrogens in Breast Cancer Cells. *Plos One* 6 doi: e20898 10.1371/journal.pone.0020898
- Bovee TFH, Helsdingen RJR, Hamers ARM, Brouwer BA, Nielen MWF (2011) Recombinant cell bioassays for the detection of (gluco)corticosteroids and endocrine-disrupting potencies of several environmental PCB contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401: 873–882 doi: 10.1007/s00216-011-5162-5
- Bowerman WW, Best DA, Grubb TG, Sikarskie JG, Giesy JP (2000) Assessment of environmental endocrine disruptors in bald eagles of the Great Lakes. *Chemosphere* 41: 1569–1574 doi: 10.1016/s0045-6535(00)00014-x
- Braoudaki M, Hilton AC (2004) Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *Fems Microbiology Letters* 235: 305–309 doi: 10.1016/j.femsle.2004.04.049
- Butler E, Whelan MJ, Sakrabani R, van Egmond R (2012) Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. *Environmental Pollution* 167: 101–109 doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.036

- Cabana H, Jiwan JLH, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, Jones JP (2007) Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere* 67: 770–778 doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.10.037
- Cajthaml T, Křesinová Z, Svobodová K, Möeder M (2009) Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75: 745–750 doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.01.034
- Calaf GM, Ponce-Cusi R, Aguayo F, Munoz JP, Bleak TC (2020) Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer. *Oncology Letters* 20: 19–32 doi: 10.3892/ol.2020.11566
- Cargnelutti F, Di Nisio A, Pallotti F, Sabovic I, Spaziani M, Tarsitano MG, Paoli D, Foresta C (2021) Effects of endocrine disruptors on fetal testis development, male puberty, and transition age. *Endocrine* 72: 358–374 doi: 10.1007/s12020-020-02436-9
- CAS (2021) <https://www.cas.org/cas-data/cas-registry>. (cit. 17. 5. 2021)
- Cavanagh JAE, Trought K, Mitchell C, Northcott G, Tremblay LA (2018) Assessment of endocrine disruption and oxidative potential of bisphenol-A, triclosan, nonylphenol, diethylhexyl phthalate, galaxolide, and carbamazepine, common contaminants of municipal biosolids. *Toxicology in Vitro* 48: 342–349 doi: 10.1016/j.tiv.2018.02.003
- Cevenini L, Lopreside A, Calabretta MM, D'Elia M, Simoni P, Michelini E, Roda A (2018) A novel bioluminescent NanoLuc yeast-estrogen screen biosensor (nanoYES) with a compact wireless camera for effect-based detection of endocrine-disrupting chemicals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410: 1237–1246 doi: 10.1007/s00216-017-0661-7
- Chen JG, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL (2007) Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221: 278–284 doi: 10.1016/j.taap.2007.03.015
- Chen Y, Vymazal J, Březinová T, Koželuh M, Kule L, Huang JG, Chen ZB (2016) Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Science of the Total Environment* 566: 1660–1669 doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.069
- Chevalier N, Fenichel P (2015) Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes & Metabolism* 41: 107–115 doi: 10.1016/j.diabet.2014.09.005
- Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A (2019) Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern?. *Frontiers in Microbiology* 10: 587 doi: 10.3389/fmicb.2019.00587
- Claffey N (2003) Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. *Journal of Clinical Periodontology* 30: 22–24 doi: 10.1034/j.1600-051X.30.s5.8.x
- Colgate-Palmolive (2019) <https://www.foo.com/earnings/call-transcripts/2019/01/25/colgate-palmolive-co-cl-q4-2018-earnings-conferenc.aspx>. (cit. 27. 6. 2021)
- Conley JM, Evans N, Mash H, Rosenblum L, Schenck K, Glassmeyer S, Furlong ET, Kolpin DW, Wilson VS (2017) Comparison of *in vitro* estrogenic activity and

- estrogen concentrations in source and treated waters from 25 US drinking water treatment plants. *Science of the Total Environment* 579: 1610–1617 doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.093
- Covino S, Svobodová K, Křesinová Z, Petruccioli M, Federici F, D'Annibale A, Čvančarová M, Cajthaml T (2010) *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresource Technology* 101: 3004–3012 doi: 10.1016/j.biortech.2009.12.020
- Čvančarová M, Křesinová Z, Filipová A, Covino S, Cajthaml T (2012) Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88: 1317–1323 doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.03.107
- Dao ATN, Vonck J, Janssens TKS, Dang HTC, Brouwer A, de Boer TE (2019) Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Industrial Crops and Products* 128: 153–161 doi: 10.1016/j.indcrop.2018.10.059
- Darbre PD (2017) Endocrine Disruptors and Obesity. *Current Obesity Reports* 6: 18–27 doi: 10.1007/s13679-017-0240-4
- Datel JV, Hrabánková A (2020) Pharmaceuticals Load in the Svihov Water Reservoir (Czech Republic) and Impacts on Quality of Treated Drinking Water. *Water* 12: 1387 doi: 10.3390/w12051387
- Datta S, He GC, Tomilov A, Sahdeo S, Denison MS, Cortopassi G (2017) *In Vitro* Evaluation of Mitochondrial Function and Estrogen Signaling in Cell Lines Exposed to the Antiseptic Cetylpyridinium Chloride. *Environmental Health Perspectives* 125: 87015 doi: 10.1289/ehp1404
- Decision 2018/840/EU (2018) Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495. *Official Journal of the European Union*: 9–12
- DeLeo PC, Huynh C, Pattanayek M, Schmid KC, Pechacek N (2020) Assessment of ecological hazards and environmental fate of disinfectant quaternary ammonium compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 206: 111116 doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111116
- Dimastrogiovanni G, Cordoba M, Navarro I, Jauregui O, Porte C (2015) Alteration of cellular lipids and lipid metabolism markers in RTL-W1 cells exposed to model endocrine disrupters. *Aquatic Toxicology* 165: 277–285 doi: 10.1016/j.aquatox.2015.06.005
- Directive 2008/105/EC (2008) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*: 84–97
- Dvořák Z, Sovadinová I, Bláha L, Giesy JP, Ulrichová J (2006a) Quaternary benzo c phenathridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: Analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1466–1473 doi: 10.1016/j.fct.2006.04.016

