

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Aplikace ligninolytických hub na pevných substrátech pro degradace endokrinních disruptorů

Application of ligninolytic fungi on solid substrates for
degradation of endocrine disrupters

Diplomová práce

Bc. Anna Slavíková-Amemori

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré (i přijaté) informace budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne 21. 8. 2012

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli doc. RNDr. Tomáši Cajthamlovi, Ph.D. za umožnění této diplomové práce a za podporu a trpělivost při jejím vedení. Dále bych chtěla poděkovat Tatianě Vlasenkové za spolupráci na experimentu a RNDr. Zdeně Křesinové a Stefanovi Covinovi Ph.D. za četné konzultace, rady a pomoc při sestavování experimentů i v jejich průběhu. Děkuji Mgr. Kateřině Svobodové Ph.D. za ochotné rady a konzultace ohledně pěstování mikroorganismů, RNDr. Martinu Ezechiášovi za pomoc při stanovování estrogenních aktivit a Mgr. Monice Čvančarové za rady ohledně statistiky.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu Centra kompetence TE01010218 a projektu TA01020804 od Technologické agentury ČR.

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam použitých zkratk.....	7
1 Úvod.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Endokrinní disruptory.....	10
2.1.1 Definice endokrinních disruptorů.....	10
2.1.2 Princip působení xenoestrogenů.....	11
2.1.3 Zástupci endokrinních disruptorů.....	12
2.1.3.1 17 α -ethynylestradiol.....	12
2.1.3.2 Alkylfenoly.....	13
2.1.3.3 Bisfenol A.....	14
2.1.3.4 Irgasan (Triclosan).....	15
2.1.4 Hodnocení estrogenních aktivit xenoestrogenů.....	16
2.1.5 Výskyt endokrinních disruptorů ve vodách.....	17
2.2 Odbourávání endokrinních disruptorů na ČOV.....	18
2.3 Alternativní způsoby odbourávání ED v odpadních vodách.....	20
2.4 Degradace ED pomocí ligninolytických hub.....	21
2.4.1 Ligninolytické houby a jejich vlastnosti.....	21
2.4.2 Princip působení ligninolytických enzymů.....	22
2.4.3 Degradace ED pomocí WRF a jejich LME na různých substrátech.....	23
2.5 Cíle práce.....	25
3 Materiály a metody.....	26
3.1 Použité chemikálie a mikroorganismy.....	26
3.2 Degradace in-vitro.....	26
3.2.1 Příprava substrátů.....	26
3.2.2 Kultivace organismů.....	27
3.2.3 Extrakce enzymů z pevného substrátu do pufru.....	28
3.2.4 Stanovení enzymových aktivit a proteinů.....	28
3.2.5 Degradáční pokus in-vitro.....	29
3.2.6 Statistické vyhodnocení výsledků.....	30

4 Výsledky.....	31
4.1 Prorůstání hub substrátem.....	31
4.2 Produkce enzymů.....	31
4.3 Výsledky měření proteinů.....	36
4.4 Výsledky in-vitro degradace.....	39
4.5 Korelace aktivit enzymů s degradacemi.....	43
5 Diskuze.....	47
6 Závěr.....	53
Přílohy.....	55
Literatura.....	61

Abstrakt

V současnosti je mezi látkami vypouštěnými člověkem do životního prostředí věnována velká pozornost tzv. endokrinním disruptorům (ED). Jde o látky schopné narušovat hormonální systém organismů včetně člověka. V různých studiích bylo zjištěno jejich nedostatečné odbourávání na čistírnách odpadních vod, čímž se dostávají do vodních toků, kde mohou poškozovat vodní organismy. Mezi zkoumanými alternativními metodami pro odbourávání ED na čistírnách odpadních vod se jeví jako perspektivní využívání ligninolytických hub. Ty jsou díky svým enzymům s nízkou substrátovou specifitou schopné rozkládat různé aromatické polutanty podobné svou strukturou ligninu. V této diplomové práci byla zkoumána schopnost růstu a produkce ligninolytických enzymů u čtyř vybraných ligninolytických hub na pevných organických substrátech (komerční slámové pelety, topolové piliny smíchané se slámovými peletami, dubové piliny smíchané se slámovými peletami), které by mohly představovat vhodný substrát pro růst hub v houbových bioreaktorech pro čištění odpadních vod, a schopnost těchto enzymů degradovat čtyři běžné ED v pokusu *in-vitro*. Jako nejlépe degradující houba na tomto typu substrátů byl stanoven *Trametes versicolor*, který byl schopen zdegradovat během 24 hodin pod mez kvantifikace 20 µg/ml bisfenolu A, 17 α-ethynylestradiolu a 4-nonylfenolu. Houby dobře degradovaly na všech třech substrátech, jako vhodnější substrát se však jevily dřevěné piliny, jelikož na čisté slámě docházelo k rychlému vyčerpání substrátu. Pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) byla určena korelace mezi enzymovými aktivitami hlavních ligninolytických enzymů a degradacemi ED. Hlavní degradující enzymy se lišily podle hub. *T.versicolor* využíval k degradaci zejména lakázu, *Lentinus tigrinus* degradoval ED hlavně pomocí mangan dependentní peroxidázy. Přítomnost enzymů nevedla u všech hub vždy k degradaci, což ukazuje na tvorbu různých izoform s odlišnými degradačními schopnostmi. Je třeba uvažovat i možný vliv neligninolytických enzymů na degradaci.

Klíčová slova: Endokrinní disruptory, degradace, ligninolytické houby, pevné substráty, bisfenol A, 17 α-ethynylestradiol, Irgasan, nonylfenol, slámové pelety, topolové piliny, dubové piliny, ligninolytické enzymy, enzymové aktivity, lakáza, mangan peroxidáza

Abstract

Today a lot of attention is focused on compounds called endocrine disrupters (EDs) among substances released to environment by humans. They are a group of substances which can disturb function of hormonal system of organisms including humans. Their poor removal at wastewater treatment plants (WwTP) were shown at various studies, thus they can reach the environment in water. A prospective way for the degradation of EDs at WwTP can be their removal by ligninolytic fungi. They are able to degrade lots of lignin-like aromatic substances because of their highly nonspecific enzymes. In this work growth and enzyme production capability of four ligninolytic fungal strains were monitored on three solid substrates (straw pellets, poplar sawdust mixed with straw pellets, oak sawdust with straw pellets), which may be suitable substrates for fungal growth in bioreactors for wastewater treatment. Ability of these enzymes to degrade EDs were tested in *in-vitro* degradation experiment. *Trametes versicolor* was found as best degrading strain with 20 µg/ml of bisphenol A, 17 α-ethynylestradiol and nonylphenol degraded below a quantification limit within 24 hours. Fungal strains degraded EDs well on all of the three substrates but wood sawdust seemed to be a better substrate for fungal growth because straw pellets showed rapid depletion during the cultivation. A correlation between the enzymatic activities and the degradation of EDs were assessed by principal component analysis (PCA). Main degrading enzymes differed among the fungal strains. *T. versicolor* degraded EDs probably with activity of laccase, while *Lentinus tigrinus* showed a correlation between the degradation and mangan dependent peroxidase. The presence of the enzymes did not lead to degradation every time, which shows that different isoformes of the enzymes with diverse degradation abilities were produced according to the fungal strains and the substrates. It is possible that some nonligninolytic enzyme activities played a role in the ED degradation.

Keywords: Endocrine disrupters, degradation, ligninolytic fungi, solid substrates, bisphenol A, 17 α-ethynylestradiol, irgasan, nonylphenol, straw pellets, poplar sawdust, oak sawdust, ligninolytic enzymes, enzyme activities, laccase, mangan peroxidase

Seznam použitých zkratek

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
ACN	acetonitril
AP	alkylfenoly
BPA	bisfenol A
B.ad.	<i>Bjerkandera adusta</i>
CCBAS	sbírka basidiomycét Akademie věd
ČOV	čistírna odpadních vod
DMP	dimethoxyfenol
DMSO	dimethylsulfoxid
D.sq.	<i>Dichomitus squalens</i>
E1	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (chelaton III)
EE2	17 α -ethynylestradiol
EPA	Environmental Protection Agency
ER α	estrogenní receptor α
ER β	estrogenní receptor β
GOD	glukóza-1-oxidáza
HPLC-UV	vysokoúčinný kapalinový chromatograf se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti spektra
IRG	Irgasan
Lac	lakáza
Lac (ABTS)	lakáza stanovovaná pomocí ABTS
Lac (DMP)	lakáza stanovovaná pomocí DMP
LiP	lignin peroxidáza
LME	lignin modifying enzymes (ligninolytické enzymy)
LNKM	dusíkem limitované minerální médium (Kirkovo médium)
LOQ	mez kvantifikace

L.tig.	<i>Lentinus tigrinus</i>
MEG	maltextrakt-glukózové médium
MnP	mangan dependentní peroxidáza
MiP	mangan independentní peroxidáza
4-NP	4-n-nonylfenol
NP	nonylfenol
OP	oktylfenol
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PC I	první komponenta v PCA analýze
PC II	druhá komponenta v PCA analýze
PCA	analýza hlavních komponent
PCB	polychlorované bifenyly
P.chr.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
P.cin.	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
P.mag.	<i>Phanerochate magnolium</i>
P.ost.	<i>Pleurotus ostreatus</i>
ppm	parts per million, jednotka hmotnostní koncentrace (µg/ml)
T.ver.	<i>Trametes versicolor</i>
VeOH	veratryl alkohol (dimethoxybenzyl alkohol)
VP	versatilní
VTG	vitellogenin
WRF	white-rot fungi (houby bílé hniloby)

1. Úvod

Endokrinními disruptory (ED) je nazývána skupina látek schopných působit na hormonální systém organismů. Patří mezi ně přirozené steroidní látky i látky syntetické, například součásti antikoncepce, plastů nebo surfaktanty [1]. Jejich výskyt byl detekován v různých složkách životního prostředí jako jsou půdy či sladké i slané vody. V mnoha studiích bylo popsáno škodlivé působení těchto látek na organismy včetně člověka. Ve vodním prostředí se jedná zejména o ryby a obojživelníky, u kterých byly pozorovány feminizace či hermafroditizace populací, metamorfózy pohlavních orgánů a zhoršení reprodukčních schopností a další vlivy na hormonální a reprodukční systém [9-17].

Detekce těchto látek na výtocích z čistíren odpadních vod či továren ukazuje jejich nedostatečné odbourávání v čistících procesech. Je proto snaha nalézt alternativní metody čištění odpadních vod, které by byly schopné tyto látky odbourat. Perspektivní se v tomto ohledu jeví biodegradace pomocí ligninolytických hub. Jedná se o skupinu houbových organismů schopných degradace ligninu pomocí svých enzymů. Díky extracelulárnímu charakteru a nízké substrátové specifitě enzymů jsou tyto houby schopné rozkládat mnohé aromatické látky podobné svou strukturou ligninu. V laboratorních podmínkách byly sledovány úspěšné degradace rozličných organických polutantů jako jsou PAH, PCB, syntetická barviva nebo organochlorované pesticidy a také ED. [55]

V současnosti je pozornost zaměřena na možnosti aplikace těchto organismů pro degradaci v bioreaktorech na čištění odpadních vod.

V této diplomové práci byla zkoumána růstová a degradační schopnost vybraných ligninolytických hub na pevných organických substrátech (dřevěných pilinách a slámových peletách). Sláma a dřevěné piliny by mohly představovat perspektivní substrát pro růst hub v bioreaktoru díky své dobré dostupnosti a nízké ceně a též větší šetrnosti vůči životnímu prostředí oproti umělým substrátům. Na jednotlivých substrátech bylo sledováno prorůstání hub maticí, tvorba hlavních ligninolytických enzymů a schopnost těchto enzymů degradovat čtyři běžné ED *in-vitro*.

2. Teoretická část

2.1. Endokrinní disruptory

2.1.1. Definice endokrinních disruptorů

V posledních desetiletích je mezi škodlivinami, dostávajícími se do životního prostředí vlivem člověka, kladena velká pozornost na látky mající schopnost poškozovat či ovlivňovat hormonální systém organismů [1,2,3,4,5,11]. Tyto látky jsou nazývány endokrinními disruptory. Podle definice EPA jde o „cizorodé látky, které zasahují do syntézy, sekrece, transportu, vazeb, činnosti a eliminace přirozených hormonů v organismu, řídících jeho homeostázi, reprodukci, vývoj a chování.“[1,5]

Předpokládá se, že působení na hormonální systém se děje kvůli schopnostem těchto látek 1) napodobovat efekt přirozených hormonů, 2) působit jako jejich antagonist, 3) narušovat syntézu a metabolismus přirozených hormonů či 4) narušovat fungování hormonálních receptorů [3]. Znamé jsou případy látek napodobujících či blokujících působení hormonů estrogenních, androgenních a thyroïdních [4,11]. Některé látky jsou přitom schopné zastávat zároveň funkce více druhů hormonů, například se mohou vázat jak na estrogenní tak na androgenní receptory [15].

Případy endokrinní disrupce v přírodě jsou nejvíce nalézané na populacích sladkovodních ryb žijících v tocích níže od výtoků z čistíren odpadních vod (ČOV) či továren na zpracování dřeva [9,11]. V různých studiích z celého světa [9,11,14,15,16] jsou popisovány vlivy na ryby, jako je inhibice vývoje vaječnicků či varlat, maskulinizace či feminizace vnitřních či vnějších genitálií, výskyt hermafroditů v populaci gonochoristů, předčasné či zpožděné pohlavní dospívání jedinců nebo snížení koncentrace hormonů hypofýzy [9,11]. Konkrétně byly pozorovány například indukce proteinu vitellogeninu u samců ryb (primárně je tento protein vázán pouze na samice), či „hermafroditizace“ jedinců plotic (*Rutilus rutilus*) na dolním toku od ČOV ve Velké Británii [28], zhoršený vývoj varlat u kaprů (*Cyprinus carpio*) v Japonsku [14], menší velikost gonopodií u živorodek (*Gambusia a. holbrooki*) v Austrálii nebo posun poměru pohlaví v rybí populaci *Catostomus commersoni* v USA směrem k samicím spolu se zhoršeným vývojem vaječnicků u samic a výskytem oboupohlavních gonád v téže populaci [16]. Kromě ryb byly popsány znaky endokrinní disrupce, jako je feminizace populací, i u obojživelníků. [17]

V těchto studiích byla prokázána viditelná příčinná souvislost mezi vodami vypouštěnými z ČOV či továren a endokrinními efekty, přičemž je velmi pravděpodobné

působení hormonálních látek (hlavně estrogenního charakteru) obsažených v těchto vodách. Kvůli velkému množství antropogenních látek dostávajících se do prostředí je velmi obtížné identifikovat jasný vztah mezi konkrétní látkou a specifickou odpovědí [11]. Přesto se na základě mnoha studií podařilo prokázat působení rozličných látek jakožto endokrinních disruptorů.

Patří mezi ně přirozené steroidní estrogény estron (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) a syntetický steroidní estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2) a dále látky napodobující funkci estrogenů, které mohou být rostlinného původu – tzv. fytoestrogeny (β -sitosterol, genistein) nebo syntetického původu – tzv. xenoestrogeny. [1,13] Mezi xenoestrogeny se řadí široká škála chemických látek, jako jsou pesticidy (patří sem v naší zemi již zakázaný DDT, dieldrin či toxafen), polychlorované bifenyly (PCB), alkylfenoly a fenolové antioxidanty, plastifikátory (ftaláty) či bisfenol-A používaný při výrobě plastů [1,2,3]. V současnosti se přisuzuje hormonální působení i některým bromovaným zpomalovačům hoření, například u 2,4,6-tribromofenolu bylo prokázáno anti-estrogenní a anti-androgenní působení. [82] Estrogenní a androgenní působení je připisováno i antibakteriální látce Irgasan.

2.1.2. Princip působení xenoestrogenů

Xenoestrogeny jsou látky napodobující působení přirozených estrogenů, tj. estradiolu E2. Přirozené steroidní hormony působí v těle organismů skrze specifické receptorové proteiny. Estrogenní receptory patří mezi skupinu jaderných receptorů a nacházejí se v cytoplazmě buněk. V těle obratlovců se nacházejí dva hlavní estrogenní receptory ER α a ER β . Hormony procházející skrze lipidovou membránu do buňky se naváží na receptory a tím je aktivují. Takto vzniklé komplexy hormon-receptor putují k DNA a naváží se na specifický úsek DNA zvaný responzivní element. Tím je pak spuštěn proces exprese genu [6,20].

Xenoestrogeny mohou působit na různých úrovních této dráhy. Mohou se vázat na estrogenní receptory, ty mají nízkou substrátovou specifitu a může se tak na ně navázat široká škála látek podobných svou strukturou estradiolu. Cizorodé estrogenní látky mohou působit také přes navázání se na estrogenní responzivní element. V tomto případě často působí jako inhibitory signálů řízených estrogenními receptory. Xenoestrogeny však mohou působit také zcela nezávisle na této dráze. Tyto mechanismy jsou nejméně probádané a způsobují mnoho nejasností v chápání způsobů působení endokrinních

disruptorů. Mohly by sem patřit vlivy na fosforylaci proteinů, působení přes změnu syntézy steroidů, působení na AhR receptor či změna v expresi genů [6].

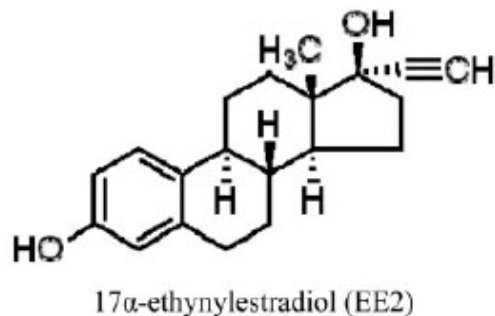
2.1.3. Zástupci endokrinních disruptorů

2.1.3.1. 17 α -ethynylestradiol

Syntetický steroidní estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2) tvoří hlavní estrogení složku v orální antikoncepci. Z těla je vylučován v podobě glukuronidových konjugátů spolu s močí. Na ČOV se činností β -glukuronidázy, produkované mikroorganismy v kalu, může z těchto konjugátů uvolňovat aktivní forma EE2, která se tak dostává do vodního prostředí [12,26]. Ačkoliv byla podle některých studií stanovena jeho koncentrace ve vodě i aktivita oproti přirozeným steroidním estrogenům jako nižší (poměr E2:EE2 ve výtocích z ČOV činil v anglické studii 9:1 [12]), je oproti těmto estrogenům méně rozpustný a odolnější vůči biodegradaci, s větší tendencí kumulovat se v organismech [12].

U EE2 byl prokázán vliv na produkci proteinu vitellogeninu u rybích samců a přisuzuje se mu důležitá role ve feminizačních jevech u rybích populací vystavených výtokům z ČOV [9,11,12,26]. Vitellogenin (VTG) je prekurzor žloutku syntetizovaný v játrech samic vejcorodých obratlovců v reakci na estrogení působení, samci VTG ve svém těle nevytvářejí, obsahují však geny pro jeho tvorbu, které se při vystavení působení estrogenů mohou aktivovat, výskyt VTG v krvi samců tak slouží jako biomarker pro expozici estrogenům [11].

Při vystavení 4 ng/l EE2 po dobu 2 let došlo u skupiny plotic (*Rutilus rutilus*) ke kompletní feminizaci populace. Při expozici plotic v časném stadiu života stejné koncentraci EE2 došlo ke vzniku oboupohlavních žláz (ovotestes) u 20 % jedinců [9]. Expozice časných stádií života střevlí (*Pimephales promelas*) koncentraci 10 ng/l EE2 vedlo k vývojovým vadám gonád a tvorbě „vaječnickových dutin“ v tělech až 60 % samců [32].



2.1.3.2. Alkylfenoly

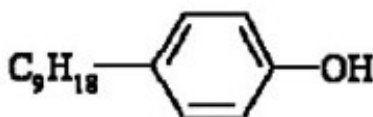
Alkylfenoly (AP) jsou degradačními produkty alkylfenoethoxylátů (APEs), široce využívaných neiontových surfaktantů. Fungují jako emulgátory a rozpouštědla, vyskytují se v domácích detergentech a čistících prostředcích, důležité jsou i v průmyslu, například při výrobě pesticidů, nebo v papírenském či textilním odvětví. Mezi dva nejběžnější surfaktanty z této skupiny patří oktylfenoethoxyláty a nonylfenoethoxyláty. Při degradaci těchto látek na ČOV či v přírodě dochází k uvolňování mnohem persistentnějších látek – nonylfenolů (NP) a oktylfenolů (OP), které oproti původnímu produktu vykazují vyšší toxicitu a jsou schopné působit jako endokrinní disruptory. 80 % APEs představují nonylfenoethoxyláty [25]. Proto je větší pozornost kladena výskytu a vlivům nonylfenolu.

Hlavní cestou vstupu do životního prostředí a expozice lidí i volně žijících živočichů je voda. AP se dostávají do odpadních vod a mohou se dostávat do přírody přes výtoky z ČOV, dále se mohou uvolňovat při užívání některých pesticidů. Díky své vysoké hydrofobicitě se na ČOV mohou sorbovat na kaly a dostávat se spolu s nimi do půd [1,25]. Zatímco ve vodě vykazují alkylfenoly poměrně dobré degradační vlastnosti, nesorbované v kalu či v sedimentech zůstávají neměnné a mohou se v těchto maticích akumulovat [24,25].

