

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav pro životní prostředí**

**Studijní program: Environmentální vědy**



**Fungální degradace organopolutantů s endokrinně  
disruptivní aktivitou**

**Fungal biodegradation of endocrine disruptors**

Disertační práce

Praha 2013

RNDr. Zdena Křesinová

Vědecká práce prezentovaná v této disertační práci byla finančně podpořena z následujících zdrojů: Technologická agentura České Republiky (grant č. TA01020804), Centrum kompetence Technologické agentury České Republiky č. TE01010218, Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy (granty č. LC 06066 a č. 2B06156), Grantová agentura České Republiky (granty č. 503/10/0408, č. KJB600200613 a č. 525/09/1058), Program rozvoje vědních znalostí na UK (PRVOUK 02), Akademie věd České Republiky (výzkumný záměr č. AV0Z50200510).

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

Školitel:	doc. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze
Školitel-konzultant:	Dr. Monika Möder Helmholtz Centre for the Environmental Research, Leipzig, Germany

Autorka prohlašuje, že tato disertační práce je založená na jejích původních datech, všechny ostatní zdroje jsou řádně uvedeny a citovány a práce nebyla použita k získání jiného vysokoškolského titulu. Spoluúčast autorky při přípravě odborných článků, které jsou součástí přílohy, je uvedena v následujícím textu.

**Prezentovaná práce je založená na následujících publikacích, které jsou součástí přílohy:**

**1. Publikace**

Křesinová, Z., Svobodová, K., Cajthaml, T., 2009. Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek – review. *Chemické Listy* 103, 200-207.

**2. Publikace**

Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K., Řezanka, T., 2009. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environmental Pollution* 157, 3325-3335.

**3. Publikace**

Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M., 2009. Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745-750.

**4. Publikace**

Křesinová, Z., Moeder, M., Ezechiáš, M., Svobodová, K., Cajthaml, T., 2012. Mechanistic study of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: Tracking of extracellular and intracellular degradation mechanisms. *Environmental Science and Technology* 46, 13377-13385.

**5. Publikace**

Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Covino, S., Cajthaml, T., 2012. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* 88, 1317-1323.

**6. Publikace**

Muzikář, M., Křesinová, Z., Svobodová, K., Filipová, A., Čvančarová, M., Cajthamlová, K., Cajthaml, T., 2011. Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *Journal of Hazardous Materials* 196, 386-394.

**7. Publikace**

Olšovská, J., Křesinová, Z., Flieger, M., Cajthaml, T., 2010. Separation of PCBs by liquid chromatography on reversed phase sub-2-micron particle columns. *Talanta* 15, 1849-1855.

**8. Publikace**

Křesinová, Z., Muzikář, M., Olšovská, J., Cajthaml, T., 2011. Determination of 15 isomers of chlorobenzoic acid in soil samples using accelerated sample extraction followed by liquid chromatography. *Talanta*, 84, 1141-1147.

## **Deklarace spolupráce na odborných publikacích:**

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 1 (její podíl 70%). Její účast byla následující: příprava podkladů, vyhodnocení a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 2 (její podíl 45%). Její účast byla následující: příprava podkladů jedné z kapitol a podíl při psaní manuskriptu.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 3 (její podíl 65%). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci a při psaní manuskriptu.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 4 (její podíl 80%). Její účast byla následující: téměř všechny experimentální práce, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová podílela na vzniku publikace 5 (její podíl 25%). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 6 (její podíl 50%). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 7 (její podíl 40%). Její účast byla následující: podíl na experimentální práci a přípravě manuskriptu.

Jménem dalších spolautorů prohlašuji, že se RNDr. Zdena Křesinová významně podílela na vzniku publikace 8 (její podíl 80%). Její účast byla následující: veškerá experimentální práce, vyhodnocení dat a příprava manuskriptu.

## ABSTRAKT

Výsledky uvedené v této disertační práci se týkají oboru environmentálních věd, konkrétně mykoremediace. Velká část těchto výsledků byla uveřejněna v recenzovaných časopisech s impakt faktorem, z toho 7 článků v zahraničních časopisech. Práce zahrnuje také dva souhrnné články a dosud nepublikovaná data. Z obecného pohledu přispěla tato práce k rozvoji znalostí v oblasti degradace organopolutantů a konkrétně byla zaměřená na biodegradace endokrinně disruptivních látek (ED) pomocí hub bílé hniloby.

První tematický okruh se zabývá screeningem degradačně vhodných kmenů hub bílé hniloby. V rámci práce bylo otestováno 8 kmenů na modelovém tekutém médiu a 4 kmeny na pevném slámovém substrátu. Degradační potenciál byl určen na základě kvantifikace koncentračních změn ED (bisfenolu A, irgasanu, 4-nonylfenolu a 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu), dále byly zhodnoceny změny estrogenních aktivit a produkce ligninolytických enzymů. *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus* a *Trametes versicolor* byly vyhodnoceny jako nejslibnější kmeny pro degradaci ED v tekutých médiích a prokázaly dobrou degradační účinnost vůči směsi ED (syntetické ED a přirozené estrogény) během kultivace na pevném substrátu. Naopak kmen *Phanerochaete chrysosporium*, dosud nejstudovanější zástupce hub bílé hniloby, zcela nedegradoval 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) a bisfenol A (BPA) a pouze částečně degradoval irgasan (IRG) a 4-nonylfenol (NP). V rámci prvního okruhu byly zpracovány dva souhrnné články. Jeden zaměřený na původ, výskyt a odbourávání ED v životním prostředí a druhý zabývající se detailně látkou EE2.

Druhý tematický okruh je věnován detailní studii mechanismu houbového metabolismu EE2. Byla provedena frakcionace houbových kultur 8 kmenů za účelem lokalizace degradačního aparátu a identifikace několika dosud nepopsaných metabolitů EE2. Pomocí série *in vitro* pokusů byl dále otestován degradační potenciál lakázy jedlého kmenu *P. ostreatus*, produkované za různých podmínek a také mikrosomální frakce *P. ostreatus*. Bylo prokázáno, že do procesu degradace EE2 v houbových kulturách není zapojen pouze jeden mechanismus, ale že se pravděpodobně jedná o kooperaci několika extracelulárních a intracelulárních mechanismů.

Třetí tematický okruh se týká biodegradace ED látek patřící mezi skupinu perzistentních aromatických polutantů, jako jsou polychlorované bifenyly a jejich bakteriální metabolity chlorbenzoové kyseliny. Do tohoto okruhu spadá také vývoj selektivních a citlivých analytických metod kapalinové chromatografie a extrakčních metod. Při degradačních experimentech v tekutých médiích a kontaminované zemině byly z hlediska degradace a snížení toxicity nejefektivnější kmeny *P. ostreatus* a *I. lacteus*.

## ABSTRACT (EN)

This dissertation thesis contains scientific results attained in the field of bioremediation. The major part of the results has been published in international journals in 8 papers. In addition, relevant yet unpublished results have been included too.

The first thematic part describes the screening of the degradation ability of white rot fungi (WRF). In the screening, several endocrine-disrupting compounds (EDs; bisphenol A, triclosan, 4-nonylphenol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol) were degraded by 8 different fungal strains in the presence of liquid medium. The most promising strains were used for the degradation of an ED mixture (synthetic and natural estrogens) in the presence of a straw substrate. Attention was paid to the evaluation of stimulation or suppression of enzyme activities during the biodegradation processes and changes in residual estrogenic activity. *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus* and *Trametes versicolor* showed the highest degradation ability under both cultivation conditions. On the contrary, *Phanerochaete chrysosporium*, to date the most studied representative of white rot fungi, did not degrade bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) at all. Two review articles have been published to summarize the origin, presence and biodegradation of EDs, mainly EE2, in the environment.

The second thematic part is focused on the investigation of EE2 biodegradation mechanisms. Fractionation of fungus bodies and extracellular contents were used in EE2 degradation in order to detect the degradation apparatus. Identification of a number of EE2 metabolites was performed; many of them have not yet been described. The degradation ability of lacase from edible fungus *P. ostreatus* as well as microsomal fraction was tested in a set of *in vitro* experiments. It has been proved that in the EE2 biodegradation by *P. ostreatus* (and other strains) several enzymatic mechanisms (intracellular, extracellular) are involved most likely via cooperation.

The third thematic part focuses on the biodegradation of persistent aromatic organopollutants with endocrine-disruptive activity, such as polychlorinated biphenyls and their bacterial metabolites chlorobenzoic acids. This part also includes the development of sensitive liquid chromatography methods and an extraction method using accelerated solvent extraction. During the degradation experiments in a liquid medium and contaminated soil, *P. ostreatus* and *I. lacteus* showed the highest degradation rate and also the highest toxicity reduction.

## OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT (EN)</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2 LITERÁRNÍ ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
2.1 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY .....	11
2.1.1 <i>Mechanismus působení ED a vliv na organismy</i> .....	12
2.1.2 <i>Zástupci ED a jejich výskyt v životním prostředí</i> .....	14
2.1.2.1 <i>Přirozené estrogény</i> .....	15
2.1.2.2 <i>Syntetické endokrinní disruptory a irgasan</i> .....	15
2.1.2.3 <i>Perzistentní aromatické polutanty</i> .....	18
2.1.2.3 <i>Výskyt ED v životním prostředí</i> .....	19
2.2 HOUBY BÍLÉ HNILOBY A JEJICH ENZYMOVÝ APARÁT .....	23
2.2.1 <i>Mangan-dependentní peroxidáza</i> .....	25
2.2.2 <i>Mangan-independetní peroxidáza</i> .....	25
2.2.3 <i>Lignin peroxidáza</i> .....	26
2.2.4 <i>Versatilní peroxidáza</i> .....	27
2.2.5 <i>Lakáza</i> .....	27
2.2.6 <i>Cytochrom P-450</i> .....	28
2.2.7 <i>Ostatní enzymy</i> .....	30
2.3 DEGRADACE ED.....	31
2.3.1 <i>Abiotické degradace ED</i> .....	31
2.3.2 <i>Degradace na ČOV</i> .....	31
2.3.3 <i>Mikrobiální degradace ED v laboratorním měřítku</i> .....	34
2.3.4 <i>Degradace ED pomocí ligninolytických hub</i> .....	35
2.3.4.1 <i>Degradace in vivo</i> .....	36
2.3.4.2 <i>Degradace pomocí ligninolytických enzymů</i> .....	37
2.3.4.3 <i>Degradace in vitro – P450</i> .....	40
2.3.5 <i>Degradace na pevných substrátech</i> .....	42
2.3.6 <i>Degradace PBC a CBA</i> .....	43
<b>3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>47</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>49</b>
2.1 MIKROORGANISMY A MATERIÁL.....	49



4.1	ANALYTICKÉ METODY .....	49
4.2	PŘÍPRAVA SUBSTRÁTŮ A KULTIVACE MIKROORGANISMŮ .....	50
4.3	PŘÍPRAVA A FRAKČONACE HOUBOVÝCH KULTUR PRO DEGRADACE <i>IN VITRO</i> .....	51
4.4	PŘÍPRAVA A IZOLACE LAKÁZY KULTUR <i>P. OSTREATUS</i> , KULTIVOVANÝCH ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK .....	51
4.5	<i>IN VIVO</i> DEGRADACE ED PŘI KULTIVACI HUB NA SLÁMOVÉM SUBSTRÁTU .....	51
4.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	52
<b>5</b>	<b>DISKUZE A VÝSLEDKY .....</b>	<b>53</b>
5.1	MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE ENDOKRINNĚ DISRUPTIVNÍCH LÁTEK - REVIEW (PUBLIKACE 1) .....	53
5.2	MIKROBIÁLNÍ TRANSFORMACE SYNTETICKÉHO ESTROGENU 17 $\alpha$ -ETHYNYLESTRADIOLU - REVIEW (PUBLIKACE 2).....	53
5.3	DEGRADACE ED A ODSTRANĚNÍ JEJICH ESTROGENNÍ AKTIVITY POMOCÍ LIGNINOLYTICKÝCH HUB (PUBLIKACE 3).....	53
5.4	DEGRADACE EE2 ENZYMOVÝMI FRAKCEMI HOUBOVÝCH KULTUR (NEPUBLIKOVÁNO).....	54
5.4.1	<i>Stanovení enzymů v průběhu kultivace</i> .....	54
5.4.2	<i>Degradace in vitro</i> .....	55
5.5	DEGRADACE ED LAKÁZOU <i>P. OSTREATUS</i> (NEPUBLIKOVÁNO) .....	58
5.5.1	<i>Purifikace lakázy</i> .....	58
5.5.2	<i>In vitro inkubace EE2 s purifikovanou lakázou</i> .....	58
5.5.3	<i>In vitro inkubace ED s purifikovanou lakázou</i> .....	59
5.6	DEGRADACE EE2 KMENEM <i>P. OSTREATUS</i> : MECHANISTICKÁ STUDIE (PUBLIKACE 4).....	61
5.7	DEGRADACE ED NA SLÁMOVÝCH PELETÁCH V PROSTŘEDÍ ODPADNÍCH VOD (NEPUBLIKOVÁNO) .....	61
5.7.1	<i>Prorůstání hub substrátem a fungální toxicita odpadních vod</i> .....	62
5.7.2	<i>Stanovení enzymů v průběhu degradace</i> .....	62
5.7.3	<i>Degradace ED</i> .....	64
5.7.4	<i>Stanovení estrogenních aktivit</i> .....	66
5.8	BIODEGRADACE POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ POMOCÍ LIGNINOLYTICKÝCH HUB A DETEKCE DEGRADAČNÍCH METABOLITŮ (PUBLIKACE 5) .....	67
5.9	BIODEGRADACE CHLORBENZOOVÝCH KYSELIN POMOCÍ LIGNINOLYTICKÝCH HUB (PUBLIKACE 6) .....	67
5.10	ANALÝZA POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ POMOCÍ KOLONY S REVERZNÍ FÁZÍ SE SUB-2-MIKRONOVÝMI ČÁSTICEMI (PUBLIKACE 7) .....	68
5.11	ANALÝZA 15 ZÁSTUPCŮ CHLORBENZOOVÝCH KYSELIN V PŮDNÍ MATRICI POMOCÍ URYCHLENÉ EXTRAKCE ROZPOUŠTĚDLEM VE SPOJENÍ S KAPALINOVOU CHROMATOGRÁFIÍ (PUBLIKACE 8) .....	69
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
	<b>LITERATURA.....</b>	<b>73</b>
	<b>PŘÍLOHA A .....</b>	<b>87</b>
	<b>PŘÍLOHA B – PUBLIKACE 1-8 .....</b>	<b>91</b>

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová) kyselina
AC	Abiotická kontrola
ACN	Acetonitril
APE	Alkylfenoethoxyláty
ASE	<i>z angl.</i> „Accelerated solvent extraction“ (Urychlená extrakce rozpouštědlem)
BK	Biotická kontrola
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CBA	<i>z angl.</i> „Chlorobenzoic acid“ (Chlorbenzoové kyseliny)
CCBAS	Sbírka basidiomycet AV ČR v.v.i.
cit.	Citace
ČOV	Čistírna odpadních vod
DDE	1,1-dichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
DL	Detekováno, nekvantifikováno
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -estradiol
E3	Estriol
EA	Estrogenní aktivita
ED	Endokrinně disruptivní látky
EE2	17 $\alpha$ - ethynylestradiol
EEQ	Estradiol ekvivalent
EtOAc	Ethylacetát
FDA	<i>z angl.</i> „Food and drug administration“ (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
HBA	Hydroxybenzoová kyselina
HKC	<i>z angl.</i> „Heat killed control“ (Teplem inaktivovaná kontrola)
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
I.D.	Vnitřní průměr
IRG	Irgasan
K <sub>d</sub>	Koeficient sorpce
KV ED	Uměle kontaminovaná kohoutková voda
LC/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
LiP	Lignin peroxidáza
LOQ	Limit kvantifikace
MEG	<i>z angl.</i> „Malt-extract medium“ (Typ komplexního média)
MiP	Mangan independentní peroxidáza
MnP	Mangan dependentní peroxidáza
MQ	Millipore deionizovaná voda
MS	<i>z angl.</i> „Mass spectrometry“ (Hmotnostní spektrometrie)

MW	Molekulová hmotnost
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
ND	Nedetekováno
NM	Nestanoveno
NP	4-nonylfenol
NPE	Nonylfenolethoxyláty
OV ED	Uměle kontaminovaná odpadní voda
P450	Cytochrom P-450
PAH	Polyaromatické uhlovodíky
PCA	<i>z. angl.</i> „Principal component analysis“ (Analýza hlavních komponent)
PCB	Polychlorované bifenyly
pH	Vodíkový exponent
pI	Izoelektrický bod
ppm	Jedna milióntina celku
R <sup>2</sup>	Koeficient determinace
RH	Organický substrát
ROH	Hydroxylovaný organický substrát
ROOH	Karboxylová kyselina
rpm	<i>z angl.</i> „Revolutions per minute“ (Otáčky za minutu)
RT	Laboratorní teplota
Std.	Standardní směrodatná odchylka
t-NP	Technická směs nonylfenolů
U	Jednotka enzymové aktivity
UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
US EPA	<i>z. angl.</i> „Environmental Protection Agency“ (Americká agentura pro životní prostředí)
UV	Ultrafialová
VP	Verzatilní peroxidáza
V/V	Objemový zlomek
∅	Průměr

# 1 Úvod

Endokrinní disruptory (ED) patří do široké skupiny environmentálních polutantů. Jedná se biologicky aktivní látky, které mají schopnost vyvolat negativní efekt již při velmi malých koncentracích a výskyt těchto látek v životním prostředí představuje hrozbu nejen pro citlivé vodní organismy, ale následně i pro volně žijící zvěř, člověka i celý ekosystém. ED jsou definovány Americkou Agenturou Ochrany Životního Prostředí (US EPA) jako „látky, které brání syntéze, sekreci, transportu, vazbě, činnosti nebo eliminaci přirozených hormonů v těle odpovědných za udržování homeostázy, reprodukční vývoj a/nebo chování.“ Tato široká skupina zahrnuje látky antropogenního i přírodního původu, jako jsou syntetické nebo přírodní hormony, fytoestrogeny, některé mikrobiální toxiny, farmaka, antimikrobiální sloučeniny, chlorované pesticidy a perzistentní organopolutanty (polychlorované bifenyly, dioxiny, bromované retardátory hoření), změkčovadla plastů, těžké kovy, organokovové sloučeniny nebo alkylfenoly<sup>1</sup>. V literatuře jsou nejvíce popsány látky ovlivňující estrogenní hormony (tzv. xenoestrogeny), ale existují i druhy látek napodobující či blokující působení hormonů androgenních<sup>2</sup>, thyroidních<sup>3,4</sup>, ovlivňující dráhy glukokortikoidů<sup>5</sup>, insulínu<sup>6</sup> či gonadotropních hormonů<sup>7</sup>. Některé látky mohou zároveň ovlivňovat více hormonálních receptorů. Správná funkce endokrinního systému v organismu je udržována pomocí mechanismu zpětné vazby a je tudíž značně flexibilní vůči změnám hormonálního stavu, ale velmi citlivá vůči rušivým vlivům. Negativní vlivy se nejvíce projeví u zárodků či mladých organismů, kde je schopnost regulovat změny velmi omezená.

ED se v životním prostředí vyskytují v koncentracích pohybujících se od ng po µg na litr<sup>8</sup>. Stanovení ED v environmentálních matricích vyžaduje velmi selektivní a citlivé analytické metody. Během několika posledních let bylo publikováno mnoho prací zabývajících se výskytem ED v životním prostředí. Z prací, týkajících se odpadních vod vyplývá, že čistírný odpadních vod nejsou schopné tyto látky účinně degradovat<sup>9,10,11</sup>, a mnohdy během procesu čištění dochází pouze k přesunu na jinou environmentální matici, např. sorpcí na aktivovaný kal<sup>12</sup>.

Ligninolytické kmeny hub jsou hojně rozšířené v přírodě a díky svému extracelulárnímu enzymatickému aparátu představují perspektivní nástroj pro odstraňování organopolutantů. Houby vykazují vysokou odolnost vůči vysokým koncentracím řady organických látek a prostřednictvím hyf také značnou schopnost prorůstat ligninocelulóзовým substrátem i půdou. Jejich hlavní výhoda plyne z konstitutivní povahy extracelulárních enzymů (peroxidázy, lakáza).

Oproti intracelulárním bakteriálním degradacím je tento mechanismus výhodný z hlediska dostupnosti enzymů i pro hůře rozpustné polutanty a také z hlediska eliminace adaptace organismu na polutant.

Tato disertační práce začíná širokým teoretickým úvodem rozděleným do tří částí (kapitola 2). První část je věnována původu a vlastnostem ED, druhá část ligninolytickým houbám a jejich enzymovému aparátu a třetí část se zabývá degradacemi ED. Následují cíle práce (kapitola 3), instrumentace a metodika nepublikovaných výsledků (kapitola 4). Diskuze a výsledky (kapitola 5) představují stručný výpis nejdůležitějších bodů u publikovaných prací a detailně výsledky prací nepublikovaných. Podrobný popis experimentálních postupů, rešerše, diskuze a výsledky se nacházejí v publikacích 1-8, které jsou přiloženy jako součást přílohy B.

## 2 LITERÁRNÍ ÚVOD

Tato kapitola shrnuje literární pozadí této disertační práce. Hlavním cílem je zde představit zástupce endokrinních disruptorů, jejich rozdělení a původ a také možnosti jejich odstraňování pomocí abiotických i biologických metod. Část kapitoly je věnována výskytu ED v životním prostředí a samostatná kapitola pak popisu a charakterizaci ligninolytických hub.

### 2.1 Endokrinní disruptory

V posledních desetiletích se objevují četné důkazy o přítomnosti látek s hormonální aktivitou v životním prostředí. První studie přítomnosti farmak a lidských hormonů v životním prostředí pochází ze 70.–80. let<sup>13,14,15</sup>, avšak tehdy detekovaná stopová množství ED nevzbuzovala velkou pozornost, až do doby zjištění negativního vlivu přítomnosti syntetické antikoncepce v životním prostředí na ryby<sup>16,17,18</sup>.

Problematice ED v životním prostředí se věnuje celá řada světových i Evropských organizací. V Americe v roce 1995 US EPA zřídila Endocrine Disruptor Screening Program k vytvoření screeningových metod a strategie testů toxicity pro vymezení endokrinně disruptivních látek<sup>19</sup>. V Německu v roce 1995 UBA (Umweltbundesamt – Federální úřad pro životní prostředí) zahájil projekt sledování ED v životním prostředí<sup>20</sup>, roku 1996 byla založena skupina pro screening a testování ED organizací OECD (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)<sup>21</sup>. Od roku 1997 se endokrinním disruptorům věnuje i Evropská komise vypracováním Strategie pro endokrinní disruptory<sup>22</sup>. První projekt Evropské komise z let 1997–2004 (CSTEE<sup>23</sup>, výbor pro toxicitu, ekotoxicitu a životní prostředí) byl zaměřený na vliv endokrinních disruptorů na zdraví volně žijících organismů a lidské populace. V letech 2000–2003 byl v Itálii plněn evropský projekt REMPHARMAWATER<sup>24</sup> zaměřený na ekotoxikologické hodnocení a vytvoření technologií pro odstraňování léčiv v odpadních vodách, na který navázal projekt POSEIDON<sup>25</sup> (2004–2007, Německo), rozšířený vedle léčiv i o odstraňování produktů osobní péče z odpadních a pitných vod. V současné době běží několik programů na testování, screening a odstraňování ED a dalších látek, jako jsou léčiva či produkty osobní péče, ze životního prostředí. Dosud je popsáno mnoho sloučenin s endokrinní aktivitou (viz tabulka 1) a testování dalších stále probíhá.

**Tabulka 1 Seznam vybraných sloučenin s endokrinně disruptivní aktivitou.**

<b>Třída ED</b>	<b>Sloučeniny</b>	<b>Původ/použití</b>
Přirozené hormony	Estron, estradiol, estriol, metabolit 16 $\alpha$ -hydroxyestron, testosteron, equilin, 19-norethisteron	Produkovány lidmi a zvířaty, využití některých v hormonálních substitučních terapiích
Fytoestrogeny	Genistein, daidzein, matairesol, biochanin A, enterodiol, enterolacton	Přírodní sloučeniny rostlinného původu
Mykoestrogeny	Zearalenon a jeho metabolity $\alpha$ -zearalanon a $\beta$ -zearalanon	Mikrocyclické toxiny produkovány houbou <i>Fusarium</i> sp. (kontaminanty kukuřice, obilí atd.)
Syntetické hormony	17 $\alpha$ -ethynylestradiol, diethylstilbesterol, mestranol, norgestrel, 19-norethindron	Součást substituční hormonální léčby a antikoncepce
Bisfenoly	Bisfenol A	Prekurzor v plastovém průmyslu pro výrobu polykarbamátů a expoxidových pryskyřic
Surfaktanty	Nonylfenoethoxylát, oktylfenoethoxylát a jejich metabolity nonylfenol a oktylfenol	Výroba pryskyřic, využití jako tenzidy, aditiva plastů
Produkty osobní péče	Irgasan (triclosan), methyl-, ethyl-, propyl- a butylparaben	Využití v kosmetickém průmyslu a přípravkách pro osobní hygienu
Ftaláty	Butylbenzylftalát, di- <i>n</i> -butylftalát, di-(2-ethylhexyl)ftalát	Aditiva plastů, součást detergentů, pryskyřic
Pesticidy	DDT, DDE, deltametrin, karbofuran, atrazine, lindan, vinklozolin	Insekticidy, herbicidy a fungicidy využívané v zemědělství
Polychlorované bifenyly	Delor 103, metabolity chlorbenzoové kyseliny	Součást olejů do výměnkových stanic, lubrikantů atd. (použití zakázáno)
Polyaromatické uhlovodíky	Fenantren, fluoren, antracen, pyren, naftalen	Produkty nedokonalého spalování pevných paliv přírodního původu
Bromované retardátory hoření	Polybromované difenyletery, tetrabrombisfenol A,	Využití jako prevence požárů v elektronických přístrojích, izolaci domů, nábytku, textilu atd.
Těžké kovy	Kadmium, rtuť, olovo, arsen	Metalurgický průmysl
Organokovy	Tributylcín, trifenylcín	Ochranné barvy pro lodní trupy

### 2.1.1 Mechanismus působení ED a vliv na organismy

Endokrinní disruptory napodobují působení přirozených hormonů a jejich estrogenní aktivita je vztahována k 17 $\beta$ -estradiolu (E2). Působení přirozených hormonů v těle živočichů probíhá skrze jaderné hormonální receptory zahrnující androgenní receptory, progesteronové a thyroïdní receptory a především estrogenní receptory, které jsou u obratlovců zastoupeny dvěma hlavními typy – ER $\alpha$  a ER $\beta$ . ED mohou dále ovlivňovat také nejaderné steroidní receptory hormonů (membránové) i nesteroidní receptory (dopaminové, noradrenalinové a serotoninové). ED ovlivňují endokrinní systém na několika úrovních, působí jako agonisté i antagonisté receptorů<sup>26</sup>, ale také ovlivňují steroidní biosyntézu, metabolismus a úroveň receptorů<sup>27</sup>. Estrogeny vyvolávají cílenou odezvu skrze expresi genu<sup>28</sup> spouštěnou responzivním elementem (úsek DNA), který je předtím aktivován nasednutím komplexu

hormon-receptor. Estrogenní receptory mají nízkou substrátovou specifitu, takže může dojít k navázání cizorodých látek strukturně podobných estradiolu, které tak mohou vyvolat odezvu, ale narušení může ovlivnit i jiné úrovně tohoto mechanismu. Hormonální signály řídí normální vývoj mnoha orgánů včetně mozku, proto mohou ED měnit vývojové procesy těchto systémů<sup>29</sup>. Účinky ED na organismus v průběhu vývoje jsou nejzávažnější, protože expozice může mít negativní vliv na organizaci nervových systémů a tím vyvolávat trvalé a nevratné dopady<sup>30</sup>. U dospělých jedinců jsou změny zpravidla reverzibilní a po ukončení expozice organismu endokrinním disruptorům jsou kompenzovány<sup>29</sup>.

Endokrinní disruptory, spíše než dle jejich biochemického mechanismu účinku, dělíme na skupiny dle jejich efektu. Největší skupinou jsou xenoestrogeny mezi které patří 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, bisfenol A (BPA), 4-nonylfenol (NP), ftaláty, chlorbenzoové kyseliny (CBA), některé pesticidy (DDT, dieldrin), polychlorované bifenyly (PCB), hydroxylované PCB atd. Dále jsou popsány xenoandrogeny, které mají nejčastěji anti-androgenní funkci (např. některé bromované étery<sup>31</sup>, fytosterol<sup>32</sup>, DDE) a látky ovlivňující thyroïdní hormony (např. irgasan (IRG)<sup>33</sup>, PCB, některé bromované étery<sup>31</sup>). Jedna sloučenina může působit na několika úrovních, ale také na několik různých typů receptorů zároveň. Příkladem je tributylcín<sup>34</sup>, který napodobuje přirozený hormon testosteron u vodních plžů (funguje tak jako agonista), ale také blokuje receptory testosteronových antagonistů a také aromatázovou aktivitu, čímž se hladina testosteronu ještě zvyšuje. Představuje tak sloučeninu působící na několika úrovních. Příkladem druhé skupiny je endosulfan<sup>7</sup>, působí jako agonista estrogenních receptorů, ale zároveň jako inhibitor syntézy testosteronu a gonadotropinu u krys. Dalším nezanedbatelným faktem je, že organismy v přírodě nejsou většinou vystaveny pouze jedné látce, ale většímu množství různě působících sloučenin, kdy výsledný efekt nemusí být pouze součtem jednotlivých efektů, ale často dochází k synergickému působení sloučenin. Toto téma je široce zpracováno v souhrnném článku autora Kotenkampa z roku 2007 (cit.<sup>35</sup>).