- Dvořák Z, Vrzal R, Maurel P, Ulrichová J (2006b) Differential effects of selected natural compounds with anti-inflammatory activity on the glucocorticoid receptor and NF-kappa B in HeLa cells. *Chemico-Biological Interactions* 159: 117–128 doi: 10.1016/j.cbi.2005.10.105
- Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GDW, Leppard GG, Hitchcock AP (2006) Quantitative mapping of chlorhexidine in natural river biofilms. *Science of the Total Environment* 369: 369–383 doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.04.033
- Dzink JL, Socransky SS (1985) Comparative *in vitro* activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27: 663–665 doi: 10.1128/aac.27.4.663
- ECHA (2021) <https://echa.europa.eu/cs/information-on-chemicals/ec-inventory>. (cit. 17. 5. 2021)
- Eguchi K, Ozawa M, Endoh YS, Nishikawa J, Nishihara T, Goto K, Yoshimura H (2003) Validity test for a yeast two-hybrid assay to screen for estrogenic activity, and its application to insecticides and disinfectants for veterinary use. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 226–232 doi: 10.1007/s00128-002-0181-8
- Eibes G, Debernardi G, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM (2011) Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation* 22: 539–550 doi: 10.1007/s10532-010-9426-0
- EPA (1997) Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. EPA/630/R-96/012
- Escalas A, Guadayol JM, Cortina M, Rivera J, Caixach J (2003) Time and space patterns of volatile organic compounds in a sewage treatment plant. *Water Research* 37: 3913–3920 doi: 10.1016/s0043-1354(03)00336-1
- Eurostat (2021) https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/env_chmhaz/default/table?lang=en. (cit. 17. 5. 2021)
- Ezechiáš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z, Cajthaml T (2016) Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as *in vitro* antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere* 152: 284–291 doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.067
- FDA (2016) Safety and effectiveness of consumer antiseptics; topical antimicrobial drug products for over-the-counter human use. Final rule. *Federal register* 81: 61106–61130
- Fijalkowski K, Rorat A, Grobelak A, Kacprzak MJ (2017) The presence of contaminations in sewage sludge - The current situation. *Journal of Environmental Management* 203: 1126–1136 doi: 10.1016/j.jenvman.2017.05.068
- Finger JW, Gogal RM (2013) Endocrine-Disrupting Chemical Exposure and the American Alligator: A Review of the Potential Role of Environmental Estrogens on the Immune System of a Top Trophic Carnivore. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 704–714 doi: 10.1007/s00244-013-9953-x
- Fischer A, Smiesko M (2019) Ligand Pathways in Nuclear Receptors. *Journal of Chemical Information and Modeling* 59: 3100–3109 doi: 10.1021/acs.jcim.9b00360
- Fisher RM, Barczak RJ, Gaitan JPA, Le-Minh N, Stuetz RM (2017) Odorous volatile organic compound (VOC) emissions from ageing anaerobically stabilised

- biosolids. *Water Science and Technology* 75: 1617–1624 doi: 10.2166/wst.2017.030
- Foran CM, Bennett ER, Benson WH (2000) Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Marine Environmental Research* 50: 153–156 doi: 10.1016/s0141-1136(00)00080-5
- Fornell J, Sundin Y, Lindhe J (1975) Effect of listerine on dental plaque and gingivitis. *Scandinavian Journal of Dental Research* 83: 18–25
- Fu XD, Simoncini T (2008) Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life* 60: 502–510 doi: 10.1002/iub.80
- Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Portier CJ, McDonnell DP (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicology and Applied Pharmacology* 143: 205–212 doi: 10.1006/taap.1996.8069
- Garcia-Reyero N, Raldua D, Quiros L, Llaveria G, Cerda J, Barcelo D, Grimalt JO, Pina B (2004) Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 670–675 doi: 10.1007/s00216-003-2295-1
- Gavrilescu M, Demnerova K, Aamand J, Agathoss S, Fava F (2015) Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology* 32: 147–156 doi: 10.1016/j.nbt.2014.01.001
- Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD (2008) Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology* 28: 78–91 doi: 10.1002/jat.1316
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews* 58: 685–704 doi: 10.1124/pr.58.4.2
- Gilbert RJ, Williams PEO (1987) The oral retention and antiplaque efficacy of triclosan in human volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 23: 579–583 doi: 10.1111/j.1365-2125.1987.tb03094.x
- Glenn JK, Gold MH (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete-chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 242: 329–341 doi: 10.1016/0003-9861(85)90217-6
- Godayol A, Besalu E, Antico E, Sanchez JM (2015) Monitoring of sixteen fragrance allergens and two polycyclic musks in wastewater treatment plants by solid phase microextraction coupled to gas chromatography. *Chemosphere* 119: 363–370 doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.06.072
- Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT (2015) EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews* 36: E1–E150 doi: 10.1210/er.2015-1010
- Grand View Research (2021) <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/oral-care-market>. (cit. 21. 5. 2021)
- Grimaldi M, Boulahtouf A, Delfosse V, Thouennon E, Bourguet W, Balaguer P (2015) Reporter cell lines for the characterization of the interactions between human