Díky své fenolové skupině mohou působit jako xenoestrogeny [1,24,25]. Podle studie zkoumající vliv NP na produkci vitellogeninu u ryb bylo sledováno, že NP pravděpodobně funguje podobným způsobem jako E2 přes vazbu na estrogenní receptory. [29]

V japonské studii s rybou medaka (*Oryzias latipes*) byla při expozici NP o koncentraci 17,7 μ g/l po celou dobu jejich vývoje nalezena tvorba ovotestes u 20 % jedinců, při 51,5 μ g/l u 40 % jedinců [31]. Pětitédenní expozice stejného druhu ryby

koncentraci 0,1 µg/l NP vedla k tvorbě proteinů specifických pro samice (včetně VTG) u samců ryb [33]. 4 µg/l NP byly schopné indukovat expresi mRNA pro vitellogenin u živorodek rodu *Xiphophorus helleri* a vést k apoptóze některých buněk varlat u samců. 0,2 µg/l NP bylo schopné u stejného rodu způsobit zkrácení „mečíku“, pohlavního znaku samců živorodek [19].



Nonylphenol (NP)

2.1.3.3. Bisfenol A

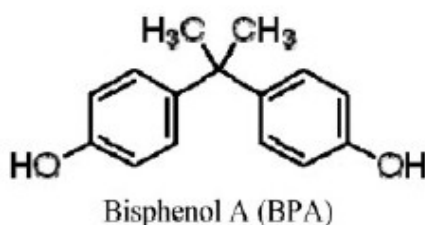
Bisfenol A (BPA) je používán pro výrobu polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic. Menší množství BPA se používá i v papírenském průmyslu. Polykarbonáty tvoří například obaly od potravin nebo kompaktní disky. Jako součást epoxidových pryskyřic ho lze nalézt v dentálních potřebách, například zubních plombách, nebo tvoří ochranné nátěry plechových konzerv. BPA se přitom z těchto materiálů může uvolňovat. V současnosti se hojně diskutuje jeho uvolňování z obalů do potravin, ze kterých se dále může dostávat do lidského organismu. Jeho přítomnost byla zjištěna i v prachu, podzemní vodě či v moři [7]. Do životního prostředí se dostává z továren, ve kterých se využívá při výrobě, uvolňováním z plastových odpadů [1] a prosakováním ze skládek [45].

BPA je díky přítomnosti fenolových skupin schopen vázat se na estrogenní receptory a to jak na ER α , tak ER β . Jeho afinita k estrogenním receptorům je pokládána za 1000-10000krát slabší oproti přirozenému estrogenu E2 [7,19,20]. Kromě estrogenních účinků bylo u BPA prokázáno působení thyroïdní a antiandrogenní [5,7].

BPA byl dlouho pokládán za slabý estrogen kvůli jeho nízké afinitě k estrogenním receptorům [5,7,8]. Ve studiích zkoumajících vliv estrogenních látek na organismy často vycházel jako slabý estrogen oproti ostatním látkám. Ve studii s rybami medaka (*Oryzias latipes*) došlo k indukci proteinů specifických pro samice (včetně VTG) při koncentraci 10 µg/l BPA ve vodě (u NP to stačilo 0,1 µg/l a u E2 0,005 µg/l) [33]. Pro indukci VTG u živorodek (*Xiphophorus helleri*) bylo třeba 2 mg/l BPA (u NP stačilo 4 ppb), u 2 µg/l však

již bylo patrné jasné zkrácení „mečíku“, pohlavního znaku samců [19]. V jiné studii při zkoumání estrogenních aktivit látek *in-vitro* pomocí kvasinkového testu vyšla estrogenní aktivita BPA oproti NP vyšší [22]. Jasný vliv BPA byl prokázán i u myši – při expozici 0,1 mg/kg BPA byly patrné znaky předčasného dospívání u samic v podobě otevírající se dělohy, 5 mg/kg bylo schopných ovlivnit tvar epiteliálních buněk v děloze a při 100 mg/kg došlo k prokazatelnému zvýšení váhy dělohy [34]. Referenční dávka BPA byla EPA stanovena jako 50 µg/kg tělesné váhy/den [7].

Současné studie ukazují na význam jeho působení pomocí drah nezávislých na estrogenních receptorech, kde může ovlivňovat hormonální systém již ve velmi malých koncentracích (tzv. efekt nízkých dávek). V úvahu je třeba brát i jeho působení thyroïdní či antiandrogenní [5,7]. BPA by tak, i kvůli své vysoké produkci, mohl patřit mezi nejvýznamnější endokrinní disruptory.



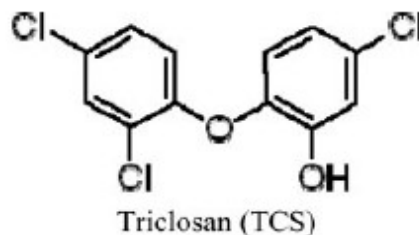
2.1.3.4. Irgasan (Triclosan)

Triclosan (TCS) neboli 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-difenylether, známý též pod obchodním názvem Irgasan (IRG), je antibakteriální látka nacházející se v širokém spektru produktů. Díky svým antiseptickým, desinfekčním a konzervačním účinkům je používána v hygienických potřebách, jako jsou zubní pasty, deodoranty či tekutá mýdla, v čistících prostředcích, zdravotnických potřebách či v textilích. Většina triclosanu se nachází v běžných hygienických produktech pro osobní potřebu [23].

Do životního prostředí se tak nejčastěji dostává spolu s odpadní vodou a kalem. Je nalézán v odpadních vodách a výtocích z ČOV, v povrchových tocích, jezerech a pobřežních vodách. Navázaný na čistírenský kal se může dostávat do půd [23].

Strukturálně se Irgasan podobá dioxinům. O jeho působení jakožto endokrinního disruptoru se ví málo, přisuzuje se mu slabá estrogenní i androgenní aktivita, může také narušovat genovou expresi spjatou s působením thyroïdních hormonů [1].

U ryb rodu medaka (*Oryzias latipes*) byla indukována tvorba VTG v krvi samců při koncentraci IRG ve vodě 20 µg/l a výše, ani dávka 200 µg/l však nezpůsobovala žádné změny v produkci vajec a plodnosti [35]. V jiné studii [37] byl naopak prokázán slabý androgenní účinek IRG na stejný druh ryb, kdy při expozici koncentracím 1 – 100 µg/l byl pozorovatelný mírný posun poměru pohlaví jedinců směrem k samcům (nikoli však statisticky významně) a zvětšování anální ploutve u samců. Thyroïdní efekt IRG byl prokázán u pulců žab *Rana catesbeiana*. U nich je řízena metamorfóza pulců v dospělé jedince pomocí thyroïdních receptorů. Přítomnost 0,3 µg/l IRG vedla k uspíšení vývoje pulců a při koncentraci 0,03 µg/l způsobila zvýšenou genovou expresi jako následek aktivace thyroïdních receptorů [38].



2.1.4. Hodnocení estrogenních aktivit xenoestrogenů

Hodnocení estrogenních aktivit ED se často provádí *in-vitro* pomocí modifikovaných kvasinek s (většinou lidským) estrogenním receptorem, je možné použít i *in-vivo* testy, například využívající indukci VTG v krvi živočichů či zkoumající životní cyklus konkrétních organismů. Výsledky se poté vztahují k působení přirozeného estrogenu E2. Snyder et al. [30] stanovili hodnoty estrogenních potenciálů látek ve vztahu k E2 jako 0,1 u EE2 a $1,25 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-5}$ u NP a OP, přičemž NP a OP tvořily pouze 1 % z celkové estrogenní aktivity přítomné ve výtoku z ČOV. Podle Coldham et al. [40] byly hodnoty relativní estrogenní aktivity vůči aktivitě E2 (1,00) určeny jako 0,89 pro EE2 a 5×10^{-5} pro BPA i NP. Suzuki et al. [71] stanovily aktivity E2 a EE2 téměř shodné zatímco aktivity BPA a NP byly 10^{-4} až 10^{-5} krát slabší oproti předchozím dvěma látkám.

Podle těchto studií vycházejí jako hlavní estrogenní látky působící ve vodách jak přírodní, tak syntetické steroidní estrogeny – přirozené E1, E2, E3 a syntetický EE2 [10,12,21,30]. Naopak podíl xenoestrogenů na celkové estrogenní aktivitě ve vodách se jeví dle testů až o několik řádů menší [13].

Přestože xenoestrogены mohou samostatně vykazovat pouze nízké hodnoty estrogenní aktivity, je známo, že působení estrogenních látek ve směsi má synergický efekt. Například ve studii vlivu BPA a NP na živorodku druhu *Xiphophorus helleri* vykazovala směs 4 ppb NP a 400 ppb BPA vyšší produkci VTG oproti samotnému působení 20 ppb NP či 10 ppm BPA (samotných 400 ppb BPA nevedlo přitom k žádné produkci VTG) [19].

U některých xenoestrogenů pak byla prokázána působení antiestrogenní, androgenní či thyroïdní (BPA, IRG). Například v kanadské studii [39] byla u BPA naměřena velmi nízká estrogenní aktivita vůči ER, ale bylo patrné jeho antiestrogenní působení. Tyto cesty působení však nejsou ještě dostatečně prozkoumány.

Proto ani malé koncentrace antropogenních endokrinních disruptorů přítomné ve vodách nelze podceňovat.

2.1.5. Výskyt endokrinních disruptorů ve vodách

Bylo provedeno mnoho studií zkoumajících obsah endokrinních disruptorů jak v odpadních, tak povrchových vodách. Hodnoty EE2 se ve výtociích z různých ČOV po Evropě pohybovaly od 5 ng/l až do 15 ng/l (review [9]). Ve výzkumu prováděném na výtociích z čistíren komunálních vod (bez přídavku vod industriálních) ve Velké Británii byl EE2 naměřen v 7 z 21 čistíren a nejvyšší naměřená hodnota činila 7 ng/l. Vzhledem k tomu, že se většina hodnot (mediánová hodnota se rovnala 0,8 ng/l) blížila detekčnímu limitu, je pravděpodobné, že se EE2 vyskytoval i na dalších čistírnách, studie předpokládá průměrnou hodnotu 0,6 ng/l [12]. V novější studii pak byly naměřeny hodnoty 0,15 - 2,85 ng/l a EE2 představoval nejvíce estrogenně aktivní látku ve vodě (kromě něj byly objeveny ve stejných výtociích přirozené E1 a E2 a antropogenní NP) [27].

NP byl naměřen ve všech zkoumaných 14 výtociích evropských ČOV v hodnotách 0,05 – 1,31 µg/l (mediánová hodnota 0,31 µg/l) [42]. Pro BPA byla provedena kompilační studie [50] z 89 evropských a amerických studií zkoumajících obsah BPA v povrchových vodách. Mediánové hodnoty vyšly 0,081 µg/l pro Severní Ameriku a 0,01 µg/l pro Evropu,

95. percentily vyšly podobněji – 0,47 µg/l pro Severní Ameriku a 0,35 µg/l pro Evropu. Podle review Bedoux et al. [23] se hodnoty IRG ve výtocích z ČOV v Evropě pohybovaly mezi 10 a 2220 ng/l, v USA 50 – 5370 ng/l a v Asii 11 – 360 ng/l.

Ve studii zkoumající obsah antropogenních organických látek ve 139 tocích po celé USA, byl EE2 nalezen v 16 % tocích s mediánovou koncentrací 0,073 µg/l (maximální koncentrace 0,83 µg/l), BPA byl objeven ve 41 % tocích s koncentrací 0,14 µg/l (maximální 12 µg/l), 4-NP v 51 % tocích s koncentrací 0,8 µg/l (maximální 40 µg/l) a Irgasan v 58 % tocích s koncentrací 0,14 µg/l (maximální 2,3 µg/l). 4-NP a IRG přitom představovaly jedny z nejčastěji se vyskytujících organických látek ve vodách, přičemž 4-NP patřil i mezi látky s nejvyšší koncentrací, s velkou částí vzorků přesahující hranici 1 µg/l [36]. O něco novější studie z USA uvádí výsledky pro EE2, BPA a NP okolo 2 ng/l, 2,5 – 85 ng/l a 46 – 720 ng/l ve výtocích z ČOV a pro stejné látky koncentrace 0,7 – 2 ng/l, 2,5- 35 ng/l a 39 – 340 ng/l pro toky ležící níže od ČOV [16].

Ve studii prováděné na kanadských ČOV [39] byly naměřeny ve výtocích hodnoty 1,6 – 17 µg/l pro NP (průměr 6,8 µg/l) a nd – 0,44 µg/l pro BPA (průměr 0,14 µg/l). NP tvořil nejčastěji přítomný nesteroidní syntetický estrogen jak v přítocích, tak ve výtocích z ČOV. EE2 byl naměřen jen v malé míře, jeho hodnoty ve výtocích se pohybovaly okolo 5 ng/l a méně.

Při měření BPA a NP v japonských řekách byly stanoveny hodnoty pod mezí detekce až o velikosti 1,4 µg/l a 3 µg/l (průměrně 0,053 a 0,2 µg/l). U stejných látek ve výtocích z ČOV pak hodnoty pod mezí detekce až 0,51 µg/l a 0,9 µg/l (průměrně 0,107 a 0,485 µg/l) [33].

Je možné vidět, že koncentrace endokrinních disruptorů v povrchových tocích a vodách do nich vypouštěných často dosahují hodnot, které prokázaly vliv na endokrinní systémy organismů (výjimkou je BPA, jehož hodnoty jsou většinou nižší než hodnoty, které vedly k prokazatelnému estrogennímu působení, u této látky je však třeba brát v úvahu efekt nízkých dávek).

2.2. Odbourávání endokrinních disruptorů na ČOV

Výskyt ED ve výtocích z ČOV prokázáný ve výše zmíněných studiích poukazuje na to, že ED nejsou dostatečně odbourávány na ČOV. Naopak steroidní estrogeny a alkylfenoly přicházejí na čistírnu v podobě konjugátů (u steroidních hormonů jde o

glukuronidy a sulfonidy, u alkylfenolů o APE), ze kterých se teprve degradací na ČOV mohou uvolňovat. U steroidních estrogenů je tak možné sledovat i nárůst koncentrace ve výtoku z ČOV oproti přítoku [39,41].

APE se degradují v aktivovaném kalu na NP, OP, ethoxyláty s kratším řetězcem a karboxylované alkylfenoly. Platí přitom, že čím kratší řetězec, tím vyšší hydrofobicita a estrogení aktivita. Zatímco hydrofilnější NP-ethoxyláty mají tendenci zůstat ve vodě, hydrofobní NP se z velké části váží na kal. Tímto sice dochází k jeho odstranění z odpadní vody, pouze však přechází do jiného substrátu a nedochází k jeho degradaci [41]. Podle studií prováděných s aktivovaným kalem v laboratorních podmínkách zůstal NP v kalu stabilní a nepodléhal anaerobní digesci [43,44].

Nejvíce estrogeně potentní přírodní steroidní estrogen E2 byl na ČOV degradován velmi úspěšně, podle review Jobling et al. [41] docházelo ke snížení jeho koncentrace ve výtocích oproti přítokům o 90 %. E2 však může degradovat do podoby estronu E1, který má sice o polovinu nižší estrogenitu, ale vykazuje vyšší odolnost proti degradaci, může se tak dostávat do povrchových vod a působit zde jako významný endokrinní disruptor [41,46]. Syntetický EE2 je značně hydrofobnější oproti přirozeným steroidním estrogenům a očekává se proto, že se z velké části naváže na kal stejně jako NP. Studie se však v tomto ohledu velmi rozcházejí, je možné nalézt výsledky, které ukazují, že až 80 % EE2 vstoupilo do kalu, zatímco jiné studie přikládají vyšší význam biodegradaci a sorpci na aktivovaný kal pak přisuzují podíl pouze 10 % [41,48]. EE2 se také jeví odolnější vůči degradaci oproti přirozeným hormonům. Ternes et al. [46] prokázali, že v aerobních podmínkách aktivovaného kalu zůstal EE2 stabilní. Byla však objevena degradace EE2 v přítomnosti nitrifikačních bakterií v aktivovaném kalu [41]. EE2 v kalu lépe degradoval při anaerobní digesci než při aerobním kompostování (naopak E2 reagoval zcela opačně), v obou případech však zůstávalo v kalu množství EE2 představující možné environmentální riziko [51].

Baronti et al. [47] ve svých měřeních na italských ČOV určili degradaci jednotlivých steroidních estrogenů jako 87 % pro E2, 61% pro E1, 95 % pro E3 a 85 % pro EE2. U EE2 je však třeba myslet na to, že se velká část mohla pouze přesunout do kalu a nedegradovala.

U BPA bylo sledováno úspěšné odstranění okolo 90 % dávky přitékající na ČOV. [49] Stejně tak u IRG bylo pozorováno odstranění na ČOV okolo 90 % [23,52]. Podle

Singera et al. [54] činí sorpce na kal 15 % z tohoto úbytku IRG. IRG degradoval v kalu za aerobních podmínek o 75 %, zatímco za anaerobních podmínek v podstatě nedegradoval. [53]

V měřeních prováděných na kanadských ČOV [39] byla sledována redukce NP a BPA na ČOV o 56 – 90 % pro NP (průměrně 70 %) a o 28 – 100 % pro BPA (průměrně 72 %). EE2 se ve vodách vyskytovalo velmi málo, a byl zde naopak častý jev, kdy se nevyskytoval v přítoku, avšak byl naměřen ve výtoku, což ukazuje na jeho uvolňování z konjugátů na ČOV.

Při zkoumání vod na 17 ČOV po celé Evropě [42] byl porovnáván vliv čistících procesů na odstraňování ED na základě redukce E1. E1 velmi dobře degradoval na všech čistírnách s biologickým stupněm čištění, využívající v procesu čištění aktivovaný kal. V jediné čistírně mající pouze chemický stupeň čištění nedošlo skoro k žádnému odbourání E1. Byla také prokázána přímá úměra mezi dobou zdržení čištěné vody a dobou zdržení aktivovaného kalu s mírou odstranění ED. To poukazuje na to, že mikrobiální aktivita v biologickém stupni čištění hraje hlavní roli při odbourávání ED. Důležitost sekundárního stupně čištění pomocí aktivovaného kalu pro odbourávání endokrinních disruptorů potvrzují i další studie [84].

2.3. Alternativní způsoby odbourávání ED v odpadních vodách

Kvůli nedostatečnému odbourávání endokrinních disruptorů na ČOV při současných technologiích čištění je snaha nalézt alternativní způsoby jejich odstraňování z odpadních vod. Byly úspěšně zkoumány fyzikální a chemické způsoby odstraňování endokrinních disruptorů jako rozklad pomocí UV záření či oxidací ozonem, jejich nevýhodou je však vysoká cena. Perspektivní cestou z hlediska jak ekonomického, tak účinnosti se jeví biodegradace pomocí mikroorganismů [85].

V mnoha studiích byly zkoumány schopnosti rozličných bakteriálních kmenů odbourávat endokrinní disruptory.

Fujii et al.[83] prokázali schopnost bakteriálního kmene *Sphingomonas sp.* degradovat nonylfenol. Kmeny *Sphingomonas* byly schopné v laboratorním bioreaktoru odbourat během 10 dní více než 95 % NP. U stejného rodu bakterií kmene AO1 byla prokázána i schopnost degradace BPA [86]. Bakterie byla schopná degradovat 115 µg/ml BPA pod mez detekce za 6 hodin degradace, přičemž byla sledována tvorba meziproduktů,

jejichž množství kleslo pod detekční limit po 8 hodinách. Hlavní roli v degradačním metabolismu přitom hrál bakteriální cytochrom P-450.

Kim et al. [87] zkoumali degradaci irgasanu pomocí tří bakteriálních kmenů *Sphingomonas wittichii*, *Sphingomonas sp.* PH-07 a *Burkholderia xenovorans*. Pouze kmen PH-07 byl schopen tuto látku odbourávat. Za 8 dní snížil koncentraci irgasanu v roztoku z 10 µg/ml na 7,5 µg/ml. Byly přitom detekovány hydroxylované meziprodukty (monohydroxy-triclosan, dihydroxy-triclosan) a meziprodukty vniklé štěpením etherové vazby (4-chlorfenol, 2,4-dichlorfenol). 2,4-dichlorfenol je toxická látka schopná inhibovat bakteriální růst. Její toxicita však byla naměřena jako o 50 % nižší oproti irgasanu.

V mnoha studiích bylo sledováno bakteriální odbourávání EE2 za aerobních podmínek. [88]. Byla zaznamenána degradace EE2 v aktivovaném kalu pomocí nitrifikačních bakterií, skupina Shi et al. [89] prokázali spojení degradace EE2 s působením bakterií oxidujících amoniak. Ve studii Ke et al. [90] byla sledována úspěšná degradace přírodních steroidů E1, E2 a E3 pomocí bakterií rodu *Acetivobacter*, *Agromyces* a *Sphingomonas*. EE2 však zůstával stabilní. Yoshimoto et al. [93] úspěšně degradovali všechny čtyři zmíněné steroidní estrogeny pomocí bakterií *Rhodococcus zopfii* a *Rhodococcus equi*. Ty byly schopné odbourat 100 mg/l EE2 během 24 hodin.

2.4. Degradace ED pomocí ligninolytických hub

2.4.1. Ligninolytické houby a jejich vlastnosti

Perspektivní skupinu mezi mikroorganismy schopnými degradovat endokrinní disruptory tvoří tzv. ligninolytické houby.