Případy negativního vlivu endokrinních disruptorů byly prvně nalézány u sladkovodních ryb žijících na dolních tocích u čistíren odpadních vod a také v blízkosti průmyslových vod. Negativní vliv ED na organismy se projevuje např. maskulinizací či feminizací genitálií, výskytem hermafroditismu, porušením vývoje varlat a vajíček, předčasným či zpožděným vyspíváním jedinců, zaostalostí, neplodností atd. Sladkovodní ryby patří mezi nejvíce studované organismy, u kterých byly popsány případy změny v syntéze specifického samičího hormonu vitellogeninu u samců<sup>36,37</sup>, inhibice vývoje pohlavních orgánů u kaprů (*Cyprinus carpio*)<sup>38</sup>, zhoršení vývoje vaječnicků v populaci *Catostomus commersoni*<sup>39</sup> atd. Změny vlivem působení ED byly ale pozorovány např. i u ptáků<sup>40,39</sup>, plazů<sup>39</sup>, obojživelníků<sup>26</sup>, koryšů<sup>26</sup> i savců<sup>41</sup>.



U člověka je expozice syntetickým i přirozeným estrogenům dávána do spojitosti se vznikem rakoviny prsou<sup>42</sup>, vaječníku<sup>43,44</sup> a varlat<sup>45</sup>. Je prokázáno, že endokrinní disruptory mají negativní vliv na kvalitu spermií<sup>46,47</sup>, a výrazně tak ovlivňují mužskou plodnost. Expozice mladých jedinců látkám ovlivňující thyroideální a estrogenní systém vede k předčasnému pohlavnímu dospívání<sup>47</sup>. Panzica a kol. se ve svém souhrnném článku věnuje negativním vlivům na ED na nervovou soustavu živočichů i člověka<sup>29</sup>.

Vzhledem k negativním vlivům endokrinních disruptorů nejen na vodní živočichy, ale i ostatní organismy a člověka, je jejich přítomnost v životním prostředí nežádoucí a je nutno nalézt vhodné metody odstranění.

### **2.1.2 Zástupci ED a jejich výskyt v životním prostředí**

V životním prostředí na celém světě jsou nalézána stopová množství endokrinních disruptorů syntetického i přirozeného původu. Zdroje ED v životním prostředí lze rozdělit na bodově a plošně působící. Mezi plošně působící počítáme odtoky odpadních vod z městské zástavby nebo zemědělských oblastí, mezi bodově působící spadají průmyslové odpadní vody a odtoky čistíren odpadních vod (ČOV). Současné studie potvrzují, že čistírny odpadních vod nedostatečně odstraňují organické polutanty a jejich účinnost odstranění pro různé látky se uvádí mezi 60 % až 90 % (cit.<sup>36,48</sup>). Tyto hodnoty ale nepředstavují pouze degradaci, ale také přenos látek z vodního prostředí do matrice kalu. Velká část organopolutantů má přímou souvislost s rozvojem průmyslu (plastového, detergentního atd.), a proto bývá pravidlem nalézání vyšších koncentrací ED v blízkosti průmyslových oblastí.

Vliv ED na životní prostředí není dán pouze mírou jejich koncentrace, ale do jejich efektu je nutno také zahrnout míru jejich bioakumulace, lipofilního charakteru, perzistentnosti, délku expozičního času a biotransformační a eliminační mechanismy. V některých případech mohou být produkty rozkladu látek škodlivější než jejich mateřské sloučeniny (např. nonylfenoly, rozkladné produkty alkylfenoethoxylátů). Osud ED v životním prostředí není dosud zcela popsán, ale jejich chování je velkou měrou odvozené od jejich fyzikálně-chemických vlastností a vlastností prostředí. Jedním z nejdůležitějších parametrů hodnocení toxicity a účinku látek je množství vázané a volné frakce látek (tzn. dostupné frakce). Sorpce látek na matici je závislá hlavně na lipofilní povaze látek, nepřímo úměrná velikosti molekul, přímo úměrná obsahu organického uhlíku v matici<sup>49</sup> a salinitě prostředí<sup>50</sup>.

Tato disertační práce je zaměřena na endokrinní disruptory běžně detekované ve vodních tocích v životním prostředí: tři nejčtenější zástupce endogenních hormonů estron (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) a estriol (E3), syntetický hormon EE2, xenoestrogen BPA a NP a dále je

v práci zahrnut IRG, ovlivňující thyroideální systém. Fyzikálně-chemické parametry a struktury jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 2. Pozornost je také věnována xenoestrogenům z řad PCB a CBA, ačkoliv tyto jsou spíše půdními kontaminanty.

### **2.1.2.1 Přirozené estrogeny**

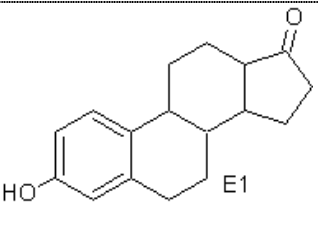
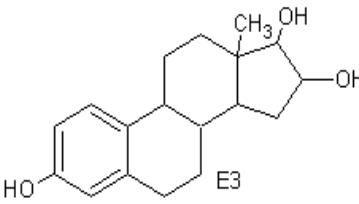
Přirozené estrogenní hormony nalézané v životním prostředí pocházejí ze živočišné a humánní produkce a do životního prostředí vstupují ze splaškových vod. Hlavním zdrojem znečištění jsou ČOV, kde nedochází k úplnému odbourání těchto látek v průběhu čistících procesů. Estrogeny (E1, E2 a E3) jsou odvozeny od esterálního cyklu (struktury viz tabulka 2), jsou produkovány v tělech samic a v malé míře také samců. Koncentrační hladina (jednotky až stovky  $\mu\text{g}/\text{den}$ ) produkce estrogenů se u žen mění v průběhu života a také kolísá v průběhu menstruačního cyklu. E3 je produkován téměř výhradně placentou, v průběhu těhotenství jeho koncentrace vzrůstá z hodnot  $10^{-3}$   $\text{mg}/\text{den}$  až na  $10^2$   $\text{mg}/\text{den}$ . Estrogenní účinek E3 dosahuje zhruba 1/10 účinků E2, E1 dosahuje zhruba 1/2 účinku oproti E2.

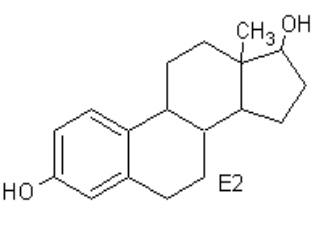
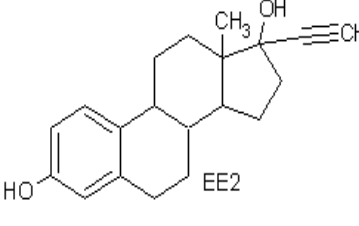
Estrogeny jsou z velké části exkretovány ve formě glukuronových konjugátů, ale v odtocích odpadních vod jsou estrogeny často přítomny ve své volné formě vlivem enzymatické dekonjugace v přítomnosti enzymů fekálních bakterií (např.  $\beta$ -glukuronasa bakterie *Escherichia coli*)<sup>51</sup>. E1 je exkretován více ve formě sulfonových konjugátů, které jsou v ČOV stabilnější, protože přítomnost bakteriální arylsulfatasy v ČOV není příliš běžná<sup>52</sup>. Původ volného E1 detekovaného na ČOV pochází pravděpodobně z mikrobiální transformace E2 nebo z dekonjugace E1 při průchodu kanalizací.

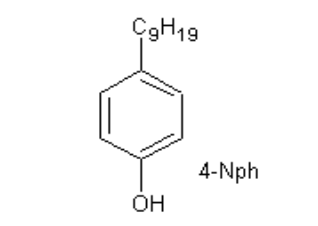
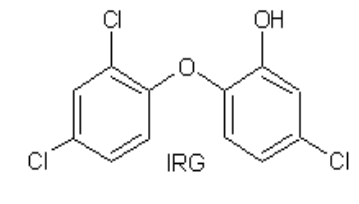
### **2.1.2.2 Syntetické endokrinní disruptory a irgasan**

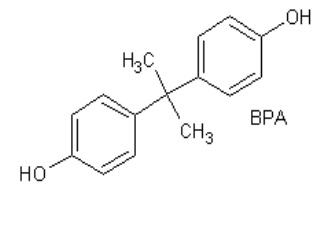
Mechanismus vstupu xenoestrogenů do životního prostředí je oproti přirozeným estrogenům jiný a primárním zdrojem jsou zpravidla průmyslové a městské odpadní vody. U některých perzistentních polutantů se na znečištění podílejí významnou měrou také průsaky ze skládek. Pouze syntetický estrogen EE2, používaný jako součást hormonální antikoncepce, má mechanismus vstupu do životního prostředí shodný s přirozenými estrogeny – tj. lidskými exkrementy. Zdrojem znečištění v životním prostředí jsou, stejně jako u endogenních estrogenů, ČOV kde nedochází k úplnému odstranění těchto látek.

Tabulka 2 Souhrn chemických struktur a fyzikálně chemických vlastností xenoestrogenů a irgasanu.

Struktura	Vlastnosti		Struktura	Vlastnosti	
<b>Estron</b>	CAS číslo	53-16-7	<b>Estriol</b>	CAS číslo	53-16-7
	MW	270,37		MW	270,37
	Sumární vzorec	$C_{18}H_{22}O_2$		Sumární vzorec	$C_{18}H_{22}O_2$
	Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	13		Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	13
	LogK <sub>ow</sub>	3,1		LogK <sub>ow</sub>	2,8
3-Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-on			Estra-1,3,5(10)-trien-3,16α,17β-triol		

Struktura	Vlastnosti		Struktura	Vlastnosti	
<b>17β-estradiol</b>	CAS číslo	50-28-2	<b>17α-ethynylestradiol</b>	CAS číslo	57-63-6
	MW	272,38		MW	296,40
	Sumární vzorec	$C_{18}H_{24}O_2$		Sumární vzorec	$C_{20}H_{24}O_2$
	Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	13		Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	4,8
	LogK <sub>ow</sub>	3,9		LogK <sub>ow</sub>	3,9
Estra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol			17α-Ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17β-diol		

Struktura	Vlastnosti		Struktura	Vlastnosti	
<b>4-nonylfenol</b>	CAS číslo	104-40-5	<b>Irgasan</b>	CAS číslo	3380-34-5
	MW	220,35		MW	289,54
	Sumární vzorec	$C_{15}H_{24}O$		Sumární vzorec	$C_{12}H_7Cl_3O_2$
	Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	1,6		Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	4,9
	LogK <sub>ow</sub>	4,5		LogK <sub>ow</sub>	4,8
4-(2,4-dimethylheptan-3-yl)phenol			5-chlor-2-(2,4-dichlorofenoxi)fenol		

Struktura	Vlastnosti	
<b>Bisfenol A</b>	CAS číslo	80-05-7
	MW	228,29
	Sumární vzorec	$C_{15}H_{16}O_2$
	Rozpuštnost ve vodě <sup>1</sup>	120
	LogK <sub>ow</sub>	3,3
2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan		

<sup>1</sup> mg/l při 20 °C

Syntetický EE2 je analog E2 a je součástí většiny orálních kontraceptiv. Jako jediná studovaná sloučenina vykazuje 2,2x vyšší estrogenní aktivitu než E2. Denní příjem této látky se dle terapie pohybuje v rozmezí od 10 do 40 µg. V lidském těle je EE2 metabolizován zhruba z 40%, zbytek je ve formě konjugátů (převážně glukuronových a minoritně sulfonových) vyloučen močí a stolicí a malá část je vyloučena ve volné formě<sup>53</sup>. V ČOV jsou tyto konjugáty štěpeny stejným mechanismem jako u přirozených estrogenů a většina EE2 se tak v odpadních vodách nachází ve své volné formě<sup>51</sup>. Díky přítomnosti ethynylu na uhlíku C17 je EE2 obtížně odbouratelným a díky vysoké lipofilitě má tendenci se kumulovat v životním prostředí<sup>54</sup>.

BPA (monomerní sloučenina 2,2-bis(4-hydroxyfenyl)propan) patří mezi jednu z nejvíce produkováných chemikálií na světě a používá se při výrobě polykarbamátových plastů, fenolových pryskyřic, polyakrylátů a polyesterů<sup>55</sup>. Polykarbonáty se používají jako obalový materiál nebo jako materiál pro výrobu kompaktních disků. Epoxidové pryskyřice lze nalézt např. v zubařských náhradách a plombách, nebo jako ochranný nátěr plechových konzerv. Obecně se však BPA nachází téměř ve všech výrobcích z plastových hmot, včetně mobilních telefonů, počítačů, lahví na pití, plastových jídelních nádob atd. Polymerizací nedostatečně zpracovaný BPA se uvolňuje do svého okolí, takže dalšími zdroji kontaminace vedle průmyslových a městských odpadních vod mohou být také průsaky ze skládek<sup>56</sup>. BPA má zhruba 1000x nižší estrogenní účinky než E2, ale díky svému hojnému rozšíření (byl detekován i v prachových částicích a podzemní vodě<sup>57</sup>) a vysokým koncentracím přítomným v životním prostředí, patří mezi závažné polutanty s biologickou aktivitou<sup>58</sup> a to i v případě, že koncentrace nemusí vždy dosahovat hodnot nutných pro vyvolání účinku (tzv. efekt nízkých dávek)<sup>59</sup>. Mimo estrogenních účinků u něj byly popsány také účinky thyroïdní a antiandrogenní<sup>57</sup>.

4-nonylfenol je metabolit alkylfenoethoxylátů (APE), které se používají jako neionogenní tenzidy. Jsou součástí povrchově aktivních přípravků v domácnostech i v průmyslu, využívají se jako pěnídla, smáčedla či emulgátory v papírenském, textilním a kožedělném průmyslu. A dále při zpracování kovů jako mazadla a součást barev, při aplikaci biocidů, při výrobě epoxidových pryskyřic atd. Při degradaci alkylfenoethoxylátů dochází ke vzniku mnohem více perzistentních nonylfenolů (v malé míře i oktylfenolů)<sup>36</sup>, které vykazují estrogenní aktivitu (zhruba 1000x nižší než E2). NP je také hlavní složkou technického nonylfenolu – směsi C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> alkylfenolů využívané jako stabilizátor plastů a prekurzor pro syntetickou výrobu alkylfenoethoxylátů.

Nonylfenoly jsou velmi obtížně odbouratelné v životním prostředí, proto jejich zdrojem bývají ČOV, kde vznikají v průběhu čistícího kroku z rozkladu alkylfenoethoxylátů (hlavně

nonyl- a oktyl-). Platí přitom, že čím delší uhlovodíkový řetězec, tím vyšší hydrofobicita a estrogenní aktivita. Dalšími zdroji znečištění mohou být průsaky ze skládek odpadů, recyklace čistírenského kalu, městské odpadní vody nebo uvolňování z některých pesticidů<sup>60</sup>. Běžně nalézané koncentrace NP v povrchových vodách se pohybují v rozmezí od  $10^2$ - $10^4$  ng/l (cit.<sup>61</sup>).

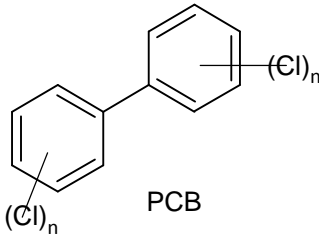
Thyroidní disruptor irgasan (2,4,4-trichloro-2-hydroxydifenyl ether) patří v posledních desetiletích mezi hojně používané látky především v produktech osobní péče. Pro své antimikrobiální a antifungální vlastnosti je využíván v kosmetickém průmyslu (deodoranty, zubní pasty), také jako součást antibakteriálních mýdel, přípravků ve zdravotnictví a domácnosti (např. antimikrobiální plastové nádoby, bezpachové tkaniny atd.). Do životního prostředí se dostává jako součást odpadních vod a kalů. Mimo thyroïdních účinků<sup>33</sup> jsou IRG přisuzovány také slabé estrogenní<sup>62</sup> a antiandrogenní účinky<sup>63</sup>. Kvůli obsahu atomů chlóru v molekule (struktura viz tabulka 2) bývá často diskutován také vliv jeho přítomnosti v průběhu vodárenského chlorování vody na zvýšenou produkci karcinogenního chloroformu<sup>64</sup> a dioxinů<sup>65</sup>. Jeho přítomnost v životním prostředí může mít také vliv na vznik nežádoucí bakteriální rezistence<sup>66</sup>. IRG byl nalezen v některých biologických matricích jako např. rybí maso<sup>67</sup> a mateřské mléko<sup>68</sup>.

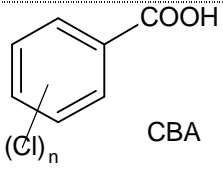
### **2.1.2.3 Perzistentní aromatické polutanty**

Estrogenní, antiestrogenní, androgenní a thyroïdní aktivita byla prokázána u řady kongenerů polychlorovaných bifenyľů (PCB)<sup>69,70</sup>, jejich metabolitů (např. hydroxylovaných PCB<sup>71,72</sup> a chlorbenzoových kyselin<sup>70</sup>) a jejich směsí (např. Delor 103)<sup>73</sup>.

Pro své chemické a fyzikální vlastnosti (dobré elektroizolační vlastnosti, nehořlavost, dobrá tepelná vodivost, nízká rozpustnost ve vodě atd.) byly PCB hojně využívány v 50.–60. letech minulého století. V 70. letech ukázaly první studie perzistentnost těchto látek v životním prostředí a negativní vliv na zdraví člověka<sup>74</sup>. Díky těmto studiím se jejich výroba omezila nejprve na uzavřené systémy a posléze byla zastavena úplně (v ČSSR k 1.1.1984). Ačkoliv je jejich výroba dnes již zakázaná, předpokládá se, že v biosféře se stále nachází přibližně 7 500 000 tun PCB. Díky svému vysoce lipofilnímu charakteru se PCB začlenily do potravního řetězce a mimo negativního vlivu na endokrinní systém ovlivňují také nervový<sup>75</sup> a reprodukční systém<sup>76</sup> a patří mezi podezřelé karcinogeny<sup>77</sup>. Jejich toxicita závisí na poloze a počtu chlórů v molekule. Tabulka 3 shrnuje jejich fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, včetně popisu původu látek v životním prostředí.

Tabulka 3 Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti vybraných aromatických organopolutantů.

Struktura	Vlastnosti – 209 kongenerů	
 <p>PCB</p>	Sumární vzorec	$C_{12}H_{10-x}Cl_x$
	CAS číslo	1336-36-3
	Log $K_{ow}$	Velmi lipofilní
	Rozpustnost ve vodě	0,0027–0,42 ng/L
	Účinky	Thyroidní, estrogenní, androgenní aktivita, karcinogenní
	Původ	Aditiva v barvách, hydraulických zařízeních, či teplotnosných médiích
n,n'-chlorobifenyl (2-10 atomů chlóru)		

Struktura	Vlastnosti – 19 izomerů	
 <p>CBA</p>	Sumární vzorec	$C_7O_2H_{5-x}Cl_x$
	MW	156,57–294,35
	Rozpustnost ve vodě	Vysoká, dle počtu chlorů v molekule
	Účinky	Mírná estrogenní aktivita, toxicita vůči vodním organismům
Původ	Bakteriální rozklad PCB, pesticidů a herbicidů	
Chlorbenzoové kyseliny (1-5 atomů chlóru)		

Kyseliny chlorbenzoové pocházejí z bakteriálního rozkladu PCB a jiných chlorovaných látek jako jsou např. některé herbicidy a pesticidy. Existuje 19 možných izomerů (struktura viz tabulka 3) a chemicko-fyzikální vlastnosti, stejně jako biologické účinky, jsou odvozené dle počtu chlorů a jejich poloh v molekule. Na toxicitu chlorbenzoových kyselin (CBA, z anglického chlorobenzoic acid) má velký vliv ionizace karboxylové skupiny. Toxicita CBA byla prokázána vůči některým modelovým rostlinám (např. tabák<sup>78</sup>), některým živočichům (dafnie, ryby<sup>79</sup>), ale z environmentálního hlediska je nejzávažnější inhibice a toxicita CBA vůči bakteriím, které jsou schopny degradovat PCB. Výskyt bakteriálních metabolitů PCB v kontaminované lokalitě tak vede k inhibicím jejich dalšího rozkladu<sup>80,81,82</sup>. CBA mají oproti PCB vyšší polaritu, a mohou tak z místa vzniku migrovat do podzemních vod<sup>83</sup>. Některé ze zástupců CBA byly prokázány jako slabé estrogény. Pro testovanou směs mono-, di- a trichlorderivátů vykazoval nejvyšší estrogenní aktivitu derivát 2,3-CBA, naopak nejnižší aktivita byla zaznamenána u mono-CBA<sup>73</sup>.

### 2.1.2.3 Výskyt ED v životním prostředí

Přítomnost přírodních i umělých estrogenů a dalších mikropolutantů v životním prostředí je předmětem mnoha studií z posledních let<sup>84,85,86,87,88,89,90,91</sup>. Tabulka 4 shrnuje několik prací zaměřených na stanovení přirozených a umělých estrogenů v povrchových a odpadních vodách.

Tabulka 4 Vybrané příklady stanovení koncentrací (ng/l) ED v povrchových a odpadních vodách. ND-nedetkováno; DL-detkováno, nekvantifikováno

Lokalita	Typ vzorku	Období	Koncentrace (ng/l)				BPA	NP	Reference
			E1	E2	E3	EE2			
ČR – střeđočeský kraj	Botič - Praha	2005	DL	1,5	1,7	3,3			92
	Odtok ČOV		43-330	DL-11	DL-10	DL-5			
	Vltava – Praha		DL	DL-2,6	DL-1,7	DL-3,8			
Střeđní Itálie	Odtok ČOV	03–05/02	5-30	3-8	ND-1	ND	13-36	1120-2235	85
	Přítok ČOV		15-60	10-31	23-48	ND	332-339	4194-8768	
	Řeka Tibera		5-12	2-6	2-6	ND-1	15-29	1289-1466	
Francie – okolí Paříže	Přítok ČOV	12/01–02/02	9,6-17,6		11,1-17,4	11,4-15,2	4,9-7,1		94
	Odtok ČOV		4,3-7,2	4,5-8,6	5,0-7,3	2,7-4,5			
	Řeka Seina		1,1-2,7	1,4-3,0	1,0-2,5	1,1-2,9			
Francie – 14 ČOV	Přítok ČOV	2009	78	23	313	ND			95
	Odtok ČOV		8	4	33	2,7			
Španělsko - Katalánsko	Přítok ČOV	03–04/06	ND-71		32-160			3310-7040	86
	Odtok ČOV		ND		ND		ND-2250		
Španělsko - Galicie	Odpadní voda	10/01–07/02	2-3	2-3		ND			96
Belgie	Řeka Schelt	12/04–12/04	0,7-10,0	ND-0,27	ND	ND			97
Německo – Sasko-Anhaltsko	Řeka Saale (Halle)	10/10	ND	ND	ND	DL	67	35	98
	Řeka Saale (Bracheitz)		ND	ND	ND	28	41		
	Odtok ČOV		ND	ND	18	DL	68	55	
Německo – Frankfurt (Niederrad-griesheim; Sindlingen)	Přítok ČOV	01/03–09/05					466-12205	<10-9124	99
	Odtok ČOV						<20-7625	<10-14444	
	Přítok ČOV						<20-9124	<10-7977	
	Odtok ČOV						<20-4890	<10-3031	
USA – Las Vegas	Řeka Las Vegas Wash	05/03–12/07	ND-36	ND-1,2		ND-1			100
USA - Ontario	Přítok ČOV	08–12/02	29,5-48,7	8,3-13,9					101
Čína - Xiamen	Povrchová voda	04/08	ND-5,3	ND-1,6		ND-0,4	14-31	587-619	90
	Kapilární voda		ND-10,9	ND-2,9		0,8-2,5	18-42	609-965	
Čína - Tinjin	Řeka Betiang	06/07	4,3-49,8	2,5-21,2	ND-15,4	1,6-24,4			102
	Řeka Dagu	06/07	5,0-55,3	0,9-2,4	2,3-46,4	ND-9,3			
Taiwan - Taipei	Řeka Dan-Shui	06/04	22,4-66,2	1,4-33,9	12,4-73,6	75,3-27,4			103
	Odtok ČOV	06–08/04	2,4-73,6	10,2-48,6	ND-39,1	2,25-37,9			

E2 může být za určitých podmínek degradován na E1 a/nebo na E3 (cit.<sup>91</sup>). Oba tyto estrogény mají sice nižší estrogenní aktivitu než E2, jsou ale více perzistentní vůči mikrobiálnímu rozkladu. V odpadních vodách je E1 zpravidla nacházen v nižších koncentracích než ostatní hormony. Hodnoty koncentrací přirozených estrogenů v odpadních vodách se pohybují v rozmezí  $10^1$  až  $10^3$  ng/l a zpravidla kopírují trend  $E3 > E2 > E1$  (cit.<sup>90</sup>).

Stopová množství EE2 jsou nalézána na celém světě (podrobněji je této tématice věnována souhrnná publikace 2). Morteani a kol. ve své práci detekovali EE2 na několika místech v Praze, ale také v upravené pitné vodě z nádrže Želivka (2,3-2,4 ng/l), která je zásobárnou vody pro Prahu<sup>92</sup>. Problematika výskytu EE2 na odtocích ČOV na území České Republiky je ale mnohem širší (nepublikovaná data autorky).

BPA a NP pocházejí z průmyslových odpadních vod a z městských odtoků a jejich koncentrace jsou zpravidla výrazně vyšší než u přirozených hormonů (dosahují až jednotky  $\mu\text{g/l}$ ). NP, který je patrně hůře odbouratelný v životním prostředí, dosahuje celosvětově nejvyšších koncentrací z řad ED. Klečka a kol. se ve studii z roku 2009 zaměřili na srovnání 89 publikovaných prací zaměřených na analýzu BPA v životním prostředí Severní Ameriky a Evropy z let 1997 až 2007 (cit.<sup>93</sup>). Z dat je patrný trend nárůstu koncentrace BPA v životním prostředí. Detekované koncentrace se pohybovaly v okolo jednotek  $\mu\text{g/l}$ . Nárůst přítomnosti estrogenů je patrný např. v porovnání dat ze dvou studií z Francie z let 2002 a 2009 (viz tabulka 4).

Studie z Evropy, Severní Ameriky, Austrálie i Asie ukazují velmi široký rozptyl koncentrace irgasanu v životním prostředí. V povrchových vodách se množství IRG pohybuje v rozptýlu  $< 1-100$  ng/l (cit.<sup>104,105,106</sup>), hodnoty na ČOV jsou několikanásobně vyšší ( $10^1$  po  $10^5$  ng/l)<sup>107,36, 108</sup> (viz tabulka 5). Účinnost odstranění IRG na ČOV se dle typu čištění uvádí v rozsahu 60-90 % (cit.<sup>106,105</sup>). Účinnější jsou ČOV, které mají zařazený aerobní biologický proces a aktivovaný kal, naopak mikrobiální filtr se ukázal být neúčinný<sup>36</sup>. Na odstranění IRG v ČOV se podílejí abiotické (sorpce) i mikrobiologické procesy, proto je monitoring mikrobiální degradace IRG zpravidla založen na stanovení bakteriálního metabolitu methyl-irgasanu, který odpovídá zhruba 20-30 % IRG přítomného v ČOV<sup>105</sup>. Koncentrace v podobném rozmezí jsou nacházeny i na ČOV území ČR (nepublikovaná data autorky).

US EPA udává v programu Ambient Water Quality Criteria meze pro endokrinní disruptory. Pro nonylfenol je to hodnota 28  $\mu\text{g/l}$  (akutní expozice) a 6,6  $\mu\text{g/l}$  (chronická expozice) v povrchové vodě, pro PCB 0,0014  $\mu\text{g/l}$  (chronická expozice)<sup>114</sup>. Tyto kritéria nejsou závazná, ale stanovují hodnoty pro kvalitu vody v životním prostředí tak, aby nedocházelo k negativním vlivům přítomností organopolutantů. Nonylfenoly a 4-nonylfenol jsou na seznamu prioritních látek



Evropské komise (EEC793/93, 2000/60/ES)<sup>115,116</sup> a jejich výroba je v Evropské unii zakázána. Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv pro potraviny a léčiva (FDA) v 80. letech stanovil jako maximální hodnotu denního příjmu BPA 50 µg/kg. Od té doby proběhlo několik pokusů ze stran vědců i veřejnosti o přehodnocení parametrů na základě nových výzkumů. Od roku 2009 reguluje FDA použití BPA jako prekurzoru pro výrobu medicínských pomůcek<sup>117</sup>.

**Tabulka 5 Výskyt IRG v přítoku a odtoku ČOV a v povrchových vodách.** DL-detekováno, nekvantifikováno

Lokalita	Období	Koncentrace IRG (ng/l)			Ref.
		Přítok ČOV	Odtok ČOV	Povrchová voda	
Velká Británie – řeka Taff	04–08/07	97-240	72-520	5-11	109
Velká Británie – řeka Ely	04–08/07	33-463	13-82	5-24	109
Německo – Pobřeží Sev. moře	02/04–07/05			0,001-6,87	110
Švédsko	2002	380	160		111
Španělsko - Almeria	07/03–04/04	390-4200	80-400		112
Austrálie	2004		23-434	DL-75	36
Hong Kong, Čína	2005			15-110	106
USA – 139 toků	99–00		140		113
USA - Ontario	08–12/02	1930-4001	400-2210		101

Přítomnost estrogenů v povrchových vodách není směrnice regulována. Koncentrační mez pro vyvolání negativních účinků bývá udávána 0,1 ng/l pro E2 a analogicky jeho estrogenních ekvivalentů (tzn. 0,05 ng/l pro EE2, 1 ng/l pro E3 a cca 3,3 ng/l pro E1)<sup>118</sup>. Pro irgasan se tyto hodnoty pohybují zhruba od 150 ng/l (cit.<sup>119</sup>).