- nuclear receptors and endocrine disruptors. *Frontiers in Endocrinology* 6: 62 doi: 10.3389/fendo.2015.00062
- Guillette LJ, Crain DA, Gunderson MP, Kools SAE, Milnes MR, Orlando EF, Rooney AA, Woodward AR (2000) Alligators and endocrine disrupting contaminants: A current perspective. *American Zoologist* 40: 438–452 doi: 10.1668/0003-1569(2000)040[0438:aaedca]2.0.co;2
- Gutleb AC, Meerts I, Bergsma JH, Schriks M, Murk AJ (2005) T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 231–238 doi: 10.1016/j.etap.2004.06.003
- Habauzit D, Boudot A, Kerdivel G, Flouriot G, Pakdel F (2010) Development and Validation of a Test for Environmental Estrogens: Checking Xeno-Estrogen Activity by CXCL12 Secretion in breast cancer cell lines (CXCL-Test). *Environmental Toxicology* 25: 495–503 doi: 10.1002/tox.20594
- Habauzit D, Martin C, Kerdivel G, Pakdel F (2017) Rapid assessment of estrogenic compounds by CXCL-test illustrated by the screening of the UV-filter derivative benzophenones. *Chemosphere* 173: 253–260 doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.037
- Haldosen LA, Zhao CY, Dahlman-Wright K (2014) Estrogen receptor beta in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382: 665–672 doi: 10.1016/j.mce.2013.08.005
- Hansen PD, Dizer H, Hock B, Marx A, Sherry J, McMaster M, Blaise C (1998) Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 17: 448–451 doi: 10.1016/s0165-9936(98)00020-x
- Hilscherová K, Jones PD, Gracia T, Newsted JL, Zhang XW, Sanderson JT, Yu RMK, Wu RSS, Giesy JP (2004) Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicological Sciences* 81: 78–89 doi: 10.1093/toxsci/kfh191
- Hinther A, Bromba CM, Wulff JE, Helbing CC (2011) Effects of Triclocarban, Triclosan, and Methyl Triclosan on Thyroid Hormone Action and Stress in Frog and Mammalian Culture Systems. *Environmental Science & Technology* 45: 5395–5402 doi: 10.1021/es1041942
- Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30: 454–466 doi: 10.1016/s0141-0229(01)00528-2
- Hundt K, Martin D, Hammer E, Jonas U, Kindermann MK, Schauer F (2000) Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4157–4160 doi: 10.1128/aem.66.9.4157-4160.2000
- Huyck CL (1945) The effect of cetylpyridinium chloride on the bacterial growth in the oral cavity. *Journal of the American Pharmaceutical Association-Scientific Edition* 34: 5–11 doi: 10.1002/jps.3030340103
- Ioannou S, Andrianou XD, Charisiadis P, Makris KC (2017) Biomarkers of end of shift exposure to disinfection byproducts in nurses. *Journal of Environmental Sciences* 58: 217–223 doi: 10.1016/j.jes.2017.06.031
- Iughetti L, Lucaccioni L, Street ME, Bernasconi S (2020) Clinical expression of endocrine disruptors in children. *Current Opinion in Pediatrics* 32: 554–559 doi: 10.1097/mop.0000000000000926

- Jackson LM, Felgenhauer BE, Klerks PL (2019) Feminization, altered gonadal development, and liver damage in least killifish (*Heterandria formosa*) exposed to sublethal concentrations of 17 alpha-ethinylestradiol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170: 331–337 doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.094
- Janusz G, Pawlik A, Sulej J, Swiderska-Burek U, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczynski A (2017) Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 41: 941–962 doi: 10.1093/femsre/fux049
- Kampf G (2018) Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. *Antibiotics-Basel* 7: 110 doi: 10.3390/antibiotics7040110
- Karakaya P, Christodoulatos C, Koutsospyros A, Balas W, Nicolich S, Sidhoum M (2009) Biodegradation of the High Explosive Hexanitrohexaazaisowurtzitane (CL-20). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6: 1371–1392 doi: 10.3390/ijerph6041371
- Karthikeyan BS, Ravichandran J, Aparna SR, Samal A (2021) DEDuCT 2.0: An updated knowledgebase and an exploration of the current regulations and guidelines from the perspective of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere* 267: 9 doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128898
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, FennerCrisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104: 715–740 doi: 10.1289/ehp.96104s4715
- Keerthisinghe TP, Nguyen LN, Kwon EE, Oh S (2019) Antiseptic chlorhexidine in activated sludge: Biosorption, antimicrobial susceptibility, and alteration of community structure. *Journal of Environmental Management* 237: 629–635 doi: 10.1016/j.jenvman.2019.02.043
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM (1995) Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375: 581–585 doi: 10.1038/375581a0
- Kerdivel G, Habauzit D, Pakdel F (2013) Assessment and Molecular Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals That Interfere with Estrogen Receptor Pathways. *International Journal of Endocrinology* 2013: 501851 doi: 10.1155/2013/501851
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 8897–8901 doi: 10.1073/pnas.0609568104
- Kido Y, Kodama H, Uraki F, Uyeda M, Tsuruoka M, Shibata M (1988) Microbial-degradation of disinfectants .2. Complete degradation of chlorhexidine. *Eisei Kagaku-Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 34: 97–101 doi: 10.1248/jhs1956.34.97
- Klaschka U, Von der Ohe PC, Bschorer A, Krezmer S, Sengl M, Letzel M (2013) Occurrences and potential risks of 16 fragrances in five German sewage treatment plants and their receiving waters. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 2456–2471 doi: 10.1007/s11356-012-1120-9