Ligninolytické neboli dřevokazné houby, nazývané též jako „houby bílé hniloby“, jsou skupinou houbových organismů (z velké části se jedná o bazidiomycety) schopných degradovat rekalitrantní polyfenolický polymer lignin. V angličtině jsou často označovány zkratkou WRF (White rot fungi). Schopnost odbourávat lignin jim umožňuje oproti jiným organismům získávat energii z polysacharidů zabudovaných v lignocelulózových substrátech a „chráněných“ ligninem. Samotné odbourávání ligninu jim nepřináší žádný energetický zisk [55,56].

Degradace ligninu se tedy děje v rámci jejich sekundárního metabolismu a to pomocí produkce tzv. lignin modifikujících enzymů (lignin modifying enzymes – LME). Hlavními LME u dřevokazných hub představují lignin peroxidáza (LiP, E.C. 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidáza (MnP, E.C.1.11.1.13.) a lakáza (Lac, E.C. 1.10.3.2.),

někdy se též mluví o na manganu nezávislé aktivitě MiP [55]. U některých rodů ligninolytických hub byla popsána aktivita versatilní peroxidázy (VP) [91].

Všechny tyto enzymy díky jejich působení přes radikály vykazují značnou nespecifitu co se týče substrátů. Byla tak pozorována jejich schopnost degradovat různé látky podobné svoji strukturou ligninu. V posledních letech je velký zájem kladen na jejich schopnost degradovat vysoce odolné organopolutanty. V různých studiích bylo prokázáno, že dovedou degradovat velmi širokou škálu polutantů, jako jsou PCB, PAH, triazinové i organochlorované pesticidy (DDT, lindan...), syntetická barviva či látky ze skupiny BTEX (benzen, toluen, xylen, ethylbenzen) a další [55].

Výhoda využití hub bílé hniloby v bioremediaci místo bakterií spočívá hlavně v extracelulárním charakteru jejich enzymů. Oproti bakteriím, u nichž se degradace polutantů děje uvnitř bakteriální buňky, se tak u dřevokazných hub zvyšuje biodostupnost polutantů a to i díky značné schopnosti houbových hyf prorůstat substrátem [1,55].

Od bakterií se však také liší tím, že jsou striktní aerobové (u bakterií známe druhy aerobní i anaerobní) a na rozdíl od nich nevyužívají polutanty jako zdroj dusíku či uhlíku. Při jejich využívání při remediacích je proto třeba na tyto vlastnosti myslet a zajistit pro ně jiný zdroj energie a živin [55].

2.4.2. Princip působení ligninolytických enzymů

WRF provádějí degradaci ligninu pomocí tzv. ligninolytických enzymů (anglicky lignin-modifying enzymes – LME). Stěžejními LME jsou již výše zmíněná lignin peroxidáza (LiP), mangan peroxidáza (MnP) a lakáza (Lac). Kromě nich však při degradaci ligninu spolupracují další podpůrné enzymy, jako jsou superoxid dismutáza (SOD) či glykol oxidáza, které samy o sobě nemají schopnost odbourávat lignin, tvoří však důležitou součást degradačních pochodů. Například SOD chrání buňku od superoxidových radikálů, vznikajících v lakázou katalyzovaných oxidačních reakcích vzniku chinonů, jejich přeměnou na peroxid vodíku. Ten je nezbytnou součástí peroxidázových reakcí LiP a MnP. Dále se na degradačních pochodech podílejí enzymy fungující na principu zpětné vazby. Patří sem například glukóza-1-oxidáza (GOD) či celobióza:chinon oxidoreduktáza (CBQ) [56].

Vzhledem ke značné molekulové velikosti LME, která nedovolí jejich plný průnik do dřevěného substrátu, se působení LME odehrává na úrovni nízkomolekulárních

mediátorů. Ty svým průnikem do lignocelulózového substrátu působí jako iniciátoři rozkladu. Jako mediátory mohou fungovat například veratryl alkohol (VeOH) u LiP, rozličné oxaláty či dikarboxyláty (u MnP), u lakázy bylo objeveno mediátorové působení látek 1-hydroxybenztriazolu (HBT) a 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS) [56].

Leonowicz et al. vytvořili hypotetické schéma degradace lignocelulózy pomocí LME [56]. Podle něj jsou LME produkovány v houbové hyfě v místě kontaktu s okolním prostředím. První degradační krok se děje působením enzymů LiP a MnP. LiP působí přes oxidaci mediátoru VeOH, který pak odebráním jednoho elektronu oxiduje nefenolická aromatická jádra ligninu a vytváří aryl kationtové radikály. MnP jedná přes oxidaci Mn^{2+} na Mn^{3+} a mediátorem jeho působení je Mn^{3+} -oxalát, který oxiduje fenolické komponenty ligninu [55]. K průběhu obou reakcí je nezbytná přítomnost peroxidu vodíku H_2O_2 .

Působením peroxidáz tak lignin degraduje na menší methoxylované molekuly. Ty jsou demethylovány působením lakázy a rozštěpeny na menší chinonové fragmenty. Při přebytku těchto chinonů hrozí jejich opětovná polymerizace. Tomu brání enzym GOD, který chinony využívá jako zdroj kyslíku a degraduje je do podoby fenolů. GOD dále degraduje glukózu vzniklou degradací celulózy části lignocelulózy za vzniku peroxidu vodíku. Ten aktivuje a podporuje působení LiP a MnP. Fenoly se dále stávají substráty pro dioxigenázy, které z nich štěpením aromatických jader vytvářejí ketokyseliny putující do Krebsova cyklu [56].

V případě nepřítomnosti LiP se má za to, že funkci GOD zastává celulóza:chinin oxidoreduktáza (CBQ) [56].

U některých kmenů rodu *Pleurotus sp.* a *Bjerkandera sp.* byla mezi hlavními ligninolytickými enzymy stanovena VP. Tato peroxidáza je schopná oxidovat substráty jak LiP (VeOH), tak MnP (Mn^{2+}) [91].

2.4.3. Degradace ED pomocí WRF a jejich LME na různých substrátech

V mnoha studiích byly zkoumány degradační schopnosti jak celého organismu ligninolytických hub, tak separovaných ligninolytických enzymů. Úspěšné odbourávání endokrinních disruptorů bylo sledováno ve vodních matricích i na kontaminovaných půdách.

Lee et al. [95] prováděli pokus na kapalném médiu s houbami *Stereum hirsutum* a *Heterobasidium insulare*. Obě houby byly schopné degradovat 200 µg/ml BPA během 14 dnů kultivace, jeho hodnoty se však pohybovaly blízko nuly již po 7 dnech růstu. Degradace byla doprovázena poklesem estrogenní aktivity. Jako degradační produkty byly identifikovány 2-hydroxy-3-fenylpropanová kyselina, 4-methoxyfenylethen, kyselina 2-fenylactová a kyselina 2-hydroxy-2-fenylactová. Klíčovou roli při degradaci hrála lakáza.

Úspěšnou degradaci BPA pomocí manganperoxidázy houby *P.ostreatus* sledovali Hirano et al. [96]. Při reakci *in-vivo* s mycelií houby bylo 0,4 mM BPA ve 20 ml substrátu odbouráno po 12 dnech kultivace o 80 %. Při degradaci *in-vitro* se samotnou MnP pak byly zaznamenány metabolity fenol, 4-isopropenylfenol, 4-isopropylfenol a hexestrol.

Blanquéz et al. [94] zaznamenali úspěšnou degradaci EE2 a E2 pomocí houby *Trametes versicolor*. 10 µg/ml těchto látek bylo odstraněno během 24 hodin z více než 97 %. Jako hlavní degradační enzym byla určena lakáza.

Suzuki et al. [71] degradovali E2 a EE2 v množství 10^{-5} M pomocí manganperoxidázy a lakázy získaných z kultur *Trametes versicolor* a *Phanerochaete chrysosporium* mající aktivity 10 nkat/ml. Po hodině degradace zaznamenali pokles estrogenní aktivity v roztoku o 80 %, po 8 hodinách došlo k odstranění veškeré estrogenní aktivity.

Degradace irgasanu na méně toxické meziproducty byla sledována u hub *Trametes versicolor* a *Pycnoporus cinnabarinus* [70].

Degradace technického nonylfenolu byla sledována u kmene ligninolytické houby UHH 1-6-18-4 [97] izolované z nonylfenolem kontaminovaného říčního toku. Houba odbourala celý objem NP z původních 250 µM po 35 dnech. Soares et al. [57] úspěšně degradovali nonylfenol pomocí kmenů *Trametes versicolor*, *Bjerkandera sp.*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Pleurotus ostreatus*. Ze 100 µg/ml původního objemu degradovaly jednotlivé houby o 96 % u prvních dvou hub a o 30 – 50 % a o 32 – 70 % u dalších dvou druhů.

Cajthaml et al. [66] degradovali pět druhů endokrinních disruptorů (EE2, NP, BPA 4-n-NP a technický NP) pomocí osmi vybraných kmenů ligninolytických hub. Nejlepší degradační vlastnosti u všech látek byly sledovány u hub *Irpex lacteus* a *Pleurotus ostreatus*. Naopak slabší degradační schopnosti vykazovaly houby rodu *Phanerochaete sp.*

Účinná degradace byla sledována i u dřevokazných hub aplikovaných na půdě. Houby *Bjerkandera adusta* a *Trametes versicolor* byly schopné za 5 týdnů degradovat nonylfenol v uměle kontaminované půdě v množství 430 mg/kg o 98 % [57].

Schopnost ligninolytických hub degradovat endokrinní disruptory je evidentní a byla již mnohokrát prokázána na laboratorní úrovni. V současnosti se pozornost zaměřuje na výzkum aplikace těchto organismů v biodegradačních zařízeních.

Jak je patrné z předchozích studií, ligninolytické houby se liší mezi sebou ve svých degradačních schopnostech, přičemž každá z nich volí odlišné strategie pro odbourávání organických polutantů. Je známo, že chování stejného ligninolytického enzymu se může lišit podle jeho izoformy [1]. Tyto mechanismy nejsou dosud dostatečně prozkoumány. Pro úspěšnou aplikaci ligninolytických hub v reálných podmínkách čistíren odpadních vod je třeba lépe prozkoumat mechanismy působení těchto hub a jejich enzymů. Je třeba prozkoumat substráty vhodné pro růst a produkci enzymů těmito houbami a stanovit dobře degradující druhy hub, schopné růst a degradovat na těchto substrátech.

V této diplomové práci byla zkoumána růstová a degradační schopnost čtyř vybraných kmenů ligninolytických hub na pevném organickém substrátu – slámě a dřevěných pilinách. Ty by mohly představovat ekonomicky a ekologicky vhodný substrát pro houbové bioreaktory. Tato práce měla prozkoumat jejich vhodnost pro využití v dalších pokusech s laboratorními bioreaktory pro odbourávání endokrinních disruptorů.

2.5. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je:

- porovnání růstových a degradačních schopností vybraných kmenů ligninolytických hub na pevných organických substrátech
- porovnání tří pevných organických substrátů z hlediska vhodnosti pro růst ligninolytických hub a tvorbu jejich enzymů
- kvalitativní i kvantitativní stanovení ligninolytických enzymů vytvářených dřevokaznými houbami rostoucími na pevných substrátech
- zkoumání vztahu mezi ligninolytickými enzymy a degradací endokrinních disruptorů

3. Materiály a metody

3.1. Použité chemikálie a mikroorganismy

Chemikálie 17 α -ethynylestradiol (min. 98 %, HPLC), 2,2'-azino-bis(3-ethylenzothiazolin-6-slfonová kyselina) (ABTS, 98%), albumin bovine (98%), bisfenol A (99+%), dimethoxybenzyl alkohol (96%), dimethylsulfoxid (99,9%, a.c.s. spectrophotometric grade), kyselina malonová (99%), $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$), Na-acetát a peroxid vodíku (30 %) byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

Chemikálie chelaton 3, kyselina vinná (99,5%) a vínan sodný (99%) byly pořízeny od výrobce Lachema Brno – Chemapol Praha (ČR). Kyselina octová byla zakoupena od výrobce Lachema (ČR). Chemikálie hydroxid sodný mikropelety (99,1%) byla pořízena od firmy Lach-ner (ČR).

Od firmy Fluka (Švýcarsko) byly pořízeny chemikálie 2,6-dimethoxyfenol, 4-NP (99,9%, GC), irgasan (≥ 97 %, HPLC), a kyselina ortofosforečná (84-85%).

Od firmy Oxoid (VB) byly pořízeny Malt Extract Broth a Agar no. 3.

Od firmy Chromservis byl pořízen methanol (99,98%, HPLC-G).

D-glukóza monohydrát byl pořízen od firmy PENTA (ČR). Acetonitril (99,9+%, HPLC g.g.) byl pořízen u firmy Chem-LAB (Belgie). Barvivo Comassie Brilliant Blue G250 bylo pořízeno od firmy Serva (Německo).

Slámové pelety (\varnothing 0,8 mm, 100 % pšeničná sláma) byly zakoupeny od firmy ATEA Praha (ČR). Topolové piliny byly pořízeny z Itálie od lokální stolařské firmy. Dubové piliny byly laskavě poskytnuty Doc. Gryndlerem z AV ČR.

Následující mikroorganismy byly získány ze sbírky basidiomycét Akademie věd (CCBAS): *Irpex lacteus* (Fr.:Fr.)Fr. CCBAS 931, *Pleurotus Ostreatus* (Jacq.)P.Kumm. 3004, *Trametes versicolor* (L.:Fr.)Pilát CCBAS 612, *Lentinus tigrinus* (Bull.)Fr. CBS 577.79.

3.2. Degradace in-vitro

3.2.1. Příprava substrátů

Byly zvoleny tři typy substrátů – komerční slámové pelety prodávané pro topné účely (\varnothing 0,8 mm, 100% pšeničná sláma, ATEA Praha), topolové piliny smíchané se slámovými peletami a dubové piliny smíchané se slámovými peletami. Dřevěné piliny byly smíchané se slámovými peletami po předchozích zkušenostech se špatným prorůstáním

hub na čistě dřevěných substrátech. Slámové pelety byly k dřevěným pilinám přidány jako podpurný substrát pro počátek růstu. Topolové piliny prokázaly v předchozích pokusech dobré prorůstání houbami, zatímco na dubových pilinách byl sledován růst pomalý a neefektivní [data nepublikována]. Dubové piliny byly proto před pokusem promyty podle Abbas et al. [58], aby byly odstraněny tzv. „hnědé extrakty“, třísloviny, které by mohly působit antisepticky proti houbovým organismům. Piliny byly autoklávovány (121 °C, 25 minut) spolu s destilovanou vodou přidanou v poměru 5ml na 1 g substrátu. Poté byla voda slita a proces se opakoval celkově třikrát. Piliny pak byly usušeny v sušičce při 50 °C.

Jednotlivé substráty byly naplněny do 250 ml Erlenmayerových baněk tak, aby celkový objem činil 10 g. Dřevěné piliny byly vždy namíchaný se slámovými peletami v poměru 5:5. K substrátům bylo doplněno 30 ml destilované vody, aby celková vlhkost dosahovala 75 % a ještě 3 ml navíc jakožto předpokládaná ztráta při autoklávování. Poté byly baňky se substráty dvakrát autoklávovány (121 °C, 25 minut) a uchovávány v pokojové teplotě.

3.2.2. Kultivace organismů

Pro degradační pokus byly vybrány ligninolytické houby *I. lacteus*, *L. tigrinus*, *P. ostreatus* a *T. versicolor*, které prokázaly dobré degradační schopnosti v předchozích pokusech na kapalných médiích (pokus na maltextraktovém médiu provedený Cajthaml et al.(2009)[66] a pokusy na dusíkem limitovaném médiu viz přílohy 1 a 2). Houby byly uchovávány na agarových miskách (5 g malt extraktu, 10 g glukózy a 20 g agaru na 1 l vody). Preinokulace hub byla provedena na tekuté malt extrakt-glukózové medium (MEG; 5 g malt extraktu a 10 g glukózy na 1 l vody) rozlité po 30 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk. Z agarových misek byly vždy vyříznuty za sterilních podmínek dva disky (o průměru 0,8 mm) a vloženy do baněk s médiem. Houby v baňkách byly inkubovány při 28 °C po dobu 7 dnů.

Po uplynutí této doby byla narostlá mycelia homogenizována pomocí homogenizátoru Ultra-Turrax-T25 (IKA-Labortechnik, Německo) a poté zaočkována po 1 ml do baněk s pevným substrátem. Inokulované baňky s pevným substrátem byly uloženy do termostatu o 25 °C po dobu 5, 8, 12, 16 a 20 d. Každá houba byla nasazena po třech paralelách na každý den.

3.2.3. Extrakce enzymů z pevného substrátu do pufru

V jednotlivé dny odběru byly vždy příslušné baňky přeneseny do 4 °C, kde byl jejich obsah převeden do kádinky s 15 mM Na-acetátovým pufrům o pH = 5 (jeho objem se lišil podle množství biomasy od 75 ml do 200 ml). V něm byl substrát promícháván pomocí magnetického míchadla po dobu 30 minut tak, aby přítomné enzymy přešly ze substrátu do pufru. Poté byl pufr přelit do jiné nádoby a substrát byl vymačkán pomocí nerezového kuchyňského lisu na brambory (Tescoma s.r.o., ČR) přes bavlněnou gázu, aby se z něho dostal pokud možno veškerý pufr s enzymy. U získaného enzymového roztoku byl změřen jeho objem, roztok byl homogenizován a část byla přelita do 15 ml falkonů a centrifugována (4 °C, 5000 rpm, 5 min). U vzorků s dřevěnými pilinami se pro množství nečistot v roztoku prováděla centrifugace dvakrát u každého vzorku. Supernatant byl přelit do nových falkonů a filtrován přes filtrační papír pomocí podtlaku.

3.2.4. Stanovení enzymových aktivit a proteinů

Části přefiltrovaných roztoků byly převedeny do 1,5 ml zkumavek Eppendorf a centrifugovány při 16,1 G po dobu 3 minut. Poté byly v roztocích stanoveny enzymové aktivity pomocí spektrofotometru SPECTRAMax PLUS (Molecular Devices, USA). Lakáza (Lac) byla stanovována pomocí dvou metod. První metoda využívala jako reakční činidlo ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina)] a byla upravena podle Matsumury et al. [64] (160 µl 120 mM Na-acetátového pufru, pH = 5, 20 µl vzorku, 20 µl 50 mM ABTS jako reakční činidlo, $\lambda = 420$ nm). Ve druhé metodě byla Lac stanovována pomocí DMP (2,6-dimethylfenol) jakožto substrátu [63] spolu s mangan-dependentní peroxidázou (MnP) a mangan-independentní peroxidázou (MiP) (170 µl 65,8 mM Na-malonátového pufru, pH = 4,5, 20 µl vzorku, 10 µl DMP jako reakční činidlo, $\lambda = 469$ nm). Pro stanovení MnP podle stejné metody dle De Jonga et al. [63] bylo ke vzorku přidáno 150 µl pufru, 10 µl MnSO₄ a 10 µl H₂O₂. Aktivita MnP byla vypočítána odečtením peroxidázových aktivit naměřených při absenci Mn²⁺ iontů (místo MnSO₄ se přidávalo 10 µl EDTA) od hodnot naměřených v přítomnosti těchto iontů. Aktivity MiP byly vypočítány z hodnot aktivit naměřených při absenci Mn²⁺ iontů odečtením aktivit lakázy. LiP byla stanovena pomocí veratryl alkoholu (VeOH) jakožto reakčního činidla podle metody popsané Tienem a Kirkem [60] (155 µl 0,1 M Na-tartarátového pufru, pH = 3,0, 10 µl

H₂O₂, 30 µl vzorku, $\lambda = 310$ nm). Jednotka enzymové aktivity (U) je definována jako aktivita produkovaná 1 µmol produktu za minutu za daných podmínek. [61]

Dále byly stanoveny koncentrace proteinů v roztocích pomocí metody popsané Bradfordem [65]. Ke 20 µl vzorku bylo přidáváno 180 µl Bradfordova činidla (50 mg barviva Comassie Brilliant Blue, 25 ml ethanolu, 50 ml kyseliny fosforečné, doplněno do 500 ml destilovanou vodou). Po 5 minutách inkubace byly vzorky měřeny při vlnové délce 595nm. Výsledné koncentrace byly odečítány z kalibrační křivky vytvořené pomocí hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin) ze 6 bodů (10µg/ml, 20µg/ml, 40µg/ml, 60µg/ml, 80µg/ml, 100µg/ml) s $R^2 > 0,95$. V případě koncentrace vyšší než 100µg/ml se vzorky naředily a byly měřeny znova.

3.2.5. Degradční pokus *in-vitro*

S enzymovými roztoky byly provedeny *in-vitro* degradační pokusy čtyř vybraných endokrinních disruptorů – BPA, EE2, 4-NP a IRG. ED byly rozpuštěny v DMSO tak, aby vytvořily zásobní roztok o koncentraci 400 µg/ml.

U každé houby byla pro daný den vytvořena jedna abiotická kontrola odebráním části enzymového roztoku a jeho vystavením teplotě 100 °C po dobu 30 minut. Tím došlo k degradaci přítomných enzymů.

Od všech enzymových roztoků včetně abiotických kontrol bylo odebráno po 2 ml do mikrozkuvek a centrifugováno při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut. Poté bylo od každého vzorku odebráno po 1140 µl do skleněných vialek a bylo k nim postupně podle časového harmonogramu přidáváno 60 µl zásobního roztoku s ED. Výsledný objem tak činil 1,2 ml. Podíl DMSO ve vialce byl 5 %. Vzorky byly vortexovány a poté centrifugovány při 6000 otáčkách po dobu 5 minut.