Z prací publikovaných v posledních letech je jasně patrné, že endokrinní disruptory se v životním prostředí nachází v koncentracích postačujících pro vyvolání biologického efektu. I v případě podprahových dávek však nelze zanedbávat efekt dlouhodobé expozice organismů daným látkám a v neposlední řadě také zatím málo objasněný synergický efekt působení různých organopolutantů při současné expozici.

## 2.2 Houby bílé hniloby a jejich enzymový aparát

Ligninolytické houby neboli houby bílé hniloby, jsou organismy rostoucí na dřevě, resp. ligninocelulózových substrátech. Houby bílé hniloby jsou převážně basidiomycety a askomycety a jsou schopny rozkládat heterogenní polyfenolický polymer lignin. Z bioremediačního hlediska jsou zajímavé svým extracelulárním enzymatickým aparátem. Produkují velké množství enzymů schopných vedle ligninu rozkládat i celou škálu dalších organických sloučenin jako jsou halogenované látky, pesticidy<sup>120</sup>, průmyslová syntetická barviva<sup>121</sup>, léčiva<sup>122</sup>, přirozené i syntetické estrogény<sup>123</sup> atd. Mezi nejznámější a nejvíce studované druhy patří *Phanerochaete chrysosporium* (Kornatec) a dále *Pleurotus ostreatus* (Hlíva ústříčná), *Trametes versicolor* (Outkovka pestrá), *Pycnoporus cinnabarinus* (Outkovka rumělková) a *Panus (Lentinus) tigrinus* (Houževnatec tygrovaný).

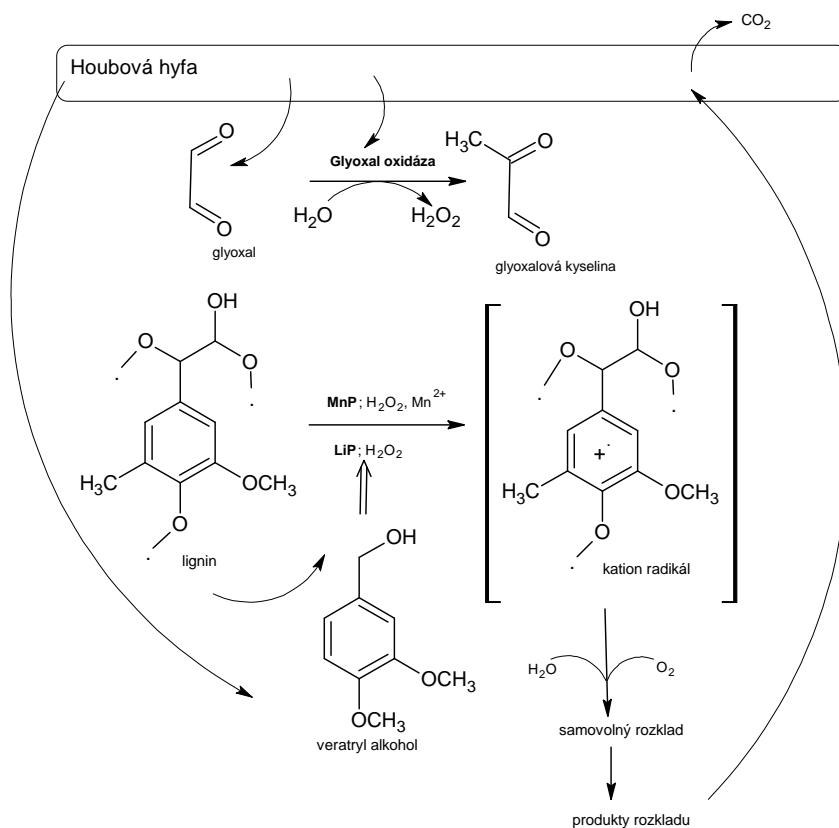
Lignin patří mezi nejhojněji zastoupené biopolymery (třetí nejhojnější biopolymer po celulóze a hemicelulóze) na světě a skládá se ze tří základních jednotek, jimiž jsou primární aromatické kyseliny, resp. jejich hydroxyderiváty (*p*-kumarylalkohol, koniferylalkohol, sinapylalkohol), které jsou u rostlinných druhů zastoupeny v různém poměru. Odbourávání ligninu nepřináší houbám žádný energetický zisk ani jiné živiny (s výjimkou minoritních dusíkatých látek vázaných v ligninu), ale poskytuje strategickou výhodu v přístupu k substrátům obsahujícím celulózu v místech krytých ligninem<sup>124</sup>. Celulóza a hemicelulóza jsou pak houbou rozkládány a využívány jako zdroj energie a uhlíku, zatímco z degradovaného ligninu vznikají humínové látky. Vzhledem k četnosti výskytu ligninu na Zemi je jeho biodegradace zásadní pro koloběh uhlíku v přírodě.

Odbourávání dřeva, resp. ligninocelulózových komplexů, je u hub striktně aerobní proces probíhající zejména působením extracelulárních enzymů. Vzhledem k velké strukturní heterogenitě ligninu mají ligninolytické enzymy velmi širokou substrátovou specifitu. Řadíme mezi ně lignin peroxidázu (LiP; EC 1.11.1.14), mangan-dependentní peroxidázu (MnP; EC 1.11.1.13) a versatilní peroxidázu (VP; 1.11.1.16). U některých druhů se také vyskytuje mangan-independtní peroxidáza (MiP)<sup>120</sup>. Důležitou roli hraje také fenol oxidáza lakáza (EC 1.10.3.2).

Další skupinou jsou tzv. pomocné enzymy jako např. arylalkohol oxidáza (EC 1.1.3.7), glyoxal oxidáza (EC 1.2.3.5), či superoxid dismutáza (EC 1.15.11). Tyto enzymy samy neinicují atak ligninu a ani nemají schopnost lignin štěpit, ale významně se podílí na degradačních pochodech. Kvůli své velikosti enzymy nemohou plně difundovat k molekulám ligninu v substrátu, takže reakci zahajují nízkomolekulární mediátory (např. veratryl alkohol, hydroxybenzotriazol atd.)<sup>124</sup>. Enzymy jsou u různých kmenů ligninolytických hub produkovány na různé koncentrační úrovni.

Superoxid dismutáza chrání buňky před působením reaktivních superoxidových radikálů vznikajících při reakcích lakázy s chinony a přeměňuje je na méně reaktivní  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Glyoxal oxidáza produkuje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nutný pro reakce MnP a LiP, katalýzou přeměny aldehydu na karboxylovou skupinu. Navíc při oxidaci glyoxalu na kyselinu glyoxalovou a následně oxalovou vzniká kofaktor nutný pro funkci MnP<sup>125</sup>. Arylalkohol oxidáza má stejnou funkci jako glyoxal oxidáza - produkci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a katalyzuje oxidativní dehydrogenaci širokého spektra polynenasycených alifatických alkoholů<sup>126</sup>.

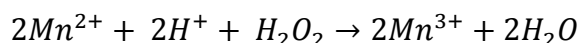
Princip rozkladu ligninu i organopolutantů je nejvíce popsán u kmenu *P. chrysosporium* a *Bjerkandera adusta*. Počáteční atak komplexu ligninu (popř. organopolutantů), zprostředkovávají MnP a LiP, které pro svou funkci potřebují peroxid vodíku (viz obrázek 1). Během reakcí dochází k uvolňování velmi reaktivních volných radikálů kyslíku, které reagují s molekulou ligninu, štěpí kovalentní vazby a uvolňují mnoho různých fenolických sloučenin ve formě kationových radikálů. Tyto radikály reagují s kyslíkem a vodou a vznikají nízkomolekulární látky, které jsou zpětně přijímány houbovou hýfou<sup>124,125</sup>.



Obrázek 1 Ligninolytický systém houby *Bjerkandera* sp. (převzato od de Jong<sup>125</sup>).

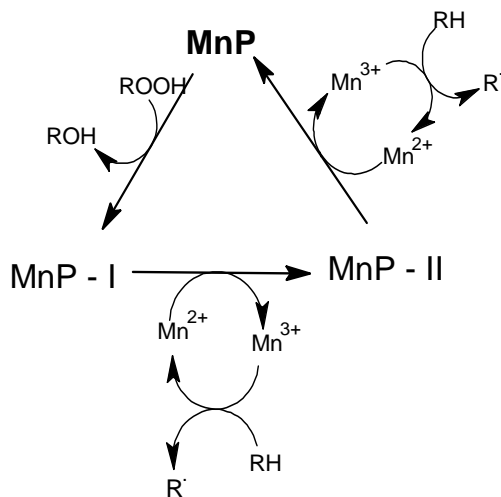
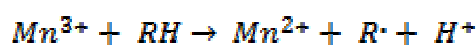
### 2.2.1 Mangan-dependentní peroxidáza

MnP je hemová peroxidáza katalyzující  $H_2O_2$ -dependentní oxidaci  $Mn^{2+}$  na vysoce reaktivní  $Mn^{3+}$  dle schématu:



Vzniklý kation pak následně oxiduje fenolické části ligninu za vzniku volných radikálů. MnP patří mezi glykoproteinové peroxidázy a je často produkována ve formě izoenzymů, jejichž molekulová hmotnost se pohybuje od 45–55 kDa a liší se hodnotou izoelektrického bodu  $pI$  (cit.<sup>127</sup>). Molekulová struktura MnP je podobná struktuře LiP a skládá se ze dvou proteinových domén, mezi nimiž je uložen hem. Dále struktura zahrnuje 11  $\alpha$ -helixů a 5 disulfidických můstků.  $Mn^{2+}$  vazebné místo se nachází na C-terminálním konci a je tvořeno disulfidickým můstkem<sup>128</sup>.

Katalytický cyklus je obdobný jako u ostatních hemových peroxidáz (obrázek 2). Zahrnuje nativní formu enzymu obsahující  $Mn^{2+}$  a reaktivní meziproducty (sloučenina I a II). Kation  $Mn^{2+}$  vstupuje do reakce jako donor elektronu a je oxidován na  $Mn^{3+}$ . Reaktivní  $Mn^{3+}$  se disociuje od enzymu a následně dochází k jeho stabilizaci v komplexu pomocí  $\alpha$ -hydroxy kyselin (oxalová, malonová). Vzniklé komplexy jsou schopné difúze a působí jako oxidační činidlo schopné jednoelektronové oxidace různých substrátů (RH) dle rovnice<sup>128</sup>:



Obrázek 2 Katalytický cyklus mangan-dependentní peroxidáz (MnP). RH-substrát. Upraveno dle cit<sup>130</sup>.

Vzniklý nestabilní fenoxi-radikál podléhá dalším neenzymatickým reakcím. Za fyziologických podmínek je oxidace MnP omezena na jednoduché fenolické substráty. Pro oxidaci nefenolických substrátů je zpravidla vyžadována přítomnost mediátoru (např. glutationu).

Mezi reakce katalyzované MnP patří např. mineralizace fenolů a chlorofenolů, organických barviv a dalších organopolutantů<sup>120</sup>. MnP byla detekována např. u kmenů *Phanerochaete* a *Dichomitus squalens*<sup>129</sup>.

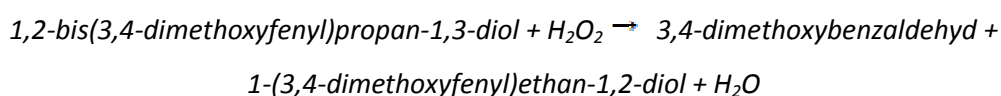
### 2.2.2 Mangan-independentní peroxidáza

MiP byla prvně popsána v roce 1988 a byla definována jako izoenzym MnP a pojmenovaná jako manganem inhibovaná peroxidáza<sup>131</sup>. Tento enzym není zatím příliš prostudován a charakterizován, ale patří do skupiny peroxidáz, katalyzujících jednoelektronovou oxidaci

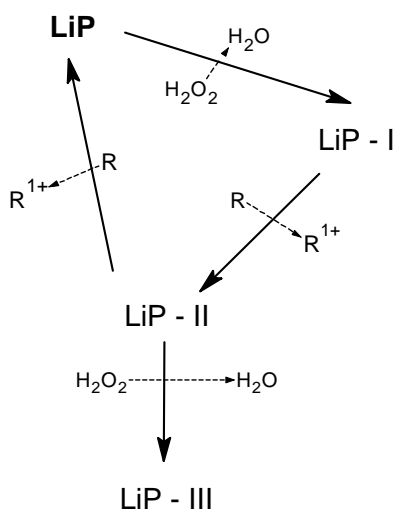
substrátu při redukci  $\text{H}_2\text{O}_2$  na  $\text{H}_2\text{O}$ . Substrátem pro MiP je např. 2,6-dimethoxyfenol (DMP) a oproti MnP není MiP dle některých autorů schopná oxidovat veratryl alkohol<sup>125</sup>. MiP může oxidovat substráty i bez přítomnosti  $\text{H}_2\text{O}_2$  a v několika případech byla pozorována inhibice MiP aktivity přítomností  $\text{Mn}^{2+}$  (cit.<sup>125,132</sup>). Role MiP v biodegradaci ligninu je neobjasněná.

### 2.2.3 Lignin peroxidáza

Lignin peroxidáza je hemový glykoprotein s molekulovou hmotností v rozmezí 30–46 kDa. LiP katalyzuje  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dependentní oxidativní depolymerizaci ligninu a oxidaci fenolických i nefenolických aromatických struktur za vzniku arylkationových a fenoxylových radikálů<sup>128</sup>. Pro LiP je charakteristická nízká hodnota pH optima (okolo pH 3), se stoupající hodnotou pH aktivita enzymu rychle klesá<sup>128</sup>. Reakce lze zapsat jako:



LiP je globulární protein skládající se ze dvou domén, mezi kterými se nachází štěrbina se začleněným hemem. Struktura je bohatá na  $\alpha$ -helixové struktury a cysteinové zbytky, které se podílí na tvorbě disulfidických můstků. Každá doména obsahuje kalcium-vazebné místo, jehož funkcí je udržování struktury aktivního centra. C-terminální konec je proti proteolýze chráněný glykosylací. Vazebné místo pro peroxid je umístěno na distální straně hemu a je přístupné prostřednictvím kanálu<sup>128</sup>.



Obrázek 3 Katalytický cyklus lignin peroxidázy (LiP); R-substrát. Upraveno dle cit.<sup>127</sup>.

Katalytický cyklus LiP je zobrazen na obrázku 3.

V průběhu cyklu dochází k odebrání dvou elektronů z molekuly LiP za vzniku meziprojektu (LiP-I), který oxiduje substrát odstraněním elektronu za vzniku redukovanějšího enzymového meziprojektu (LiP-II). LiP-II oxiduje další molekulu substrátu odejmutím elektronu, čímž se vrací do svého původního stavu. V případě nedostatku substrátu nebo vysoké koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$  může LiP-II reagovat na neaktivní LiP-III. Přítomnost některých aromatických látek může tento krok blokovat (např. veratryl alkohol nebo tryptofan)<sup>133</sup>.

Reakce katalyzované LiP zahrnují štěpení aromatických cyklů i alifatických řetězců, oxidace benzylalkoholu a oxidativní i reduktivní dechlorinaci a methoxylaci. Byla popsána u kmenů *Phanerochete*, *Trametes* a *Bejkandera*<sup>129</sup>.

## 2.2.4 Versatilní peroxidáza

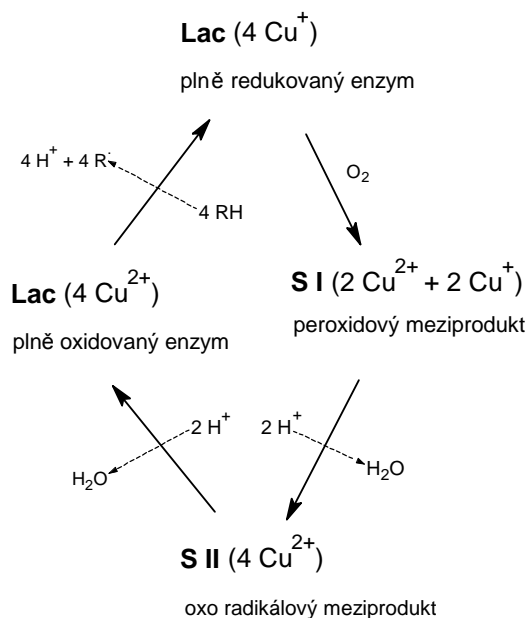
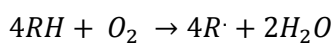
Versatilní peroxidáza (VP) byla vzhledem ke svým katalytickým vlastnostem označena jako LiP-MnP hybrid<sup>127</sup>. Strukturně se VP více podobá LiP, obsahuje aminokyselinové zbytky charakteristické pro vazbu aromatického substrátu, ale také obsahuje vazebné místo na  $Mn^{2+}$ . Unikátní je díky spektru substrátů, které je schopná oxidovat, jako je např. veratryl alkohol (typický pro LiP), ale také např. průmyslová barviva s vysokým i nízkým redoxním potenciálem, substituované fenoly a  $Mn^{2+}$  atd.<sup>128</sup>.

Katalytický cyklus VP je shodný s ostatními peroxidázami, kdy dochází ke dvouelektronové oxidaci enzymu prostřednictvím  $H_2O_2$ , a následně k jednoelektronovým oxidacím substrátů a návratu enzymu do nativního stavu.

VP oxiduje dimethylbenzeny, ligninové dimery, fenoly, aminy, syntetická barviva a aromatické alkoholy<sup>134</sup>. V nepřítomnosti MnP oxiduje VP fenolické a nefenolické substráty obdobně jako LiP. Enzym byl detekován např. u kmenů *Pleurotus*, *Bjerkandera* a *Trametes*<sup>129</sup>.

## 2.2.5 Lakáza

Lakáza patří do skupiny fenol oxidáz obsahujících měď. Lakáza katalyzuje čtyřelektronovou redukci kyslíku na vodu:



Obrázek 4 Katalytický cyklus lakázy. Lac-lakáza; SI a SII-reaktivním meziprodukty; RH-substrát. Upraveno dle cit<sup>128</sup>.

Velikost lakázy se pohybuje v rozmezí od 50–110 kDa a převážně je exprimovaná extracelulárně. U rostlin lakáza participuje na syntéze ligninu<sup>128</sup>, u hub se mimo rozkladu ligninu účastní také pigmentace a sporulace<sup>135</sup>. Lakáza oxiduje mnoho sloučenin, jako jsou fenoly, polyfenoly, aromatické aminy a nefenolické substráty za vzniku radikálů, které podléhají depolymerizaci, repolymerizaci a methylaci.

Lakáza obsahuje ve své molekule 4 centra obsahující měď ve formě  $Cu^{2+}$ , které jsou rozmístěny mezi 3 vazebnými místy do dvou reakčních center (T1 a T2/T3). T1 obsahuje jeden kation  $Cu^{2+}$ , druhé centrum T2/T3 se skládá z vazebného místa T2, které váže jeden kation  $Cu^{2+}$  a vazebného místa T3 pro zbývající dva kationty  $Cu^{2+}$ .

Katalytický cyklus je znázorněn na obrázku 4. Molekula kyslíku se nejprve naváže na centrum T2/T3, přičemž dojde k rychlému transportu dvou elektronů ze dvou kationtů mědi ve vazebném místě T3 za vzniku peroxidového meziprojektu (S I). Následně dojde k rychlému transportu elektronu z reakčního centra T1 za vzniku oxy- radikálového meziprojektu (S II). Po reduktivním štěpení kyslíkové vazby (O-O) dochází k uvolňování molekuly H<sub>2</sub>O. Pomalý rozpad oxo- meziprojektu je usnadněn přenosem 1 elektronu z centra T2. V posledním kroku se 4 kationty mědi nacházejí v oxidačním stavu <sup>2+</sup> a anion O<sub>2</sub><sup>-</sup> je uvolněn ve formě druhé molekuly H<sub>2</sub>O (cit. <sup>136</sup>).

Katalytické působení lakáz mohou usnadňovat nízkomolekulární mediátory přírodního či syntetického původu, které působí jako oxidační činidlo. Substrát je oxidován sekundárně bez přímého kontaktu s enzymem. Mezi přírodní mediátory patří např. 4-hydroxybenzoová kyselina (HBA), tyrozin, redukovaný glutation či kyselina sinapová<sup>137</sup>. V souvislosti s degradacemi organopolutantů bylo popsáno také několik mediátorů syntetického původu jako např. například 2,2'-azinobis(3-etylbenzthiazolin)-6-sulfonová kyselina (ABTS)<sup>138</sup>.

Obdobně jako peroxidázy katalyzují lakázy jednoelektronovou reakci fenolů na fenoxylradikály. V přítomnosti mediátorů oxidují lakázy nefenolické substráty<sup>134</sup>. Přítomnost lakázy byla detekovaná např. v kulturách *Trametes*, *Bjerkandera* a *Pleurotus*<sup>139</sup>.

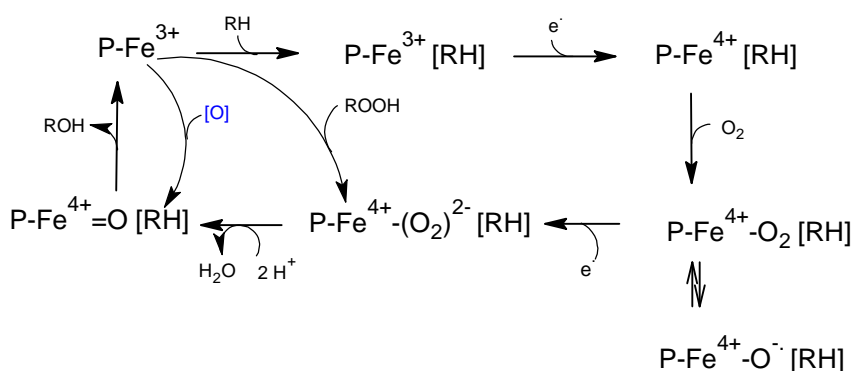
### 2.2.6 Cytochrom P-450

Mezi důležité enzymové aparáty schopné metabolismu cizorodých látek patří u ligninolytických hub (stejně tak jako u jiných organismů) cytochrom P-450 (P450). P450 (tzv. systém oxidáz se smíšenou funkcí) se v eukaryotické buňce nachází v membráně hladkého endoplasmatického retikula a podílí se na biotransformačních procesech primárního a sekundárního metabolismu a metabolismu xenobiotik. V menší míře se nachází také v membráně mitochondrií, kde se podílí na biosyntéze steroidů. P450 se podílí na široké škále reakcí, které lze vyjádřit obecnou rovnicí:



Elektrony potřebné pro reakci substrátu s molekulou O<sub>2</sub> jsou generovány samostatným systémem. Donor elektronů u mitochondriálních a prokaryotických P450 je proteinový systém adrenodoxin a NADPH-adrenodoxin reduktáza. U eukaryotních a retikulárních P450 je donorem cytochrom P450 reduktáza<sup>140</sup>. Dle proteinů, participujících na transferu elektronů, jsou cytochromy rozděleny na 10 skupin, z nichž 3 byly prokázány u hub<sup>141</sup>. Dohromady je popsáno 6000 houbových genů z 276 rodin kódujících P450 (cit.<sup>142</sup>). Největší počet houbových P450 genů (148 genů) bylo popsáno u *P. chrysosporium*<sup>143</sup>.

Struktury cytochromů P450 se mohou značně lišit a ačkoliv jejich aminokyselinové složení není příliš konzervováno, 3D struktury různých rodin cytochromů jsou velmi podobné. Silně konzervované je pouze aminokyselinové složení na C-terminálním konci, které obsahuje vazebné místo pro hem a substrát. P450 obsahuje ve své struktuře porfyrinový skelet, který je v aktivním centru vázán hydrofobními silami a také pomocí síry z cysteinu. Díky tomuto uspořádání mají P450 unikátní katalytické a spektrální vlastnosti. Dalším ligandem železa v porfyrinu je molekula vody.



Obrázek 5 Katalytický cyklus P450; RH-substrát. Upraveno dle cit. <sup>144</sup>.

Katalytický cyklus P450 je znázorněn na obrázku 5. Vazba substrátu (RH) do dutiny v blízkosti kationtu  $\text{Fe}^{3+}$  porfyrinu vyvolá konformační změnu, která usnadňuje redukcí  $\text{Fe}^{3+}$ . Redukce je zprostředkována přenosem elektronů z NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) na NADPH-cytochrom P450 reduktázu (v endoplasmatickém retikulu) nebo na ferredoxin reduktázu (v mitochondriích) a následně na P450. Na redukováný P450 se váže molekula  $\text{O}_2$  za vzniku nestabilního komplexu, který je redukován na superoxidový meziprodukt, který je dále protonován za štěpení O-O vazby. Jeden z atomů kyslíku je redukován na vodu a druhý zůstává navázaný v aktivním centru komplexu. V následující reakci dochází k odštěpení  $\text{H}^+$  z molekuly substrátu za vzniku nestabilního radikálu a následného uvolnění hydroxylovaného substrátu (ROH) z komplexu. Tím se P450 dostane do své nativní formy.

Společným rysem cytochromů je hydrofobní povaha jejich substrátů. Primárním úkolem P450 je oxidace substrátů za zvýšení jejich rozpustnosti. Cytochromy katalyzují především epoxidace, štěpení C=C vazby a hydroxylace. Dále se podílí na deaminacích, dealkylacích, dehydrogenacích, dehydratacích, desulfatacích a dále oxidativních i reduktivních dehalogenacích. P450 pravděpodobně hraje důležitou roli v rozkladu depolymerovaných metabolitů ligninu, vznikajících při působení houbových peroxidáz.



### 2.2.7 Ostatní enzymy

Mezi další enzymy schopné participace při degradaci ligninu a xenobiotik můžeme řadit např. tyrosinázu (polyfenolexidázu), nitrát reduktázu a dioxygenázy, jako je např. pyrokatechol-3,4-dioxygenáza, 1,2,4-trihydroxybenzen 1,2-dioxygenáza a katechol 1,2-dioxygenáza<sup>124</sup>. Do metabolismu xenobiotik mohou být zapojené také glukozylační a xylozylační enzymy<sup>145</sup>.

## 2.3 Degradace ED

Výskyt ED v životním prostředí a hlavně v odtocích ČOV ukazuje na nedostatečné odbourání těchto látek v průběhu čistírenských procesů. V případě konjugovaných sloučenin (estrogeny, EE2) může na ČOV docházet k dekonjugaci a tím k nárůstu koncentrace těchto látek. K odstraňování organopolutantů z odpadních a pitných vod lze použít velké množství technik, nebo jejich kombinací. Volby vhodné techniky závisí na typu cílové sloučeniny či jejich směsi a matici. Důležitým parametrem pro výběr metody jsou vedle účinné eliminace látek z prostředí i technické požadavky, typ vznikajících produktů, parametry prostředí (průtok, koncentrace atd.) a také ekonomické hledisko.

### 2.3.1 Abiotické degradace ED

Abiotické metody odstranění ED z vodných matric lze rozdělit na dvě skupiny dle mechanismu – destrukční a záchytné. Mezi metody účinné destrukce ED řadíme například oxidace ozonizací<sup>146</sup>, použití  $\text{MnO}_2$  (cit.<sup>147</sup>),  $\text{Mn}^{3+}$  (cit.<sup>148</sup>),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cit.<sup>149</sup>),  $\text{TiO}_2$ -fotooxidace<sup>150</sup> a fotolýzy<sup>151,152</sup>. K nedestrukčním metodám odstranění ED z vodného prostředí patří koagulace-flokulace např. s  $\text{FeCl}_3$  (cit.<sup>12</sup>), adsorpce na aktivní uhlí<sup>12</sup> a různé membránové techniky, jako je nanofiltrace<sup>153</sup> či reverzní osmóza<sup>154</sup>. Většina popsaných metod vykazuje velmi vysoký degradační potenciál, ale jejich vysoká cena z nich činí nástroje zpravidla jen pro úpravu pitné vody.

### 2.3.2 Degradace na ČOV

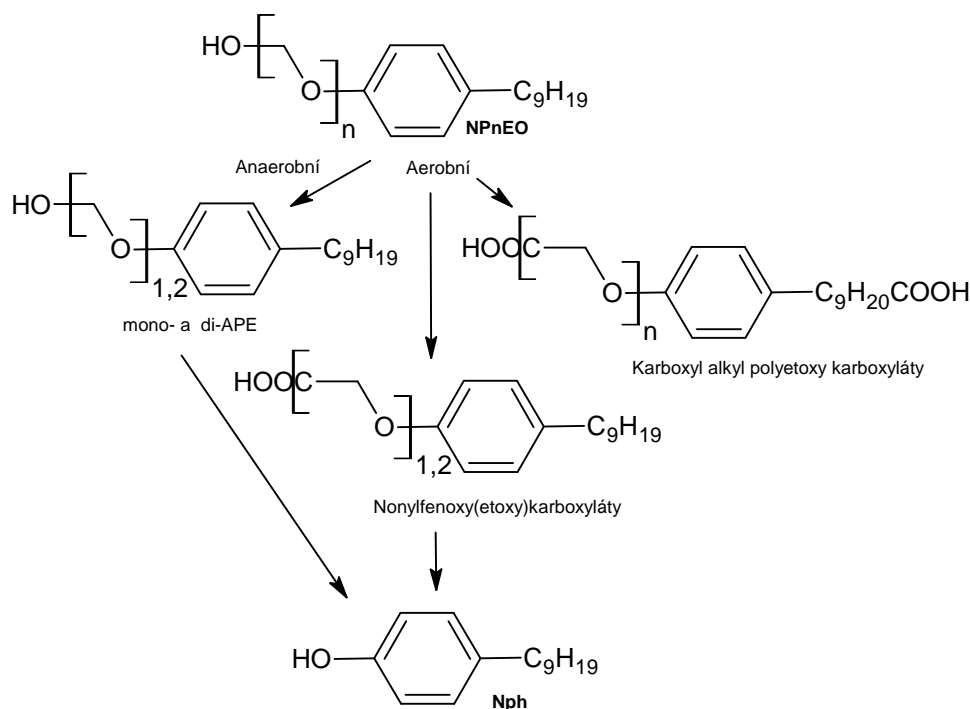
Jako nejlevnější a technologicky dostupná biologická metoda odstranění organopolutantů je použití aktivovaného kalu, který je běžně používán jako součást ČOV pro velká města. V případě mikropolutantů však není tento proces zcela účinný<sup>155</sup> a v řadě případů je také nutno zohlednit snížení dostupnosti organopolutantů vazbou na matici<sup>87</sup> vlivem lipofilního charakteru některých látek. Afinita látek vůči částicím kalu bývá definována jako koeficient sorpce  $K_d$ . Clara a spol.<sup>156</sup> stanovili, že sorpce na částice je stěžejní u látek, jejichž hodnota  $\log K_d$  se pohybuje nad hodnotou 4. Naopak u látek s  $\log K_d$  menší než 2 lze sorpci zanedbat. Pro E1, E2 a EE2 se hodnoty  $\log K_d$  pro aktivovaný kal pohybují v rozmezí od 2,88 (EE2), 2,84 (E2)<sup>157</sup>, 2,6 (E1)<sup>156</sup>, takže předpokládaná sorpce látek na kal je 50-75 %. Některé práce uvádějí sorpci estrogenů na pevné matrice jako nepodstatnou část jejich odstranění v porovnání s jejich biodegradací (např. Andersen a kol.<sup>88</sup> uvádějí pouze 5% sorpci látek na čistírenský kal, Janex-Habibi a kol.<sup>158</sup> méně než 10 % sorpce), jiné práce naopak tomuto procesu přiřkládají velký důraz<sup>36,50</sup>.