- Koburger T, Hubner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A (2010) Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 1712–1719 doi: 10.1093/jac/dkq212
- Kodama H, Hashimoto T, Tsuruoka M, Kido Y, Uyeda M, Shibata M (1988) Microbial-degradation of disinfectants. IV. Treatment by activated-sludge of chlorhexidine. *EISEI Kagaku-Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 34: 408–413 doi: 10.1248/jhs1956.34.408
- Koh SM, Song MS, Takagi T (2005) Mineralogy, chemical characteristics and stabilities of Cetylpyridinium-exchanged smectite. *Clay Minerals* 40: 213–222 doi: 10.1180/0009855054020167
- Kosek K, Luczkiewicz A, Fudala-Ksiazek S, Jankowska K, Szopinska M, Svahn O, Tranckner J, Kaiser A, Langas V, Bjorklund E (2020) Implementation of advanced micropollutants removal technologies in wastewater treatment plants (WWTPs) - Examples and challenges based on selected EU countries. *Environmental Science & Policy* 112: 213–226 doi: 10.1016/j.envsci.2020.06.011
- Kotowska U, Zalikowski M, Isidorov VA (2012) HS-SPME/GC-MS analysis of volatile and semi-volatile organic compounds emitted from municipal sewage sludge. *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 2893–2907 doi: 10.1007/s10661-011-2158-8
- Křesinová Z, Linhartová L, Filipová A, Ezechiáš M, Mašín P, Cajthaml T (2018) Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. *New Biotechnology* 43: 53–61 doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.004
- Křesinová Z, Möeder M, Ezechiáš M, Svobodová K, Cajthaml T (2012) Mechanistic Study of 17 alpha-Ethinylestradiol Biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: Tracking of Extracellular and Intracellular Degradation Mechanisms. *Environmental Science & Technology* 46: 13377–13385 doi: 10.1021/es3029507
- Lasek F, Leitner NKV, Rauwel G, Blanchier L, Castel O, Ayraud-Thevenot S, Deborde M (2019) Discharge of biocidal products from healthcare activities into a sewage system-a case study at a French university hospital. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 4938–4951 doi: 10.1007/s11356-018-3882-1
- Latimer J, Munday JL, Buzza KM, Forbes S, Sreenivasan PK, McBain AJ (2015) Antibacterial and anti-biofilm activity of mouthrinses containing cetylpyridinium chloride and sodium fluoride. *BMC Microbiology* 15: 169 doi: 10.1186/s12866-015-0501-x
- Lawrence JR, Zhu B, Swerhone GDW, Topp E, Roy J, Wassenaar LI, Rema T, Korber DR (2008) Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3541–3550 doi: 10.1128/aem.02879-07
- LeBlanc GA (2007) Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16: 61–81 doi: 10.1007/s10646-006-0115-z
- Lee CJ, Rasmussen TJ (2006) Occurrence of organic wastewater compounds in effluent-dominated streams in Northeastern Kansas. *Science of the Total Environment* 371: 258–269 doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.07.023

- Legler J, van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, van der Saag PT, Vethaak AD, van der Burg P (1999) Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicological Sciences* 48: 55–66 doi: 10.1093/toxsci/48.1.55
- Lehtinen J, Veijanen A (2011) Odour Monitoring by Combined TD-GC-MS-Sniff Technique and Dynamic Olfactometry at the Wastewater Treatment Plant of Low H₂S Concentration. *Water Air and Soil Pollution* 218: 185–196 doi: 10.1007/s11270-010-0634-3
- Leskinen P, Michelini E, Picard D, Karp M, Virta M (2005) Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere* 61: 259–266 doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.080
- Leusch FDL, Chapman HF, Korner W, Gooneratne SR, Tremblay LA (2005) Efficacy of an advanced sewage treatment plant in southeast Queensland, Australia, to remove estrogenic chemicals. *Environmental Science & Technology* 39: 5781–5786 doi: 10.1021/es0484303
- Leusch FDL, Neale PA, Hebert A, Scheurer M, Schriks MCM (2017) Analysis of the sensitivity of *in vitro* bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environment International* 99: 120–130 doi: 10.1016/j.envint.2016.12.014
- Leusch FDL, van den Heuvel MR, Chapman HF, Gooneratne SR, Eriksson AME, Tremblay LA (2006) Development of methods for extraction and *in vitro* quantification of estrogenic and androgenic activity of wastewater samples. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 143: 117–126 doi: 10.1016/j.cbpc.2005.12.010
- Li CW, Wei YL, Zhang ST, Tan WL (2020) Advanced methods to analyze steroid estrogens in environmental samples. *Environmental Chemistry Letters* 18: 543–559 doi: 10.1007/s10311-019-00961-2
- Li M, Han XY, Gao WH, Chen F, Shao B (2015) Bisphenol AF stimulates transcription and secretion of C-X-C chemokine ligand 12 to promote proliferation of cultured T47D breast cancer cells. *Toxicology* 338: 30–36 doi 10.1016/j.tox.2015.09.007
- Linhartová L, Michalíková K, Šrédlová K, Cajthaml T (2020) Biodegradability of Dental Care Antimicrobial Agents Chlorhexidine and Octenidine by Lignolytic Fungi. *Molecules* 25: 400 doi: 10.3390/molecules25020400
- Lishman L, Smyth SA, Sarafin K, Kleywegt S, Toito J, Peart T, Lee B, Servos M, Beland M, Seto P (2006) Occurrence and reductions of pharmaceuticals and personal care products and estrogens by municipal wastewater treatment plants in Ontario, Canada. *Science of the Total Environment* 367: 544–558 doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.03.021
- Loos R, Carvalho R, António DC, Cornero S, Locoro G, Tavazzi S, Paracchini B, Ghiani M, Lettieri T, Bláha L, Jarošová B, Voorspoels S, Servaes K, Haglund P, Fick J, Lindberg RH, Schwesig D, Gawlik BM (2013) EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research* 47: 6475–6487 doi: 10.1016/j.watres.2013.08.024
- Lozano N, Rice CP, Ramirez M, Torrents A (2013) Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Research* 47: 4519–4527 doi: 10.1016/j.watres.2013.05.015