Byla sledována degradace ED po dobu 24 hodin na HPLC-UV od firmy Bio-Tek složeného z částí HPLC system 522, dávkovače HPLC autosampler 465, detektoru HPLC 540+ Diode Array Detector (vše Bio-Tek Instruments) a vyhodnocovacího systému Kroma System 3000 1.5.305.12. HPLC byl vybaven kolonou LiChroCart® s náplní LiChrosphere® 100 RP-18, 250 x 4,0 mm s velikostí částic 5 µm a velikostí pórů 100 Å, s předkolonou s náplní C18.

ED byly stanovovány gradientovou metodou se 100% ACN (A) a 10% ACN (B). Počáteční poměr činil 55 % B na 45 % A a poměr B postupně klesal na 0 % během prvních

6 minut. Jeho podíl se opět začal zvedat od 12. minuty tak, aby ve 13. minutě bylo dosaženo původního poměru mobilních fází. Celková délka metody činila 20 minut.

Vzorky byly dávkovány v množství 20 μ l a průtok mobilní fáze se rovnal 1ml/min. Látky byly detekovány při 280nm. Teplota kolony byla udržována na 35 °C.

Úbytek ED byl měřen po 3, 6, 9 a 24 hodinách, přičemž u třetích paralel byly vzorky měřeny pouze na začátku a na konci pokusu kvůli časovým parametrům. Abiotické kontroly byly měřeny na samém počátku a na úplném konci měření. Pro kontrolu možné sorpce ED v pufru a jejich nedostupnost pro detektor bylo po 24-hodinovém měření přidáno 200 μ l DMSO, které mělo zvýšit rozpustnost a tím dostupnost případných nasorbovaných enzymů, a vzorky byly znovu změřeny. Všechny vzorky (kromě abiotických kontrol) byly po měřeních po 3 a 6 hodinách provzduchovány vzduchovačem po dobu jedné minuty, aby byl zajištěn dostatečný přísun vzduchu pro enzymy. Po změření degradace po 9 hodinách byly vzorky ponechány s propíchnutým víčkem až do měření po 24 hodinách kvůli přísunu vzduchu.

Kalibrační křivky byly vytvořeny ředěním zásobního roztoku směsi ED do Na-acetátového pufru. Koeficient determinace R^2 kalibračních křivek byl vždy vyšší než 0,99.

3.2.6. Statistické vyhodnocení výsledků

Stanovené enzymové aktivity a koncentrace proteinů byly přepočítány na původní objem pufru a poté převedeny na jednotky U/g substrátu. Byly vypočítány průměry z paralel spolu se směrodatnými odchylkami. U degradačního pokusu byl pro statistické vyhodnocení použit studentův t-test pro dva výběry pro porovnání degradací ve vzorcích a v abiotických kontrolách. T-test byl použit i pro porovnání enzymových aktivit.

Korelace mezi aktivitami jednotlivých enzymů a degradacemi ED byla testována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) v programu Minitab 16.2.2.

4. Výsledky

4.1. Prorůstání hub substrátem

Podle vizuálního porovnání prorůstaly houby rychleji na čisté slámě než slámě smíchané s dřevěnými pilinami. Rozdíly mezi substráty se staly nevýraznými okolo 12. dne kultivace. Nejrychlejší růstové schopnosti prokázala houba *I.lacteus*, která plně prorostla slámou i dubovými pilinami již 5. den kultivace. Po 20 dnech měly podle vzhledu nejvíce houbové biomasy druhy *L.tigrinus* a *T.versicolor*.

4.2. Produkce enzymů

Při experimentu byly spektrofotometricky stanovovány enzymové aktivity 3 hlavních ligninolytických enzymů – lakázy (Lac), mangan peroxidázy (MnP) a lignin peroxidázy (LiP), dále pak byla měřena i aktivita mangan independentní peroxidázy (MiP). Lac byla stanovována pomocí dvou metod – s ABTS jako reakčním činidlem [64] a s DMP jako reakčním činidlem [63]. Výsledky jsou uvedeny v grafech 1 – 4. Závislosti tvorby enzymů na substrátu byly stanoveny pomocí PCA (Graf 5a-d).

Každá houba produkovala enzymy odlišným způsobem. Nezávisle na substrátu produkoval nejvíce Lac stanovované pomocí ABTS kmen *P.ostreatus* (Graf 1). Lac stanovovaná pomocí DMP vykazovala nejvyšší aktivity u houby *T.versicolor* (Graf 2) a MnP byla produkována nejvýrazněji houbami *I.lacteus* a *P.ostreatus* (Graf 3).

Závislost enzymových aktivit na substrátu se také lišila podle kmenů. *L.tigrinus* produkoval Lac nezávisle na substrátu všude obdobně (Graf 5c). U MnP byla stanovena významně vyšší aktivita na dřevěných pilinách oproti čisté slámě ($p < 0,05$). *P.ostreatus* naopak produkovala na všech substrátech podobným způsobem MnP, množství enzymu postupně přibývalo se dny kultivace. Její aktivity byly významně vyšší na topolových pilinách oproti ostatním substrátům ($p < 0,05$). Naopak u Lac byl sledován odlišný růstový trend podle substrátů. Na slámových peletách byla dosažena maximální aktivita v 12. den kultivace a poté postupně klesala. Zatímco na dřevěných pilinách její množství postupně stoupalo se dny kultivace (Graf 1). To zřejmě odpovídalo rychlejšímu prorůstání této houby na slámě a vyčerpání substrátu již v půlce experimentu. Na dřevěných pilinách bylo prorůstání pomalejší, ke konci experimentu se však tvořily vysoké aktivity Lac srovnatelné s nejvyššími aktivitami Lac na slámě.

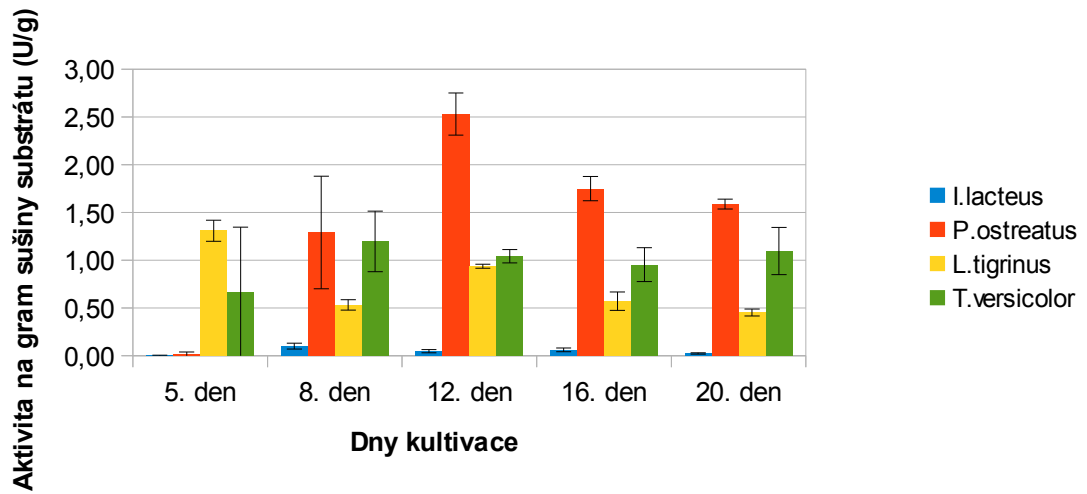
U kmenů *I. lacteus* a *T. versicolor* byly sledovány rozdíly mezi substráty u všech enzymů (Grafy 5a a 5d). U druhu *I. lacteus* nebyla na dubových pilinách detekovaná žádná aktivita Lac pomocí ABTS (Graf 1c), velmi nízké hodnoty aktivit byly stanoveny i na slámových peletách (Graf 1a). Použitím DMP však bylo možné lakázovou aktivitu nalézt u všech tří substrátů (Graf 2). MnP se tvořila více na dřevěných pilinách než na slámě, mezi dubovými pilinami a slámovými peletami byl tento rozdíl statisticky významný ($p < 0,05$). Aktivity enzymů houby *T. versicolor* dosahovaly podobných hodnot na všech substrátech, lišily se však růstové trendy. U Lac (DMP) byl trend obdobný jako u Lac houby *P. ostreatus*, na slámě bylo dosaženo maxima 8. den kultivace a poté aktivity klesaly (Graf 2a), zatímco na dřevěných pilinách byla tendence k růstu aktivit s počtem dní (u topolu) či konstantní tvorba po celou dobu pokusu (na dubu) (Grafy 2b a 2c).

Aktivity LiP nebyly na slámových peletách detekovány. Na dřevěných pilinách byly ojediněle u některých paralel detekovány nízké hodnoty aktivit, pravidelněji pak byly nacházeny u některých hub na dubových pilinách (Graf 4). Vzhledem ke sporadickému výskytu a nízkým hodnotám je však sporné jejich označení za aktivity.

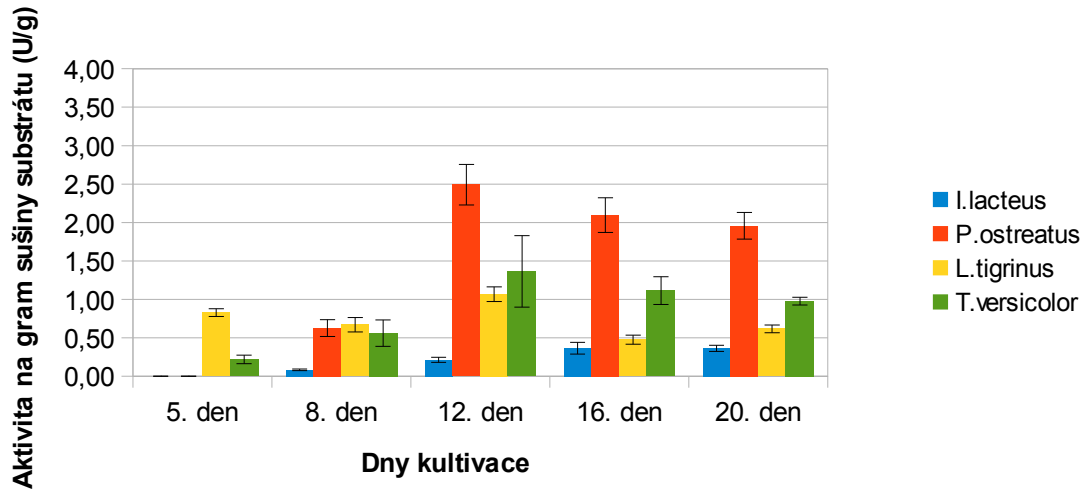
MiP také nebyla ve většině případů detekována. Jediných kladných hodnot aktivit MiP bylo dosaženo v některých počátečních dnech kultivace, jako 5. den růstu na slámových peletách u hub *I. lacteus* (s průměrem a směrodatnou odchylkou $0,05 \pm 0,02$ U/g) a *P. ostreatus* ($0,10 \pm 0,01$ U/g) nebo u houby *L. tigrinus* 5. den na dubových pilinách ($0,09 \pm 0,05$ U/g). Dále byla aktivita MiP ojediněle detekována např. u *T. versicolor* v 16. den na topolových pilinách ($0,113 \pm 0,059$ U/g) a u některých jednotlivých paralel byly dosaženy hodnoty okolo 0,15 U/g substrátu. Tyto výsledky se však pro své nízké hodnoty jeví spíše jako náhodné důsledky výpočtů a pravděpodobně se nebude jednat o skutečné aktivity stejně jako u LiP. Pokud se aktivita MiP doopravdy vyskytovala, její hodnoty byly tak malé, že je možné je zanedbat.

Graf 1. Enzymové aktivity Lac stanovené pomocí ABTS

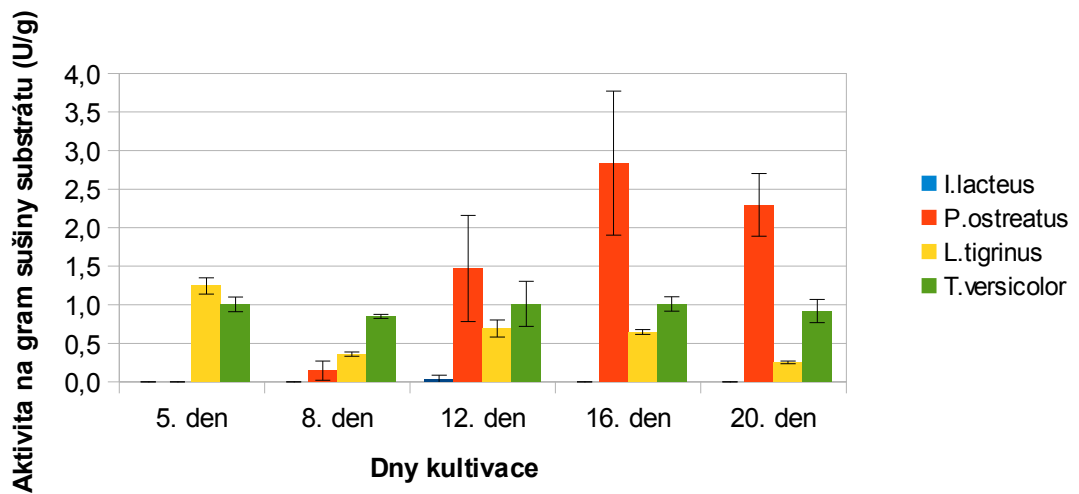
a) Slámové pelety 100 %



b) Topolové piliny + slámové pelety

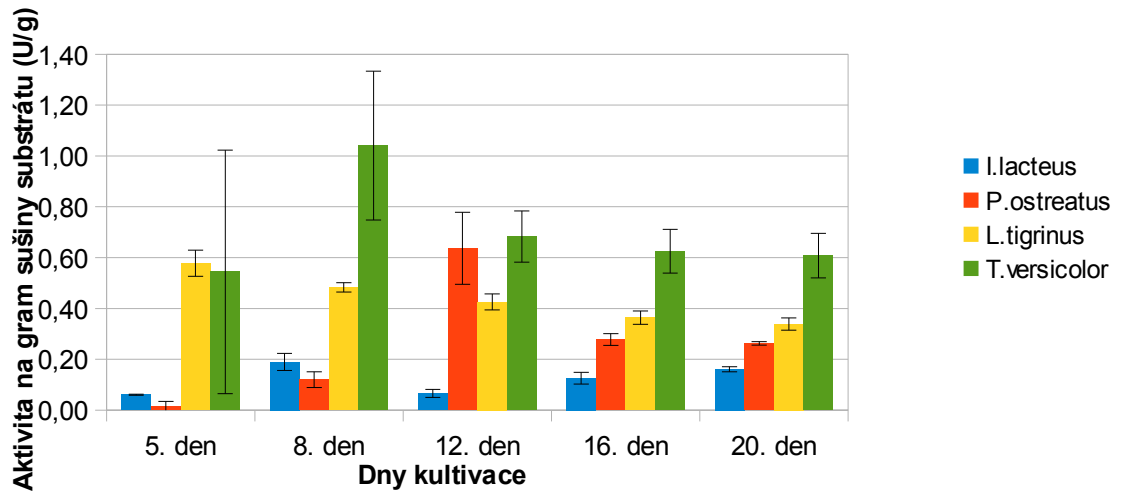


c) Dubové piliny + slámové pelety

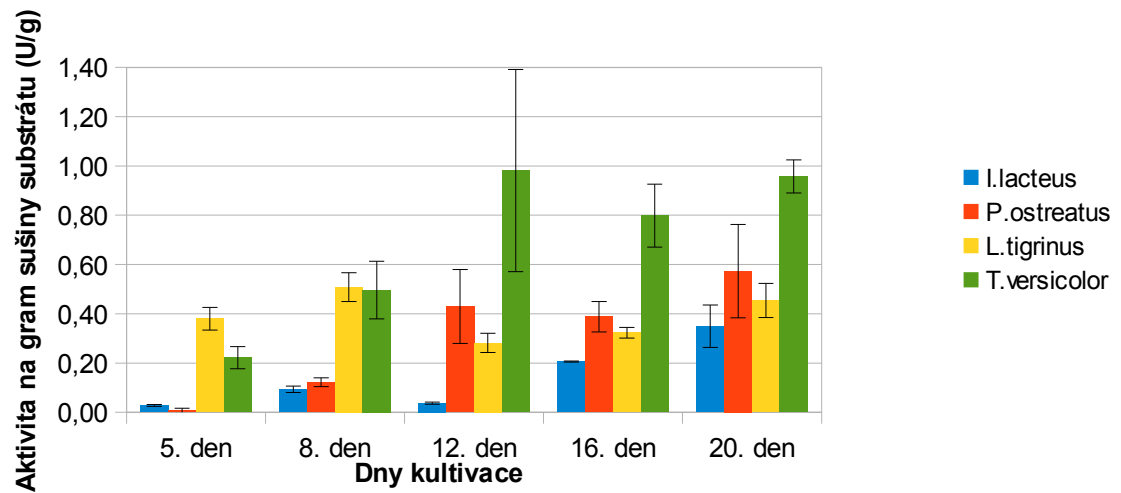


Graf 2. Enzymové aktivity Lac stanovené pomocí DMP (U/g substrátu)

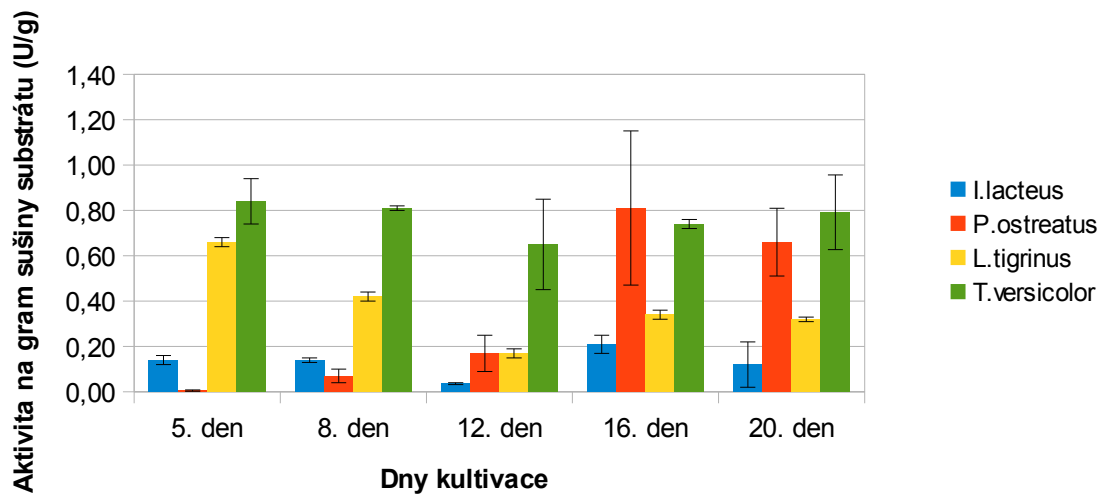
a) Slámové pelety 100 %



b) Topolové piliny + slámové pelety

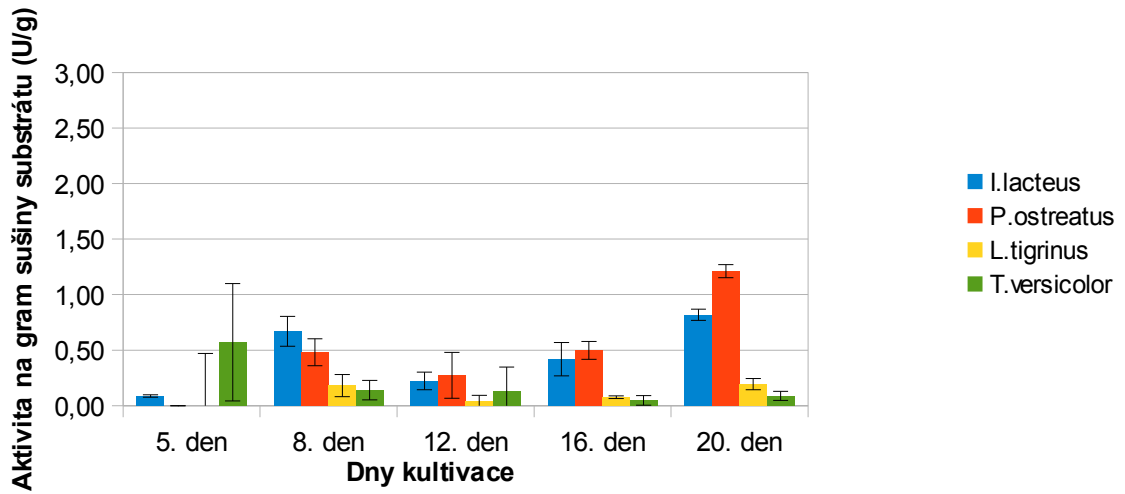


c) Dubové piliny + slámové pelety

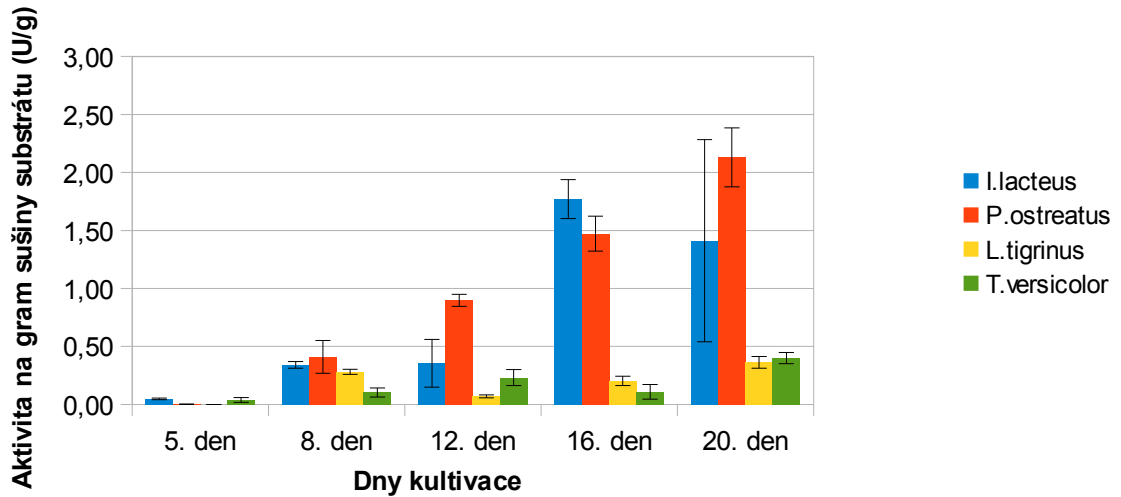


Graf 3. Enzymové aktivity MnP stanovené pomocí DMP (U/g substrátu)