Johnson a kol.<sup>61</sup> porovnávali přítomnost estrogenů a nonylfenolu na 17 různých evropských ČOV. ČOV, které zahrnovaly pouze primární čištění, měly nejnižší schopnost odstranit ED, resp. na odtocích byl detekován vzrůst koncentrace (odtok 35 ng/l E1, přítok 13 ng/l E1). ČOV, zahrnující aktivovaný kal jako sekundární čistící proces, prokázaly 82-90% účinnost odstranění E1, mimo jednoho případu, kdy došlo k poklesu pouze z 54 %. Velmi účinné v odstranění E1 se ukázaly být ČOV zahrnující techniku umožňující promíchávání a oxidaci kalu (89-99%) a taktéž kombinaci biologického filtru s aktivovaným kalem (99%). Johnson a kol.<sup>61</sup> detekovali E2 v odtoku ČOV pouze v 6 případech ze 17 a koncentrace se pohybovala v rozmezí 0,7-5,7 ng/l, s výjimkou ČOV s primárním čištěním, kde koncentrace dosáhla 13 ng/l. Nonylfenol byl detekován na odtoku 14 ČOV v rozmezí 0,05-2,3 µg/l (cit.<sup>61</sup>). Ternes a kol.<sup>159</sup> uvádí až 90% přeměnu estrogenu E2 ve slabší estrogen E1 během 30 min v podmínkách aktivovaného kalu. Následný rozklad E1 je výrazně pomalejší (redukce 50 % za 24 h) díky větší stabilitě E1 vůči mikrobiálnímu rozkladu.

EE2 má oproti přirozeným hormonům nižší rozpustnost ve vodě, vyšší odolnost vůči bakteriálnímu rozkladu a vyšší estrogenní aktivitu. Miège a kol.<sup>160</sup> srovnávali degradační účinnost různých typů ČOV vůči organopolutantům. Až 70% odstranění EE2 bylo popsáno u ČOV zahrnujících pevný bioreaktor s vodnou fází a dlouhou retenční dobou. Baronti a kol.<sup>52</sup> zaznamenali 61%-95% degradaci na ČOV u přirozených estrogenů a 85% degradaci u EE2. Naopak velmi nízkou degradaci EE2 (3 %) a velmi vysokou degradaci E1, E2 a NP (98 %) popsal Kanda a kol. ve své práci z roku 2008 (cit.<sup>161</sup>). Mes a kol.<sup>162</sup> srovnávali digesci E1, E2 a EE2 za přidavku aktivovaného kalu jako inokula na různých substrátech a za anaerobních podmínek nedetekovali pokles estrogenů. Vliv přítomnosti kyslíku a stupně nitrifikace na degradaci EE2 a E2 srovnával ve své práci také Dytczak a kol.<sup>163</sup>. Za anaerobních (denitrifikačních) podmínek byl EE2 perzistentní, za aerobních (nitrifikačních) podmínek dosáhla degradace 22 % po 7h. E2 byl rychle přeměněn na E1, který se dále kumuloval. Vyšší degradace estrogenů byla v obou případech zaznamenána v přítomnosti nitrifikační biomasy. Další příklady degradace EE2 a estrogenů v ČOV pomocí bakterií a dalších mikroorganismů jsou diskutovány v souhrnném článku 2.

Alkylfenoethoxyláty, které jsou dobře rozpustné ve vodě a zůstávají ve vodné frakci, jsou v aktivovaném kalu bakteriálně degradovány na méně polární a více perzistentní alkylfenoly<sup>155</sup>. Na obrázku 6 je schematicky znázorněná bakteriální degradace nonylfenoethoxylátu (NPE) přes dimerické meziproducty na nonylfenol. Nonylfenol má vysokou hodnotu sorpčního koeficientu (3,87), a proto předpokládaným mechanismem jeho odstranění z vod v ČOV je sorpce na částice kalu<sup>164</sup>. V laboratorních podmínkách bylo prokázáno, že NP v aktivovaném kalu nepodléhal anaerobní digesci a zůstal stabilní<sup>165</sup>. Fernandéz a kol. sledovali pokles NP, BPA a estrogenů ve 4 kanadských ČOV<sup>166</sup>. Degradace NP se pohybovala v rozmezí 56-90 %, BPA 28-100 %. Estrogeny

byly ve většině případů detekovány pouze v odtoku ČOV, což poukazuje na možné uvolňování hormonů z konjugátů. Fuerhacker a kol. stanovili 78-89% odstranění BPA oproti vstupu u 4 ČOV z průmyslových oblastí a 2 ČOV u velkých měst<sup>167</sup>.



**Obrázek 6 Aerobní a anaerobní bakteriální degradace nonylfenoethoxylátů v ČOV (NPE) na nonylfenol (NP); APE-alkylfenoethoxyláty. Upraveno dle Corvini a kol.<sup>168</sup>.**

Irgasan byl při laboratorním pokusu za aerobních podmínek v aktivovaném kalu degradován ze 75 %, zatímco za anaerobních podmínek je téměř nedegradován<sup>169</sup>. V průběhu jednoleté monitorovací studie na jihu Španělska byl pozorován trend poklesu IRG při průchodu ČOV (v průměru okolo 88 %) <sup>112</sup>. 90% odstranění IRG bylo pozorováno u ČOV zahrnujících aktivovaný kal, avšak z celkového úbytku IRG je 40-60 % přisuzováno biodegradaci a zbytek sorpčním mechanismům<sup>105,170</sup>. Singer a kol.<sup>171</sup> přisuzuje sorpci na kal 15 % z celkového úbytku IRG (94 %).

Přítomnost druhého biologického čistícího stupně v ČOV se zdá být dle dostupných dat velmi podstatná v odstraňování ED ze životního prostředí. Přesto se však na odtocích ČOV nacházejí koncentrace ED, které mohou mít negativní vliv na životní prostředí. Vhodnou metodou by mohlo být zařazení dalšího, tzv. terciárního stupně čistění odpadních vod, který se dosud kvůli své finanční nákladnosti používá spíše ojediněle. Zpravidla se jedná o fyzikální metody (např. filtrace), ale mohou zde být zařazeny i biologické metody (např. biologické filtry, reaktory atd.).

### 2.3.3 Mikrobiální degradace ED v laboratorním měřítku

Mezi studované mikrobiální degradační metody patří také využití některých kmenů bakterií, hub, a v několika málo případech také řas. Podrobněji se tomuto tématu věnuje souhrnný článek autorky (publikace 1), na shrnutí mikrobiálního rozkladu EE2 je zaměřen další souhrnný článek (publikace 2).

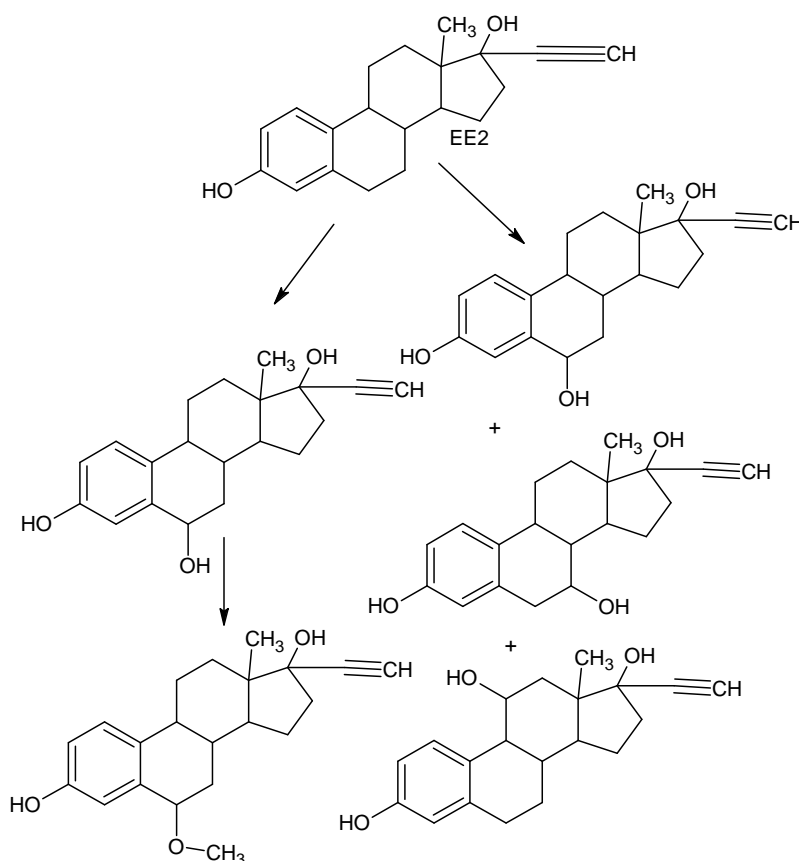
Bakterie přítomné v ČOV mají zpravidla schopnost částečně či zcela degradovat přirozené estrogény. První kmen schopný degradovat E2 izolovaný z aktivovaného kalu byl *Novosphingobacterium tardaudens* (publikováno v roce 2003)<sup>172</sup>. Ke a kol. popisují degradaci E1, E2, E3 a EE2 pomocí kmenů bakterií izolovaných z odtoku ČOV, která zahrnovala biologický krok<sup>173</sup>. E3 a EE2 nebyly za anaerobních podmínek degradovány žádným z izolovaných kmenů (*Acinetobacter*, *Agromyces*, *Sphingomonas*), E3 byl degradován za aerobních podmínek kmenem *Agromyces*. Za aerobních podmínek došlo k rychlé degradaci E2 na E1 u všech tří izolovaných kmenů, ale E1 byl degradován pouze kmenem *Sphingomonas*. Schopnost degradovat zároveň E1, E2, E3 a EE2 byla popsána u bakteriálních kmenů *Rhodococcus zopfii* a *Rhodococcus equi*, izolovaných z čistírenského aktivovaného kalu<sup>174</sup>. Degradace EE2 byla popsána také u houbového kmenu *Fusarium proliferatum*, izolovaného z odpadních vod kravína<sup>175</sup>. Přeměna E2 a EE2 na E1 byla prokázána při použití říčního bakteriálního biofilmu v průtočném reaktoru<sup>176</sup>.

4-Nonylfenol může být bakteriálně metabolizován přes rozklad aromatického kruhu za vzniku nonylalkoholů<sup>168</sup>. Tento proces byl nejprve popsán u bakterie *Sphingomonas* sp.<sup>177</sup>, a od té doby bylo izolováno mnoho kmenů *Sphingomonas*, schopných degradace NP (např. *Sphingomonas xenophaga*, *Sphingomonas cloacae* a *Sphingobium amiense*<sup>178,179</sup>). Schopnost degradovat NP kmeny *Sphingomonas* sp.<sup>180</sup> byla prokázána také v prostředí laboratorního reaktoru, kde došlo k poklesu počáteční koncentrace z 95 % během 10 dnů. Kmeny *Sphingomonas* se ukázaly jako vhodné i pro degradaci BPA a IRG. BPA byl zcela degradován již po 6 hodinách kultivace a za úbytek byl dle detekovaných hydroxylovaných metabolitů pravděpodobně zodpovědný cytochrom P450<sup>181</sup>. Degradace IRG kmenem *Sphingomonas* byla pomalejší a ze tří testovaných kmenů pouze jeden dokázal redukovat IRG z 25 % za 8 dní<sup>182</sup>. Detekované metylované a štěpné meziprodukty vykazovaly nižší antimikrobiální aktivitu než irgasan.

V literatuře existuje několik prací, zabývajících se degradací ED pomocí sladkovodních a mořských řas. BPA byl částečně degradován pomocí zelené řasy *Chlorella fusca*<sup>183</sup> a také fytoplanktonní mořskou jednobuněčnou řasou<sup>184</sup>. Ge a kol. izolovali tři druhy sladkovodních řas (*Chlorella vulgaris*, *Anabaena cylindrica*, *Microcystis aeruginosa*) a použili je při fotodegradacích E2 a EE2. *Navicula incerta*, mořská řasa, degradovala v průběhu 96 h 20 % NP, 38 % BPA, 52 % E2 a 31 % EE2 v prostředí slané vody<sup>185</sup>. Ve většině případů dochází k inhibici růstu řas při vyšších

koncentracích ED a degradační testy byly prováděny na hladině environmentálních koncentrací (ng/l). Irgasan je však toxický vůči řasám již v takto nízkých koncentracích<sup>186</sup>.

Degradace EE2 byla popsána u půdní houby *Cunninghamella elegans*<sup>187</sup>. Houba *Cephalosporium aphidicola*, u které byla popsána schopnost biotransformovat deriváty pregnanu<sup>188</sup>, nejprve v prostředí tekutého média degradovala norethisteron na EE2. Ten byl následně houbou *C. elegans* degrádován na methoxylované a hydroxylované produkty, které jsou zobrazeny na obrázku 7.



Obrázek 7 Metabolická dráha EE2 houby *Cunninghamella elegans*<sup>187</sup>.

### 2.3.4 Degradace ED pomocí ligninolytických hub

V literatuře existuje mnoho prací zabývajících se degradací celé řady organopolutantů pomocí celých houbových kultur nebo izolovaných<sup>120,125,189,190</sup>, popř. imobilizovaných ligninolytických enzymů<sup>191</sup>. Taktéž jsou popsány studie intracelulárních degradací organopolutantů, např. prostřednictvím mechanismu P450 (cit.<sup>192</sup>). Cabana a spol. ve svém článku z roku 2007 shrnuje práce, které se týkají degradace mnoha látek s estrogenní aktivitou (např. BPA, nonylfenol, IRG, E2, E3, EE2, E1, dibutylftalát, fytoestrogeny atd.)<sup>123</sup>. Z výsledků je však patrné, že všechny kmeny hub nemají stejný degradační potenciál. Fyziologie produkce ligninolytických enzymů pro degradace organopolutantů byla studována v mnoha pracích. Ačkoliv

houby bílé hniloby zahrnují velké množství kmenů, lze shrnout několik pravidel týkajících se degradace organopolutantů. Bylo prokázáno, že produkce ligninolytických enzymů může být vyvolána nedostatkem živin v prostředí (hlavně C a N) a dále ovlivněna teplotou, tlakem, pH, přítomností anorganických solí a těžkých kovů, parciálním tlakem kyslíku a v neposlední řadě také přítomností dalších organických sloučenin. Uvedené parametry ovlivňují produkci, aktivitu a stabilitu enzymu a tím přímo ovlivňují degradaci organopolutantů.

Jedním z prvních článků, zaměřených na degradaci perzistentních organopolutantů pomocí ligninolytických hub, byla práce autora Bumpuse a kol., která vyšla v roce 1985 v časopise *Science*<sup>193</sup>. Práce byla zaměřená na degradaci DDT, některých PCB, chlorovaných dioxinů a polyaromatických uhlovodíků (PAH) kmenem *P. chrysosporium* a potvrdila důležitou úlohu lignin-degradujícího systému v odstraňování organopolutantů. Degradace přirozených estrogenů (E1, E2 a E3) izolovanou lakázou z kmene *Polyporus versicolor* byla v roce 1973 popsána v práci Lugara a kol.<sup>194</sup>.

#### **2.3.4.1 Degradace in vivo**

Ačkoliv jsou přirozené estrogény zpravidla dobře rozkládány v přítomnosti ligninolytických hub<sup>125,195</sup>, více prací je zaměřeno na jejich odstranění pomocí izolovaných enzymů. 98% degradaci E1 během 5 dnů kultivace kmenem *Phanerochaete sordida* v prostředí dusíkem limitovaného média popsal Tamagawa a kol. Počáteční koncentrace E1 byla  $10^{-5}$  M a degradace korelovala s produkcí lakázy a MnP<sup>196</sup>. Odstranění E2 a EE2 bylo popsáno také u kultivace *T. versicolor*, kde došlo k degradaci 97 % po 24 h (vstupní koncentrace 10 ppm) pravděpodobně prostřednictvím enzymu lakázy<sup>197</sup>.

Degradační potenciál ligninolytických kmenů *Stereum hirsutum* a *Heterobasidium insulare* vůči BPA byl otestován během 14 denní kultivace při 30 °C, kdy došlo k 99% poklesu počáteční koncentrace<sup>198</sup>. Protože v průběhu degradace nedošlo k ovlivnění hladiny ligninolytických enzymů, domnívají se autoři, že do mechanismu odstranění BPA jsou zapojeny i intracelulární pochody. V předchozích studiích byla dokázána také schopnost kmenu *P. ostreatus* degradovat BPA z 80 % v průběhu 12 dní kultivace, pravděpodobně díky přítomnosti enzymu MnP<sup>199</sup>. Kum a spol. vytvořili pro degradaci BPA a NP rekombinantní kmen *Phlebia tremellosa*, který produkuje vysoké množství lakázy, ale MnP na nízké úrovni. Transformant byl vytvořen vnesením genem pro produkci MnP z kmenu *Polyporus brumalis* a jeho prostřednictvím bylo dosaženo rychlejší a účinnější degradace obou látek<sup>200</sup>. Shin a kol. testovali degradaci BPA pomocí hub *I. lacteus*, *T. versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *P. brumalis*, *Pleurotus eryngii* a *Schizophyllum commune* a dvou transformantů *T. versicolor*. Nejúčinnější byly kmeny *I. lacteus* a *T. versicolor*, které byly schopny odstranit 100 %

BPA během 12 h inkubace. Transformanti s genem potlačujícím produkci MnP degradovali 76 % BPA za stejných podmínek<sup>201</sup>.

Z testovaných kmenů *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *T. versicolor* a *Bjerkandera* sp. prokázaly nejvyšší degradační účinnost vůči nonylfenolu *T. versicolor* a *Bjerkandera* sp., které v průběhu 25 denní kultivace odstranily 97-99 % počáteční koncentrace. U *T. versicolor* pokles koncentrace koreloval s produkcí lakázy, ale u kmenu *Bjerkandera* sp. zůstávaly hladiny enzymů na nízkých hodnotách v průběhu celé kultivace, což ukazuje na odlišnou strategii hub v degradaci NP. Aplikace těchto dvou kmenů na uměle kontaminované půdě (430 mg/kg) prokázala pokles téměř 100 % počáteční koncentrace během 5 týdnů<sup>60</sup>. Martin a kol.<sup>202</sup> ve své práci srovnával intracelulární a extracelulární degradaci technické směsi nonylfenolu (t-NP) a 4-nonylfenolu pomocí kmenu *Clavariopsis aquatica*, vodní hyfomycety produkující lakázu. V kulturách s indukovanou lakázou zaznamenali 2,6x vyšší degradaci u NP a 1,6x vyšší u t-NP než u kultur s přidanými inhibitory lakázy (72 %). Pokles koncentrace izomerů t-NP (40 %) v průběhu degradace s inhibitorem lakázy cykloheximidem přikládají autoři intracelulárním mechanismům a dokládají tak důležitost propojení obou procesů v průběhu *in vivo* degradačních pochodů. Na rozdíl od lakázy byla však degradace intracelulárními mechanismy stereospecifická a nejlépe probíhala u izomerů s méně objemným substituentem v poloze  $\alpha$ .

Na degradaci irgasanu pomocí kultur ligninolytických hub je zaměřeno pouze několik prací, více článků je zaměřeno na jeho degradaci pomocí izolovaných enzymů (viz dále). Irgasan díky své antimikrobiální a antifungální aktivitě podléhá degradaci obtížněji než ostatní ED. Hundt a kol. popsali výraznou inhibici růstu *T. versicolor* po přidavku IRG (0,25 mM) v prvních 3 dnech kultivace. Srovnatelných hodnot s biotickou kontrolou bylo dosaženo až po 10 dnech kultivace. Růst kultury kmene *Pycnoporus cinnabarinus* za stejných podmínek nebyl přidavkem IRG ovlivněn<sup>203</sup>. Během degradačních experimentů s extraktem buněk *T. versicolor* byly detekovány konjugované metabolity odpovídající zapojení uridindifosfát-xylozyltransferázy v transformaci IRG, zatímco v kulturách *P. cinnabarinus* byly detekované methylované metabolity<sup>203</sup>.

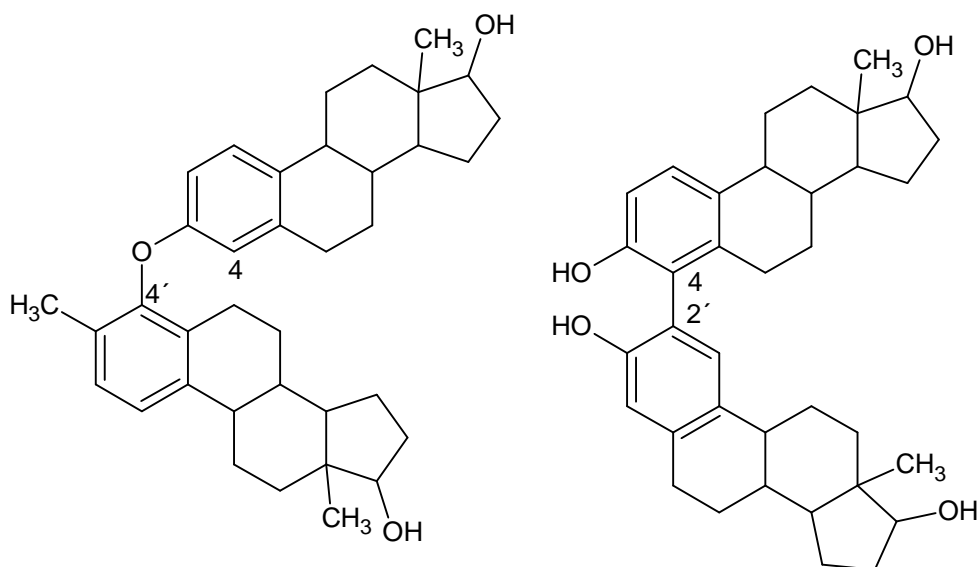
#### **2.3.4.2 Degradace pomocí ligninolytických enzymů**

Ve snaze překonat nedostatky, plynoucí z tradičních chemických a biologických remediačních postupů, se někteří autoři zaměřili na degradaci organopolutantů pomocí izolovaných enzymů. Bylo prokázáno, že mezi slibné enzymy patří např. polyfenol oxidázy (lakáza, tyrosináza) nebo oxidoreduktázy (houbové i rostlinné peroxidázy). Výsledky nedávných studií ukázaly, že mezi neúčinnější degradační enzymy patří vedle křenové peroxidázy také manganová peroxidáza a lakáza<sup>189,123,196,204,205</sup>. Díky své extracelulární povaze představují ligninolytické enzymy perspektivní nástroj pro odstranění organopolutantů ze životního prostředí.



Schopnost lakázy, manganové peroxidázy, versatilní peroxidázy i lignin peroxidázy odstraňovat endokrinní disruptory, jako jsou např. přirozené a syntetické estrogény, bisfenol A, nonylfenol a irgasan byla prokázána ve studiích z poslední doby<sup>122,123,206</sup>. Shrnutí některých vybraných studií s účinnou degradací endokrinních disruptorů je uvedeno v tabulce 6.

V průběhu degradace ED nedochází vždy k odpovídajícímu poklesu toxicity a estrogenní aktivity, což může být způsobeno formováním metabolitů, např. oligomerů (zpravidla di- až penta-). Tyto polymery mohou vykazovat vlastní biologickou aktivitu. Tvorba C-C a C-O dimerů byla popsána např. u degradace E2 lakázou v systému reverzních micel<sup>207</sup>, kdy dochází k degradaci v nevodném prostředí. Popsané produkty byly symetrické 4-4' a asymetrické 4-2' dimery (viz obrázek 8).



Obrázek 8 Zástupci C-C a C-O dimerů vzniklých při oxidaci E2 lakázou<sup>207</sup>.

Tsustsumi a kol.<sup>208</sup> popsali úplnou degradaci NP a BPA při 1h inkubaci s izolovanými enzymy z kultury *P. ostreatus* (MnP, lakáza), ale detekovali 60% reziduální estrogenní aktivitu, způsobenou pravděpodobně enzymatickou tvorbou oligomerů BPA a NP. Vznik C-C a C-O dimerů, trimerů, tetramerů a pentamerů BPA, NP a IRG byl pozorován také při oxidaci substrátů pomocí lakázy izolované z *Coriolopsis polyzona*<sup>209</sup>. Vznik metabolitů IRG v přítomnosti lakázy je diskutován také v článku Murugesana a kol.<sup>210</sup>. Autoři detekovali dva typy metabolitů: a) dimery a trimery IRG vzniklé při degradaci bez mediátorů a b) štěpné produkty IRG, které byly dále dehalogenované, vzniklé při degradaci s přidavkem mediátorů. Dimery a trimery vykazovaly reziduální toxicitu při bakteriálním testu, zatímco u štěpných produktů toxicita vůči bakteriím poklesla. Přidavek mediátorů tedy ovlivňuje nejen degradační výtěžnost, ale může ovlivňovat i formování metabolitů.

Pozitivní vliv redoxních mediátorů jako např. ABTS či HBT je deklarován mnoha pracemi, zvláště v případě odstraňování IRG<sup>209,211</sup> (viz tabulka 6). Degradace IRG lakázou izolovanou z kmene *Ganoderma lucidum* vzrostla z 56 % na 90 % po přidavku mediátorů<sup>210</sup>. Také lakáza *T. versicolor* prokázala vyšší degradační účinnost IRG v přítomnosti ABTS jako mediátoru, kdy bylo dosaženo úplné degradace během 30 min oproti 60% degradaci bez přidavku mediátorů. Naopak přidavek mediátoru HBA reakci neovlivnil<sup>211</sup>. Zvýšení degradační účinnosti IRG lakázou během 1 h z 20 % na 50 % bylo pozorováno u přidavku HBA k lakáze z *C. polyzona*. U BPA a NP bylo pozorováno zvýšení účinnosti z 35 % na 50 % a 60 % (cit.<sup>209</sup>).

Dle Inoue a kol.<sup>212</sup> by MnP mohla být vhodnějším nástrojem při odstranění toxicity IRG. Během srovnávacího experimentu degradačních schopností MnP, lakázy a lakázy s mediátory, MnP redukovala IRG z 94 % během 30 min a zároveň zcela redukovala bakteriální toxicitu, zatímco lakáza a lakáza s mediátorem degradovala za 30 min 30 %, resp. 40 % počáteční koncentrace IRG.

Imobilizace enzymů na nosič výrazně zvyšuje stabilitu enzymů, které pak v degradačních studiích vykazují vyšší účinnost. Navíc umožňuje opětovné použití katalyzátorů a zvyšuje možnosti jejich průmyslového využití např. v procesech čištění odpadních vod. V práci autora Songulashviliho byla popsána 7x vyšší účinnost lakázy kmene *Cerrera unicolor* imobilizované na silikagelovém základu vůči ABTS a zástupcům ED než tomu bylo u volné formy lakázy<sup>220</sup>. Nicolucci a kol. studovali schopnost imobilizované lakázy z *T. versicolor* a houbové tyrosinázy degradovat BPA a jeho analogy bisfenol B, bisfenol F a tetracholobisfenol A v podmínkách vsádkového reaktoru. Po 8 min došlo k poklesu 50 % BPA u lakázy, u tyrosinázy bylo stejného poklesu dosaženo po 12 min. Obecně byla imobilizovaná lakáza účinnější než tyrosináza v odstraňování všech látek<sup>221</sup>. Cabana a kol. imobilizovali lakázu na pevném nosiči, který byl posléze použit jako součást náplňového reaktoru pro kontinuální odstraňování ED<sup>216</sup>. Taboada-Puing a kol. imobilizovali verzatilní peroxidázu metodou zkřížené vazby enzymu do agregátů bez použití nosiče. Takto připravený enzym byl následně použit na degradaci ED v membránovém reaktoru<sup>219</sup>. Reaktory s imobilizovanými enzymy mají oproti klasickým bioreaktorům, kde dochází k odplavení enzymů v každém cyklu výhodu v „zadržetí“ a možnosti opětovného použití enzymů. Ztrátě enzymů lze také zabránit také použitím ultrafiltračních membrán o různé velikosti pórů. Příkladem může být enzymový membránový reaktor, kde je enzym pomocí semipermeabilní membrány oddělen od svých produktů<sup>213</sup>.