- Lucaccioni L, Trevisani V, Marrozzini L, Bertoncetti N, Predieri B, Lugli L, Berardi A, Iughetti L (2020) Endocrine-Disrupting Chemicals and Their Effects during Female Puberty: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 2078 doi: 10.3390/ijms21062078
- Luo YL, Guo WS, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, Liang S, Wang XCC (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 473: 619–641 doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Malhotra A, Bali A, Bareja R (2016) Anti-bacterial efficacy of octenidine as a mouth wash. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7: 340–344 doi: 10.13040/ijpsr.0975-8232.7(1).340-44
- Mao XJ, Auer DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A, Cieplik F (2020) Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 64: e00576-20 doi: 10.1128/aac.00576-20
- Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, Abegglen C, Thonney D, Chevre N, Schärer M, Barry DA (2013) Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? *Science of the Total Environment* 461: 480–498 doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.05.034
- Maryšková M, Linhartová L, Novotný V, Rysová M, Cajthaml T, Ševců A (2021) Laccase and horseradish peroxidase for green treatment of phenolic micropollutants in real drinking water and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research* 28: 31566–31574 doi: 10.1007/s11356-021-12910-0
- Maryšková M, Schaabová M, Tománková H, Novotný V, Rysová M (2020) Wastewater Treatment by Novel Polyamide/Polyethylenimine Nanofibers with Immobilized Laccase. *Water* 12: 588 doi: 10.3390/w12020588
- Mazurová E, Hilscherová K, Jálková V, Köhler HR, Triebskorn R, Giesy JP, Bláha L (2008) Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* *in vivo* and in the cell bioassays *in vitro*. *Aquatic Toxicology* 89: 172–179 doi: 10.1016/j.aquatox.2008.06.013
- McAllister BG, Kime DE (2003) Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 65: 309–316 doi: 10.1016/s0166-445x(03)00154-1
- Melo CF, Dezotti M, Marques MRC (2016) A comparison between the oxidation with laccase and horseradish peroxidase for triclosan conversion. *Environmental Technology* 37: 335–343 doi: 10.1080/09593330.2015.1069897
- Michalíková K, Linhartová L, Ezechiáš M, Cajthaml T (2019) Assessment of agonistic and antagonistic properties of widely used oral care antimicrobial substances toward steroid estrogenic and androgenic receptors. *Chemosphere* 217: 534–541 doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.006
- Mohan S, Balakrishnan P (2019) Triclosan in Treated Wastewater from a City Wastewater Treatment Plant and its Environmental Risk Assessment. *Water Air and Soil Pollution* 230: 69 doi: 10.1007/s11270-019-4098-9
- Moško J, Pohořelý M, Cajthaml T, Jeremiáš M, Robles-Aguilar AA, Skoblia S, Beňo Z, Innemanová P, Linhartová L, Michalíková K, Meers E (2021) Effect of pyrolysis

- temperature on removal of organic pollutants present in anaerobically stabilized sewage sludge. *Chemosphere* 265: 7 doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129082
- Mot AC, Silaghi-Dumitrescu R (2012) Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry(Moscow)* 77: 1395–1407 doi: 10.1134/s0006297912120085
- Murk AJ, Legler J, van Lipzig MMH, Meerman JHN, Belfroid AC, Spenkeliink A, van der Burg B, Rijs GBJ, Vethaak D (2002) Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 16–23 doi: 10.1002/etc.5620210103
- Muzikář M, Křesinová Z, Svobodová K, Filipová A, Čvančarová M, Cajthamlová K, Cajthaml T (2011) Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *Journal of Hazardous Materials* 196: 386–394 doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.041
- Nakada N, Kiri K, Shinohara H, Harada A, Kuroda K, Takizawa S, Takada H (2008) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environmental Science & Technology* 42: 6347–6353 doi: 10.1021/es7030856
- Nakada N, Shinohara H, Murata A, Kiri K, Managaki S, Sato N, Takada H (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 41: 4373–4382 doi: 10.1016/j.watres.2007.06.038
- Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research* 40: 3297–3303 doi: 10.1016/j.watres.2006.06.039
- Neves TD, Assano PK, Sabino LR, Nunes WB, Prediger P (2020) Influence of Adsorbent/Adsorbate Interactions on the Removal of Cationic Surfactants from Water by Graphene Oxide. *Water Air and Soil Pollution* 231: 304 doi: 10.1007/s11270-020-04669-w
- Nguyen LN, Oh S (2019) Impacts of antiseptic cetylpyridinium chloride on microbiome and its removal efficiency in aerobic activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation* 137: 23–29 doi: 10.1016/j.ibiod.2018.11.006
- Nielsen FK, Hansen CH, Fey JA, Hansen M, Jacobsen NW, Halling-Sorensen B, Bjorklund E, Styrihave B (2012) H295R cells as a model for steroidogenic disruption: A broader perspective using simultaneous chemical analysis of 7 key steroid hormones. *Toxicology in Vitro* 26: 343–350 doi: 10.1016/j.tiv.2011.12.008
- Nilsen BM, Berg K, Eidem JK, Kristiansen SI, Brion F, Porcher JM, Goksoyr A (2004) Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 621–633 doi: 10.1007/s00216-003-2241-2
- Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science* 46: 282–298 doi: 10.1248/jhs.46.282