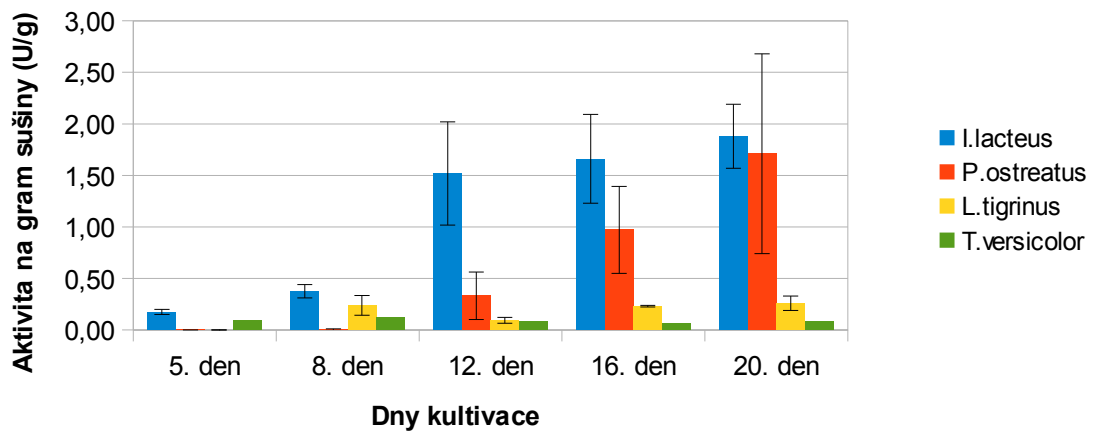
a) Slámové pelety



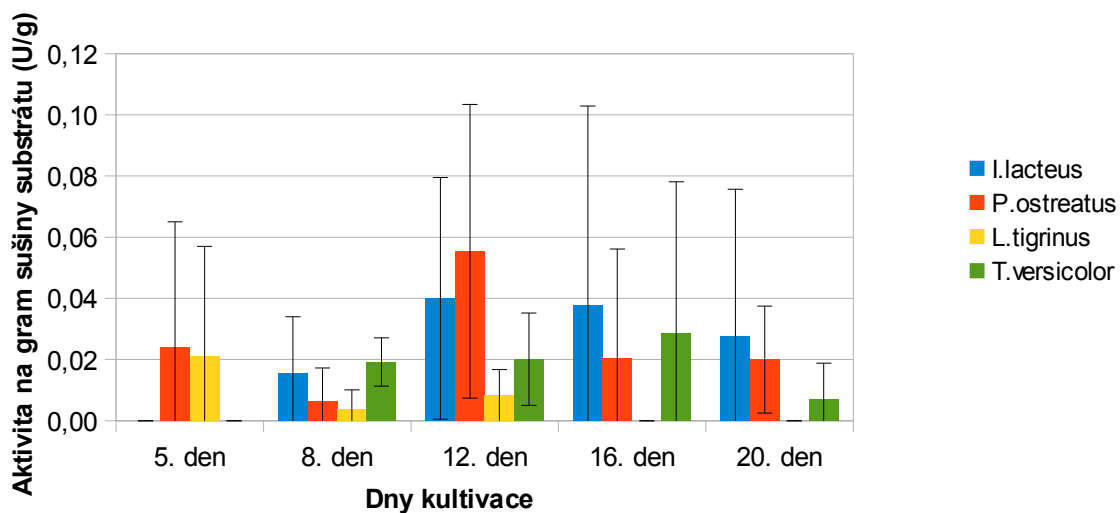
b) Topolové piliny + slámové pelety



c) Dubové piliny + slámové pelety



Graf 4. Enzymové aktivity LiP na dubových pilinách (U/g substrátu)



4.3. Výsledky měření proteinů

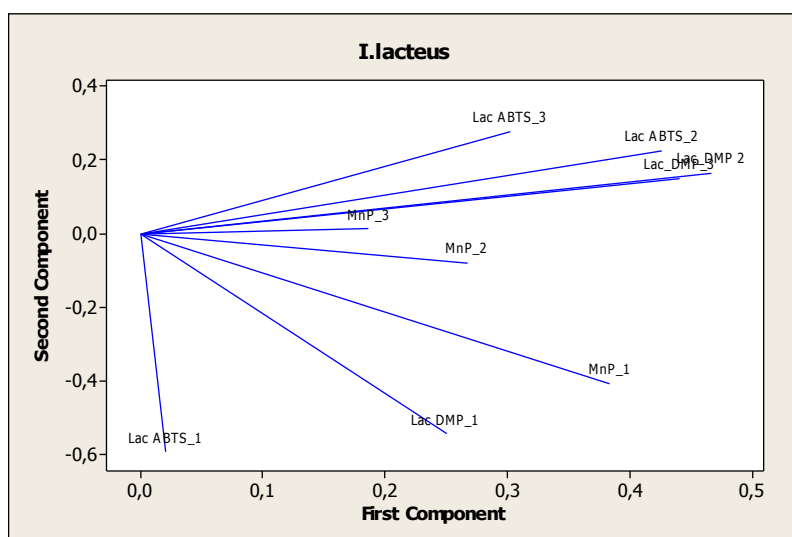
Celkové množství proteinů by mělo odpovídat množství přítomných enzymů. Stanovení proteinů bylo proto provedeno pro porovnání s enzymovými aktivitami. Z výsledků (Tabulka 1) vyplynulo, že aktivity měřených enzymů s tvorbou proteinů příliš nekorelovaly a to hlavně na dřevěných pilinách. Je to vidět u hub *P. ostreatus* či *I. lacteus*, kde na dubových pilinách docházelo s počtem dní k nárůstu enzymových aktivit, což však na výsledcích z měření proteinů není patrné. To ukazuje na tvorbu dalších, v tomto experimentu nestanovovaných, enzymů. Enzymovým výsledkům odpovídají trendy na slámových peletách, kde je produkce proteinů nejvyšší v půlce experimentu a poté klesá.

Tab. 1 Koncentrace proteinů (µg/g substrátu)

	5d	Std	8d	Std	12d	Std	16d	Std	20d	Std
Slámové pelety										
<i>I.lacteus</i>	511	18	545	189	453	59	194	106	147	39
<i>P.ostreatus</i>	598	38	1402	48	654	59	252	11	413	72
<i>L.tigrinus</i>	875	38	818	119	1044	28	279	41	487	80
<i>T.versicolor</i>	563	37	689	44	569	13	332	59	353	27
Topol + pelety										
<i>I.lacteus</i>	1109	169	646	68	667	85	773	89	768	205
<i>P.ostreatus</i>	696	150	977	134	740	96	811	46	1006	55
<i>L.tigrinus</i>	1253	248	907	146	1156	144	1092	22	1131	164
<i>T.versicolor</i>	1160	295	936	51	819	101	804	173	886	67
Dub + pelety										
<i>I.lacteus</i>	668	132	596	72	591	75	480	44	441	52
<i>P.ostreatus</i>	426	90	366	116	754	305	663	107	586	127
<i>L.tigrinus</i>	795	15	588	67	828	34	637	33	534	50
<i>T.versicolor</i>	815	49	570	38	554	6	525	23	513	57

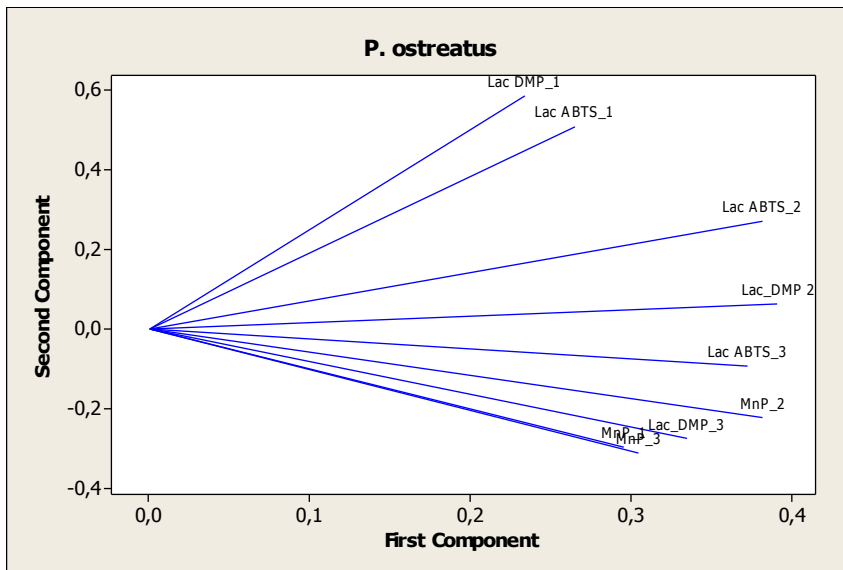
Graf 5. PCA analýza tvorby enzymů podle substrátu

a) *I. lacteus*



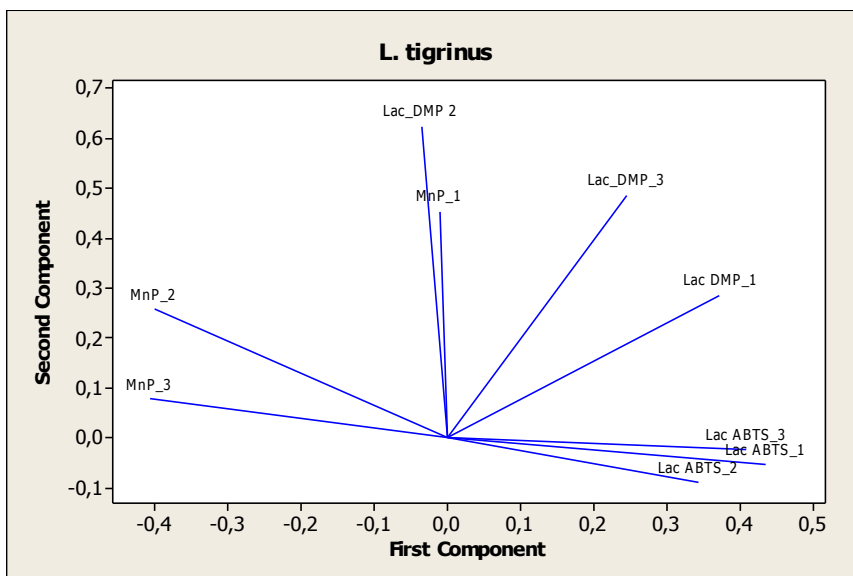
(první komponenta (PC I) vysvětluje 38 % celkové variability, druhá komponenta (PC II) vysvětluje 24 % celkové variability)

b) *P. ostreatus*



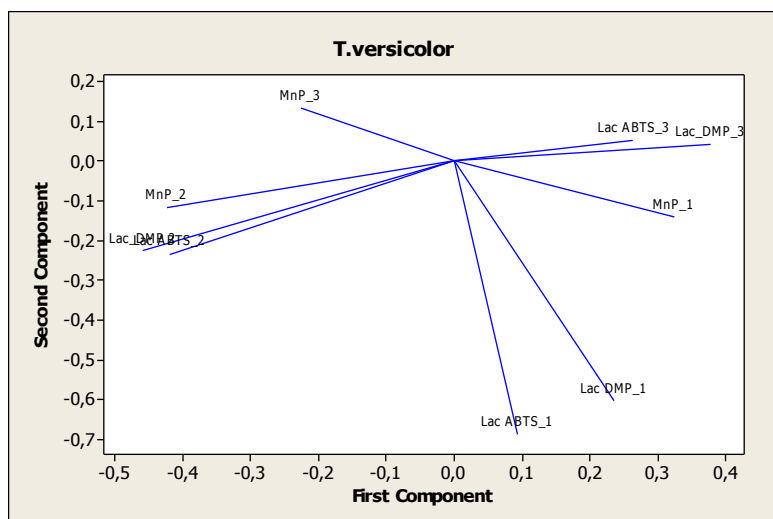
(PC I vysvětluje 63 % variability, PC II 21 % variability)

c) *L. tigrinus*



(PC I vysvětluje 56 % variability, PC II 22 % variability)

d) *T. versicolor*



(PC I vysvětluje 38 % variability, PC II 22 % variability)

4.4. Výsledky in-vitro degradace

Při převádění enzymů z pevných substrátů do Na-acetátového pufru bylo voleno různé množství pufru podle objemu biomasy tak, aby docházelo k vhodnému míchání pomocí magnetického míchadla. Pro slámové pelety bylo toto množství v ml pro jednotlivé dny 75-75-75-90-90, pro topolové piliny 170-175-200-200-200 a pro dubové piliny 120-120-120-120. Tyto rozdílné hodnoty zředění je potřeba brát v úvahu při vyhodnocování výsledků degradačního pokusu (aktivity enzymů v roztocích použitých k degradaci *in-vitro* – Příloha 1). Výsledky degradačních pokusů na jednotlivých substrátech je možno vidět v tabulkách 2 – 4. Počáteční koncentrace přidávaných ED byla 20 ppm. V tabulkách je vyjádřena koncentrace naměřená po 24 hodinách degradace v procentech oproti původní koncentraci.

Mez kvantifikace (LOQ) byla stanovena jako nejnižší bod kalibrační křivky 0,5 ppm. To se v přepočtu na procenta pohybovalo okolo 3 % původní koncentrace.

Tab.2 Množství ED po 24 hodinové degradaci, slámové pelety (%)

	5d		8d		12d		16d		20d		Kontroly	
	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std
P.ostreatus												
BPA	83	14	29	2	22	6	73	13	90	1	97	3
EE2	74	21	<LOQ	0	<LOQ	0	49	16	71	3	99	4
IRG	91	2	31	8	15	2	82	2	91	1	92	5
4-NP	83	10	9	2	10	3	26	8	32	9	87	3
T.versicolor												
BPA	19	29	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	103	4
EE2	11	19	<LOQ	0	<LOQ	0	3	0,3	4	1	101	3
IRG	71	28	26	8	61	6	42	10	58	8	95	5
4-NP	26	31	8	0,1	9	0,2	8	0,3	9	0,01	90	7
I.lacteus												
BPA	99	2	94	8	91	20	92	23	83	22	98	3
EE2	100	3	80	12	83	23	83	33	69	30	98	4
IRG	107	3	98	6	86	9	87	11	74	7	94	5
4-NP	109	4	73	28	53	32	89	1	46	33	92	7
P.tigrinus												
BPA	20	12	5	1	<LOQ	0	2	3	3	3	100	2
EE2	8	7	1	1	<LOQ	0	3	0,2	<LOQ	0	99	2
IRG	73	3	71	6	51	7	61	19	69	5	95	6
4-NP	12	5	9	0,3	7	0,1	8	0,3	8	1	95	9

Tab. 3 Množství ED po 24 hodinové degradaci, topolové piliny se slámou (%)

	5d		8d		12d		16d		20d		Kontroly	
	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std
P.ostreatus												
BPA	99	6	90	4	103	4	97	3	96	5	95	11
EE2	97	6	76	3	86	4	88	3	89	4	93	9
IRG	90	9	96	1	94	1	78	2	87	3	89	12
4-NP	81	9	41	7	25	7	53	5	57	2	84	15
T.versicolor												
BPA	32	12	8	4	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	98	2
EE2	16	9	4	1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	96	2
IRG	79	1	73	2	46	9	49	9	37	2	92	9
4-NP	4	5	2	0,2	2	1	5	1	6	0,1	93	9
I.lacteus												
BPA	92	9	99	0,5	96	4	97	2	100	5	95	3
EE2	89	6	98	1	90	6	93	4	88	8	94	4
IRG	86	1	90	2	85	2	78	4	85	4	93	1
4-NP	79	3	67	5	48	14	50	9	46	10	92	1
P.tigrinus												
BPA	77	1	8	1	3	1	10	2	11	4	100	2
EE2	64	2	2	2	<LOQ	0	4	1	4	1	101	2
IRG	89	2	74	2	64	1	66	2	72	6	100	2
4-NP	43	7	2	0,3	1	1	6	0,3	5	0,2	96	5

Tab.4 Množství ED po 24 hodinové degradaci, dubové piliny se slámou (%)

	5d		8d		12d		16d		20d		Kontroly	
	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std	Prům.	Std
P.ostreatus												
BPA	88	1	71	20	42	27	70	3	85	7	90	12
EE2	87	4	54	28	24	18	49	4	55	3	89	12
IRG	89	3	84	8	82	12	84	1	85	6	92	7
4-NP	85	9	50	22	16	17	9	3	11	1	94	5
T.versicolor												
BPA	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	93	9
EE2	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	92	9
IRG	47	4	38	9	49	12	53	8	47	4	91	4
4-NP	3	0,4	3	0,1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	93	5
I.lacteus												
BPA	82	5	73	6	97	2	90	6	102	5	89	3
EE2	80	7	57	6	90	4	83	8	113	5	89	4
IRG	80	3	81	3	87	1	78	14	88	6	87	5
4-NP	65	3	46	6	64	14	69	19	77	18	88	8
L.tigrinus												
BPA	28	13	4	1	6	2	5	1	16	3	95	7
EE2	15	8	2	0,1	<LOQ	0	<LOQ	0	<LOQ	0	95	5
IRG	66	2	53	3	62	5	68	4	84	11	99	2
4-NP	9	4	3	0,3	<LOQ	0,2	<LOQ	0,1	<LOQ	0	96	2

Podle výsledků degradačního pokusu se závislost schopnosti degradace endokrinních disruptorů na druhu substrátu značně lišily u jednotlivých druhů hub.

Nejúspěšněji degradoval endokrinní disruptory *T. versicolor*, který byl schopný na všech třech substrátech odbourávat BPA a EE2 pod LOQ či těsně k němu nejpozději od 12. dne kultivace dále. Na dřevěných pilinách byl schopen degradovat pod LOQ i 4-NP. Odbourával poměrně úspěšně i IRG, nejnižší dosažené hodnoty po degradaci se pohybovaly okolo 40 % původní koncentrace. Na slámových peletách 8. den růstu byl IRG degradován až na 26 %. *T. versicolor* degradoval dobře na všech třech substrátech, degradace byla všude statisticky významná ($p < 0,05$). Na základě degradace tří výše zmíněných prvků pod LOQ po celou dobu od 12. dne pokusu dále se jeví jako nejlepší substrát pro degradaci ED houbou *T. versicolor* dubové piliny smíchané se slámou. Velmi dobré výsledky však byly patrné i na topolových pilinách, kde se množství 4-NP po degradaci také velmi blížilo LOQ a hodnoty IRG po degradaci byly podobné jako u dubu. Vzhledem k tomu, že enzymy z topolových pilin byly o třetinu více nařaděné oproti dubovým pilinám, lze předpokládat zcela stejnou či dokonce vyšší degradační schopnost této houby na topolových pilinách oproti dubovým (Příloha 1).

Dobré degradační schopnosti prokázala i houba *L. tigrinus*, u níž byly patrné dobré degradační výsledky nezávisle na substrátu. Tomu odpovídaly i enzymové aktivity, které se

tvořily obdobně na všech třech substrátech. Všechny degradace byly vůči kontrole statisticky významné ($p > 0,05$).

Nejhůře degradovala houba *I. lacteus*. Ta ani na jednom ze substrátů nedegradovala žádný z endokrinních disruptorů pod LOQ. Z nich pak ani na jediném substrátu nedegradovala BPA na statisticky významnou hodnotu ($p < 0,05$). Jedinou výjimkou byl 8. den na dubu, kde degradovala BPA na 73 % původní hodnoty. Na slámových peletách *I. lacteus* nedegradoval statisticky významně v podstatě po celou dobu pokusu až na občasné výjimky (EE2 v 8. den kultivace a IRG a 4-NP ve 20. den kultivace). Na topolových pilinách degradoval po celou dobu pokusu významně pouze IRG a 4-NP ($p < 0,05$). Při růstu na dubových pilinách pak statisticky významně degradoval po celou dobu pokusu pouze 4-NP, v počátcích experimentu (5. a 8. den kultivace) pak též EE2.