Tabulka 6 Degradace ED pomocí izolovaných ligninolytických enzymů; EA – estrogenní aktivita

Enzym	Polutant	Zdroj enzymu	Popis degračních experimentů	Ref.
<b>Lakáza</b>	E1, E2, E3	<i>Polyporus versicolor</i>	Emulze vody obsahující lakázu	194
	IRG	<i>T. versicolor</i>	Degradace ovl. přidavkem mediátorů	211
	IRG, BPA, NP	<i>C. polyzona</i>	Degradace 65 % IRG, 100 % BPA a NP (4h)	209
	E1, E2	<i>Myceliophthora thermophila</i>	94% degradace ve vsádkovém reaktoru (30 min)	213
	E2	<i>Trametes pubescent</i> , <i>Myceliophthora sp.</i>	Tvorba C-C a C-O dimerů E2	207
	NP, BPA	<i>P. tremellosa</i>	65-75% pokles estrogenní aktivity při 3h inkubace	214
	NP, E1, EE2, BPA	<i>C. versicolor</i> , <i>P. ostreatus</i> , <i>P. coccineum</i>	ED adsorbované na písku; E1 degradován ze 40 %, ostatní ED 100 % degradace (3h)	206
	E1, E2, E3, EE2	<i>T. versicolor</i>	100% degradace ED během 1h v prostředí odpadní vody	204
ABTS systém	IRG, BPA, NP	<i>C. polyzona</i>	Účinnější degradace s mediátory; tvorba polymerů ED	209
	E2, EE2	<i>T. versicolor</i> , <i>P. chrysosporium</i>	Odstranění ED během 1h, pokles EA během 8h	215
HBT systém	E2, EE2	<i>T. versicolor</i>	80% úbytek estrogenní aktivity během 1h	215
	NP, BPA	<i>P. tremellosa</i>	60-75% degradace během 3h	214
Imobilizace	IRG, BPA, NP	<i>C. polyzona</i>	100% degradace během 200 min	216
	IRG, BPA, NP	<i>C. unicolor</i>	80% degradace BPA, 60 % degradace IRG a 40% degradace NP (30 min)	216
Reverzní micely	BPA, NP	<i>Coriolus versicolor</i>	100% degradace v nevodném prostředí (1h)	191
<b>Mangan-dependentní peroxidáza</b>	IRG	<i>P. chrysosporium</i>	94% degradace během 30 min	212
	E2, EE2	<i>P. chrysosporium</i>	80% úbytek estrogenní aktivity během 1h	190
	BPA	<i>P. ostreatus</i>	Detekce 4 fenolických metabolitů	199
	NP, BPA	<i>P. chrysosporium</i>	100% degradace během 1h	208
<b>Lignin peroxidáza</b>	E2	<i>P. chrysosporium</i>	Sled degračních experimentů; tvorba dimerů a trimerů	217
Reverzní micely	BPA, NP	<i>P. chrysosporium</i>	Degradace v prostředí org. rozpouštědla; 92% degradace po 1h, s přidavkem HBA 100% degradace	218
<b>Versatilní peroxidáza</b>	E1, E2, EE2	<i>B. adusta</i>	100% degradace jednotlivých ED během 10 min	122
Imobilizace	BPA, NP, IRG, EE2, E1	<i>B. adusta</i>	IRG 25% degradace, ostatní 55% degradace (10 min)	219

#### 2.3.4.3 Degradace in vitro – P450

Původně byla schopnosti kmenu *P. chrysosporium* degradovat organopolutanty spojována s extracelulárními enzymy (LiP, MnP), následně byla degradace objevena i u kmenů neprodukcujících ligninolytické enzymy, což vedlo k domněnce, že do metabolismu jsou zapojené i jiné enzymové systémy. Schopnost degradovat některé organopolutanty pomocí P450 byla později prokázána u několika druhů hub (souhrnné články cit.<sup>140</sup> a cit.<sup>222</sup>). Kvůli obtížné izolaci

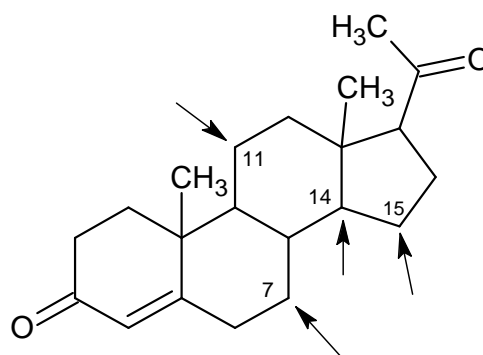
houbového P450, který je ve většině případů exprimován v nízkých koncentracích a má také nízkou stabilitu, jsou důkazy katalýzy degradačních pokusů často ověřovány nepřímými metodami, např. přidávkem inhibitorů mezi které patří CO (cit.<sup>140</sup>) či piperonylbutoxid (PB)<sup>223</sup>. Nebo naopak je participace CYP ověřená přidávkem kofaktoru NAD(P)H<sup>+</sup>, popř. detekcí exprese P450 kódujících genů indukovaných přítomností polutantů<sup>224</sup>.

Degradace intracelulárními mechanismy při zapojení P450 je nejvíce prostudovaná degradace PAH<sup>225,226</sup>, několika přirozených steroidních hormonů<sup>140,227</sup> a některých léčiv<sup>228</sup>. Kasai a kol.<sup>229</sup> ověřili participaci P450 kmene *P. chrysosporium* při degradaci chlorovaných dioxinů pomocí molekulárně-genetických metod. 120 genů P450 bylo vloženo do kvasinek, ze kterých bylo 40 klonů využito pro degradační pokus s chlorovanými dioxiny. 6 klonů prokázalo vysoký degradační účinek vůči 2-chloro-dibenzo-*p*-dioxinu.

Někteří zástupci PAH, jako je třeba benzo(a)pyren, jsou podezřelé karcinogeny<sup>230</sup> a prokázané antiestrogeny<sup>231</sup>. Bezalel a kol.<sup>225</sup> provedl degradační experiment s kmenem *P. ostreatus* a jeho extracelulární tekutinou. Zatímco během *in vivo* pokusů došlo k poklesu koncentrace většiny PAH, při inkubaci pouze s extracelulární tekutinou nebyl zaznamenán žádný pokles. Autor navrhl mechanismus počátečního ataku skeletu PAH cytochromem P450 a následnému rozkladu prostřednictvím extracelulárních enzymů. Bezalel a kol. identifikovali při degradaci pyrenu hydroxylované metabolity, které by mohly vzniknout zapojením P450 do degradace<sup>225</sup>. Participaci P450 při degradaci benzo(a)pyrenu potvrdil také Masaphy a kol. u kmenu *P. pulmonaris*<sup>226</sup>.

Řada prací dokazuje, že houbový cytochrom P450 se účastní biotransformace exogenních steroidů, ačkoliv u ligninolytických kmenů nebyl tento proces doposud pozorován. Endogenně se P450 zapojuje do biotransformace ergosterolu buněčné stěny.

Hydroxylace progesteronu v pozici 11 $\alpha$ - a 11 $\beta$ - byla prokázána např. u druhů *Cunninghamella elegans*<sup>227</sup> a *Paecilomyces lilacinus*<sup>232</sup>, 11 $\alpha$ - a 15 $\beta$ -hydroxylace u *Aspergillus fumigatus*<sup>233</sup> a dalších (obrázek 9). Demethylace lanosterolu v 14 $\alpha$ - pozici byla prokázána u kvasinek u řady kmenů *Candida* sp.<sup>140</sup>.



Obrázek 9 Hydroxylace progesteronu houbovým P450. Převzato od van den Brink a kol.<sup>140</sup>.

Zapojení P450 jako prvotního činidla při rozkladu organopolutantů bylo prokázáno také u jednoho z kongenerů PCB (cit.<sup>234</sup>). Participace P450 byla ověřena na základě kultivace *Phanerochaete* sp. s/bez inhibitoru piperonylbutoxidu a na základě identifikace hydroxylovaných a

methoxylovaných meziproduktů při degradaci. Jako koncové metabolity byly stanoveny 4-chlorobenzoová kyselina, 4-chlorbenzaldehyd a 4-chlorbenzylalkohol.

P450 hrají u hub podstatnou roli v primárním i sekundárním metabolismu, ale také představují nástroj pro detoxifikaci xenobiotik. Z publikovaných prací vyplývá, že P450 se často při degradaci účastní prvotního ataku organopolutantu.

### 2.3.5 Degradace na pevných substrátech

Imobilizace mikrobiálních buněk obecně umožňuje snazší manipulaci s organismy, zabezpečuje buňkám vhodné prostředí a umožňuje jejich opětovné použití. Pro využití reaktorů je nutné nalézt vhodný nosič pro houbovou kulturu, který musí splňovat několik faktorů. Mezi nejdůležitější parametry v závislosti na použití patří toxicita nosiče, jeho cena, tvar, adhezivní vlastnosti povrchu a také jeho degradabilita.

Bylo prokázáno, že kmeny produkují na různých nosičích i substrátech různé množství ligninolytických enzymů a že biosubstráty mohou také sloužit jako nosiče houbových kultur s výhodou absence nutnosti sekundárního dodávání živin. Přírodním substrátem hub bílé hniloby je ligninocelulózní materiál – např. dřevo, dřevěné piliny, sláma atd. Ovlivnění produkce enzymů při kultivaci na třech typech biosubstrátů (slámové pelety a slámové pelety smíchané s hoblinami dubu a topolu) srovnávala ve své diplomové práci Slavíková-Amemori<sup>195</sup>. Kmen *Pleurotus*, který představuje třetí nejčastější druh kultivovatelných jedlých hub, zahrnuje kmeny s vysokým medicínou potenciálem. Za účelem jeho pěstování bylo proto testováno velké množství přírodních substrátů a zemědělských odpadů, mezi které patří např. dřevěné hobliny, stvolý kukuřice, rýžová sláma, stonky bavlníku, slupky ovoce atd.<sup>235</sup>. V literatuře ale existuje pouze málo prací zaměřených na degradaci organopolutantů při kultivaci hub na pevných substrátech.

Bioreaktory zajišťují stabilní podmínky pro degradaci organopolutantů a také umožňují snadnou regulaci podmínek. Pro imobilizaci kultur *P. chrysosporium* při degradaci azo-barviva v přikapávaném reaktoru se sypaným ložem (trickle-bed) byla využita polyuretanová pěna, několik komerčních nosičů pro biomasu, vinylchlorid, keramické kuličky, dřevěné piliny<sup>236</sup> a minerální skelná pěna<sup>237</sup>. Nylon byl kvůli jeho degradaci v přítomnosti VP vyhodnocen jako nevhodný nosič<sup>238</sup>. Nejvyšších hodnot VP bylo dosaženo při kultivaci na speciálně připravených komerčních nosičích pro biomasu, které jsou ale nevhodné z hlediska výše pořizovací ceny. Nejnižších výtěžků bylo dosaženo při pěstování *P. chrysosporium* na pilinách z borovice<sup>236</sup>, což může být dáno nevhodně zvoleným dřevním substrátem. Obdobně srovnával vhodnou imobilizaci Pcedic a kol. pro imobilizaci kultury *I. lacteus* na lufě, pěně z polyéteru a kuchyňské drátěnky pro degradaci barviva v přikapávaném reaktoru. Nejrychlejší degradace bylo dosaženo v reaktoru s kuchyňskou

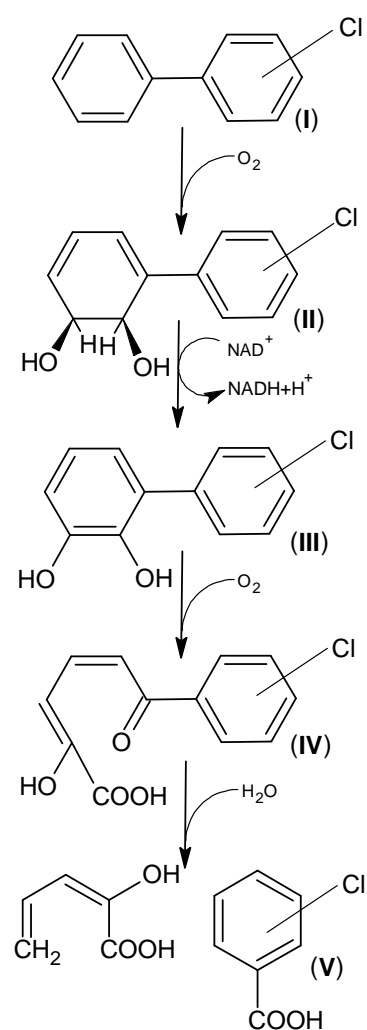
drátěnkou jako nosičem kultury<sup>239</sup>. Dle hladin produkce MnP z *P. chrysosporium* zvolil Linag a kol. polystyrenovou pěnu jako nejvhodnější substrát, vzhledem k jejímu velkému povrchu i dostatečné velikosti kavit pro prorůstání houbou a transport živin a kyslíku. Dalšími srovnávacími nosiči byly nylonové, kovové a vlákenné sítě<sup>240</sup>. Dubové kostky jako nosič pro *T. versicolor* a *Lentinus edodes* jako součást reaktorů se sypaným ložem pro použití v odpadních vodách z papírenské produkce navrhl Ortega-Clemente<sup>241</sup>.

Vzhledem k odlišným kultivačním, imobilizačním i degradačním technikám je velmi obtížné srovnávat výsledky, přesto se použití bioreaktorů při odstraňování endokrinních disruptorů jeví jako perspektivní technika.

### 2.3.6 Degradace PBC a CBA

V minulosti byly PCB považovány za zcela rezistentní vůči bakteriálnímu rozkladu. Později byly objeveny a izolovány bakteriální i houbové kmeny schopné degradovat některé kongenery PCB (cit.<sup>242</sup>). Mechanismus degradace je odlišný za aerobních a anaerobních podmínek.

Anaerobní reduktivní dechlorinace byla poprvé popsána Brownem a kol. (1987)<sup>243</sup> u bakterií v říčním sedimentu. Obecně za anaerobních podmínek dochází k atakům více substituovaných kongenerů v polohách *meta*- a *para*-. To vede ke snížení toxicity a kumulaci *ortho*-substituovaných PCB. Aerobní bakterie přímo atakují bifenylový skelet méně substituovaných PCB. Nejčastěji jsou PCB v přírodě odbourávány aerobními bakteriemi kometabolismem prostřednictvím tzv. horní bifenylové metabolické dráhy, kdy dochází ke štěpení jednoho z kruhů v pozici *meta*- (cit.<sup>244</sup>). Tato degradace je 4 stupňová (řízená *bph* operonem) a je znázorněná na obrázku 10. Reakci zahajuje enzym bifenyl-2,3-dioxygenáza, která přeměňuje bifenyl (I) na *cis* 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybifenyl (II), který je dehydrogenován bifenylhydrogendiol-dehydrogenázou na 2,3-dihydroxybifenyl (III). Následuje *meta* štěpení jednoho z kruhů v pozici 1,2 enzymem 2,3-dihydroxybifenloxigenázou za vzniku kyseliny 2-hydroxy-6-oxo-6-fenyl-hexan-2,4-dienové (IV), která je následně rozštěpena za vzniku příslušné chlorbenzoové (V) a hydroxypentadienové kyseliny.

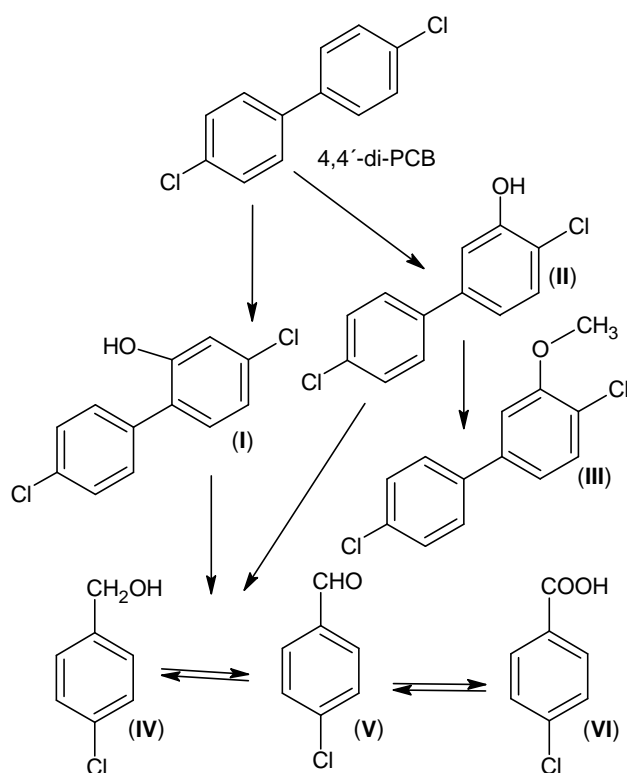


Obrázek 10 Metabolická dráha bakteriálního odbourávání PCB.

Tato cesta ale vede k akumulaci CBA, které jsou pro PCB-degradující bakterie toxické a zpětně tak inhibují celý proces<sup>82,245</sup>. Mezi bakteriální kmeny schopné degradovat širší spektrum kongenerů PCB kmeny *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* a *Corynebacterium*<sup>246</sup>. Degradabilita jednotlivých kongenerů závisí především na specifitě klíčového degradačního enzymu – bifenyloxigenázy. Furukawa a kol. ve své práci definoval několik obecných pravidel<sup>244</sup>:

- Se zvyšujícím se počtem Cl v molekule klesá degradabilita
- Cl v poloze *ortho* snižují degradabilitu
- Substituce Cl pouze na jednom z kruhů usnadňuje degradaci
- K iniciačnímu kroku dochází na méně substituovaném kruhu
- Tetra- a pentachlorbifenyly jsou snadněji degradovatelné, pokud je jeden kruh substituován v polohách 2 a 3

PCB nemohou pro bakterie sloužit jako zdroj energie, ale jedná se o kometabolický proces při transformaci bifenyly. Bifenyl musí být přítomen nejen jako růstový substrát, ale zároveň jako induktor potřebných enzymů. Při remediačních studiích *in situ* tak nutnost přítomnosti bifenyly představuje jeden z klíčových problémů.



Obrázek 11 Rozkladná cesta PCB houby *P. chrysosporium* vedoucí ke vzniku CBA<sup>150</sup>.

*P. chrysosporium* byl první ligninolytický kmen u kterého byl prokázán degradační potenciál vůči PCB kongenerům<sup>193</sup>. Následně bylo prokázáno, že ligninolytické houby mají schopnost degradovat jednotlivé kongenery PCB (cit.<sup>247</sup>) i jejich směsi (např. Delor, Aroclor atd.)<sup>248,249</sup>. Obecně schopnost degradovat PCB klesá se stoupajícím počtem atomů chlóru v molekule a důležitou roli hraje také pozice chlórů. Kamei a kol. prokázali, že PCB s atomem chlóru v *ortho*- pozici je výrazně lépe mineralizován kmenem *P. brevispora* než PCB s atomem chlóru v pozici *meta*- (cit.<sup>250</sup>). Stejně i *P. ostreatus* při degradaci komerční směsi Delor 103 prokázal největší degradační účinnost u PCB s atomy chlóru v *ortho*-

poloze a nejnižší u PCB s atomy chlóru v *para*- poloze<sup>248</sup>. Schopnost degradovat méně substituované kongenery PCB byla také prokázána u vláknité houby *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus*<sup>242</sup>.

V pracích zaměřených na analýzu metabolitů bylo prokázáno, že hexa-, penta- a tetrachloro-PCB jsou ligninolytickými houbami nejčastěji methoxylované a částečně dechlorované<sup>250</sup>. Štěpné produkty byly detekovány pouze u degradace dichloro-PCB. Kamei a kol.<sup>234</sup> popsali transformaci 4,4'-dichloro-PCB (viz obrázek 11) kmenem *P. chrysosporium* na 2-hydroxy- a 3-hydroxy PCB (**I**, **II**). 3-hydroxy-PCB byl dále metabolizován na 4-chlorbenzoovou kyselinu (**VI**), 4-chlorbenzaldehyd (**V**) a 4-chlorbenzylalkohol (**IV**), zatímco 2-hydroxy-PCB byl dále methoxylován (**III**).

Na rozdíl od PCB, hydroxylované metabolity PCB lze degradovat pomocí izolované lakázy<sup>251,252</sup>. Pravidlo degradability a počtu chlórů v molekule je stejné jako při použití celých houbových kultur<sup>252</sup>.

Jedinou rozsáhlejší prací zabývající se degradačním potenciálem ligninolytických hub vůči zástupcům CBA, je práce autorky (publikace 6). Ning a kol. popsali silnou indukci aktivity P450 *P. chrysosporium* v přítomnosti benzoové kyseliny a mono-CBA (cit.<sup>253</sup>). Bakteriální rozklad CBA je lépe prozkoumaný a je popsáno několik degradačních cest CBA. Nejhojněji se vyskytuje rozklad enzymem benzoát 1,2-dioxygenázou na chlorodihydrodihydroxybenzoáty a následně enzymem benzoát dihydrodioldehydrogenáza na příslušné chlorokatecholy<sup>254</sup>.

Některé bakterie rodu *Pseudomonas*, *Burkholderia* a *Alcaligenes* jsou schopny využít mono-CBA jako jediný zdroj uhlíku a energie<sup>255</sup>. Schopnost degradovat 2-CBA a 3-CBA byla prokázána také u bakterie *Pseudoxanthomonas* sp. *PNK-04*.





### 3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce byla zaměřená na testování degradačního potenciálu ligninolytických kmenů hub s vysokým biotechnologickým potenciálem vůči endokrinně disruptivním látkám pro využití v bioremediačních procesech odstraňování organických polutantů.

Dílčí cíle byly následující:

- 1) **Shrnutí současného stavu problematiky výskytu a degradace endokrinních disruptorů (publikace 1 a 2).**
- 2) **Degradační screening ligninolytických hub vůči látkám z řad ED (publikace 3).**
- 3) **Popis degradačních mechanismů 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu u 8 kmenů ligninolytických hub (nepublikováno).**
- 4) **Objasnění degradačního metabolismu 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu u *P. ostreatus* pomocí frakcionace houbových kultur a identifikace metabolitů (publikace 4).**
- 5) **Degradace ED lakázou *P. ostreatus* izolovanou z kultur rostoucích v/bez přítomnosti induktorů a EE2 (nepublikováno).**
- 6) **Optimalizace faktorů, ovlivňujících bioremediační procesy v prostředí odpadních vod obsahujících ED, které využívají houbové kultury pěstované na pevných substrátech (nepublikováno).**
- 7) **Degradace perzistentních polychlorovaných bifenylnů (PCB) a jejich bakteriálních metabolitů chlorbenzoových kyselin (CBA) v tekutých médiích (publikace 5) a půdě (publikace 6).**
- 8) **Vytvoření vhodných metod stanovení směsí PCB a CBA pomocí pokročilých extrakčních technik a analytických metod vysoceúčinné a ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s UV detekcí (publikace 7 a 8).**



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část shrnuje použité metody a techniky pro nepublikované výsledky. Metodiky publikovaných výsledků jsou součástí publikací 1-8 v příloze A.

### 4.1 Mikroorganismy a materiál

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.4, 5.5 a 5.7.

Ze sbírky basidiomycet Akademie věd (CCBAS) byly získány následující mikroorganismy: *Bjerkandera adusta* 606/93, *Dichomitus squalens* CCBAS 750, *Irpex lacteus* CCBAS 931, *Lentinus tigrinus* 577.79, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595 a *Trametes versicolor* CCBAS 612. Kultury byly uchovávány na miskách s malt extrakt médiem s agarem při 4 °C.

Biosubstrát pro pěstování kultur byl pořízen od firmy Atea (slámové piliny, Ø 0,8 mm, 100% pšeničná sláma; Praha, ČR). Malt extrakt broth pro přípravu komplexních tekutých médií (MEG) byl zakoupen od firmy Oxoid (Merck, Praha, ČR).

Rozpouštědla pro kapalinovou chromatografii a extrakce byly pořízeny v kvalitě pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí (LC/MS) nebo pestapur kvalitě od firmy Chromservis (Praha, ČR). Derivatizační činidlo N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid s chlorotrimethylsilanem (BSTFA:TMCS; 99:1) a standardy ED byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo). Odpadní vody byly dodány firmou Dekonta a.s. (ČR) a před použitím byly skladovány při 4 °C v tmavých lahvích. Ostatní chemikálie a přístroje jsou popsány v jednotlivých publikacích v metodické části.

### 4.1 Analytické metody

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.4, 5.5 a 5.7. Stanovení enzymatických aktivit a reziduální estrogenní aktivity jsou popsány v publikaci 3.

Pro analýzu EE2 byl použit kapalinový chromatograf Alliance Waters 2695 Separation module (Waters, Milford, USA) s detektorem diodového pole (Waters 2996) a kolonou XBridge C18 (250 mm x 4 mm, 3.5 µm; Waters). Průtok mobilní fáze složené z 60% acetonitrilu (ACN) byl 0,8 ml/min, teplota kolony 35 °C a dávkovaný objem vzorků připravených v ACN 20 µl. Kalibrační křivka byla sestavena z 6 hodnot v rozmezí 0,5-50 µg/ml EE2 (3 opakování měření) a její regresní koeficient byl 0,9998. Kvantifikační limit metody (LOQ) byl 0,5 µg/ml EE2.

Analýzy směsi ED byly prováděny na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí (GC/MS) Varian 450-GC (Palo Alto, CA, USA) s automatickým injektorem (Combi-Pal injector; CTC Analytics, Švýcarsko) a iontovou pastí jako hmotnostním detektorem (Varian 240 Mass Selective Detector). Pro ionizaci látek byla použita elektronová ionizace (70 eV). Látky byly separovány na koloně 30m DB-5MS (30 m×0,25 mm I.D., 0,25 mm; Agilent, Santa Clara, CA, USA). Teplotní gradient pece byl nastaven následovně: 60 °C po dobu 1min, zahřátí na 120 °C rychlostí 25 °C/min, následně na 240 °C rychlostí 2,5°C/min a 28 min udržení teploty na 240 °C. Teplota zdroje byla 230 °C a iontové pasti 150 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium (1 ml/min). Dávkovaný objem vzorků rozpuštěných v ethylacetátu (EtOAc) byl 1 µl. Kalibrační křivky byly sestaveny pomocí 6 hodnot ED v rozmezí 20-1000 ng/ml (3 opakování) a regresní koeficienty se pohybovaly od 0,9980-0,9994. LOQ byl pro jednotlivé ED 20 ng/ml.

Aktivity enzymů byly měřeny dle publikovaných spektrofotometrických metod (viz publikace 3 a 4) na přístroji NanoQuant (Tecan, Švýcarsko). Enzymová aktivita je vyjádřena jednotkami U (enzymatic unit). Jedna jednotka představuje množství enzymů, které za 1 min přemění 1 µmol substrátu za podmínek metody při laboratorní teplotě.

Estrogenní aktivity (EA) byly měřeny pomocí testu s rekombinantní kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* s vloženým genem pro lidský estrogenní receptor dle metodiky popsané v publikaci 3. Estrogenní aktivita je vyjádřena jako procento vůči referenční látce – E2 ve formě estradiol ekvivalentů (EEQ).

#### **4.2 Příprava substrátů a kultivace mikroorganismů**

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.4, 5.5 a 5.7.

Houby byly kultivovány na tekutém malt extrakt mediu (MEG; 0,5% malt extrakt, 1% glukóza). K inokulaci 20 ml živného média byly použity 3 bločky (Ø 10 mm) se 7 dní starou kulturou. Kultury byly kultivovány staticky po dobu 8 a 9 dní ve tmě při 28 °C.

Pro kultivaci hub na komerčních slámových peletách prodávaných pro topné účely bylo k 10 g slámových pilin ve 250 ml Erlenmayerově baňce přidáno 33 ml deionizované Millipore vody (MQ) (75% vlhkost substrátu). Vlhké substráty byly sterilizovány (120 °C, 25 min) a uchovávány v pokojové teplotě po dobu 24h. Následně byly substráty sterilizovány za stejných podmínek a po vychladnutí na pokojovou teplotu byly za sterilních podmínek inokulovány 3 bločky (Ø 10 mm) z agarové misky se 7 dní starou kulturou. Kultivace probíhala 7 dní ve tmě při 28 °C.

### **4.3 Příprava a frakcionace houbových kultur pro degradace *in vitro***

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.4. Degradální experiment a jeho vyhodnocení je popsáno v publikaci 4.

Houbové kultury *B. adusta*, *D. squalens*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium*, *P. cinnabarinus*, *P. magnoliae* a *T. versicolor* byly ihned po zaočkování na tekutá MEG média kontaminovány 1 ml roztoku EE2 v 50% dimethylsulfoxidu (DMSO; 10 µg/ml) a ponechány po dobu 9 dní při 28 °C. Následně byla provedena frakcionace houbových kultur a degradální experiment dle publikace 4.

Po 24 hodinové inkubaci při 28 °C byly ke vzorkům přidány 2 ml EtOAc a vzorky byly extrahovány a analyzovány dle postupu popsaného v publikaci 4.

### **4.4 Příprava a izolace lakázy kultur *P. ostreatus*, kultivovaných za různých podmínek**

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.5. Degradální experiment a jeho vyhodnocení je popsáno v publikaci 4.

Houbové kultury *P. ostreatus* byly kultivované na tekutém mediu s/bez přítomnosti induktoru Cu<sup>2+</sup> (150 µM CuSO<sub>4</sub>) nebo EE2 (10 µg/l). Sterilní roztok induktoru v MQ vodě byl ke kulturám přidán 5. den kultivace, EE2 byl přidán ihned po zaočkování. Lakázy byly izolovány dle postupu uvedeného v publikaci 4. Doba kultivace hub byla 8 dní.

Degradální pokus, extrakce i analýzy reziduální koncentrace a estrogenní aktivity EE2 byly shodné s degradálním pokusem s neindukovanou lakázou popsaným v publikaci 4.