- Noguera-Oviedo K, Aga DS (2016) Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. *Journal of Hazardous Materials* 316: 242–251 doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.04.058
- Novotný C, Svobodová K, Kasinath A, Erbanová P (2004) Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54: 215–223 doi: 10.1016/j.ibiod.2004.06.003
- Oehlmann J, Di Benedetto P, Tillmann M, Duft M, Oetken M, Schulte-Oehlmann U (2007) Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* 16: 29–43 doi: 10.1007/s10646-006-0109-x
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA (2006) Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda : Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* 114: 127–133 doi: 10.1289/ehp.8065
- Oliveira TS, Murphy M, Mendola N, Wong V, Carlson D, Waring L (2015) Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the Total Environment* 518: 459–478 doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.104
- Orrego R, Moraga-Cid G, Gonzalez M, Barra R, Valenzuela A, Burgos A, Gavilan JE (2005) Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1935–1943 doi: 10.1897/04-251r1.1
- Ostman M, Fick J, Tysklind M (2018) Detailed mass flows and removal efficiencies for biocides and antibiotics in Swedish sewage treatment plants. *Science of the Total Environment* 640: 327–336 doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.304
- Ostman M, Lindberg RH, Fick J, Bjorn E, Tysklind M (2017) Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Research* 115: 318–328 doi: 10.1016/j.watres.2017.03.011
- Padhye LP, Yao H, Kung'u FT, Huang CH (2014) Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Research* 51: 266–276 doi: 10.1016/j.watres.2013.10.070
- Pazda M, Kumirska J, Stepnowski P, Mulkiewicz E (2019) Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems - A review. *Science of the Total Environment* 697: 134023 doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134023
- Pellerin E, Caneparo C, Chabaud S, Bolduc S, Pelletier M (2021) Endocrine-disrupting effects of bisphenols on urological cancers. *Environmental Research* 195: 110485 doi: 10.1016/j.envres.2020.110485
- Pilnáček V, Innemanová P, Šereš M, Michalíková K, Stránská S, Wimmerová L, Cajthaml T (2019) Micropollutant biodegradation and the hygienization potential of biodrying as a pretreatment method prior to the application of sewage sludge in agriculture. *Ecological Engineering* 127: 212–219 doi: 10.1016/j.ecoleng.2018.11.025
- Predieri B, Bruzzi P, Bigi E, Ciancia S, Madeo SF, Lucaccioni L, Iughetti L (2020) Endocrine Disrupting Chemicals and Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 2937 doi: 10.3390/ijms21082937

- Ramirez-Cavazos LI, Junghanns C, Ornelas-Soto N, Cardenas-Chavez DL, Hernandez-Luna C, Demarche P, Enaud E, Garcia-Morales R, Agathos SN, Parra R (2014) Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 108: 32–42 doi: 10.1016/j.molcatb.2014.06.006
- Rehberger K, von Siebenthal EW, Bailey C, Bregy P, Fasel M, Herzog EL, Neumann S, Schmidt-Posthaus H, Segner H (2020) Long-term exposure to low 17 alpha-ethinylestradiol (EE2) concentrations disrupts both the reproductive and the immune system of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environment International* 142: 14 doi: 10.1016/j.envint.2020.105836
- Riva F, Castiglioni S, Fattore E, Manenti A, Davoli E, Zuccato E (2018) Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221: 451–457 doi: 10.1016/j.ijheh.2018.01.008
- Ross JJ, Zitomer DH, Miller TR, Weirich CA, McNamara PJ (2016) Emerging investigators series: pyrolysis removes common microconstituents triclocarban, triclosan, and nonylphenol from biosolids. *Environmental Science-Water Research & Technology* 2: 282–289 doi: 10.1039/c5ew00229j
- Rout PR, Zhang TC, Bhunia P, Surampalli RY (2021) Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* 753: 141990 doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141990
- Routledge EJ, Sumpter JP (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 241–248 doi: 10.1002/etc.5620150303
- Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Martinez AT (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31: 223–235 doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01164.x
- Russell AD (2003) Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases* 3: 794–803 doi: 10.1016/s1473-3099(03)00833-8
- Saggiaro EM, Chaves FP, Felix LC, Gomes G, Bila DM (2019) Endocrine Disruptor Degradation by UV/Chlorine and the Impact of Their Removal on Estrogenic Activity and Toxicity. *International Journal of Photoenergy* 2019: 7408763 doi: 10.1155/2019/7408763
- Sanderson JT (2006) The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences* 94: 3–21 doi: 10.1093/toxsci/kfl051
- Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GWA, van den Berg M (2002) Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182: 44–54 doi: 10.1006/taap.2002.9420
- Schiott CR, Løe H, Jensen SB, Kilian M, Davies R, Glavind K (1970) Effect of chlorhexidine mouth-rinses on human oral flora. *Journal of Periodontal Research* 5: 84–89 doi: 10.1111/j.1600-0765.1970.tb00697.x
- Semenza JC, Tolbert PE, Rubin CH, Guillette LJ, Jackson RJ (1997) Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environmental Health Perspectives* 105: 1030–1032 doi: 10.2307/3433835