P. ostreatus nejlépe degradoval na slámových peletách, na kterých byl v 8. a 12. den pokusu schopen odbourat EE2 pod LOQ. V tyto dny také vykazoval velmi dobrou schopnost degradace IRG. 12. den růstu na slámových peletách byl schopen odbourat IRG až na 15 % původní hodnoty (3 ppm), což byla vůbec nejnižší hodnota dosažená u této látky během celého experimentu. IRG se u většiny hub a na všech substrátech choval velmi persistentně a nebyl skoro odbouráván. *L. tigrinus*, který jinak vykazoval velmi dobré degradační schopnosti, degradoval po většinu dní IRG na hodnoty okolo 60-70 %. *P. ostreatus* byl jedinou houbou, která u této látky dosáhla takto nízké hodnoty. 12. den na slámových peletách odpovídal dnu s nejvyšší produkcí Lac (hlavně stanovované pomocí ABTS) na tomto substrátu. Na dubových pilinách, kde podle spektrofotometrického stanovení tvořil *P.ostreatus* nejvyšší hodnoty Lac (ABTS), však již tak dobré degradační schopnosti sledovány nebyly. V 16. den kultivace na dubu, kdy byly naměřeny maximální aktivity Lac (ABTS) u této houby, došlo ke statisticky významné degradaci ($p < 0,05$) BPA, EE2 a 4-NP, přičemž 4-NP degradoval až na 9 % původní hodnoty. Avšak IRG významně odbouráván nebyl ($p > 0,05$). Celkově byl *P.ostreatus* spíše slabě degradující houbou. Na topolových pilinách po celou dobu nedegradoval statisticky významně ani BPA ani IRG, kromě 8. dne pak významně neodboural ani EE2 ($p > 0,05$). Velmi malé degradace byly pozorovány i na dubu a to přesto, že roztok enzymů z dubu i při větším zředění obsahoval podobné a někdy i vyšší množství enzymů než roztok enzymů získaný ze slámových pelet.

4.5. Korelace aktivit enzymů s degradacemi

Pomocí PCA byla určena korelace mezi enzymy u jednotlivých hub s degradacemi (Graf 6 a-d). U houby *L. tigrinus* byla jasně patrná korelace tvorby MnP s degradací a naopak nezávislost degradace na tvorbě Lac (Graf 6c). To souhlasí s předchozím pokusem s degradací PAH pomocí této houby, kde byla též prokázána dominance MnP při degradacích [68].

U hub *T.versicolor* a *P.ostreatus* byly patrné výraznější korelace degradací s Lac (Grafy 6b a 6d). Velmi jasná korelace degradace s tvorbou obou typů Lac a naopak její slabá korelace s MnP byla patrná u *T.versicolor* na slámě a na topolových pilinách. Na dubových pilinách byla degradace podle PCA nezávislá na enzimech, tento výsledek je však zřejmě důsledkem konstantně stejné produkce enzymů a podobné degradace po celou dobu experimentu na dubových pilinách spíše než skutečné nezávislosti enzymových aktivit na degradaci (Příloha 4 a-c). U druhu *P.ostreatus* byl na slámových peletách, kde daná houba degradovala nejlépe, zjištěn jasný vliv Lac na degradaci, zatímco aktivity MnP s degradací nesouvisely (Příloha 5).

U kmene *I.lacteus* tvorba enzymů s degradacemi nekorelovala (Graf 6 a). Ačkoli tato houba produkovala nejvyšší množství MnP ze všech čtyř vybraných hub, degradace ED pomocí jejích enzymů byla většinou vůči degradacím v kontrolách statisticky nevýznamná. Statisticky významná degradace IRG a NP pozorovaná na topolových pilinách korelovala jak s přítomností obou typů Lac, tak MnP (Příloha 6). Na dubových pilinách po většinu času významně degradoval NP, zde však tvorba enzymů s degradací nekorelovala.

Nejlépe degradující houba *T.versicolor* podle PCA odbourávala ED hlavně pomocí lakázové aktivity. Její nejvyšší hodnoty byly u této houby naměřeny na slámových peletách a topolových pilinách. Na slámových pilinách bylo vrcholu aktivity dosaženo 8. den růstu a poté již docházelo k vyčerpávání. Na topolových pilinách naopak byly dosahovány vysoké hodnoty s přibývajícím dnem pokusu a aktivity se na této úrovni držely po delší dobu. Vhodnějším se tak jeví využívání dřevěných pilin smíchaných se slámou než samotné slámy.

Je patrné, že tvorba konkrétního enzymu nemusí vždy souviset s degradací. U houby *L. tigrinus*, u které byla sledována dobrá degradační schopnost, byla stanovena hlavním degradujícím enzymem MnP. Ta však byla touto houbou produkována v malém

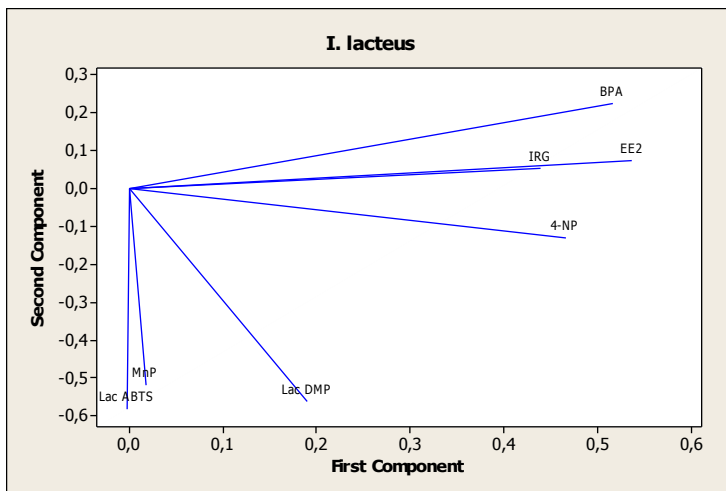
množství, na slámě a topolových pilinách byl *L.tigrinus* houbou s nejmenšími aktivitami tohoto enzymu. Pohybovaly se všechny pod 0,5 U/g substrátu. Naopak *I.lacteus*, který produkoval nejvíce tohoto enzymu (až 3 U/g substrátu), byl houbou nejhůře degradující. To ukazuje na tvorbu různých izoform ligninolytických enzymů, které mají odlišné schopnosti odbourávat polyaromatické látky.

K tvorbě různých izoform enzymů mohlo docházet i v rámci jednotlivých druhů v závislosti na substrátu. Tím by se dalo vysvětlit, proč vysoká aktivita Lac vedla na slámových peletách u houby *P.ostreatus* k úspěšné degradaci (a největší degradaci IRG mezi houbami vůbec), zatímco stejné množství Lac na dubových pilinách obdobný efekt nezpůsobilo.

V úvahu je třeba brát i možné vlivy jiných než výše stanovených enzymů na degradaci endokrinních disruptorů. U houby *I.lacteus* docházelo na dubových pilinách k úspěšnější degradaci na počátku experimentu, kdy byly statisticky významně odbourávány EE2 a 4-NP, zatímco ke konci experimentu byl odbouráván již pouze 4-NP. Enzymové aktivity však vykazují tendenci růstu s počtem dní. Vysvětlení lepších degradačních výsledků ve stavu s menší produkcí enzymů by se tak dalo vysvětlit buď produkcí jiných izoform enzymů na počátku a na konci kultivační doby nebo právě vlivem enzymů zcela jiných. Tomu odpovídají výsledky ze stanovení proteinů, kde bylo na dubu produkováno vyšší množství proteinů v počátečních dnech kultivace (průměrně 668 µg/g substrátu v 5. den vůči 441 µg/g substrátu ve 20. den).

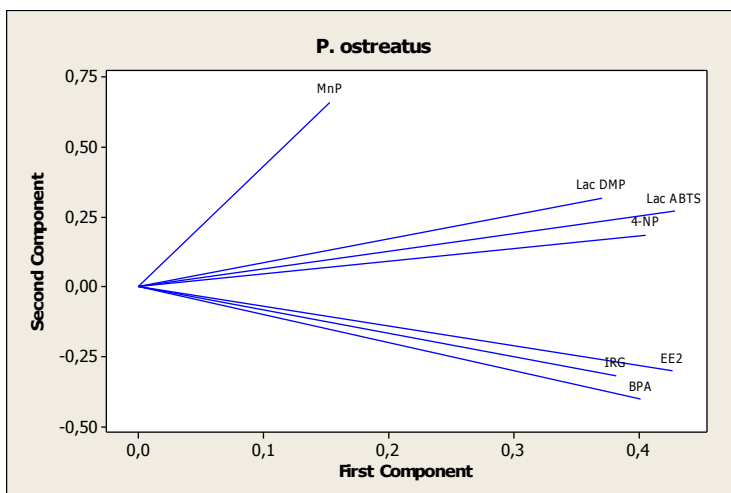
Graf 6. Míra korelace mezi enzymy a degradací jednotlivých ED

a) *I. lacteus*



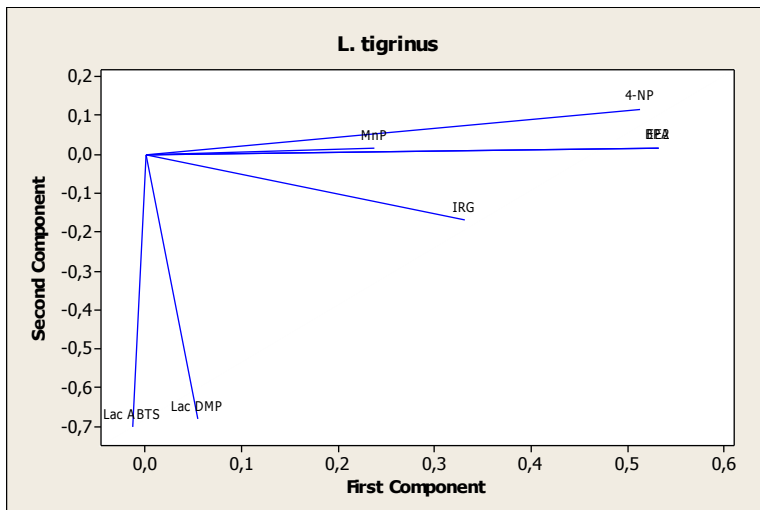
(PC I pokrývá 43 % celkové variability, PC II 21 % variability)

b) *P. ostreatus*



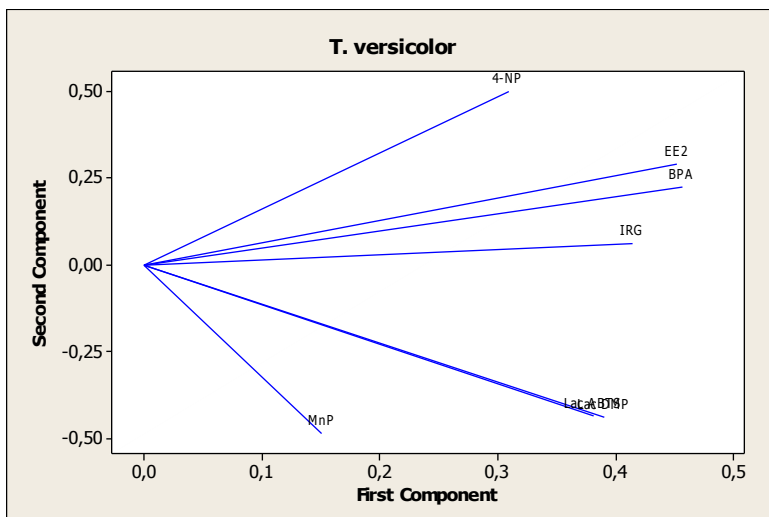
(PC I pokrývá 62 % celkové variability, PC II 22 % variability)

c) *L. tigrinus*



(PC I pokrývá 48 % celkové variability, PC II 27 % variability)

d) *T. versicolor*



(PC I pokrývá 57 % celkové variability, PC II 22 % variability)

5. Diskuze

Během tohoto experimentu se čtyřmi vybranými druhy ligninolytických hub kultivovanými na pevných substrátech se jako nejlépe degradující z těchto druhů projevily *T. versicolor* a *L. tigrinus*. *P. ostreatus* a *I. lacteus* se chovaly jako houby se slabými degradačními schopnostmi, přestože na kapalných médiích vykazovaly degradační vlastnosti velmi dobré.

Ve studii provedené Cajthaml et al. [66] bylo 8 druhů ligninolytických hub (včetně *I. lacteus*, *P. ostreatus* a *T. versicolor*) nasazeno na 20 ml maltextrakt-glukózového média (MEG) a byla u nich sledována degradace vybraných endokrinních disruptorů *in-vivo* – EE2, BPA, IRG, technického NP a 4-n-NP. *I. lacteus* a *P. ostreatus* byly jedinými houbami, které byly schopné degradovat technickou směs nonylfenolů pod detekční limit již po třech dnech kultivace spolu s tímto disruptorem. Stejně tak degradovaly již po 3 dnech zcela EE2. Na maltextraktovém substrátu byly tyto houby schopné pod detekční limit degradovat i další zkoumané disruptory. *T. versicolor* byl schopen též do 14 dnů kultivace zdegradovat všechny látky pod detekční limit, avšak žádnou již ve 3. dnu kultivace. *I. lacteus* a *P. ostreatus* se tak jevily jako houby lépe degradující.

Enzymové aktivity přitom byly naměřeny velmi podobné těm, které vykazovaly roztoky enzymů používané na *in-vitro* degradaci v tomto pokusu s pevnými substráty. Maximální hodnoty Lac (ABTS) u *T. versicolor* se pohybovaly většinou v rozmezí 50 – 100 U/l, u kmene *P. ostreatus* nejvyšší hodnoty dosahovaly čísel okolo 300 U/l a u kmene *I. lacteus* se pohybovaly okolo 10 U/l. Nejvyšší hodnoty MnP se pohybovaly mezi 3 – 20 U/l u kmene *T.versicolor*, mezi 2 – 5 U/l u kmene *P.ostreatus* a mezi 20 a 70 U/l u kmene *I.lacteus* (srovnání – Příloha 1). Stejně jako zde vykazovaly na MEGu nejvyšší aktivitu Lac (měřenou pomocí ABTS) *P. ostreatus* a nejvyšší aktivitu MnP *I. lacteus*. Obdobně LiP a MiP nebyly naměřeny ve významné míře. *I. lacteus* byl jednou ze dvou hub, u kterých byla naměřena mírná aktivita MiP mezi 5 – 18 U/l a u *T.versicolor* byla zaznamenána slabší aktivita LiP pohybující se mezi hodnotami 1 – 17 U/l. Výjimkou byly kultury vystavené EE2, kde byla u *T.versicolor* indukována zvýšená tvorba LiP (81 U/l). Při porovnání celkové aktivity enzymů na 20 ml média MEG (bez ED) a na 10g pevných substrátů vychází z produkčního hlediska lépe pevné substráty. Enzymové aktivity tak ukazují na to, že slámové a dřevěné substráty jsou velmi vhodným materiálem pro kultivaci ligninolytických hub.

Horší degradační schopnosti enzymů získaných extrakcí z pevných substrátů porostlých mycelii hub by se dalo vysvětlit tím, že jimi bylo degradováno velké množství disruptorů (4x20 ppm) v poměrně malém objemu enzymového roztoku (1,2 ml). V pokusu na médiu MEG bylo degradováno pouze 10 ppm EE2 a BPA a 2,5 ppm 4-n-NP a IRG. Ke každé houbě byl vždy přidáván pouze jeden z disruptorů nikoli ve směsi a degradace probíhala v 20 ml média. Bylo tedy přítomno větší množství enzymů na menší koncentraci látek.

Lepší degradační schopnosti houby *T.versicolor* oproti houbám *I.lacteus* a *P.ostreatus* byly sledovány při pokusu na dusíkem limitovaném minerálním médiu (tzv. Kirkově médiu) se směsí šesti endokrinních disruptorů (nepublikováno, viz. Příloha 3). U kmene *P. ostreatus* použitým v tomto pokusu však byly prokázány obecně slabé růstové schopnosti, výsledky u této houby proto nemají vypovídací hodnotu. Z experimentu je přesto zřejmá lepší degradační schopnost druhu *T. versicolor* oproti druhu *I. lacteus* od 7. dne růstu dále.

Dobré degradační schopnosti houby *T. versicolor* byly prokázány i v dalších studiích. Soares et al. [57] sledovali odbourávání nonylfenolu v uměle kontaminovaných půdách pomocí ligninolytických hub. Nejprve byl proveden předpokus na tekutém médiu se čtyřmi vybranými druhy včetně *T. versicolor* a *P. ostreatus*. Podle měření po 15 dnech *T. versicolor* degradoval nonylfenol o 96 %, zatímco *P.ostreatus* o 32 – 70 %. *T. versicolor* spolu s houbou *Bjerkandera sp.* BOL13 byly dále použity v pokusu s kontaminovanými půdami. V prvním kroku byly inokulovány na 2g březových pilin, ke kterým bylo po třech týdnech růstu hub přidáno 15-20 g půdy s nonylfenolem v množství 430 mg/kg. Přičemž *T.versicolor* vykazoval lepší prorůstání substrátem, odolnost vůči nižším teplotám, větší odolnost vůči toxicitě nonylfenolu a dobré degradační vlastnosti spojené s úbytkem toxicity (po 5 týdnech zdegradoval nonylfenol o $96,8 \pm 2$ % průměru a směrodatné odchylky).

T.versicolor dobře prorůstal substrátem i v experimentu Rodríguez-Rodríguez et al. [67]. V něm byla sledována degradace farmaceutických látek v čistírenském kalu smíchaném se slámovými peletami (stejnými jako v tomto pokusu) tak, že pelety tvořily 38 % celkového substrátu. Nejvyšší hodnoty aktivity lakázy měřené pomocí DMP se pohybovaly mezi 3 - 4 U/g substrátu. *T. versicolor* byl schopen snížit toxicitu kalu.

Ve studii provedené Covinem et al.[69] byly sledovány schopnosti hub *I. lacteus* a *L. tigrinus* degradovat PAH v kontaminovaných půdách a v kreosotem impregnovaných dubových pilinách. Houby byly předinokulovány na lignocelulózových substrátech, kterými byly komerční slámové pelety, pšeničná sláma a nasekané kukuřičné klasy. *L. tigrinus* vykazoval na všech substrátech jasně lepší degradační vlastnosti oproti houbě *I. lacteus*, přestože houby prorůstaly, podle stanovení ergosterolu, použitými substráty obdobně. Houby nejlépe prorůstaly na komerčních slámových peletách.

V experimentu této diplomové práce by bylo vhodné dále stanovit ve vzorcích po degradaci estrogenní aktivity pro kontrolu, zda nevznikaly meziprodukty chovající se též jako endokrinní disruptory. Podle dřívějších pokusů je patrné, že degradace endokrinních disruptorů pomocí hub bílé hniloby vedla ve většině případů k úbytku estrogenních aktivit či ke snížení toxicity substrátů. Ve studii Cajthaml et al. [66] byl pomocí kvasinkového testu estrogenní aktivity sledován úbytek aktivity korespondující s degradací IRG a EE2. U NP a BPA však byly i po úplné degradaci sledovány zbytkové estrogenní aktivity, které lze přisuzovat estrogenním meziproduktům. *I.lacteus* a *P.ostreatus* byly schopny velmi rychle redukovat množství technické směsi NP, i na konci pokusu však zbývalo mezi 20-30 % estrogenní aktivity vůči kontrole. *T.versicolor* dokázal odstranit u technického NP estrogenní aktivitu zcela. U 4-n-NP však zbývalo malé množství estrogenní aktivity u všech tří zmíněných hub i přes veškerou degradaci dané látky. U hub *I.lacteus* a *T.versicolor* se pravděpodobně tvořily estrogenně aktivní meziprodukty i při degradaci BPA.

Pokles estrogenní aktivity spojený s degradací EE2 ligninolytickými houbami byl prokázán i v pokusu na dusíkem limitovaném minerálním médiu (nepublikováno, Příloha 2). V něm bylo devět kmenů hub zaočkováno na médium spolu s 200 µg EE2 a byl sledován úbytek látky v průběhu kultivace. Estrogenní aktivity byly stanoveny β-galaktázovým testem. Degradaci EE2 spojenou s redukcí estrogenní aktivity prokázali i Suzuki et al. [71]. Při degradaci EE2 pomocí Lac a MnP získaných z hub *T.versicolor* a *Phanerochate chrysosporium* byla estrogenní aktivita v roztoku zcela odbourána, přestože se v první fázi degradace evidentně tvořily estrogenní meziprodukty. Taboada-Puig et al. [72] degradovali všechny čtyři zde použité endokrinní disruptory pomocí VP houby *Bjerkandera adusta*. Dosáhli kompletní degradace všech prvků kromě IRG, který byl

degradován pouze o 36 %, u všech látek však byly detekovány zbytkové estrogení aktivity a to v množství 26 %, 40 % a 10 % u BPA, NP a EE2.

Hundt et al [70] zjistili při degradaci IRG pomocí *T. versicolor* tvorbu degradačních produktů v podobě konjugátů s xylózou a glukózou a 2,4-dichlorfenolu. Tyto produkty vykazovaly oproti irgasanu nižší cytotoxicitu.

Zde byly k degradaci ED použity samostatné enzymy. Při použití celých mycelií hub k degradaci endokrinních disruptorů v odpadních vodách je třeba uvažovat možné působení xenoestrogenů na tvorbu enzymů u ligninolytických hub. V experimentu na maltextraktovém médiu provedeném Cajthaml et al. [66] v přítomnosti IRG docházelo ke snížení aktivit Lac a LiP u *T.versicolor* a naopak ke zvýšené tvorbě MnP u této houby a houby *I. lacteus*. Aktivity Lac snižoval IRG též u hub *I. lacteus* a *P. ostreatus*. Přítomnost 4-n-NP snížila tvorbu Lac u všech tří zmiňovaných hub, u kmene *I. lacteus* pak i tvorbu MnP. Naopak technická směs NP zvýšila produkci Lac u druhů *T. versicolor* a *P. ostreatus*. Přítomnost EE2 způsobila zvýšenou aktivitu Lac a LiP u *T. versicolor*. BPA nevykazovalo žádné výrazné vlivy na tvorbu enzymů. Kollmann et al. [73] na rozdíl od výše zmíněného pokusu prokázali indukci tvorby Lac u *T.versicolor* v přítomnosti 4-n-NP.