### **4.5 *In vivo* degradace ED při kultivaci hub na slámovém substrátu**

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.6.

Ke kulturám *I. lacteus*, *P. ostreatus*, *P. tigrinus* a *T. versicolor* bylo v 7. dnu kultivace přidáno 40 ml odpadní vody (OV), uměle kontaminované odpadní vody (OV ED), kohoutkové vody (KV; dechlorované stáním 2h při RT) nebo uměle kontaminované kohoutkové vody (KV ED). Biotické kontroly (BK) byly připraveny použitím sterilní kohoutkové vody, teplem inaktivované kultury (HKC) byly připraveny ze 7 dní starých kultur sterilizací (30 min, 120 °C). Abiotické kontroly (AC) byly připraveny pouze se sterilním slámovým substrátem bez přítomnosti houbových kultur.

K degradálním kulturám s odpadní a kohoutkovou vodou (OV ED a KV ED) a kontrolám HKC a AC bylo dále přidáno 100 µg následujících látek: E1, E2, E3, EE2, BPA, NP, IRG (0,5 ml roztoku 70% DMSO o koncentraci 200 µg/ml). Kultury byly ponechány po dobu 8 dní ve tmě při

28 °C a následně byly extrahovány. K biotickým kulturám bylo přidáno 0,5 ml roztoku 70% DMSO ve vodě. Kultury *T. versicolor* byly pěstovány za statických i třepaných podmínek (150 rpm).

Hladiny enzymových aktivit LiP, MnP, MiP a lakázy byly ve dnech 1, 3 a 5 stanoveny na základě publikovaných spektrofotometrických metod uvedených v publikacích 3,4. Estrogenní aktivity byly stanoveny na základě testu s rekombinantní kvasinkou (metodika publikací 3,4).

ED byly extrahovány kapalina/kapalina (l/l) extrakcí do EtOAc následujícím způsobem: ke kulturám bylo přidáno 40 ml EtOAc, kultury byly promíseny a ponechány 20 min v ultrazvukové lázni. Následně byla tekutina převedena do zásobní skleněné lahve, substrát vyždímán pomocí nerezového lisu, promyt EtOAc a opět vymačkán. Tekutiny byly sjednoceny a po přidavku 20 ml EtOAc extrahovány 20 min třepáním a 20 min v ultrazvukové lázni. Následně byla EtOAc vrstva odebrána a přidáno 20 ml čistého EtOAc. Cyklus se opakoval 5x. Pevné substráty byly extrahovány analogicky 5 cykly vždy s přidavkem 20 ml EtOAc. Sebrané EtOAc extrakty byly odpařeny na rotační vakuové odparce (45 °C, 750 hPa) na cca 2 ml, zbaveny stopového množství H<sub>2</sub>O pomocí Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a naředěny na 10 ml. 200 µl vzorku bylo derivatizováno pomocí BSTFA (30 min, 70 °C) a analyzováno na GC/MS. Výtěžnost extrakční metody byla 82-98 %.

#### **4.6 Statistické vyhodnocení**

Experimentální postupy popsané v této sekci se vztahují k výsledkům ze sekce 5.4, 5.5 a 5.7.

Stanovené enzymové aktivity a degradační účinnost (vyjádřená v procentech degradace vztažených k abiotickým kontrolám) byly vyhodnoceny použitím t-testu ( $p < 0,05$ ). Při kultivaci hub na pevných substrátech byla enzymová aktivita vztažena k 1 g substrátu, při kultivaci na tekutých médiích na 1 ml média. Korelace mezi aktivitami jednotlivých enzymů, degradací EE2 a inhibice estrogenní aktivity byla testována pomocí analýzy hlavních komponent (PCA) v programu Minitab 16.2.2.30.

## 5 DISKUZE A VÝSLEDKY

Tato kapitola sumarizuje dosažené výsledky publikované ve vědeckých časopisech (podkapitola 5.3; 5.6; 5.8; 5.9; 5.10 a 5.11) a krátká shrnutí z přehledových článků (podkapitola 5.1 a 5.2). Dále tato kapitola uvádí výsledky dosud nepublikovaných prací (podkapitola 5.4; 5.5 a 5.7).

### 5.1 Mikrobiální degradace endokrinně disruptivních látek - review (publikace 1)

Souhrnný článek z roku 2009 je zaměřený na shrnutí problematiky výskytu a degradace zástupců endokrinních disruptorů (EDs) v posledních třech dekadách se zvláštním ohledem na degradační účinnost zástupců hub bílé hniloby. Endokrinně disruptivní látky, mezi které patří např. bisfenol A, nonylfenol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol a další sloučeniny, jsou nalézány v životním prostředí na celém světě. Mikroorganismy a jejich enzymy představují perspektivní nástroj pro jejich odstranění.

### 5.2 Mikrobiální transformace syntetického estrogenu 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu - review (publikace 2)

Souhrnný článek je zaměřen na mikrobiální transformaci syntetického 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu a přirozených estrogenů. V článku jsou popsány jednotlivé procesy bakteriálního rozkladu EE2 a ostatních estrogenů za aerobních a anaerobních podmínek a dále vliv přítomnosti dusičnanů, sulfátů a iontů železa na degradaci. Rozebírán je také kometabolismus estrogenů autotrofními bakteriemi oxidujícími amoniak a heterotrofními bakteriemi. Část práce je věnována sorpčním mechanismům v životním prostředí a degradaci ligninolytickými houbami a jejich extracelulárním enzymatickým aparátem.

### 5.3 Degradace ED a odstranění jejich estrogenní aktivity pomocí ligninolytických hub (publikace 3)

Práce byla zaměřená na *in vivo* screening ligninolytických kmenů schopných účinně degradovat zástupce ED – bisfenol A, nonylfenol, 4-nonylfenol, irgasan a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. V rámci práce bylo otestováno 8 kmenů, z nichž nejlépe testované látky degradoval *P. ostreatus* a *I. lacteus* (80% degradace v průběhu 3 dnů kultivace). Nejslabší degradační



vlastnosti byly detekovány u kmenu *P. chrysosporium*, u kterého nebyla detekována žádná degradace EE2 a BPA v průběhu 14 dnů kultivace.

V průběhu degradace byl s pokročilou degradací pozorován klesající trend estrogenních aktivit. Pouze u kmenů *P. ostreatus* a *I. lacteus* byla po 14 dnech kultivace detekována vysoká estrogenní aktivita (28 % resp. 38 %). Koncentrace EE2 byla v těchto případech pod limitem detekce (0,5 µg/l). Vysoká reziduální estrogenní aktivita je pravděpodobně daná tvorbou meziproduktů s vlastní aktivitou.

V průběhu degradačních pokusů byly pomocí spektrofotometrických metod měřeny enzymové aktivity hlavních ligninolytických enzymů – lakázy, MnP, MiP a LiP. Mezi produkcí enzymů a rychlostí degradací ED nebyl nalezen jednoznačný trend. Obecně byly enzymové aktivity inhibovány přítomností IRG a NP, pouze u kmenů *T. versicolor*, *I. lacteus* a *P. ostreatus* byl detekován nárůst aktivity lakázy.

#### **5.4 Degradace EE2 enzymovými frakcemi houbových kultur (nepublikováno)**

V rámci tohoto experimentu bylo srovnáno 9 kmenů ligninolytických hub dle jejich degradačního potenciálu vůči EE2 při *in vitro* podmínkách s cílem popsat rozdíly v mechanismech jednotlivých kmenů. Kmeny byly před frakcionací kultivovány v přítomnosti EE2 na komplexním tekutém médiu. V předchozích experimentech bylo prokázáno, že různé kmeny ligninolytických hub degradují EE2 různou měrou (publikace 3). Degradaci EE2 enzymovými frakcemi kmenu *P. ostreatus* kultivovaného bez přítomnosti EE2 je věnována publikace 4.

Při frakcionaci houbových kultur došlo k oddělení volných extracelulárních enzymů (lakáza, peroxidázy) a enzymů vázaných s myceliem (intracelulární enzymy a extracelulární enzymy vázané na mycelium, z nichž nejvýznamnější skupinou jsou enzymy schopné oxidovat ABTS – substrát pro lakázu. Hladiny aktivit enzymů v jednotlivých frakcích byla stanovena na základě příslušných metod a s frakcemi byl proveden *in vitro* degradační experiment. Účinnost degradace, inhibice estrogenní aktivity a aktivita jednotlivých enzymů byly posouzeny z hlediska vzájemné korelace (viz graf 1).

##### **5.4.1 Stanovení enzymů v průběhu kultivace**

V průběhu kultivace hub před frakcionací kultur byl porovnáván vliv přítomnosti EE2 na produkci enzymů v průběhu kultivace. LiP nebyla v průběhu kultivace detekována u žádného kmenu. Výsledné aktivity biotických kontrol (BK) a kultur s přidávkou EE2 jsou uvedeny v příloze B v tabulce 9. U *P. ostreatus* a *T. versicolor* byly detekovány hodnoty lakázy i MnP.

Lakáza byla detekována u *P. cinnabarinus*, *P. tigrinus* a *B. adusta*, zatímco manganázy byly detekované u kmenů *B. adusta* a *I. lacteus*. U kmenů *P. magnoliae* a *P. chrysosporium* nebyla v průběhu kultivace detekována žádná enzymová aktivita (data neprezentována), ačkoliv po zhruba desetinásobném zkoncentrování extracelulární tekutiny *P. chrysosporium* byla detekována slabá MnP aktivita (0,2 mU/l).

V publikaci 3 byla naměřená indukce aktivity MnP a lakázy u *T. versicolor* v přítomnosti EE2. V tomto experimentu však mimo případy indukce MiP u *I. lacteus* ve 2. dnu, MnP ve 4. dnu u *D. squalens* a lakázy *P. tigrinus* ve 4. až 8. dnu nedošlo ke zvýšení aktivity enzymů v přítomnosti EE2. Naopak inhibice lakázové aktivity byla patrná u *T. versicolor* a *P. ostreatus* (viz příloha A, tabulka 9).

#### 5.4.2 Degradace *in vitro*

V předchozím experimentu (viz publikace 3) bylo prokázáno, že z použitých kmenů jsou všechny schopné částečné nebo úplné degradace EE2 s výjimkou *P. chrysosporium*. Nižší degradační potenciál vůči EE2 byl také prokázán u kmenu *P. magnoliae* a *B. adusta*.

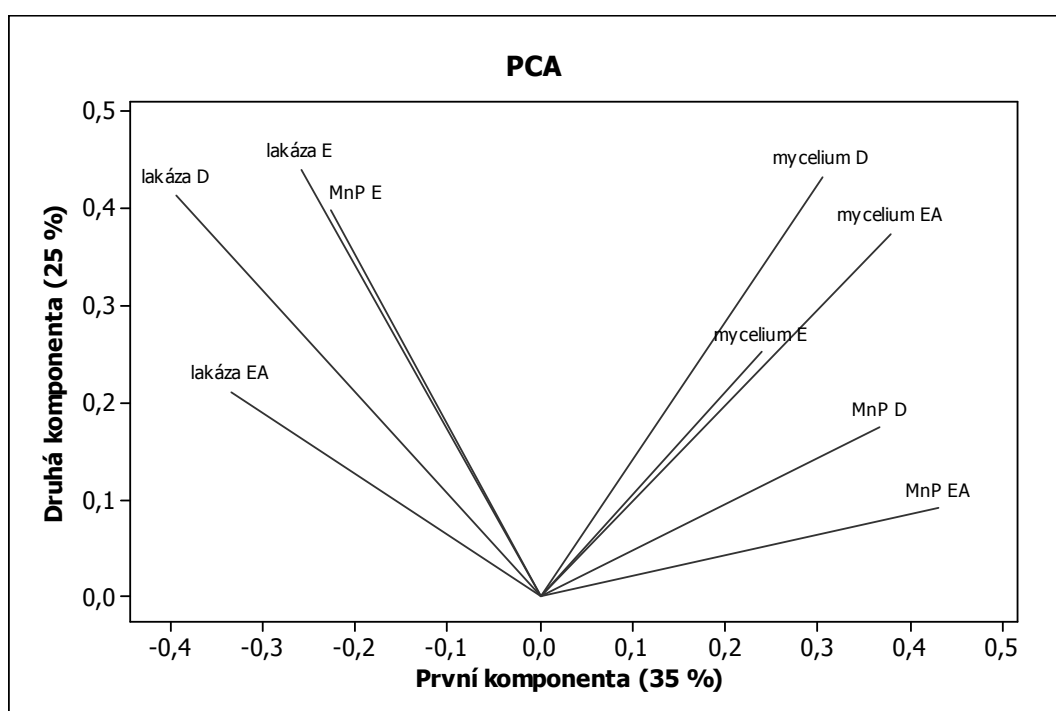
**Tabulka 7** Aktivity enzymů v reakčních směsích, reziduální koncentrace EE2 vyjádřená % ve vztahu ke kontrole a reziduální estrogenní aktivita vztahovaná ke kontrole. Mycelium vázané enzymy (mycelium váz. enz. ) představují aktivitu enzymů oxidujících ABTS.

Kmen	Aktivita (mU/systém)			Reziduální koncentrace EE2 (%)			Reziduální estrogenní aktivita (%)		
	mycelium váz.enz.	lakáza	MnP	mycelium váz.enz.	lakáza	MnP	mycelium váz.enz.	lakáza	MnP
<i>B. adusta</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	19,4±2,3	105,2±9,0	0,0±0,0	136,8±5,0	63,8±11,8	1,0±0,8
<i>D. squalens</i>	0,9±0,0	67,2±4,6	10,2±1,2	11,5±8,3	6,6±1,2	80,0±16,2	84,9±3,2	45,9±4,1	125,2±5,5
<i>I. lacteus</i>	12,2±0,2	0,0±0,0	5,3±0,4	0,0±0,0	98,0±5,0	0,0±0,0	5,9±3,3	122,8±5,0	0,0±0,0
<i>P. cinnabarinus</i>	3,4±0,1	36,1±5,6	0,0±0,0	100,0±12,3	100,0±5,1	98,0±3,1	123,0±13,1	103,8±2,9	116,2±7,7
<i>P. chrysosporium</i>	6,1±0,3	0,0±0,0	0,2±0,0	92,3±9,9	100,0±1,2	101,0±11,3	94,6±2,7	125,0±2,0	97,3±2,9
<i>P. magnoliae</i>	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	48,4±13,7	101,0±2,2	93,8±7,5	101,8±4,4	96,1±3,9	125,3±1,7
<i>P. ostreatus</i>	15,8±0,4	61,3±8,9	0,0±0,0	0,0±0,0	99,4±2,8	96,7±2,8	4,7±5,0	125,0±11,8	97,3±3,2
<i>P. tigrinus</i>	8,7±0,1	24,2±3,6	10,0±2,1	92,6±1,8	15,2±2,6	86,7±7,4	108,1±12,5	72,0±7,8	202,2±2,0
<i>T. versicolor</i>	9,7±0,2	6,4±1,2	8,6±1,5	80,2±4,0	82,0±4,0	54,5±9,9	94,6±2,3	100,1±5,6	95,0±2,3

Kvůli rozdílné expresi enzymů nebylo možné pro *in vitro* degradační směsi u všech kmenů použít stejnou hodnotu aktivity. Extracelulární tekutina byla před použitím do degradačního experimentu zkoncentrována zhruba 10x a rozdělena na dva podíly. Jeden podíl byl testován na degradační schopnost lakázy a druhý podíl byl testován na degradační schopnost lakázy a peroxidáz po přidavku Mn<sup>2+</sup> iontů a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potřebných pro katalytický cyklus

manganáz. Hodnoty aktivit jednotlivých extracelulárních enzymů v inkubačních směsích jsou uvedeny v tabulce 7.

Nejvyšších hodnot aktivity lakázy bylo dosaženo u kmenů *P. ostreatus* a *D. squalens* a (61-67 mU/ml), ačkoliv signifikantní degradace prostřednictvím této frakce (t-test,  $p < 0,05$ ) byla zaznamenána pouze u kmene *D. squalens* a dále u kmene *P. tigrinus*. Analýza reziduální estrogenní aktivity (EA) vzorků ukázala v případě *P. tigrinus* 72% a v případě *D. squalens* 46% aktivitu, což nekoresponduje s úbytkem EE2. Dle PCA analýzy (graf 1) *in vitro* experimentů bylo prokázáno, že pokles estrogenní aktivity při degradaci EE2 lakázovou frakcí nekoreluje s množstvím enzymu ani s degradací. Tento jev může být dán produkcí metabolitů s vlastní estrogenní aktivitou.



Graf 1 PCA analýza degradace EE2 (mycelium D, lakáza D, MnP D), aktivity ligninolytických enzymů (mycelium váz. enzymy E, lakáza E, MnP E) a inhibice estrogenní aktivity (mycelium EA, lakáza EA, MnP EA). První komponenta představuje 35 % celkové variability dat, druhá komponenta představuje 25 % celkové variability dat.

Aktivita MnP byla detekována u kmenů *I. lacteus*, *D. squalens*, *P. tigrinus* a *T. versicolor* a pohybovala se od 5-10 mU/ml. Oproti frakcím s lakázovou aktivitou byla u všech kmenů s detekovanou MnP zaznamenána degradace EE2. Úplná degradace EE2 v průběhu 24 h pokusu byla zaznamenána u kmenů *I. lacteus* a *B. adusta*, ačkoliv u tohoto kmene nebyla hodnota aktivity MnP ani MiP po zkoncentrování extracelulární tekutiny detekována. Pokles EE2 ve frakcích s MnP aktivitou v průběhu inkubace byl zaznamenán také u *D. squalens*, *P. tigrinus* a *T. versicolor*. Dle PCA analýzy (graf 1) spolu úzce koreluje pokles estrogenní aktivity

a degradace EE2 ve frakci s detekovanou MnP, avšak hodnota aktivity MnP s těmito dvěma jevy nekoreluje. To by mohlo být dáno přítomností dalších enzymů závislých na  $Mn^{2+}$ ,  $H_2O_2$  popř. obojím, jejichž aktivita ale není stanovovaná v rámci použitých testů.

Aktivita ABTS-oxidujících enzymů navázaných na mycelium byla detekována u všech kmenů s výjimkou *B. adusta* a *P. magnoliae*. Nízká hodnota aktivity byla detekována také u kmenu *D. squalens* (viz tabulka 7). Totální degradace v přítomnosti homogenizovaného mycelia v suspenzi s octan amonným puforem byla detekována u *P. ostreatus* a *I. lacteus*, tedy u kmenů s nejvyšší detekovanou aktivitou (16 a 12 mU). Více než 80% degradace byla také zaznamenána u kmenů *D. squalens* a *B. adusta*, ačkoliv oba kmeny měly velmi nízkou nebo nulovou aktivitu enzymů. *T. versicolor* degradoval EE2 myceliální frakcí z 20 %. Dle PCA analýzy (graf 1) je patrná úzká souvislost mezi degradací EE2 myceliální frakcí a poklesem estrogenní aktivity a zároveň s těmito jevy souvisí i aktivita myceliálních enzymů. Přesto však v žádném případě nedošlo k poklesu reziduální estrogenní aktivity na nulovou hodnotu, což naznačuje možnou tvorbu meziproductů s estrogenní aktivitou. Nejvýrazněji je tento jev patrný u kmenu *B. adusta*, kde došlo k 80% degradaci EE2, ale ve vzorku byla detekována 136% estrogenní aktivita oproti tepelně inaktivované kontrole. Je pravděpodobné, že se na degradaci vedle ABTS-oxidujících enzymů podílí i intracelulární mechanismy.

U kmenů *P. chrysosporium* a *P. cinnabarinus* nebyla zaznamenána degradace v žádné z testovaných směsí. U kmene *P. chrysosporium* jsou získaná data ve shodě s publikací 3, kde za podmínek *in vivo* taktéž *P. chrysosporium* EE2 v průběhu 14 denní kultivace nedegradoval. U kmenu *P. cinnabarinus* však došlo v průběhu 3 dnů *in vivo* kultivace k úplnému odstranění EE2. Rozdíl v dosažené degradaci *in vivo* a *in vitro* by mohl být dán kooperací intracelulárních a extracelulárních degradačních mechanismů.

Obdobně *T. versicolor* prokázal během *in vivo* experimentu vysokou degradační účinnost vůči EE2 a během *in vivo* degradace pouze částečně (65 %) degradoval EE2 pomocí MnP frakce. Slavíková-Amemori<sup>195</sup> ve své diplomové práci přisuzuje degradaci směsi ED v extracelulární tekutině z kultivace *T. versicolor* na slámových peletách hlavně lakáze, kdežto na tekutém médiu byl hlavním degradačním enzymem spíše MnP. Taktéž Suzuki a kol. prokázal dobrou degradační schopnost lakázy izolované z *T. versicolor* vůči E2 a EE2 při *in vitro* podmínkách<sup>215</sup>. Ve stejné studii byla prokázána i degradační schopnost MnP *P. chrysosporium*. Naopak u kmenu *P. tigrinus* Slavíková-Amemori sice poukazuje na degradační vlastnost MnP, kdežto v tomto experimentu byla nejúčinnější frakce s lakázovou aktivitou. Experimenty se velmi liší podmínkami kultivace hub (pevné a tekuté substráty), přítomností EE2 v průběhu kultivace a provedením degradačních experimentů. Tyto faktory mají zřejmě zásadní vliv

na produkci jednotlivých izoform enzymů s různou degradační schopností. Tento fakt byl také ověřen degradačním experimentem s izolovanou lakázou produkovanou za různých podmínek (viz kapitola 5.6).

Výsledné vysoké reziduální estrogenní aktivity v degradačních vzorcích ve srovnání s *in vivo* pokusem (publikace 3) poukazují na vhodnost použití celých mikroorganismů při degradaci EE2.

## **5.5 Degradace ED lakázou *P. ostreatus* (nepublikováno)**

Degradační experimenty s částečně purifikovanou lakázou izolovanou z kultur kmenu *P. ostreatus*, kultivaného za různých podmínek (bez/s přidavkem induktoru CuSO<sub>4</sub>, s přidavkem EE2), byly použity pro objasnění úlohy lakázy *P. ostreatus* v degradačních procesech ED (10 µg/ml; EE2, BPA, IRG a NP). Kvůli nízké hladině aktivity, byla lakáza izolovaná z kultur rostoucích v prostředí EE2 použita pouze pro degradace EE2. K části vzorků byl přidán mediátor hydroxybenzoová kyselina (1 M). Po inkubaci trvající 24 h (28 °C, tma, 100 rpm) byly stanoveny hodnoty reziduální koncentrace ED a estrogenní aktivity.

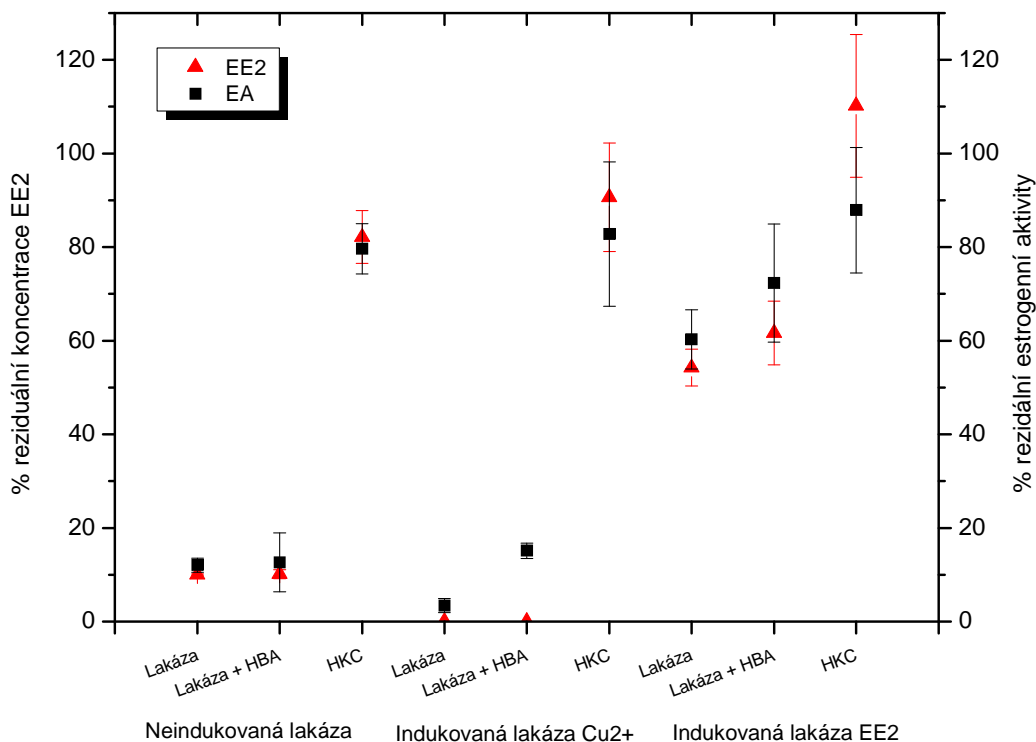
### **5.5.1 Purifikace lakázy**

Lakázové frakce byly úspěšně izolovány z kultivace *P. ostreatus* na MEG médiu, z kultivace houby na MEG médiu s přidavkem induktoru CuSO<sub>4</sub> a také z kultivace na MEG médiu s přidavkem EE2 na počátku růstu houby. Kultivace byly zastaveny ve 12. den a následně byla pomocí iontově-výměnné chromatografie provedena izolace enzymu. Získané aktivity lakázy jednotlivých frakcí byly: 478,3 U/l pro indukovanou kulturu; 169,5 U/l pro neindukovanou kulturu a 51,7 U/l pro kulturu s přidavkem EE2.

### **5.5.2 *In vitro* inkubace EE2 s purifikovanou lakázou**

Lakázové frakce izolované z kultur *P. ostreatus* (mimo frakce izolované z kultur indukovaných EE2) prokázaly více jak 90% účinnost při degradaci EE2 v průběhu 24 h inkubace (viz graf 2). Degradace EE2 ve většině případů vysoce korelovala s úbytkem estrogenní aktivity (korelační koeficient 0,98) a mezi lakázou z kultury bez a s přidavkem induktoru CuSO<sub>4</sub> nebyl detekován signifikantní rozdíl v degradační účinnosti (t-test,  $p < 0,05$ ). Degradační potenciál lakázy *P. ostreatus* byl již dříve popsán např. v experimentu degradace EE2 absorbovaném na písčové matici<sup>206</sup>. Přídavek redoxního mediátoru lakázy (HBA) degradaci neovlivnil (viz graf 2).

Suzuki a kol. posal účinnou degradaci EE2 v přítomnosti mediátoru HBA lakázou izolovanou z kmene *T. versicolor*<sup>215</sup>, kultivovaném na médiu bez přídavku EE2.



**Graf 2** *In vitro* degradace EE2 v přítomnosti částečně purifikované lakázy izolované z kmene *P. ostreatus* kultivovaného za různých podmínek vztažená k abiotické kontrole. HKC - teplem inaktivovaná kontrola; EA - estrogenní aktivita; lakáza + HBA - systém s přídavkem redox mediátoru lakázy.

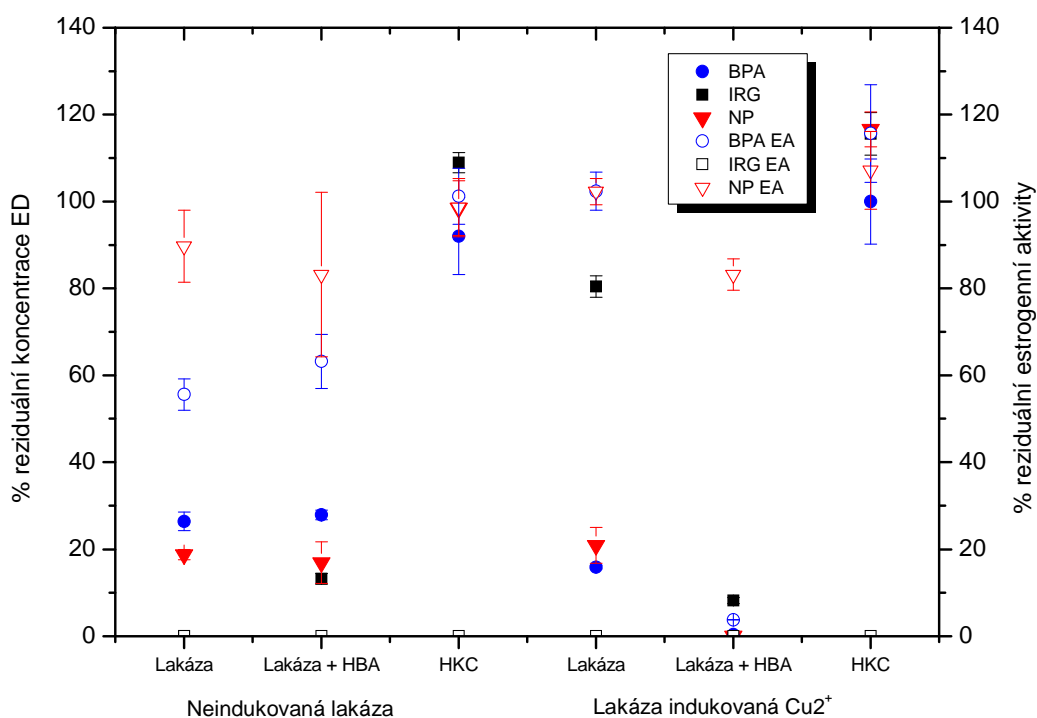
Nejslabší degradační potenciál byl zaznamenán u inkubace EE2 s lakázou, izolovanou z kultur kultivovaných na médiu obsahující EE2 (viz graf 2). Proteiny v lakázových frakcích z různých kultur *P. ostreatus* měly odlišné elektroforetické chování při elektroforéze v SDS-gelu (data neuvedena), takže se pravděpodobně jedná o různé izoformy lakázy.