- Shafei A, Matbouly M, Mostafa E, Al Sannat S, Abdelrahman M, Lewis B, Muhammad B, Mohamed S, Mostafa RM (2018) Stop eating plastic, molecular signaling of bisphenol A in breast cancer. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 23624–23630 doi: 10.1007/s11356-018-2540-y
- Sharma A, Mollier J, Brocklesby RWK, Caves C, Jayasena CN, Minhas S (2020) Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive Medicine and Biology* 19: 243–253 doi: 10.1002/rmb2.12326
- Shepherd MJ, Moore G, Wand ME, Sutton JM, Bock LJ (2018) *Pseudomonas aeruginosa* adapts to octenidine in the laboratory and a simulated clinical setting, leading to increased tolerance to chlorhexidine and other biocides. *Journal of Hospital Infection* 100: E23–E29 doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.037
- Shrivastava K, Wu HF (2007) A rapid, sensitive and effective quantitative method for simultaneous determination of cationic surfactant mixtures from river and municipal wastewater by direct combination of single-drop microextraction with AP-MALDI mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 42: 1637–1644 doi: 10.1002/jms.1266
- Sigoillot JC, Berrin JG, Bey M, Lesage-Meessen L, Levasseur A, Lomascolo A, Record E, Uzan-Boukhris E (2012) Fungal Strategies for Lignin Degradation. *Lignins: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering* 61: 263–308 doi: 10.1016/b978-0-12416023-1.00008-2
- Siracusa G, Becarelli S, Lorenzi R, Gentini A, Di Gregorio S (2017) PCB in the environment: bio-based processes for soil decontamination and management of waste from the industrial production of *Pleurotus ostreatus*. *New Biotechnology* 39: 232–239 doi: 10.1016/j.nbt.2017.08.011
- Slee AM, O'Connor JR (1983) *In vitro* antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (win-41464-2) against performed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 23: 379–384 doi: 10.1128/aac.23.3.379
- Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* 158: 327–339 doi: 10.1677/joe.0.1580327
- Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JAC, Brouwer A, van der Burg B (2005) Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicological Sciences* 83: 136–148 doi: 10.1093/toxsci/kfi005
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental-pollutants. *Environmental Health Perspectives* 103: 113–122 doi: 10.2307/3432519
- Šrédlová K, Šírová K, Stella T, Cajthaml T (2021) Degradation Products of Polychlorinated Biphenyls and Their *In Vitro* Transformation by Ligninolytic Fungi. *Toxics* 9: 81 doi: 10.3390/toxics9040081
- Šrédlová K, Škrob Z, Filipová A, Mašín P, Holecová J, Cajthaml T (2020) Biodegradation of PCBs in contaminated water using spent oyster mushroom substrate and a trickle-bed bioreactor. *Water Research* 170: 115274 doi: 10.1016/j.watres.2019.115274
- Stockholmská úmluva (2021) <http://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>. (cit. 17. 5. 2021)

- Suzuki T, Endo K, Ito M, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y (2003) A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 2167–2175 doi: 10.1271/bbb.67.2167
- Szelei J, Jimenez J, Soto AM, Luizzi MF, Sonnenschein C (1997) Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor. *Endocrinology* 138: 1406–1412 doi: 10.1210/en.138.4.1406
- Taboada-Puig R, Lu-Chau TA, Eibes G, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM (2015) Continuous removal of endocrine disruptors by versatile peroxidase using a two-stage system. *Biotechnology Progress* 31: 908–916 doi: 10.1002/btpr.2116
- Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y (2019) Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Japanese Dental Science Review* 55: 33–40 doi: 10.1016/j.jdsr.2018.07.001
- Tan LJ, Nielsen NH, Young DC, Trizna Z, Amer Med A (2002) Use of antimicrobial agents in consumer products. *Archives of Dermatology* 138: 1082–1086 doi: 10.1001/archderm.138.8.1082
- Tanaka T, Ishii M, Nakano S, Mori Y, Yano Y, Iijima T, Takeda K, Kido Y (2006) Microbial degradation of disinfectants: Two new aromatic degradation products of chlorhexidine, chlorhexidine aromatic degradation product (CHADP)-4 and CHADP6, produced by *Pseudomonas* sp. strain no. A-3. *Journal of Health Science* 52: 58–62 doi: 10.1248/jhs.52.58
- Tanaka T, Murayama S, Tuda N, Nishiyama M, Nakagawa K, Matsuo Y, Isohama Y, Kido Y (2005) Microbial degradation of disinfectants. a new chlorhexidine degradation intermediate (CHDI), CHDI-C, produced by *Pseudomonas* sp. Strain No. A-3. *Journal of Health Science* 51: 357–361 doi: 10.1248/jhs.51.357
- Tezel U, Pavlostathis SG (2015) Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology* 33: 296–304 doi: 10.1016/j.copbio.2015.03.018
- Thomaidis NS, Asimakopoulos AG, Bletsou AA (2012) Emerging contaminants: a tutorial mini-review. *Global Nest Journal* 14: 72–79
- Tiedeken EJ, Tahar A, McHugh B, Rowan NJ (2017) Monitoring, sources, receptors, and control measures for three European Union watch list substances of emerging concern in receiving waters - A 20 year systematic review. *Science of the Total Environment* 574: 1140–1163 doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.084
- Tien M, Kirk TK (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* 221: 661–662 doi: 10.1126/science.221.4611.661
- Toporova L, Balaguer P (2020) Nuclear receptors are the major targets of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 502: 110665 doi: 10.1016/j.mce.2019.110665
- Toušová Z, Oswald P, Slobodník J, Bláha L, Muz M, Hu M, Brack W, Krauss M, Di Paolo C, Tarcai Z, Seiler TB, Hollert H, Koprivica S, Ahel M, Schollee JE, Hollender J, Suter MJF, Hidasi AO, Schirmer K, Sonavane M, Ait-Aissa S, Creusot N, Brion F, Froment J, Almeida AC, Thomas K, Tollefsen KE, Tufi S, Ouyang XY, Leonards P, Lamoree M, Torrens VO, Kolkman A, Schriks M, Spirhanzlova P, Tindall A, Schulze T (2017) European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants

- in European surface waters. *Science of the Total Environment* 601: 1849–1868 doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.032
- Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A (1995) Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41: 1–17 doi: 10.1016/0168-1656(95)00042-o
- USGS (2017) Contaminants of Emerging Concern in the Environment. Environmental Health - Toxic Substances Hydrology Program. U.S. Geological Survey
- Uyeda M, Shiosaki T, Yokomizo K, Suzuki K, Uraki F, Tanaka T, Kido Y (1996) Microbial degradation of disinfectants, structures of chlorhexidine degradation intermediates, CHDI-B, CHDI-BR and CHDI-D, produced by *Pseudomonas* sp. strain no A-3. *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 42: 121–126 doi: 10.1248/jhs1956.42.121
- Valitalo P, Perkola N, Seiler TB, Sillanpaa M, Kuckelkorn J, Mikola A, Hollert H, Schultz E (2016) Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents. *Water Research* 88: 740–749 doi: 10.1016/j.watres.2015.10.056
- Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP (2012) Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 33: 378–455 doi: 10.1210/er.2011-1050
- Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen G, Helbing CC (2006) The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology* 80: 217–227 doi: 10.1016/j.aquatox.2006.08.010
- Venegas M, Leiva AM, Reyes-Contreras C, Neumann P, Pina B, Vidal G (2021) Presence and fate of micropollutants during anaerobic digestion of sewage and their implications for the circular economy: A short review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9: 12 doi: 10.1016/j.jece.2020.104931
- Versporten A, Bolokhovets G, Ghazaryan L, Abilova V, Pyshnik G, Spasojevic T, Korinteli I, Raka L, Kambaralieva B, Cizmovic L, Carp A, Radonjic V, Maqsudova N, Celik HD, Payerl-Pal M, Pedersen HB, Sautenkova N, Goossens H (2014) Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *Lancet Infectious Diseases* 14: 381–387 doi: 10.1016/s1473-3099(14)70071-4
- Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M (2014) Adverse Outcome Pathway (AOP) Development I: Strategies and Principles. *Toxicological Sciences* 142: 312–320 doi: 10.1093/toxsci/kfu199
- Wang SZ, Yin YA, Wang JL (2018) Microbial degradation of triclosan by a novel strain of *Dyella* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 1997–2006 doi: 10.1007/s00253-018-8740-z
- Wang YW, Liang W (2021) Occurrence, Toxicity, and Removal Methods of Triclosan: a Timely Review. *Current Pollution Reports* 7: 31–39 doi: 10.1007/s40726-021-00173-9
- Weikum ER, Liu X, Ortlund EA (2018) The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Science* 27: 1876–1892 doi: 10.1002/pro.3496

- Welk A, Zahedani M, Beyer C, Kramer A, Muller G (2016) Antibacterial and antiplaque efficacy of a commercially available octenidine-containing mouthrinse. *Clinical Oral Investigations* 20: 1469–1476 doi: 10.1007/s00784-015-1643-9
- White DG, McDermott PF (2001) Biocides, drug resistance and microbial evolution. *Current Opinion in Microbiology* 4: 313–317 doi: 10.1016/s1369-5274(00)00209-5
- Williams GP, Darbre PD (2019) Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 486: 55–64 doi: 10.1016/j.mce.2019.02.016
- Wilson VS, Bobseine K, Gray LE (2004) Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicological Sciences* 81: 69–77 doi: 10.1093/toxsci/kfh180
- Wong DWS (2009) Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157: 174–209 doi: 10.1007/s12010-008-8279-z
- Wu Q, Chambliss K, Umetani M, Mineo C, Shaul PW (2011) Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling in the Endothelium. *Journal of Biological Chemistry* 286: 14737–14743 doi: 10.1074/jbc.R110.191791
- Yang Y, Ok YS, Kim KH, Kwon EE, Tsang YF (2017) Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* 596: 303–320 doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.102
- Yoshida H (1883) Chemistry of lacquer (Urushi) Part 1. *Journal of the Chemical Society* 43: 472–486
- Yueh MF, Tukey RH (2016) Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 56: 251–272 doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417
- Zhang ZF, Wang L, Zhang XM, Zhang X, Li YF, Nikolaev A, Li WL (2021) Fate processes of Parabens, Triclocarban and Triclosan during wastewater treatment: assessment via field measurements and model simulations. *Environmental Science and Pollution Research* 28 (in press) doi: 10.1007/s11356-021-14141-9
- Zhou NA, Lutovsky AC, Andaker GL, Gough HL, Ferguson JF (2013) Cultivation and characterization of bacterial isolates capable of degrading pharmaceutical and personal care products for improved removal in activated sludge wastewater treatment. *Biodegradation* 24: 813–827 doi: 10.1007/s10532-013-9630-9
- Zákon č. 541/2020 Sb., o odpadech. Dostupné online: <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=541&r=2020> (cit. 17. 5. 2021)

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D., DSc., za odborné vedení práce, cenné rady a poskytnutí výborných pracovních podmínek během celého doktorského studia. Za odborné konzultace a podporu děkuji také svému konzultantovi, kterým byl Dr. Denis Habauzit, Ph.D., HDR.

RNDr. Martinovi Ezechiášovi, Ph.D. děkuji za zasvěcení do metod ekotoxikologie. Za pomoc v experimentální části, rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí děkuji PharmDr. Kláře Michalíkové, Ph.D. a všem dalším kolegům z Laboratoře environmentální biotechnologie.

Za podporu a trpělivost děkuji především svému manželovi, dcerám a jejich babičkám.

Přílohy

Publikace 1.....	67
Publikace 2.....	105
Publikace 3.....	117
Publikace 4.....	139