Přenosilová et al. [75] v pokusu na Kirkově médiu sledovali zvýšení lakázové aktivity (měřené pomocí ABTS) u *T.versicolor* a aktivity MnP u *I.lacteus* v přítomnosti EE2.

Auriol et al. [74] použili lakázu z houby *T.versicolor* k degradaci přirozených steroidních estrogenů E1, E2 a E3 a syntetického EE2 v uměle kontaminované a reálné odpadní vodě. Syntetická voda byla připravena tak, aby obsahovala stejné množství ED jako voda reálná (E1 – 33 ng/l, E2 25 ng/l a E3 a EE2 po 6 ng/l). Pokus ukázal, že odpadní voda neobsahovala ve výrazném množství látky, které by blokovaly působení lakázy a její vliv na odbourávání ED. Průběh degradace ED byl v obou typech vod obdobný. K odbourání veškerých látek bylo potřeba počáteční aktivity 20 U/ml, pouze u syntetické vody s EE2 došlo k téměř 100% degradaci již při 10 U/ml.

Dřevěné a slámové substráty se ukázaly jako vhodné pro kultivaci ligninolytických hub a tvorbu enzymů schopných degradovat endokrinní disruptory. Pro získání více informací ohledně působení látek v odpadních vodách na houby a jejich schopnosti degradace polutantů v těchto vodách je třeba dále zkoumat jejich schopnosti degradace *in-vivo* na těchto substrátech.

Lze nalézt mnoho studií zabývajících se degradací ED pomocí hub bílé hniloby na kapalných médiích či v půdě, popřípadě využíváním izolovaných ligninolytických enzymů v kapalných substrátech či imobilizovaných na umělých pevných substrátech. Velmi málo se jich však dosud zabývá degradací na dřevěných či jiných pevných organických substrátech. Přitom dřevěné piliny či sláma jsou snadno dostupným a ekonomickým substrátem s dobrým potenciálem pro růst hub a degradaci kontaminantů.

Tento pokus byl proveden jako předpokus pro výběr substrátu do laboratorních bioreaktorů na odbourávání ED. V mnoha studiích byly zkoumány možnosti degradace organických kontaminantů pomocí ligninolytických hub v laboratorních bioreaktorech. Byly při tom používány různé nosiče hub jako pemza s pískem [79], nerezové drátěnky [80] či nastříhané kuchyňské houbičky na mytí a přírodní houby z lufy [78]. V těchto experimentech houby získávaly zdroj energie z odpadní vody (reálné či uměle vyrobené, v některých případech byly kontaminované roztoky tvořeny minerálním médiem). Dřevo jakožto nosič hub v bioreaktoru skýtá výhodu lignocelulózového zdroje pro houby.

Ortega-Clemente et al.[77] použili bioreaktor naplněný kostkami ze dřeva dubu křemeláku (holm oak) o hraně 5 mm na začátku napuštěné médiem pro růst hub a inokulovaných kmenem *T.versicolor*. Pomocí tohoto bioreaktoru byla čištěna voda z papírenského průmyslu obsahující různá barviva a ligninové látky. Reaktor byl schopný fungovat po celou dobu pokusu (90 dní) bez nutnosti přidávání dalšího zdroje uhlíku jako jsou glukóza či maltóza využívané v jiných pokusech s houbovými bioreaktory využívající umělé nosiče hub. Reaktor byl schopen odstranit 77 ± 12 % (průměr \pm směrodatná odchylka) barviv z vody a produkoval enzymy v množství 3-4 U/l MnP, 1-4 U/l Lac(ABTS) a maximálně 0,2 U/l LiP. Toto množství enzymových aktivit se oproti pokusům s houbovými bioreaktory na jiných substrátech, kde se pohybovaly v hodnotách desítek až stovek U/l, řadilo k nízkým. Schopností odbourávat přítomné kontaminanty se však dubový bioreaktor rovnal ostatním bioreaktorům.

Kasinath et al. [81] použili k degradaci barviva Remazol brilliant Blue R dva typy bioreaktorů s houbou *I. lacteus*, jeden naplněný polyuretanovou pěnou, druhý kostkami z borovicového dřeva. Na umělohmotném nosiči tvořil *I. lacteus* podstatně více MnP (rozdíly v desítkách U/l), přesto lepší degradace barviva byla sledována na dřevěném substrátu. Při studiu degradace dalších barviv těmito reaktory, degradovaly oba podobným způsobem.

Z experimentu provedného v rámci této diplomové práce se zdá být pro dlouhodobější degradační experimenty vhodnější využití dřevěných substrátů smíchaných se slámou spíše než využití samotných slámových pelet. Na slámových peletách sice docházelo v prvních dnech pokusu k výrazným degradacím a vysoké tvorbě enzymů, poté však zřejmě brzy docházelo k vyčerpání substrátu a poklesu enzymových aktivit i degradačních schopností hub. Na dřevěných substrátech byl růst hub pomalejší, poté,co se dosáhlo vysokých aktivit, však tyto aktivity i degradační schopnosti zůstávaly konstantní. Rychlé prorůstání hub slámovým substrátem oproti dřevěnému pozorovali i Rubilar et al. [76]. Ligninolytická houba *Anthracophyllum discolor* ve stejné době, co kolonizovala 100% pšeničná zrna, kolonizovala pouze 50 % pšeničné slámy a 25 % dřevěných pilin.

6. Závěr

Experiment s ligninolytickými enzymy produkovanými na pevných organických substrátech prokázal vhodnost těchto substrátů pro růst dřevokazných hub a produkci enzymů schopných degradace běžných endokrinních disruptorů. Vhodnějším se jeví využití substrátu tvořeného namícháním slámových pelet s dřevěnými pilinami, kde nedocházelo k rychlému vyčerpávání substrátu jako na čisté slámě.

Degradační schopnosti a jejich závislost na substrátu byly specifické pro jednotlivé druhy. Dobře degradující kmeny *T. versicolor* a *L. tigrinus* degradovaly obdobně na všech třech vybraných substrátech, zatímco u slaběji degradujících kmenů *P. ostreatus* a *I. lacteus* byly viditelné rozdíly mezi substráty. Kmen *P. ostreatus* lépe degradoval na čisté slámě, zatímco kmen *I. lacteus* vykazoval lepší degradační schopnosti na dřevěných pilinách. Nejlépe degradoval kmen *T. versicolor*, který byl schopen degradovat pod mez kvantifikace látky BPA, EE2 a 4-NP. Žádná houba nebyla schopná odbourat IRG pod mez kvantifikace.

I. lacteus a *P. ostreatus* patřily v předchozích pokusech na kapalných médiích k nejlépe degradujícím kmenům. To ukazuje na nutnost opatrnosti při výběru kmenů vhodných pro aplikaci v reálném prostředí. Houby osvědčené na jednom substrátu se mohou v jiném prostředí chovat zcela odlišně.

U jednotlivých kmenů byly sledovány odlišné strategie pro odbourávání aromatických estrogenů. Hlavními degradujícími enzymy byly Lac a MnP, přičemž *L. tigrinus* degradoval hlavně pomocí MnP a ostatní tři kmeny využívaly spíše Lac popřípadě kombinaci obou enzymů. Vysoké aktivity enzymů neodpovídaly vždy degradaci. Například kmen *I. lacteus* produkoval šestkrát více MnP oproti houbě *L. Tigrinus*, přesto v mnoha případech nedegradoval přítomné látky statisticky významně a naopak *L. tigrinus* byl schopen s malým množstvím MnP degradovat pod mez kvantifikace EE2 a 4-NP. To ukazuje na tvorbu rozdílných izoform ligninolytických enzymů u jednotlivých kmenů. V některých případech zřejmě docházelo k tvorbě rozdílných izoform i u stejné houby v závislosti na substrátu, například u houby *P. ostreatus*, kdy tvorba Lac na slámě vedla k výrazné degradaci, zatímco její tvorba na dubových pilinách nikoli.

Vzhledem ke slabé korelaci výsledků měření enzymových aktivit se stanovením enzymů lze usuzovat na tvorbu dalších enzymů, které se též mohly určitou mírou podílet na degradaci ED.

Organické pevné substráty by mohly představovat vhodný substrát do houbových bioreaktorů pro čištění odpadních vod díky své dobré dostupnosti, ekonomičnosti a šetrnosti vůči životnímu prostředí oproti umělým nosičům. Organické dřevěné či slámové substráty navíc mohou představovat zdroj energie pro ligninolytické houby, které aromatické polutanty degradují pouze jako součást sekundárního metabolismu a energii z nich nezískávají.

Pro navazující pokus s laboratorními bioreaktory by bylo podle výsledků tohoto pokusu vhodné použít kmen *T. versicolor* a jako substrát dřevěné piliny smíchané se slámou. Dobré výsledky byly patrné na topolových pilinách, kde i při nízkých enzymových aktivitách Lac, odpovědné za degradaci, docházelo k degradaci BPA, EE2 a 4-NP pod mez kvantifikace. Na tomto substrátu byly ligninolytické houby schopné dobrého růstu bez předchozího promytí od „hnědých extraktů“, které bylo potřeba u dubového dřeva.

Přílohy

Příloha 1. Enzymové aktivity v roztocích použitých k degradaci *in-vitro*

a) Lac (ABTS) (U/l)

	5d	Std	8d	Std	12d	Std	16d	Std	20d	Std
Slámové pelety										
<i>I.lacteus</i>	0,9	0,5	13	4	6	2	7	2	3	0,9
<i>P.ostreatus</i>	6	3	172	78	337	29	194	14	176	6
<i>P.tigrinus</i>	175	15	71	7	125	3	63	11	50	4
<i>T.versicolor</i>	88	91	159	42	139	9	106	20	122	27
Topol + pelety										
<i>I.lacteus</i>	0	0	5	1	11	2	18	4	18	2
<i>P.ostreatus</i>	0	0	36	6	125	13	105	11	98	9
<i>P.tigrinus</i>	50	3	38	5	53	5	24	3	31	3
<i>T.versicolor</i>	13	3	32	10	68	23	56	9	49	3
Dub + pelety										
<i>I.lacteus</i>	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0
<i>P.ostreatus</i>	0	0	13	13	124	71	237	92	195	39
<i>P.tigrinus</i>	105	12	31	3	57	11	54	3	22	1
<i>T.versicolor</i>	85	9	71	3	84	31	78	8	74	12

b) Lac (DMP) (U/l)

	5d	Std	8d	Std	12d	Std	16d	Std	20d	Std
Slámové pelety										
<i>I.lacteus</i>	8	0,2	25	5	9	2	14	3	18	1
<i>P.ostreatus</i>	2	3	16	4	85	19	31	3	29	1
<i>P.tigrinus</i>	77	7	64	2	57	4	40	3	38	3
<i>T.versicolor</i>	72	64	139	39	91	13	69	10	68	10
Topol + pelety										
<i>I.lacteus</i>	2	0	5	1	2	0,2	10	0	17	4
<i>P.ostreatus</i>	0,5	0,6	7	1	21	8	19	3	29	9
<i>P.tigrinus</i>	23	3	29	3	14	2	16	1	23	3
<i>T.versicolor</i>	13	3	28	7	49	20	40	6	48	3
Dub + pelety										
<i>I.lacteus</i>	12	2	12	1	3	0	17	4	15	0,3
<i>P.ostreatus</i>	0,4	0,3	6	3	14	9	67	34	56	14
<i>P.tigrinus</i>	56	2	36	3	14	2	28	2	27	1
<i>T.versicolor</i>	71	10	68	1	54	21	60	1	63	13

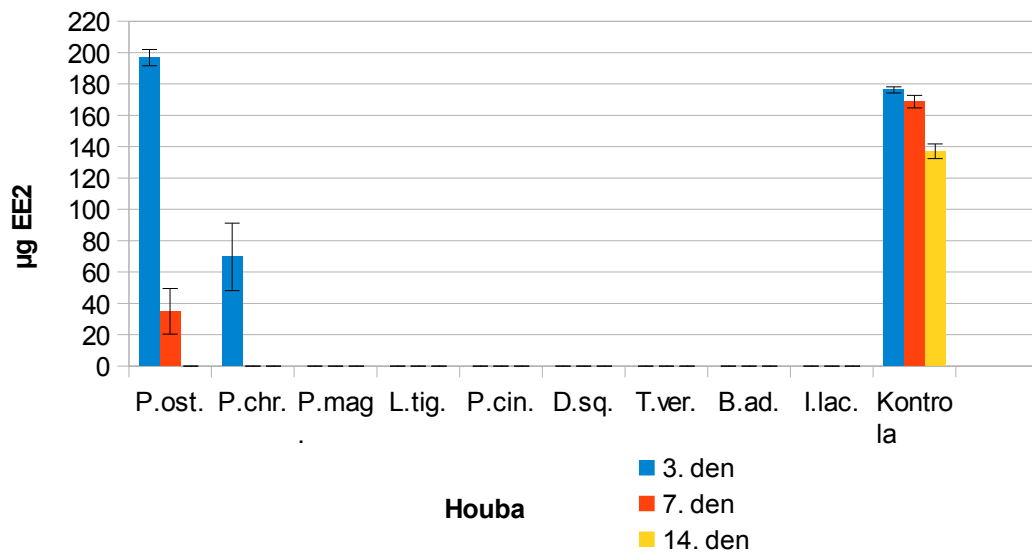
c) MnP (U/l)

	5d	Std	8d	Std	12d	Std	16d	Std	20d	Std
<i>Slámové pelety</i>										
<i>I.lacteus</i>	12	2	89	18	30	11	47	17	91	6
<i>P.ostreatus</i>	0	0	64	16	37	28	55	9	135	7
<i>P.tigrinus</i>	21	36	24	13	6	7	8	1	22	6
<i>T.versicolor</i>	76	70	19	12	21	24	5	5	10	5
<i>Topol + pelety</i>										
<i>I.lacteus</i>	3	1	19	2	18	13	88	10	71	53
<i>P.ostreatus</i>	0	0	23	10	45	3	74	9	107	16
<i>P.tigrinus</i>	0	0	16	2	4	1	10	2	18	3
<i>T.versicolor</i>	2	2	6	3	12	4	6	4	20	3
<i>Dub + pelety</i>										
<i>I.lacteus</i>	15	3	32	7	126	51	139	45	158	29
<i>P.ostreatus</i>	0	0	0,4	0,5	28	24	82	43	144	79
<i>P.tigrinus</i>	0	0	20	10	8	3	19	1	23	6
<i>T.versicolor</i>	8	3	10	3	6	2	5	1	20	6

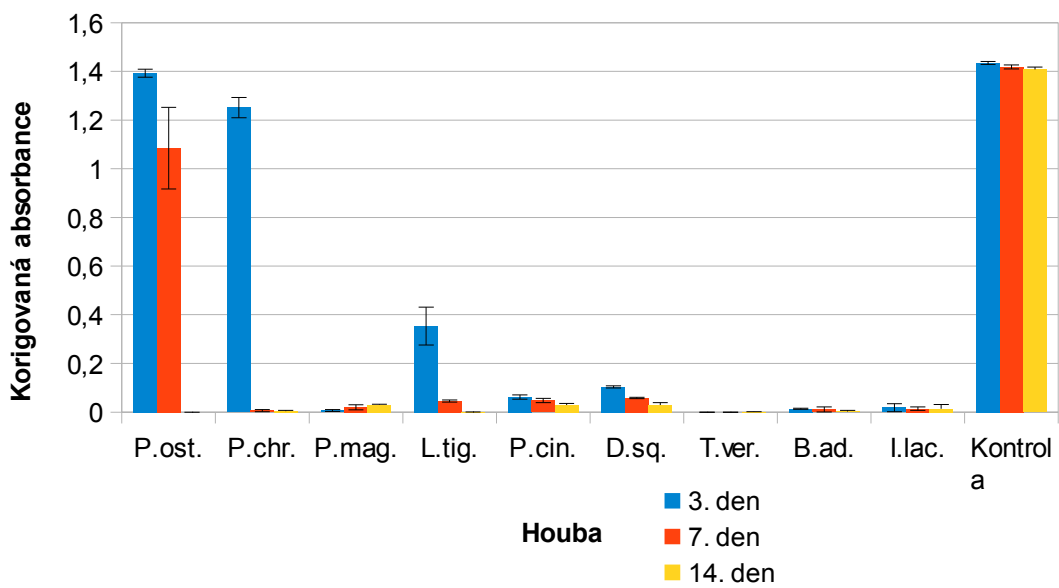
Příloha 2. Výsledky degradace EE2 na dusíkem limitovaném minerálním médiu (LNKM)

V degradačním pokusu na LNKM byly kromě hub použitých v této diplomové práci zkoumány kmeny *Dichomitus squalens* (P.Karst)Reid CCBAS 750, *Phanerochaete chrysosporium* Burds. CCBAS 854, *Phanerochaete magnoliae* (Berk. & M.A.Curtis) CCBAS 134/I, *Pycnoporus cinnabarinus* (Jacq.)P.Karst. CCBAS 595, *Bjerkandera adusta* (Willd.:Fr.)P.Karst. CCBAS 232 ze sbírky basidiomycét Akademie věd (CCBAS). Houby byly zaočkovány do 20 ml média současně s 200 µg EE2 a byl sledován úbytek látky během kultivace. Estrogenní aktivity byly stanoveny β-galaktázovým testem podle Rotledge and Sumpter (2006) [18].

a) Množství EE2 v médiu v jednotlivých dnech kultivace hub



b) Estrogenní aktivity z β -galakázového testu v jednotlivých dnech kultivace



Příloha 3. Výsledky z degradace směsi šesti ED na LNKM

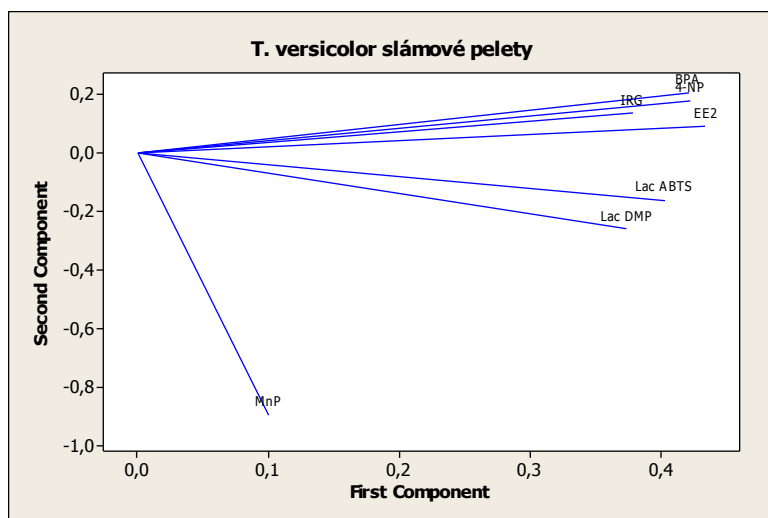
Množství látek v μg (původní obsah: 40 μg každé látky v 20 ml média)

	E3	Sd	BPA	Sd	E2	Sd	EE2	Sd	E1	Sd	IRG	Sd
IL3d	12,1	0,9	14,2	1,2	7,8	0,7	22,7	3,8	7,9	1,4	25,8	0,8
IL10d	0	0	2,3	1,2	0,8	1,7	0	0	2,3	5,1	13,2	1,7
IL 14d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20,0	2,8	4,2
PO 3d	20,3	2,2	31,1	0,2	32,5	0,8	33,1	1,5	32,8	1,5	29,5	1,2
PO 7d	16,1	7,7	27,6	4,1	30,3	3,4	30,6	4,2	27,7	2,9	24,6	3,2
PO 14d	19,5	2,2	29,7	1,4	31,9	1,4	31,8	1,4	28,7	1,1	25,9	1,0
TV 3d	17,5	1,8	28,5	0,5	28,7	0,8	28,6	1,4	28,5	1,3	6,2	2,6
TV 7d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TV 14d	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,3
Kon. 3d	16,6	0,7	34,6	0,1	37,8	1,0	34,6	1,6	34	0,9	29,8	0,9
Kon. 7d	19,3	1,8	33	0,05	37,5	1,0	32,3	0,5	34,2	0,4	28,9	1,2
Kon. 14d	16,9	3,1	31,8	0,1	37,3	0,9	31,5	1,3	34	0,9	26,4	0,7

TV – *Trametes versicolor*, IL – *Irpex lacteus*, PO – *Pleurotus ostreatus*, Kon. - mrtvá kontrola, d – den kultivace