### 5.5.3 *In vitro* inkubace ED s purifikovanou lakázou

Při degradaci NP a BPA frakcemi z indukovaných i neindukovaných kultur *P. ostreatus* nekorespondoval pokles reziduální koncentrace ED s poklesem estrogenní aktivity, která zůstávala na vysokých hladinách (viz graf 3). Obdobně jako u degradace EE2 (kapitola 5.5.2), nebyl detekován významný rozdíl v degradační účinnosti mezi jednotlivými lakázovými formami. Pozitivní vliv přídavku mediátoru HBA na degradaci BPA a NP byl zaznamenán pouze lakázy indukované přídavkem CuSO<sub>4</sub> (viz graf 3), kde přídavek HBA navíc významně ovlivnil

snížení estrogenní aktivity BPA. U NP zůstala EA na vysoké hladině ve všech testovaných směsích. V případě IRG došlo po přidavku HBA ke snížení degradační účinnosti (graf 3). V literatuře je zpravidla popisován pozitivní vliv přidavku mediátoru HBA na degradaci IRG<sup>209,2011</sup>. Za vysokou reziduální aktivitu by mohla být zodpovědná tvorba biologicky aktivních polymerů či metabolitů.

Cabana a kol. popisuje tvorbu polymerů IRG, BPA a NP v přítomnosti lakázy *C. polyzona* a nízkou korelaci odstranění ED a estrogenní aktivity<sup>209</sup>. Rozdílné typy metabolitů v závislosti přítomnosti mediátorů při degradaci IRG popisuje také Murugesan a kol. (cit.<sup>210</sup>). V případě přidavku mediátorů byl zaznamenán pokles toxicity vzorků a byly detekované štěpné metabolity, zatímco v případě vzorku bez mediátoru byly detekovány toxické dimery IRG.



**Graf 3** *In vitro* degradace jednotlivých ED pomocí lakázových frakcí kultur *P. ostreatus* kultivovaných bez přítomnosti a v přítomnosti induktoru CuSO<sub>4</sub> vztahených k abiotické kontrole. EA - % estrogenní aktivity vůči AC; HKC - teplem inaktivovaná kontrola; lakáza + HBA - systém s přidavkem redox mediátoru lakázy.

Degradace NP a BPA lakázou izolovanou z kmene *P. tremellosa* byla doprovázena poklesem estrogenní aktivity z 60 % u BPA a z 75 % u NP, avšak detekovaná reziduální koncentrace obou ED odpovídala v obou případech 10 % původního množství<sup>214</sup>. NP a BPA byly ze 100 % degradovány lakázou *P. ostreatus* v systému absorpce na pískovou matici v průběhu 3 hodin. Reziduální estrogenní aktivita nebyla v této práci studována<sup>206</sup>. Vliv přítomnosti

mediátoru ABTS na degradaci IRG lakázou *T. versicolor* popsal Kim a kol. (cit.<sup>211</sup>). Ačkoliv přítomností ABTS bylo dosaženo vyšší degradace, toxicita vzorků vzrostla ve srovnání se vzorky bez přídavku mediátoru.

Ze srovnání poklesu estrogenních aktivit v kulturách *in vivo* (viz publikace 3) a *in vitro* (viz kapitola 5.4) je patrné, že degradace izolovanými enzymy nevede vždy k žádoucímu odbourání estrogenní aktivity, což je patrně dáno tvorbou meziproductů s estrogenní aktivitou.

### **5.6 Degradace EE2 kmenem *P. ostreatus*: mechanistická studie (publikace 4)**

Práce byla zaměřená na lokalizaci degradačního aparátu *P. ostreatus* v případě degradace EE2 při *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Pro izolaci enzymatických aparátů byla použita kultura *P. ostreatus* rostoucí na komplexním médiu bez přídavku EE2. Byla provedena sada testů s izolovanou lakázou, zakoncentrovanou extracelulární tekutinou s lakázovou a MnP aktivitou, myceliem a také purifikovanou mikrosomální frakcí. Lakáza degradovala EE2 při *in vitro* inkubaci (24 h) z 90 %. Degradace se zkoncentrovanou extracelulární tekutinou byla zhruba 50%, ale v případě přídavku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a MnSO<sub>4</sub>, důležitých pro katalytický cyklus MnP, stoupla degradace na 100 %. Velmi účinně odstraňovaly EE2 také myceliální frakce, kdy bylo dosaženo 80% degradace při *in vitro* inkubaci s myceliem a 100% degradace v případě homogenizovaného mycelia (zpřístupnění intracelulárních enzymových frakcí). 80% degradace bylo dosaženo také při degradaci mikrosomální frakcí. Degradace EE2 myceliálními frakcemi (i mikrosomální) a redukce estrogenní aktivity byly výrazně negativně ovlivněny přídavkem piperonylbutoxidu – specifického inhibitoru cytochromu P450, což naznačuje zapojení tohoto systému do degradace EE2.

V práci bylo popsáno 6 metabolitů, z nichž žádný nebyl dosud popsán u ligninolytických hub a 3 nebyly dosud vůbec detekovány. Byl taktéž sledován pokles reziduální estrogenní aktivity v průběhu degradace a bylo zjištěno, že v případě degradace EE2 pomocí extracelulárních frakcí je mezi poklesem EE2 a poklesem estrogenní aktivity patrná souvislost.

### **5.7 Degradace ED na slámových peletách v prostředí odpadních vod (nepublikováno)**

Studium degradace ED (BPA, E1, E2, E3, EE2, IRG a NP) na slámových peletách bylo zaměřeno na objasnění schopnosti hub degradovat ED v prostředí reálných odpadních vod a dále na objasnění enzymatických procesů v průběhu kultivace hub a degradace. Experiment slouží jako pilotní model vsádkových bioreaktorů.



### 5.7.1 Prorůstání hub substrátem a fungální toxicita odpadních vod

Před založením degradačního experimentu byly houby ponechány 7 dní při teplotě 28 °C a tmě. Za tuto dobu došlo u všech kmenů k dobré kolonizaci slámových pelet (dle vizuální charakteristiky). Nejrychleji substrát kolonizoval kmen *T. versicolor*. Dobrou kolonizaci slámových pelet za stejných podmínek popisuje ve své diplomové práci i Slavíková-Amemori<sup>195</sup>.

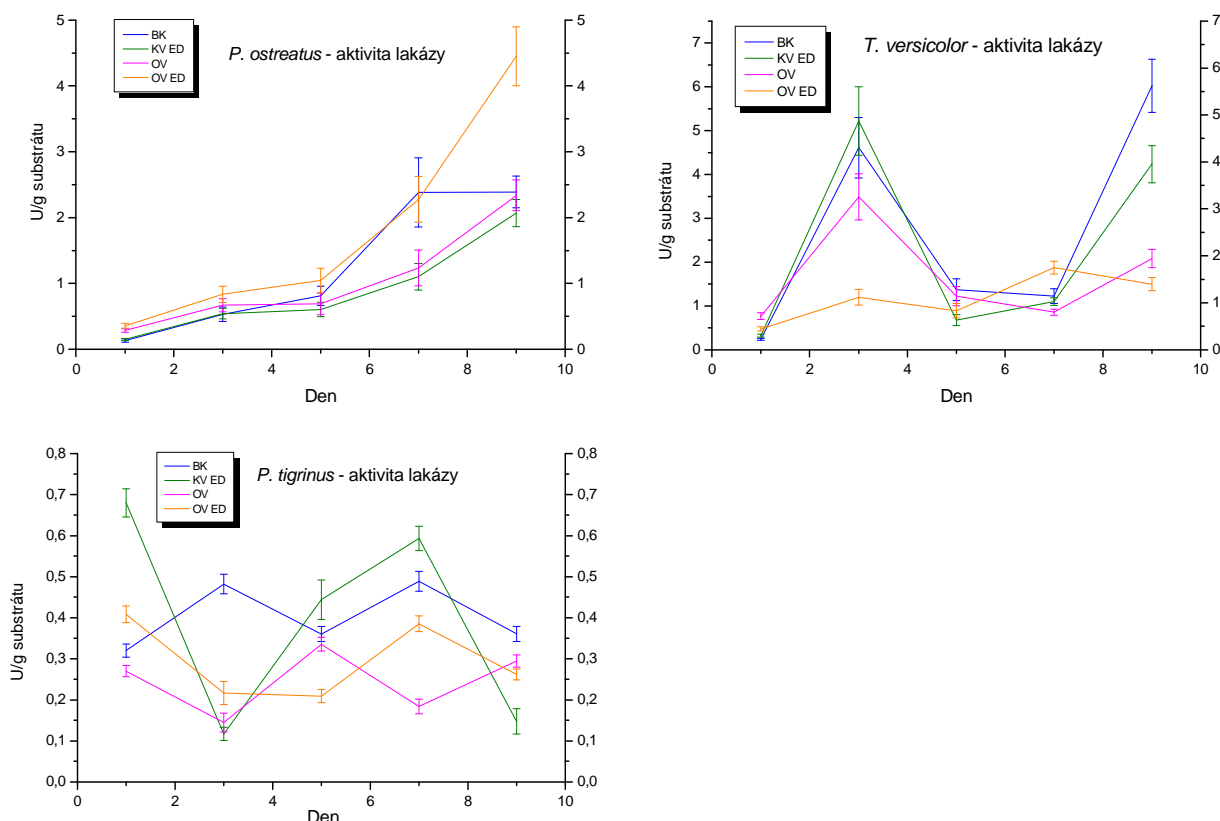
Toxicita odpadní vody vůči kulturám ligninolytických hub byla ověřena pilotním pokusem kultivace kmenů s přidavkem 40 ml odpadní a kohoutové sterilní vody. Vizuálním testem a srovnáním enzymových aktivit (data neuvedena) bylo prokázáno, že v průběhu kultivace nedochází vlivem přítomnosti odpadních vod k výraznému negativnímu ovlivnění růstu houbových kultur.

### 5.7.2 Stanovení enzymů v průběhu degradace

V průběhu degradačního experimentu byly pomocí spektrofotometrických metod stanoveny hladiny ligninolytických enzymů. Aktivita enzymu LiP nebyla stanovena u žádného kmenu v průběhu 9 denní kultivace. Aktivita MiP byla v malém množství (jednotky mU/g substrátu) stanovena od 5. do 9. dne u biologické kontroly kmene *I. lacteus*.

Nejvyšších detekovaných hodnot u všech kmenů mimo *I. lacteus* dosahovala lakáza ( $10^3$ - $10^4$  mU/g substrátu). U kmene *I. lacteus* nebyla lakáza detekovaná a taktéž hodnoty MnP dosahovaly pouze nízkých koncentrací (jednotky mU), což je ve shodě s diplomovou prací Slavíkové-Amemori<sup>195</sup>. Nízké hodnoty lakázy byly detekované i při degradaci EE2 *in vivo* (publikace 2).

U kmene *P. ostreatus* se hodnota aktivity lakázy zvyšovala s postupující kultivací při přidavku všech typů vod s výjimkou biotické kontroly (sterilní pitná voda), kde se hodnoty 7. a 9. dne nelišily (viz graf 4). U 1. a 9. dne kultivace je patrný indukční vliv přítomností vysoké koncentrace ED (celkem 700 µg na baňku) v odpadní vodě na aktivitu lakázy (2,7x a 1,8x vyšší aktivita oproti BK). Tento trend však není patrný u přidavku ED do pitné vody. U *T. versicolor* byl trend enzymových aktivit mezi jednotlivými systémy podobný, ačkoliv v případě odpadní vody s umělou kontaminací ED došlo k inhibici enzymových aktivit zhruba 4x ve srovnání s BK. Nejvyšší hodnoty byly detekovány 3. den od přidavku vod do systému, následně poklesly a začaly znovu stoupat ke konci kultivace. Pouze u OV ED se hodnoty aktivity lakázy 7. a 9. dne signifikantně neliší (t-test,  $p < 0,05$ ).

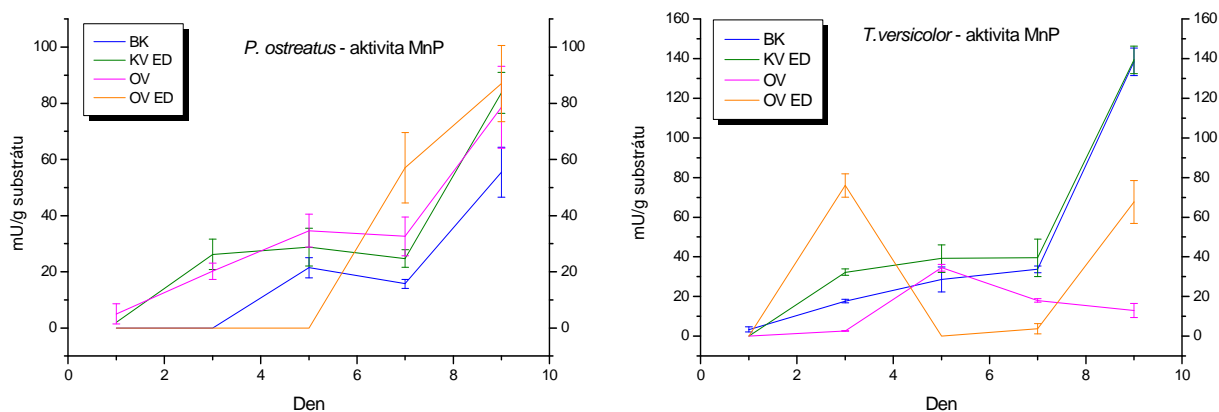


**Graf 4 Aktivita lakázy v průběhu kultivace u jednotlivých kmenů hub. BK – biologická kontrola se sterilní kohoutkovou vodou, KV ED – kohoutková voda s umělou kontaminací ED (700 µg na baňku), OV – odpadní voda, OV ED – odpadní voda s umělou kontaminací ED (700 µg na baňku).**

U kultivace kmenu *P. tigrinus* byla lakázová aktivita na velmi nízké úrovni s v porovnání s *P. ostreatus* a *T. versicolor*. Okolo 3. a 9. dne je patrný pokles enzymové aktivity ve všech systémech mimo BK v 3. dnu.

MnP byla detekována ve významnější míře pouze u *P. ostreatus* a *T. versicolor*, ale detekované aktivity (max. 140 mU/g) nedosahovaly hodnot detekovaných v práci Slavíkové-Amemori (0,1-1,2 U/g)<sup>195</sup>. Nízká aktivita MnP byla detekována u *I. lacteus* 5. a 9. den (1-12 mU/g) a taktéž 1. a 7. den u *P. tigrinus* (0,3-2 mU/g).

Mimo nízkých hodnot ve dvou případech, byly aktivity MnP detekované až od 3. dne po přidavku vod do systému. Z grafu 5 je patrné, že přidavek ED v systému s odpadní vodou měl slabě indukční vliv na aktivitu MnP *P. ostreatus*. K výrazné indukci aktivity došlo v 7. a 9. dnu kultivace (zhruba 4x oproti BK), naopak v 5. dnu nebyla aktivita MnP oproti BK detekována. Pozdější nárůst aktivity MnP může být dán negativním vlivem kombinace vysoké koncentrace ED a odpadní vody, ačkoliv u aktivit lakázy nebyl tento trend pozorován. U samotného přidavku ED a samotné odpadní vody byl pozorován nižší indukční vliv na aktivitu MnP.



**Graf 5** Aktivita manganové peroxidázy v průběhu kultivace. BK – biologická kontrola se sterilní kohoutkovou vodou, KV ED – kohoutková voda s umělou kontaminací ED (700 µg na baňku), OV – odpadní voda, OV ED – odpadní voda s umělou kontaminací ED (700 µg na baňku).

U kmenu *T. versicolor* jsou patrné rozdíly v detekovaných aktivitách enzymu v závislosti na použité tekutině. Mezi sterilní kohoutkovou vodou a uměle kontaminovanou pitnou vodou nebyl detekován významnější rozdíl v aktivitách MnP (s výjimkou 3. dne). Aktivita v odpadní vodě byly nejvyšší 5. den a následně klesala, zatímco aktivita v uměle kontaminované vodě dosáhla stejných hodnot 3. a 9. den, ostatní dny nebyla detekována nebo se pohybovala okolo nulové hodnoty.

### 5.7.3 Degradace ED

U kmenu *T. versicolor* byla srovnána degradační účinnost za statických a třepaných podmínek (viz tabulka 8). Protože však v degradační účinnosti nebyly detekovány žádné signifikantní rozdíly (t-test,  $p < 0,05$ ), byla pro další experimenty zvolena pouze statická kultivace, která více odpovídá modelovým požadavkům bioreaktorů a taktéž podmínkám při reálné aplikaci ligninolytických hub pro degradaci endokrinních disruptorů v odpadních vodách.

Koncentrace jednotlivých ED v odpadní vodě byly: NP 50 ng/l, BPA 151 ng/l, IRG 251 ng/l, E1 16 ng/l, E3 ng/l. EE2 a E2 byly pod limitem kvantifikace (1 ng/l). Z analýzy je patrné, že množství ED je zanedbatelné oproti množství, které bylo do systému uměle přidáno (2500 µg/l). Do každé ze tří paralel bylo přidáno 40 ml vody a 250 µl zásobního roztoku ED, takže výsledné množství ED v systému bylo 100 µg.

**Tabulka 8 Suma reziduálních ED ( $\mu\text{g}$ ) detekovaných po 9. dnu kultivace na pevných substrátech. % k AC vyjadřují množství reziduálních ED vztažených k abiotické kontrole. Estrogenní aktivita (EA) je vztažena k abiotické kontrole.**

Kmen		KV ED	OV ED	HKC	AC
<i>I. lacteus</i>	suma ED ( $\mu\text{g}$ )	85,5 $\pm$ 12,8	167,7 $\pm$ 23,5	472,4 $\pm$ 37,4	619,0 $\pm$ 86,3
	ED (% k AC)	13,8	27,1	76,3	
	EA (% k AC)	2,5	0,01	86,3	
<i>P. ostreatus</i>	suma ED ( $\mu\text{g}$ )	50,8 $\pm$ 7,6	42,4 $\pm$ 6,4	449,7 $\pm$ 72,0	645,0 $\pm$ 96,8
	ED (% k AC)	7,9	6,6	69,7	
	EA (% k AC)	0,2	9,3	84,7	
<i>P. tigrinus</i>	suma ED ( $\mu\text{g}$ )	78,7 $\pm$ 12,68	225,9 $\pm$ 20,3	470,6 $\pm$ 80,0	650 $\pm$ 97,5
	ED (% k AC)	12,1	34,7	72,4	
	EA (% k AC)	0,1	9,3	75,6	
<i>T. versicolor</i> - statické kultury	suma ED ( $\mu\text{g}$ )	31,1 $\pm$ 7,4	6,7 $\pm$ 1,1	407,1 $\pm$ 73,3	631,0 $\pm$ 63,1
	ED (% k AC)	6,2	1,0	58,2	
	EA (% k AC)	0,2	0,6	75,0	
<i>T. versicolor</i> - třepané kultury	suma ED ( $\mu\text{g}$ )	29,6 $\pm$ 5,6	16,7 $\pm$ 2,7	365,0 $\pm$ 40,0	568,0 $\pm$ 86,0
	ED (% k AC)	5,2	2,9	64,3	
	EA (% k AC)	0,0	0,1	85,1	

Výsledky degradačního experimentu zobrazené v tabulce 8 jsou uvedeny jako celková suma detekovaných ED ve formě procentuálního zastoupení vůči abiotické kontrole. Stejným způsobem je vyjádřena i reziduální estrogenní aktivita. Zastoupení jednotlivých ED je uvedeno v tabulce 10 v příloze B. Všechny kmeny vykázaly dobrý degradační potenciál vůči vysoké koncentraci ED v systému s uměle kontaminovanou pitnou i odpadní vodou. Nejlépe ze všech testovaných kmenů degradoval *T. versicolor*, u nějž bylo v odpadní vodě detekováno pouze stopové množství E2, NP a IRG odpovídající 1 % původní koncentrace celkové sumy ED (viz tabulka 8). Při degradačním experimentu s uměle kontaminovanou pitnou vodou byly u *T. versicolor* detekovány všechny ED mimo E3, ale hodnota žádného nepřesáhla 10 % výchozí koncentrace (jejich suma odpovídala zhruba 6 % původní koncentrace; viz tabulka 8). Obdobnou degradační účinnost prokázal i *P. ostreatus*, který degradoval všechny ED minimálně z 86 %. V přepočtu na celkové množství ED degradoval *P. ostreatus* 92 % ED v pitné vodě a 94 % ED v odpadní vodě. *P. tigrinus* i *I. lacteus* lépe degradovali ED v prostředí pitné vody (viz tabulka 8). V průběhu kultivace nebyly detekované významné rozdíly enzymatických aktivit u *P. tigrinus* ani u *I. lacteus* mezi odpadní a kohoutkovou vodou (viz graf 4). Tento jev by mohl být daný přítomností vyšší koncentrace organických látek, jako jsou např. humínové kyseliny, které mohou být dalšími substráty pro oxidaci ligninolytickými enzymy.

*P. tigrinus* nejhůře degradoval NP a v prostředí odpadních vod také IRG a EE2. NP a IRG byly kmenem *I. lacteus* obtížně degradovatelné také v prostředí pitných i odpadních vod (viz

tabulka 10). Vyšší detekované koncentrace IRG a NP jsou ve shodě s prací Slavíkové-Amemori, kde byl IRG popsán jako nejvíce perzistentní ED (ze směsi EE2, NP, IRG a BPA) vůči degradaci extracelulární tekutinou ligninolytických hub kultivovaných na slámovém substrátu. NP byl po IRG druhý nejhůře degradovatelný ED. Slavíková-Amemori ve své práci využívala pouze extracelulárních mechanismů degradace a u kmenu *I. lacteus* nebylo zvolenou metodou dosaženo signifikantní degradace ED<sup>195</sup>. Průběhu *in vivo* degradace bylo dosaženo vysoké stupně degradace (>70 %). Patrný rozdíl by mohl být dán participací intracelulárních a/nebo mycelium-vázaných extracelulárních degradačních pochodů ED u kmenu *I. lacteus*.

Degradace celkového množství ED v HKC byla 33-40 % (viz tabulka 8) a celkově nižší výtěžnost metoda poskytovala pro přirozené estrogeny E2 a E3 (viz příloha A, tabulka 10). Z odpadních vod bylo izolováno několik druhů bakterií schopných degradovat ED<sup>173,256</sup>, takže pokles ED v přítomnosti tepelně inaktivovaného mycelia by mohl být dán působením těchto bakterií. V abiotických kontrolách s uměle kontaminovanou vodou však degradace ED nebyla pozorována. Tento fakt by mohl být dán nevhodným prostředím slámového substrátu pro odpadní bakterie. V průběhu kultivace ligninolytických hub dochází ke štěpení a utilizaci složek substrátu, čímž se prostředí může stát pro bakterie příznivější. Tento jev byl potvrzen i vizuálně detekovatelnou přítomností bakteriálních kolonií u HKC a jejich absencí u AC. Sorpce ED na mycelium byla testována s tepelně inaktivovaným myceliem *T. versicolor* v přítomnosti uměle kontaminované odpadní, pitné a sterilní MQ vody. Sorpce odpovídá zhruba 11-15 % poklesu sumy ED a byla nejvyšší u NP a IRG.

#### 5.7.4 Stanovení estrogenních aktivit

Na základě testu s rekombinantní kvasinkou s vloženým genem pro lidský estrogenní receptor byla určena estrogenní aktivita degradačních vzorků. Výsledky vztažené k příslušným abiotickým kontrolám jsou uvedeny v tabulce 8. Hodnoty estrogenní aktivity se po nařazení pohybovaly v rozmezí 0,0-1,7 jednotek EEQ.

U všech kmenů byl pozorován pokles estrogenních aktivit s pokročilou degradací. U kmenu *P. tigrinus* nebyla u uměle kontaminované odpadní vody detekována žádná reziduální estrogenní aktivita, ačkoliv suma ED detekovaná po 9. dnech kultivace byla 226 µg (viz tabulka 8). Z této sumy bylo 58 µg EE2, 70 µg NP a 65 µg IRG (viz příloha A, tabulka 10). Koncentrace ostatních ED byla <10 µg. Z uvedených detekovaných sloučenin má pouze EE2 významnou estrogenní aktivitu (2,2x vyšší než E2) a tudíž se významně podílí na estrogenitě celého vzorku. Estrogenní aktivita NP je 1000x nižší než E2 a u IRG byla detekována aktivita thyroidní. Analogicky u kmene *I. lacteus*, kde byla po 9 dnech detekována reziduální

koncentrace ED 168 µg (viz tabulka 8), nebyla estrogenní aktivita téměř detekována. Z detekovaného množství ED tvořil největší podíl IRG (64 µg) a NP (63 µg) (viz příloha A, tabulka 10,).

### **5.8 Biodegradace polychlorovaných bifenyků pomocí ligninolytických hub a detekce degradačních metabolitů (publikace 5)**

Cílem této studie bylo porovnat degradační schopnosti osmi ligninolytických houbových kmenů vůči technické směsi polychlorovaných bifenyků (Delor 103). Houbové kultury byly kultivovány při dvou rozdílných fyziologických podmínkách – na komplexních a N-limitovaných médiích s technickou směsí PCB. Všechny studované kmeny byly po 6 týdnech inkubace schopny významně degradovat PCB v obou typech médií. Vynikajících výsledků bylo dosaženo v případě kmenu *P. ostreatus*, který odstranil 98% a 99% směsi PCB v komplexním a minerálním médiu. Tento kmen byl jako jediný schopen částečně degradovat penta- a hexachlorované bifenyky (komplexní médium).

Ekotoxikologické testy provedené s luminiscenční bakterií *Vibrio fischeri* prokázaly, že všichni zástupci hub byli schopni odstranit toxicitu pouze dočasně, zatímco *P. ostreatus* byl schopen potlačení toxicity spojené s PCB v průběhu celé kultivace na obou typech médií.

Metabolity PCB: hydroxy- a methoxy-bifenyky a monoaromatické struktury, tj. chlorobenzové kyseliny, chlorobenzaldehydy a chlorobenzyl alkoholy byly detekovány pomocí GC/MS. Detekované metabolity ukazují, že do degradace PCB by mohly být zapojeny intracelulární (cytochrom P-450 monooxygenáza, arylalkohol dehydrogenázy a arylaldehyd dehydrogenáza) a extracelulární (ligninolytické enzymy) enzymatické systémy. Výsledky také dokumentují schopnost ligninolytických hub degradovat metabolity PCB (tj. chlorobenzové kyseliny) v přítomnosti vysokých koncentrací PCB.

### **5.9 Biodegradace chlorbenzoových kyselin pomocí ligninolytických hub (publikace 6)**

Cílem této práce bylo otestovat degradační schopnosti několika zástupců ligninolytických hub vůči směsi 12 mono-, di- a trichlorobenzových kyselin (CBA) při kultivaci na tekutém médiu a v kontaminované půdě. V průběhu degradace byly sledovány změny v toxicitě pomocí testu s *V. fischeri*.

Výsledky ukázaly, že téměř všechny kmeny byly schopny účinně degradovat CBA v kapalných médiích, přičemž *I. lacteus*, *P. cinnabarinus* a *D. squalens* byly nejúčinnější v hodnocení hlavních faktorů, kterými byly degradace a odstranění toxicity.

Analýzou metabolitů byly detekovány převážně methoxylované a hydroxylované deriváty původních kyselin. To naznačuje, že do degradace CBA je pravděpodobně zapojeno více mechanismů. Obecně platí, že testované houbové kmeny byly schopny degradovat CBA v půdě z 85-99% v průběhu do 60 dnů. Analýza ergosterolu ukázala, že aktivní kolonizace je důležitým faktorem pro degradaci CBA. Nejúčinnější kmeny z hlediska degradace v půdě byly *I. lacteus*, *P. ostreatus*, *B. adusta*, které byly rovněž schopny aktivně kolonizovat půdu. Nicméně, na rozdíl od *P. ostreatus*, nebyly kmeny *I. lacteus* a *B. adusta* schopny výrazně snížit toxicitu.

#### **5.10 Analýza polychlorovaných bifenyly pomocí kolony s reverzní fází se sub-2-mikronovými částicemi (publikace 7)**

Práce byla zaměřená na vyvinutí nové metody ultra účinné kapalinové chromatografie (UPLC) s UV detekcí pro separaci a detekci směsí polychlorovaných bifenyly. Práce zahrnovala optimalizaci separačních podmínek pro dvě modelové směsi obsahující sedm a patnáct nejdůležitějších kongenerů PCB, srovnání tří typů reverzních fází se sub-2-mikronovými částicemi a validaci metody. Kalibrační křivky byly stanoveny v rozmezí 0,5-50,0 µg/ml a jejich korelační koeficienty byly v rozmezí 0,997-0,999. Mez detekce se pro jednotlivé kongenery pohybovala od 0,1-0,5 µg/ml.

Pro UPLC separace byla nejúčinnější kolona Grace C18 (naplněná 1,5 µm částicemi), která byla následně použita na separaci kongenerů ze směsi Delor 103. Eluční pořadí jednotlivých kongenerů bylo potvrzeno GC/MS off-line analýzou. Separováno bylo 13 individuálních kongenerů a některé z dalších koeluujících kongenerů by mohly být separovány použitím dalšího separačního rozměru (např. s hmotnostně spektrometrickým detektorem). Vyvinutá metoda může být přímo aplikovaná pro separaci méně složitých směsí kongenerů PCB ve vodných matricích, které jsou obecně používány pro studium enzymatických degradací.

### **5.11 Analýza 15 zástupců chlorbenzoových kyselin v půdní matrici pomocí urychlené extrakce rozpouštědlem ve spojení s kapalinovou chromatografií (publikace 8)**

Studie byla zaměřena na vypracování rychlé, jednoduché a efektivní metody stanovení 15 izomerů chlorbenzoových kyselin v půdní matrici pomocí HPLC ve spojení s UV detekcí a extrakce metodou urychlené extrakce rozpouštědlem.