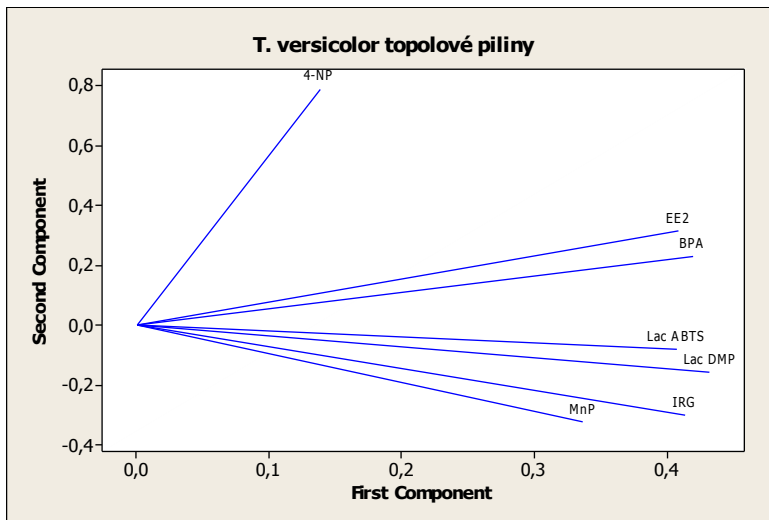
Příloha 4 Grafy PCA – korelace mezi enzymovými aktivitami a degradací ED na jednotlivých substrátech u houby *T.versicolor*

a) *T. versicolor* - slámové pelety



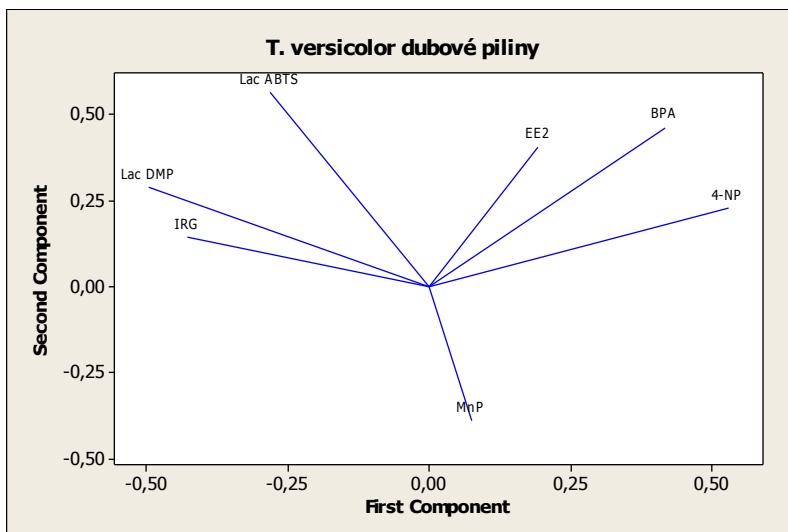
(PC I vysvětluje 69 % variability, PC II 15 % variability)

b) *T. versicolor* – topolové piliny



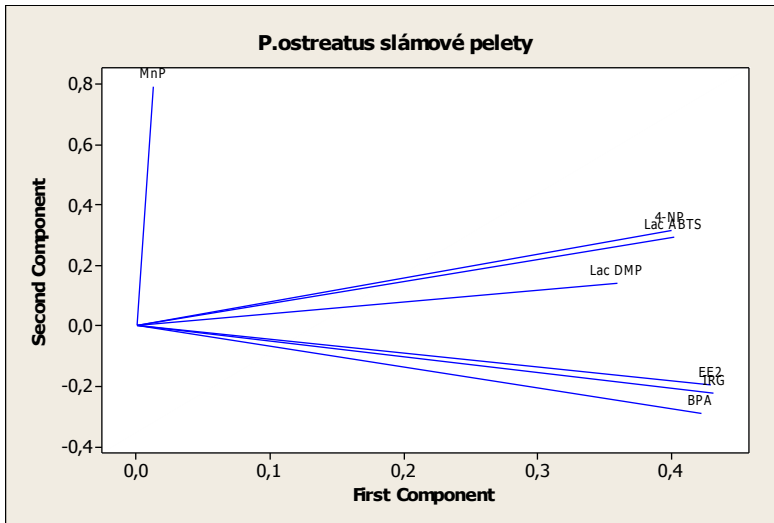
(PC I vysvětluje 69 % variability, PC II 19 % variability)

c) *T. versicolor* – dubové piliny



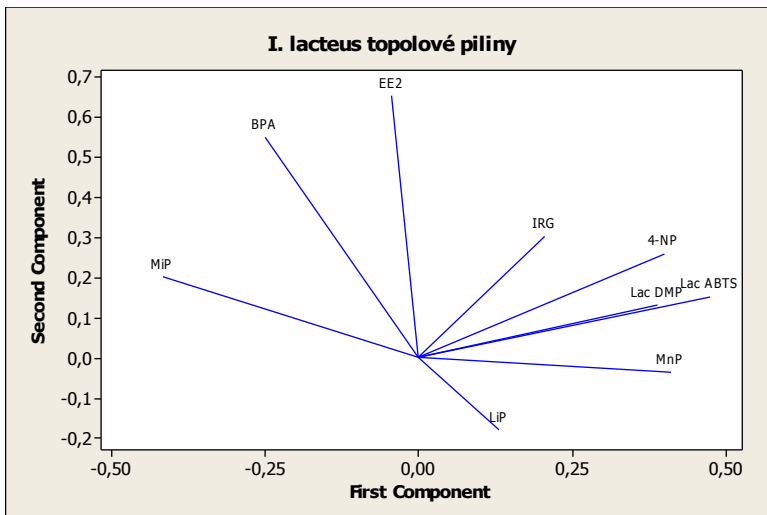
(PC I vysvětluje 36 % variability, PC II 29 % variability)

Příloha 5 Graf PCA – korelace enzymových aktivit s degradacemi u *P.ostreatus* na slámě



(PC I vysvětluje 67 % variability, PC II 21 % variability)

Příloha 6 Graf PCA - korelace enzymových aktivit s degradacemi u *I. lacteus* na topolu



(PC I vysvětluje 38 % variability, PC II 22 %)

Literatura

- [1] Cabana H., Jones J.P., Agathos S.N. (2007): Elimination of Endocrine Disrupting Chemicals using White Rot Fungi and their Lignin Modifying Enzymes: A review; *Engineering in Life Sciences*; Vol.7; Issue 5; 429-456
- [2] Sonnenschein C., Soto A.M. (1998): An Updated Review of Environmental estrogen and Androgen Mimics and Antagonists; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; Vol. 65; Issue 1-6; 143-150
- [3] Stahlschmidt-Allner P., Allner B., Römbke J., Knacker T. (1997) : Endocrine Disrupters in Aquatic Environment; *Environmental science and Pollution Research*; Vol. 4; Issue 3; 155-162
- [4] Hutchinson T.H., Brown R. et al. (2000): Ecological Risk Assessment of endocrine disruptors; *Environmental health perspectives*; Vol. 108; Issue 11; 1007-1014
- [5] Vandenberg L.N., Maffini M.V., Sonnenschein C. et al. (2009): Bisphenol-A and the Great Divide: A review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption; *Endocrine Review*; Vol. 30; Issue 1; 75-95
- [6] Gillesby B.E., Zacharewski R. (1998): Exoestrogens : Mechanims of Actions and Strategies for Identification and Assessment; *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No.1, 3-14
- [7] Rubin B.S. (2011): Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 2011; 127;27-34
- [8] Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T. (1998): A review of the environmental fate, effects and exposures of Bisphenol A; *Chemosphere*; Vol. 36; No. 10; 2149-2173

- [9] Lange A., Paull G.C., Katsu Y. et al. (2009): Sexual Reprogramming and Estrogenic Sensitization in Wild Fish Exposed to Ethynylestradiol; *Environmental Science & Technology*; 2009; 43; 1219-1225
- [10] Segner H., Navas J.M., Schäfers C., Wenzel A. (2003) : Potencies of estrogenic compounds in in vitro screening assays and life cycle tests with zebrafish in vivo; *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 2003; 54; 315-322
- [11] Jobling S., Tyler C.R. (2003): Endocrine disruption in wild freshwater fish; *Pure and Applied Chemistry*; Vol. 75; No. 11-12; 2219-2234
- [12] Desbrow C., Routledge E., Brighty G.C. et al. (1998): Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and In Vitro Biological Screening; *Environmental Science & Technology*; Vol. 32; No.11; 1549-1558
- [13] Guttendorf B., Westendorf J. (2001): Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens; *Toxicology*; 2001; 166; 79-89
- [14] Hassanin A., Kuwahara S. et al. (2002): Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals ; *Journal of Veterinary Medical Science*; Vol. 64; Issue 10; 921-926
- [15] Batty J., Lim R. (1999): Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia ; *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; Vol. 36; Issue 3; 301-307
- [16] Vajda A.M., Barber L.B., Gray J.L. (2008): Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent; *Environmental Science & Technology*; Vol.42; Issue 9; 3407-3414

- [17] Bögi C., Schwaiger J., Ferling H. (2003): Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria*; Environmental Research; Vol. 93; 195-201
- [18] Routledge E.J., Sumpter J.P., (1996): Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen; Environmental Toxicology and Chemistry; 15; 241–248
- [19] Kwak H., Bae M., Lee M. et al. (2001): Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*); Environmental Toxicology and Chemistry; Vol. 20; Issue 4; 787-795
- [20] Alonso-Magdalena P., Ropero A.B., Soriano S., et al. (2012): Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways; Molecular and Cellular Endocrinology; Vol. 355; Issue 2; 201-207
- [21] Correira A.D., Freitas S., Scholze M. (2007): Mixtures of Estrogenic Chemicals Enhance Vitellogenic Response in Sea Bass; Environmental Health Perspectives; 115; 115-121
- [22] Bonfeld-Jorgensen E.C., Long M.H., Hofmeister M.V.(2007): Endocrine-Disrupting Potential of Bisphenol A, Bisphenol A Dimethacrylate, 4-n-Nonylphenol, and 4-n-Octylphenol in Vitro: New Data and a Brief Review; Environmental Health perspectives; 115; 69-76
- [23] Bedoux G. et al. (2012): Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in environment; Environmental Science Pollution Research; 19; 1044-1065
- [24] Mao Z., Zheng X., Zhang Z., et al.(2012): Occurrence and biodegradation of Nonylphenol in the environment; International Journal of Molecular Sciences; 2012; 13; 491-505

- [25] Ying G., Williams B., Kookana R. (2002): Environmental fate of alkylphenol ethoxylates-review; *Environment International*; Vol. 28; Issue 3; 215-226
- [26] Larsson D.G.J., Adolffson-Erici M., Parkkonen J., et al.(1999); Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive?; *Aquatic Toxicology*; Vol. 45; 91-97
- [27] Thorpe K.L., Gross-Sorokin M., Johnson I., et al.(2006): An assessment of the model of concentration addition for predicting the estrogenic activity of chemical mixtures in wastewater treatment works effluents; *Environmental Health Perspectives*; Vol.114; Issue 1; 90-97
- [28] Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., et al.(1998): Widespread Sexual Disruption in Wildfish; *Environmental Science & Technology*; Vol. 32; Issue 17; 2498-2506
- [29] Thorpe K.L., Hutchinson T.H., Hetheridge M.J., et al.(2001): Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); *Environmental Science & Technology*; Vol. 35; Issue 12; 2476-2481
- [30] Snyder S.A., Villeneuve D.L., Snyder E.M., Giesy J.P.(2001): Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents; *Environmental Science & Technology*; Vol. 35; Issue 18; 3620-3625
- [31] Yokota H., Seki M., Maeda M., et al.(2001): Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*); *Environmental Toxicology and Chemistry*; Vol. 20; Issue 11; 2552-2560
- [32] Van Aerle R., Pounds N., Hutchinson T., et al.(2002): Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethynylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*; *Ecotoxicology*; Vol. 11; Issue 6; 423-434

- [33] Kashiwada S., Ishikawa H., Miyamoto N., et al.(2002): Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers; *Water Research*; Vol. 36; Issue 8; 2161-2166
- [34] Markey C.M., Michaelson C.L., Veson E.C., et al.(2001): The Mouse Uterotrophic Assay : A Reevaluation of its Validity in Assessing the Estrogenicity of Bisphenol A; *Environmental Health Perspectives*; Vol. 109; Issue 1; 55-60
- [35] Ishibashi H., Matsumura N., Hirano M., et al.(2004): Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin; *Aquatic Toxicology*; Vol. 67; Issue 2; 167-179
- [36] Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance; *Environmental Science & Technology*; Vol. 36; Issue 6; 1202-1211
- [37] Foran C.M., Bennett E.R., Benson W.H. (2000): Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan; *Marine Environmental Research*; Vol. 50; Issue 1-5; 153-156
- [38] Veldhoen N., Skirrow S.C., Osachoff H., et al.(2006): The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development; *Aquatic Toxicology*; Vol. 80; Issue 3; 217-227
- [39] Fernandez M.P., Ikonomu M.G., Buchanan I.(2007): An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewater; *Science of the Total Environment*; 373; ; 250-269
- [40] Coldham N.G., Dave M., Sivapathasundaram S., et al.(1997): Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay; *Environmental Health Perspectives*; Vol. 105; Issue 7; 734-742

- [41] Johnson A.C., Sumpter J.P. (2001): Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works; *Environmental Science & Technology*; Vol. 35; Issue 24; 4697-4703
- [42] Johnson A.C., Aerni H.R., Gerritsen A., et al.(2005): Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices; *Water Research*; Vol. 39; Issue; 47-58
- [43] Ejlertsson J., Nilsson M.L., Kylin H., et al.(1999): Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digester sludge, landfilled municipal solid waste, and landfilled sludge; *Environmental Science & Technology*; Vol. 33; Issue 2; 301-306
- [44] McNamara P.J., Wilson C.A., Wogen M.T., et al. (2012): The effect of thermal hydrolysis pretreatment on the anaerobic degradation of nonylphenol and short-chain nonylphenol ethoxylates in digested biosolids; *Water Research*; Vol. 46; Issue 9; 2937-2946
- [45] Svenson A., Sjöholm S., Allard A.S., Kaj L.(2009): Antiestrogenicity and estrogenicity in leachates from solid waste deposits; *Environmental Toxicology*; 233-239
- [46] Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J.(1999): Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge; *Science of the Total Environment*; Vol. 225; Issue 1-2; 91-99
- [47] Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., et al.(2000): Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water; *Environmental Science & Technology*; Vol. 34; Issue 24; 5059-5066
- [48] Silva C.P., Otero M., Esteves V.(2012): Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review; *Environmental pollution*; Vol. 165; Issue; 38-58
- [49] Fürhacker M., Scharf S., Weber H.(2000): Bisphenol A: emissions from point sources; *Chemosphere*; Vol. 41; Issue; 751-756

- [50] Klecka G.M., Staples C.A., Clark K.E., et al.(2009): Exposure Analysis of Bisphenol A in Surface Water System in North America and Europe; *Environmental Science & Technology*; Vol. 43; ; 6145-6150
- [51] Martín J., Camacho-Munoz M.D., Santos J.L., et al.(2012): Distribution and temporal evolution of pharmaceutically active compounds alongside sewage sludge treatment. Risk assessment of sludge application onto soils; *Journal of Environmental Management*; Vol. 102; ; 18-25
- [52] Kai B. (2005): Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters; *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; Vol. 49; Issue 1; 9-17
- [53] Chen X., Nielsen J.L., Furgal K., et al.(2011): Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions; *Chemosphere*; Vol. 84; ; 452-456
- [54] Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L (2002) Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments; *Environmental Science& Technology*; Vol. 36;4998–5004
- [55] Pointing S.B.(2001): Feasibility of bioremediation by white-rot fungi; *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol. 57; Issue 1-2; 20-33
- [56] Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., et al.(1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi; *Fungal Genetics and Biology*; Vol. 27; Issue 2-3; 175-185
- [57] Soares A., Jonasson K., Terrazas E., et al.(2005): The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol; *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol. 66; Issue 6; 719-725

- [58] Abbas A., Koc H., Liu F., Tien M. (2005): Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate; *Current Genetics*; Vol. 47; issue 1; 49-56
- [59] Tien M., Kirk T.K. (1988): Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*; *Methods in Enzymology*; Vol. 161; 238-249
- [60] Tien M., Kirk T.K. (1984): Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*; Vol. 81; Issue 8; 2280-2284
- [61] Vyas B.R.M., Bakowski S., Šašek V., Matucha M. (1994): Degradation of anthracene by selected white rot fungi; *FEMS Microbiology Ecology*; Vol. 14; Issue 1; 65-70
- [62] Niku-Paavola M.L., Karhunen E., Salola P., Raunio V. (1988): Ligninolytic enzymes of white-rot fungus *Phlebia radiata*; *Biochemical Journal*; Vol. 254; 877-884
- [63] De Jong E.D., Cazemier A.E., Field J.A., De Bont J.A.M. (1994): Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55; *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 60; Issue 1; 271-277
- [64] Matsumura E., Yamamoto E., Numata A., et al. (1986): Structures of the laccase-catalyzed oxidation-products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); *Agricultural and Biological Chemistry*; Vol. 50; Issue 5; 1355-1357
- [65] Bradford M.M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*; Vol. 72; Issue 1-2; 248-254

- [66] Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Möder M. (2009): Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi; *Chemosphere*; Vol. 75; 745-750
- [67] Rodríguez-Rodríguez C.E., Jelić A., Llorca M., et al.(2011): Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge; *Bioresource Technology*; Vol. 102, Issue 10; 5602-5608
- [68] Covino S., Svobodová K., Křesinová Z., et al.(2010): In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79; *Bioresource Technology*; Vol. 101; 3004-3012
- [69] Covino S., Čvančarová M., Muzikář M., et al.(2010): An efficient PAH-degrading *Lentinus (Panus) tigrinus* strain: Effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices; *Journal of Hazardous Materials*; Vol. 183; 669-676
- [70] Hundt K., Martin D., Hammer E., et al.(2000): Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*; *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 66; Issue 9; 4157-4160
- [71] Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T.(2003): Removal of estrogenic activities of 17 beta-estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi; *Water Research*; Vol. 37; Issue 8; 1972-1975
- [72] Taboada-Puig R., Junghanns C., Demarche P., et al.(2011): Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors; *Bioresource Technology*; Vol.102; Issue 11; 6593-6599

- [73] Kollmann A., Brault A., Touton I., et al.(2003): Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils; *Journal of Environmental Quality*; Vol. 32; Issue 4; 1269-1276
- [74] Auriol M., Filali-Meknasi Y., Tyagi R.D., Adams C.D.(2007): Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater; *Water Research*; Vol.41; 3281-3288
- [75] Přenosilová L., Křesinová Z., Svobodová K., Slavíková Amemori A., et al.(2012): Enzyme production in white-rot fungi stimulated by 17alpha-ethynylestradiol; *Environmental Microbiology Reports*; ID: EMI-2012-0717
- [76] Rubilar O., Tortella G., Cea M., et al.(2011): Bioremediation of a Chilean Andisol contaminated with pentachlorophenol (PCP) by solid substrate cultures of white-rot fungi; *Biodegradation*; Vol.22; 31-41
- [77] Ortega-Clemente A., Caffarel-Méndez S., Ponce-Noyola M.T., et al.(2009): Fungal post-treatment of pulp mill effluents for the removal of recalcitrant pollutants; *Bioresource Technology*; Vol.100; 1885-1894
- [78] Povedič J., Hasal P., Novotný J. (2008): Decolorization of organic dyes by *Irpex lacteus* in a laboratory trickle-bed biofilter using various mycelium supports; *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*; Vol.84; 1031-1042
- [79] Akdogan H.A., Pazarlioglu N.K.(2011): Fluorene biodegradation by *P. osteratus* – Part II: Biodegradation by immobilized cells in a recycled packed bed reactor; *Process Biochemistry*; vol.46; 840-846
- [80] Anatasí A., Spina F., Prigione F., et al.(2010): Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*; *Bioresource Technology*; Vol.101; 3067-3075

- [81] Kasinath A., Novotný Č., Svobodová K., et al.(2003): Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor; *Enzyme and Microbial Technology*; Vol.32; 167-173
- [82] Ezechiáš M., Svobodová K., Cajthaml T. (2012): Hormonal activities of new brominated flame retardants; *Chemosphere*; Vol.87; Issue 7; 820-824
- [83] Fujii K., Urano N., Ushio H.(2000): Profile of a nonylphenol-degrading microflora and its potential for bioremedial applications; *Journal of Biochemistry*; Vol.128; 909-916
- [84] Auriol M., Filali-Merknassi Y., Tyagi R.D., et al.(2006): Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge; *Process Biochemistry*; Vol.41; Issue 3; 525-539
- [85] Koh Y.K.K., Chiu T.Y., Boobis A., et al.(2008): Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater; *Environmental Technology*; Vol. 29; Issue 3; 245-267
- [86] Sasaki M., Maki J., Oshiman K., et al.(2005): Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp strain AO1; *Biodegradation*; Vol.16; Issue 5; 449-459
- [87] Kim Y.M., Murugesan K., Schmidt S.,et al.(2011): Triclosan susceptibility and co-metabolism – A comparison for three aerobic pollutant-degrading bacteria; *Bioresource Technology*; Vol. 102; 2206-2212
- [88] Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., et al.(2009): Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol; *Environmental Pollution*; Vol. 157; 3325-3335
- [89] Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M. (2004): Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*; *Water Research*; Vol. 38, 2323–2330

- [90] Ke J.X., Zhuang W.Q., Gin K.Y.H., et al. (2007): Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium; *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol. 75, 1163–1171
- [91] Martínez A.T. (2002): Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases; *Enzyme and Microbial Technology*; Vol. 30; Issue 4; 425-444
- [92] Ren H.Y., Ji S.L., Ahmad N.U.D., et al. (2007): Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp.JCR5; *Chemosphere*; Vol. 66, 340–346
- [93] Yoshimoto T., Nagai F., Fujimoto J., et al. (2004): Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants; *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 70; 5283–5289
- [94] Blanquéz P., Guieysse B. (2008): Continuous biodegradation of 17-estradiol and 17-ethynylestradiol by *Trametes versicolor*; *Journal of Hazardous Materials*; Vol. 150; 459-462
- [95] Lee S.M., Koo B.W., Lee S.S. et al.(2005): Degradation of bisphenol A by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity; *Enzyme Microbiology and Technology*; Vol. 35; 417-423
- [96] Hirano T., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. (2000): Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*; Vol. 64; 1958-1962
- [97] Junghans C., Moeder M., Krauss G., et al.(2005): Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases, *Microbiology-(UK)*; Vol. 151; 45-57