Uměle kontaminované půdní vzorky byly extrahovány pomocí urychlené extrakce rozpouštědlem (ASE; z *angl.* „accelerated solvent extraction“) s extrakčním činidlem: 1% kyselina octová ve směsi hexanu a acetonu (1:1, V/V) při tlaku 10.34 MPa a teplotě 150 °C. Výtěžnost ASE metody byla 82 %. Extrakty byly následně zkoncentrovány za použití malého objemu DMSO, aby se zabránilo odpařování těkavých CBA. Finální analýzy byly provedeny na HPLC přístroji vybaveném kolonou C18 XBridge a mobilní mobilní fází zahrnující acetonitril a 0,1% trifluoroctovou kyselinu ve vodě. Vyvinutá gradientová HPLC metoda byla validována. Lineární rozsah kalibračních křivek byl pro 2 CBA; 2,6 CBA; 3CBA; 4CBA; 2,3 CBA; 2,3,6 CBA; 2,5 CBA; a 2,4 CBA od 5 do 120 µg/ml s limitem kvantifikace (LOQ) 5 µg/ml a přesností 82 ± 2 až 103 ± 3%. Lineární rozsah metody pro 2,4,6 CBA; 3,4 CBA; 2,3,5,6 CBA; 3,5 CBA; 2,3,5 CBA; 2,3,4,5,6 CBA a 2,3,4,5 CBA byl 10-120 µg/ml s LOQ 10 µg/ml s přesností 94 ± 1 až 114 ± 1%.

Optimalizovaný analytický postup byl využit pro stanovení CBA na dvou půdách, historicky kontaminovaných PCB. Ve vzorcích bylo použitou metodou kvantifikováno 9 CBA. Nejvyšší koncentrace (0,6 µg/g) byla detekována pro 2,4-CBA derivát.





## 6 ZÁVĚR

Práce byla zaměřená na degradaci látek s endokrinně disruptivní aktivitou pomocí ligninolytických kmenů hub při *in vivo* a *in vitro* podmínkách. V rámci práce byla provedena řada kultivačních experimentů a izolačních postupů využívající hubové kmeny či jejich enzymatické aparáty k degradaci ED za různých podmínek. Dále byla vypracována řada extrakčních a analytických metod umožňujících selektivní a citlivou kvantifikaci ED v různých matricích a také detekci jejich metabolitů.

Specifické cíle uvedené v kapitole 4 byly vypracovány takto:

- 1) Byly publikovány dva souhrnné články, týkající se tematiky mikrobiální degradace ED. Tyto látky jsou nedostatečně odbourávány v čistících procesech v čistírnách odpadních vod a jejich stopová množství jsou nalézána v životním prostředí na celém světě.
- 2) Byl vypracován screening ligninolytických kmenů hub s ohledem na degradační účinnost vůči vybraným zástupcům endokrinních disruptorů (BPA, NP, IRG a EE2) v průběhu kultivace kmenů hub na tekutém komplexním médiu. V rámci testu byla prostřednictvím testu s rekombinantní kvasinkou hodnocena inhibice estrogenních aktivit a prostřednictvím spektrofotometrických metod produkce ligninolytických enzymů. Nejlépe degradujícími kmeny byly *P. ostreatus* a *I. lacteus*, které degradovaly jednotlivé zástupce ED už v průběhu 3 dnů kultivace z více než 80 %, ačkoliv u EE2 nedošlo ani v průběhu 14 denní kultivace k úplnému odstranění reziduální estrogenní aktivity. Nejhůře degradujícím kmenem byl *P. chrysosporium*, který nedegradoval BPA a EE2 v průběhu 14 dnů kultivace. Přímá souvislost mezi enzymatickými aktivitami a degradační účinností nebyla prokázána.
- 3) Ze série testů s enzymatickými frakcemi 8 kmenů ligninolytických hub vyplynulo, že enzymy produkované jednotlivými kmeny se ve své degradační účinnosti vůči EE2 liší, a že i kmeny se od sebe liší degradační strategií. Obecně lze říct, že při degradaci EE2 se pravděpodobně jedná o kooperaci více mechanismů a že tato degradace nemusí mít vždy přímou souvislost s hladinou enzymových aktivit.
- 4) Při testování degradačního potenciálu lakázy izolované z indukovaných ( $\text{CuSO}_4$ ) a neindukovaných kultur *P. ostreatus* vůči BPA, NP a IRG byla prokázána vysoká degradační účinnost pro všechny ED (>75 %). Při degradaci s lakázou izolovanou z kultur s přidavkem induktoru byl detekován pozitivní vliv mediátoru HBA na průběh degradace BPA a NP a také na snížení estrogenní aktivity BPA. Byl pozorován silný inhibiční vliv na produkci lakázy

u kmene *P. ostreatus* přidavkem EE2 do kultivačního média (pokles aktivity na zhruba 50 %) a takto produkovaná lakáza prokázala rovněž nejvyšší degradační potenciál vůči EE2 při *in vitro* degradaci.

- 5) Výsledky souboru *in vivo* a *in vitro* testů s kmenem *P. ostreatus* a jeho frakcemi prokázaly, že do degradace EE2 a odstranění jeho estrogenní aktivity je zapojeno několik enzymatických mechanismů, mezi které patří intracelulární degradace prostřednictvím mikrosomálních enzymů, degradace enzymy vázanými na mycelium a extracelulární degradace prostřednictvím lakázy a MnP. Bylo identifikováno 6 metabolitů EE2 a také byla potvrzena úloha eukaryotického cytochromu P450 v biodegradaci EE2.
- 6) Kmeny *P. ostreatus*, *I. lacteus*, *T. versicolor* a *P. tigrinus*, vybrané na základě předchozích experimentů, prokázaly dobrou degradační účinnost vůči vysoké koncentraci (700 µg/baňku) směsi ED (E1, E2, E3, EE2, BPA, NP, IRG) při kultivaci na slámovém substrátu v přítomnosti pitné i reálné odpadní vody. Nejlépe degradujícími kmeny byly *T. versicolor* a *P. ostreatus* u kterých bylo po 9 dnech detekováno méně než 10 % oproti původnímu celkovému množství ED a estrogenní aktivity. Tyto kmeny jsou slibnými kandidáty pro průtokové bioreaktory se sypaným ložem tvořeným slámovým substrátem s inokulem hub.
- 7) V rámci degradace perzistentních aromatických organopolutantů s endokrinně disruptivní aktivitou bylo prokázáno, že ligninolytické houby jsou schopny odstraňovat a snižovat toxicitu PCB a jejich bakteriálních toxických metabolitů CBA. Degradace probíhala v tekutých médiích a v případě CBA také v kontaminované zemině. Toxicita byla hodnocena testem s *V. fischeri*. Při degradaci PCB se z hlediska degradace a odstranění toxicity ukázal jako nejúčinnější kmen *P. ostreatus*, při degradaci CBA v tekutých médiích byly nejúčinnější kmeny *I. lacteus* a *P. cinnabarinus* a v půdě *P. ostreatus* a *I. lacteus*.
- 8) Pro zhodnocení degradačních experimentů CBA v půdě byla vytvořena extrakční metoda využívající principu urychlené extrakce rozpouštědlem za vysokého tlaku a teploty extrakčního rozpouštědla. Pro analýzu 15 zástupců CBA v půdních extraktech byla validována metoda HPLC s UV detekcí s kolonou s částicemi 3,5 µm na hybridním základu. Pro analýzu PCB z vodných matric degradačních experimentů byla vytvořena a validována metoda využívající UPLC techniky s kolonou naplněnou částicemi 1,5 µm.

Z uvedených výsledků vyplývá výhoda využití celých houbových kultur pro degradaci organopolutantů *in vivo*. Z testovaných kmenů ligninolytických hub s ohledem na různé typy kultivace, kultivační substráty a strukturní heterogenitu organopolutantů představuje *P. ostreatus* kmen s nejvyšším bioremediačním potenciálem.

## LITERATURA

- 1 Křesinová, Z., Svobodová, K., Cajthaml, T., 2009. Microbial degradation of endocrine  
disruptors. *Chemické Listy* 103, 200-207.
- 2 Whitehead, S.A., Rice, S., 2006. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid  
synthesis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 20, 45-61.
- 3 Brouwer, A., Longnecker, M.P., Birnbaum, L.S., Cogliano, J., Kostyniak, P., Moore, J., Schantz,  
S., Winneke, G., 1999. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-  
dose levels of exposure to PCBs. *Environmental Health Perspectives* 107, 639-649.
- 4 Andra, S.S., Makris, K.C., 2012. Thyroid disrupting chemicals in plastic additives and thyroid  
health. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis  
and Ecotoxicology Reviews* 30, 107-15.
- 5 Jahan, S., Ahmed, S., Razzaq, S., Ahmed, H., 2012. Adverse effects of arsenic exposure on the  
mammary glands of adult female rats. *Pakistan Journal of Zoology* 44, 691-697.
- 6 Sargis, R.M., Neel, B.A., Brock, C.O., Lin, Y., Hickey, A.T., Carlton, D.A., Brady, M.J., 2012. The  
novel endocrine disruptor tolylfluanid impairs insulin signalling in primary rodent and human  
adipocytes through a reduction in insulin receptor substrate-1 levels. *Biochimica et Biophysica  
Acta - Molecular Basis of Disease* 1822, 952-960.
- 7 Singh S. K., Pandey R. S., 1990. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma  
gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis  
in rat. *Indian Journal of Experimental Biology* 28, 953-956.
- 8 Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine disruptors in  
the environment - (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 75, 631-681.
- 9 Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Sigler, K., Řezanka, T., 2009. Microbial  
transformation of synthetic estrogen 17 alpha-ethynylestradiol. *Environmental Pollution* 157,  
3325-3335.
- 10 Racz, L., Goel, R.K., 2010. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of  
Environmental Monitoring* 12, 58-7.
- 11 Snyder, E.M., Pleus, R.C., Snyder, S.A., 2005. Pharmaceuticals and EDCS in the US water  
industry - An update. *Journal/American Water Works Association* 97, 32-36.
- 12 Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D., Bonerz, M., 2002. Determination of estrogens in sludge  
and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry* 74, 3498-3504.
- 13 Hignite, C., Azarnoff, D.L., 1977 Drugs and drug metabolites as environmental contaminants:  
chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sciences* 20, 337-  
341.
- 14 Aherne, G.W., English, J., Marks, V., 1985. The role of immunoassay in the analysis of  
microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9, 79-83.
- 15 Aherne, G.W. and Briggs, R., 1989. The relevance of the presence of certain synthetic steroids  
in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 41, 735-742.
- 16 Mitsumori, K., Furukawa, F., Sato, M., Yoshimura, H., Imazawa, T., Nishikawa, A., Takahashi,  
M. 1994. Promoting effects of ethinylestradiol on development of renal proliferative lesions  
induced by N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine in female Syrian golden hamsters. *Journal of  
Cancer Research and Clinical Oncology* 120, 131-136.
- 17 Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of  
estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological  
screening. *Environmental Science & Technology* 32, 1549-1558.
- 18 Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual  
disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498-2506.
- 19 Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G.,  
Luster, M., Mac M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M.,

- Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104, 715-740.
- <sup>20</sup> UBA TEXTE, Endocrinically active chemicals in the environment, Biochemical Ecotoxicology Division, Arthur-Scheunert-Aller, 114, 14558 Bergholz-rehbrucke, Germany, USB Texte 3/96 (1996).
- <sup>21</sup> OECD, The second meeting of the OECD validation management group (VMG) for the screening and testing of endocrine disrupters, organization for economic co-operation and development (OECD), Paris (2000).
- <sup>22</sup> Commission of the European Communities (CEC), Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Brussels, COM (1999) 706 final (1999).
- <sup>23</sup> CSTE, Human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods, Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (1999).
- <sup>24</sup> REMPHARMAWATER, Ecotoxicological assessments and removal technologies for pharmaceuticals in wastewater, EU Projects EVK1-CT- 2000-00048, Italy (2000).
- <sup>25</sup> POSEIDON, Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, EU Projects EVK1-CT-2000- 00047, Germany (2004).
- <sup>26</sup> Colborn, T., Saal, F. S. V., Soto, A. M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378-384.
- <sup>27</sup> Zoeller, R.T., Gore, C.A, Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30, 293-342.
- <sup>28</sup> Gillesby, B.E., Zacharewski, R., 1998. Exoestrogens: Mechanims of actions and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 3-14.
- <sup>29</sup> Panzica, G.C., Viglietti-Panzica C., Ottinger M.A., 2005. Introduction: neurobiological impact of environmental estrogens. *Brain Research Bulletin* 65, 187–191.
- <sup>30</sup> Sonnenschein, C., Soto, A.M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65, 143-150.
- <sup>31</sup> Stoker, T.E., Laws, S.C., Crofton, K.M., Hedge, J.M., Ferrell, J.M., Cooper, R.L. 2004. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicological Sciences* 78, 144-155.
- <sup>32</sup> Durhan, E., Lambright, C., Wilson, V., Butterworth, B.C., Kuehl, D.W., Orlando, E.F., Guillette, L.J.Jr., Gray, L.E. Jr., Ankley, G.T., 2002. Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a pulp and paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1973-1976.
- <sup>33</sup> Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D.J., Gunderson, M.P., Van Aggelen, G., Helbing, C.C., 2006. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology* 80, 217-227.
- <sup>34</sup> Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in molluscs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 37-43.
- <sup>35</sup> Konterkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 115, 98-105.
- <sup>36</sup> Ying, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28, 545-551.

- 37 Hassanin, A., Kuwahara, S., Nurhidayat, Tsukamoto, Y., Ogawa, K., Hiramatsu, K., Sasaki, F.,  
2002. Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers  
contaminated with estrogenic chemicals. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 921-926.
- 38 Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., 2008. Reproductive disruption in fish downstream from an  
estrogenic wastewater effluent. *Environmental Science & Technology* 42, 3407-3414.
- 39 Olsen, C.A., Meussen-Elholm, E.T.M., Hongslo, J.K., Stenersen, J., Tollefsen, K.E., 2005.  
Estrogenic effects of environmental chemicals: An interspecies comparison. *Comparative  
Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 141, 267-274.
- 40 Khan, S.Z., Kirk, C.J., Michelangeli, F., 2003. Alkylphenol endocrine disruptors inhibit IP3-  
sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310, 261-266.
- 41 Birnbaum, L.S. and Fenton, S.E., 2003. Cancer and developmental exposure to endocrine  
disruptors. *Environmental Health Perspectives* 111 (4), 389-394.
- 42 Henderson, B. E., Ross, R., Bernstein, L., 1988. Estrogens as a Cause of Human Cancer: The  
Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Research* 48, 246-253.
- 43 Bocchinfuso, W.P. and Korach, K.S., 1997. Biological impact of a disrupted estrogen receptor  
gene on estrogen-related cancer. *Endocrine-Related Cancer* 4, 387-406.
- 44 Toppari, J., Larsen, J.Chr., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette Jr., L.J.,  
Jégou, B., Skakkebaek, N.E., 1996. Male reproductive health and environmental  
xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 104, 741-803.
- 45 Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: An  
increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human  
Reproduction* 16, 972-978.
- 46 Safe, S., 2005. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends in  
Endocrinology and Metabolism* 16, 139-144.
- 47 Roy, J.R., Chakraborty, S., Chakraborty, T.R., 2009 Estrogen-like endocrine disrupting  
chemicals affecting puberty in humans - A review. *Medical Science Monitor* 15, 137-145.
- 48 Liu, Z.-H., Ogejo, J.A., Pruden, A., Knowlton, K.F., 2011. Occurrence, fate and removal of  
synthetic oral contraceptives (SOCs) in the natural environment: A review. *Science of the Total  
Environment* 409, 5149-5161.
- 49 Hildebrand, C., Londry, K.L., Farenhorst, A., 2006. Sorption and desorption of three endocrine  
disruptors in soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B - Pesticides Food  
Contaminants and Agricultural Wastes* 41, 907-921.
- 50 Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of waterborne steroid  
estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environmental Science & Technology*  
34, 3890-3894.
- 51 D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi,  
R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment  
facilities. *Science of the Total Environment* 302, 199-209.
- 52 Baronti, C., Curini, R., D'Assenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring  
natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a  
receiving river water. *Environmental Science & Technology* 24, 5059-5065.
- 53 Helton, E.D., Williams, M.C., Goldzieher, J.W., 1976. Human urinary and liver conjugates of  
17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Steroids* 27, 851-867.
- 54 Lima, D.L., Schneider, R.J., Esteves, V.I., 2012. Sorption behaviour of EE2 on soils subjected to  
different long-term organic amendments. *Science of the total environment* 23, 120-124.
- 55 Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to  
bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24, 139-177.
- 56 Svenson, A., Sjöholm, S., Allard, A.S., Kaj, L., 2009. Antiestrogenicity and estrogenicity in  
leachates from solid waste deposits. *Environmental Toxicology* 26, 233-239.
- 57 Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and  
multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127, 27-34.

- 58 vom Saal, F.S., Hughes, C., 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of  
bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*  
113, 926-933.
- 59 Kortenkamp, A., 2007. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of  
endocrine disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 155, 98-105.
- 60 Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J. N., 2008. Nonylphenol in the  
environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters.  
*Environment International* 34, 1033-1049.
- 61 Johnson, A.C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jürgens, M., Nakari,  
T., Pickering, A., Suter, M.J.-F., Svenson, A., Wettstein, F.E., 2005. Comparing steroid estrogen  
and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment  
and management practices. *Water Research* 39, 47-58.
- 62 Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y.,  
Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka  
*Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology* 67, 167-179.
- 63 Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M.R., Roy, P., 2009. Alteration of testicular steroidogenesis  
and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive  
Toxicology* 27, 177-185.
- 64 Fiss, E.M., Rule, K.L., Vikesland, P.J., 2007. Formation of chloroform and other chlorinated by-  
products by chlorination of triclosan-containing antibacterial products. *Environmental Science  
& Technology* 41, 2387-2394.
- 65 Latch, D.E., Packer, J.L., Stender, B.L., van Overbeke, J., Arnold, W.A., McNeill, K., 2005.  
Aqueous photochemistry of triclosan: formation of 2,4-dichlorophenol, 2,8-dichlorodibenzop-  
dioxin, and oligomerization products. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 517-525.
- 66 McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394,  
531-532.
- 67 Okumura, T., Nishikawa, Y., 1996. Gas chromatography mass spectrometry determination of  
triclosans in water, sediment and fish samples via methylation with diazomethane. *Analytica  
Chimica Acta* 325, 175-184.
- 68 Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J., 2002. Triclosan, a commonly used  
bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46,  
1485-1489.
- 69 Bonefeld-Jorgensen, E.C., Andersen, H.R., Rasmussen, T.H., Vinggaard, A.M., 2001. Effect of  
highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen  
receptor activity. *Toxicology* 158, 141-153.
- 70 Cheek, A.O., Kow, K., Chen, J., McLachlan, J.A., 1999. Potential Mechanisms of thyroid  
disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor,  
transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environmental Health Perspectives* 107, 273-278.
- 71 Shevtsov, S., Petrochenko, E.V., Pedersen, L.C., Negishi, M., 2003. Crystallographic analysis of  
a hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB) bound to the catalytic estrogen binding site  
of human estrogen sulfotransferase. *Environmental Health Perspectives* 111, 884-888.
- 72 Kitamura, S., Jinno, N., Suzuki, T., Sugihara, K., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N., 2005. Thyroid  
hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208,  
377-387.
- 73 Svobodová K., Plačková M., Novotná V., Cajthaml T., 2009. Estrogenic and androgenic activity  
of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in  
vitro yeast assays. *Science of the Total Environment* 407, 5921-5925.
- 74 Skerfving, S., Svensson, B.G., Asplund, L., Hagmar, L., 1994. Exposure to mixtures and  
congeners of polychlorinated-biphenyls. *Clinical Chemistry* 40, 1409-1415.
- 75 Schantz, S.L., Widholm, J.J., Rice, D.C., 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological  
function in children. *Environmental Health Perspectives* 111, 357-576.

- <sup>76</sup> Loch-Carusio, R., 2002. Uterine muscle as a potential target of polychlorinated biphenyls during the pregnancy. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205, 121-130.
- <sup>77</sup> Faroon, O.M., Keith, S., Jones, D., De Rosa, C., 2001. Carcinogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Industrial Health* 17, 41-62.
- <sup>78</sup> Gichner, T., Lovecká, P., Vrchatová, B., 2008. Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids-metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutation Research* 657, 140-145.
- <sup>79</sup> Zhao, Y.H., Cronin, G.D., Ji, M.T.D., Dearden, J.C., 1998. QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *Science of the Total Environment* 216, 205-215.
- <sup>80</sup> Sondossi, M., Sylvestre, M., Ahmad, D., 1992. Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 485-495.
- <sup>81</sup> Havel, J., Reineke, W., 1992. Degradation of Acrolor 1221 and survival of strains in soil microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 129-134.
- <sup>82</sup> Pieper, C.H., Seeger, M., 2008. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15, 121-138.
- <sup>83</sup> Adebuseye, S.A., Miletto, M., 2011. Characterization of multiple chlorobenzoic acid-degrading organisms from pristine and contaminated systems: Mineralization of 2,4-dichlorobenzoic acid. *Bioresource Technology* 102, 3041-3048.
- <sup>84</sup> Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D, Schafer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment* 225, 101-108.
- <sup>85</sup> Lagana, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., 2004. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 501, 79-88.
- <sup>86</sup> Fernandez, M.P., Noguerol, T.N., Lacorte, S., Buchanan, I., Piña, B., 2009. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 957-968.
- <sup>87</sup> Carballa, M., Omila, F., Lema, J. M., Llompert, M., Garcia-Jaresb, C., Rodriguez, I., Gomez, M., Ternes, T., 2004. Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* 38, 2918-2926.
- <sup>88</sup> Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sorensen, B., Ternes, T.A., 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science & Technology* 37, 4021-4026.
- <sup>89</sup> Boyd, G.R., Palmeri, J.M., Zhang, S., Grimm, D.A., 2004. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA 2004. *Science of the Total Environment* 333, 137-148.
- <sup>90</sup> Zhang, X., Gao, Y.J., Li, Q.Z., Li, G.X., Guo, Q.H., Yan, C.Z., 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61, 93-100.
- <sup>91</sup> Nie, Y.F., Qiang, Z.M., Zhang, H.Q., Adams, C., 2009. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 7071-7080.
- <sup>92</sup> Morteani, G., Moeller, P., Fuganti, A., Paces, T., 2006. Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). *Environmental Geochemistry and Health* 28, 257-264.
- <sup>93</sup> Klečka, G.M., Staples, C.A., Clark, K.E., Van Der Hoeven, N., Thomas, D.E., Hentges, S.G., 2009. Exposure analysis of bisphenol A in surface water system in North America and Europe. *Environmental Science & Technology* 43, 6145-6150.



- <sup>94</sup> Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* 324, 55-66.
- <sup>95</sup> Gabet-Giraud, V., Miege, C., Choubert, J. M., Martin Ruel, S., Coquery, M., 2010. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment* 408, 4257-4269.
- <sup>96</sup> Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llopart, M., García, C., Rodriguez, I., Gómez, M., Ternes, T., 2005. Behaviour of pharmaceuticals and personal care products in a sewage treatment plant of northwest Spain. *Water Science and Technology* 52, 29-35.
- <sup>97</sup> Noppe, H., Verslycke, T., De Wulf, E., Verheyden, K., Monteyne, E., Van Caeter, P., Janssen, C.R., De brabander, H.F., 2007. Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 1-8.
- <sup>98</sup> Prieto, A., Vallejo, A., Zuloaga, O., Paschke, A., Sellergen, B., Schillinger, E., Schrader, S., Möder, M., 2011. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 703, 41-51.
- <sup>99</sup> Höhne, C., Püttmann, W., 2008. Occurrence and temporal variations of the xenoestrogens bisphenol A, 4-tert-octylphenol, and tech. 4-nonylphenol in two German wastewater treatment plants. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 405-416.
- <sup>100</sup> Benottti, M. J., 2010. Impact of drought on wastewater contaminants in an urban water supply. *Journal of Environmental Quality* 39, 1196-2000.
- <sup>101</sup> Agüera, A., Fernandez-Alba, A.R., Piedra, L., Mezcuca, M., Gomez, M.J., 2003. Evaluation of triclosan and biphenol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 480, 193-205.
- <sup>102</sup> Lei, B., Huang, S., Zhou, Y., Wang, D., Wang, Z., 2009. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere* 76, 36-42.
- <sup>103</sup> Chen, C.-Y., Wen, T.-Y., Wang, G.-S., Cheng, H.-W., Lin, Y.-H., Lien, G.-W., 2007. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment* 378, 352-365.
- <sup>104</sup> Lindström, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Berquist, P.A., Muller, M.D. Buder, H.R., 2002. Occurrence and environmental behaviour of the bactericide triclosan and its methyl derivate in surface water. *Environmental Science & Technology* 36, 2322-2329.
- <sup>105</sup> Bester, K., 2005. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 9-17.
- <sup>106</sup> Wu, J.L., Marten D., Kettrup, A., Cai, Z.W., 2007. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta* 72, 1650-1654.
- <sup>107</sup> Halden, R.U., Paull, D.H., 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U.S. water resources. *Environmental Science & Technology* 39, 1420-1426.
- <sup>108</sup> Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., Le Bot, B., 2012. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and byproducts in environment. *Environmental Science Pollution Research* 19, 1044-1065.
- <sup>109</sup> Kasprzyk-Horden, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A. J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* 43, 363-380.
- <sup>110</sup> Xie, Z., Ebinghaus, R., Floser, G., Caba, A., Ruck, W., 2008. Occurrence and distribution of triclosan in the German Brijgt (North Sea). *Environmental Pollution* 156, 1190-1195.

- 111 Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R., Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials* 122, 195-204.
- 112 Gómez, M.J., Martínex Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernandex-Alba, A. R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993-1002.
- 113 Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211.
- 114 <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm> navštíveno 2012\_12\_20.
- 115 COUNCIL REGULATION (EEC) No 793/93 of 23 March 1993 on the evaluation and control of the risks of existing substances.
- 116 ROZHODNUTÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY č. 2455/2001/ES ze dne 20. listopadu 2001, kterým se stanoví seznam prioritních látek v oblasti vodní politiky a mění směrnice 2000/60/ES Úr. vest. c. C 176, 14.7.1982, s. 3. kterým se stanoví seznam prioritních látek v oblasti vodní politiky a mění směrnice 2000/60/ES Úr. vest. c. C 176, 14.7.1982, s. 3.
- 117 Safety Assessment of BPA in Medical Products August 7, 2009 [www.fda.gov/.../CommitteesMeetingMaterials/ScienceBoardtotheFoodandDrugAdministration/UCM176835.pdf](http://www.fda.gov/.../CommitteesMeetingMaterials/ScienceBoardtotheFoodandDrugAdministration/UCM176835.pdf) navštíveno 2012\_12\_20.
- 118 Auriol, M., Filali-Meknassi, R.D., Tyagi, C.D., Adams, R.Y., Surampalli P., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from the wastewater treatment plant, a new challenge. *Process in Biochemistry* 41, 525-539.
- 119 Rauty, S.A., Angus, R.A., 2010. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1287-1291.
- 120 Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 20-33.
- 121 Fu, Y., Viraraghavan, T., 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: A review. *Bioresource Technology* 79, 251-262.
- 122 Eibes, G., Debernardi, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2011. Oxidation of pharmaceutically active compounds by a ligninolytic fungal peroxidase. *Biodegradation* 22, 539-550.
- 123 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* 7, 429-456.
- 124 Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, 175-185.
- 125 DeJong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A., Debont, J.A.M., 1994. Physiological-role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de-novo by white-rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 271-277.
- 126 Romero, E., Ferreira, P., Martinez, A.T., Martinez, M.J., 2009. New oxidase from *Bjerkandera* arthroconidial anamorph that oxidizes both phenolic and nonphenolic benzyl alcohols. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1794, 689-697.
- 127 Šušla, M., Svobodová, K., 2006. Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro degradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chemické Listy* 100, 889-895.
- 128 Wong, D.W.S., 2009. Sctructure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174-209.
- 129 Singh, S.N.: *Microbial degradation of xenobiotics*. Environmental Science and Engineering, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.

- 130 Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31, 223-236.
- 131 Waldner, R., Lelsola, M.S.A, Flechter, A., 1988. Comparison of ligninolytic activities of selected white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 400-407.
- 132 Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2788-2793.
- 133 Collins, P.J., Field, J.A., Teunissen, P., Dobson, A.D.W., 1997. Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2543-2548.
- 134 Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T., 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 871-897.
- 135 Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- 136 Baldrian, P., 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Review* 30, 215-242.
- 137 Johannes, C., Majcherczyk, A., 1999. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 524-528.
- 138 Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1876-1880.
- 139 Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694-705.
- 140 van Den Brink, H.M., van Gorcom, R.F.M., van Den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J., 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 23, 1-17.
- 141 Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., 2007. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 330-344.
- 142 Park, J., Park, B., Jung, K., Jang, S., Yu, K., Choi, J., Kong, S., Kim, S., Kim, H., Kim, J.F., Blair, J.E., Lee, K., Kang, S., Lee, Y.H., 2008. CFGP: a web-based, comparative fungal genomics platform. *Nucleic Acids Research* 36, 562-571.
- 143 Yadav, J.S., Doddapaneni, H., Subramanian, V., 2006. Cytochrome-P450 of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochemical Society Transactions* 34, 1165-1169.
- 144 Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., 1999. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chemické Listy* 93, 229-237.
- 145 Hundt, K., Jonas, U., Hammer, E., Schauer, F., 1997. Metabolism of halogenated diphenyl ethers by selected white rot fungi, part III. *International Symposium Environmental Biotechnology*. Ed. Verstraete W., Verachtert H. (Technologisch Institut), 26-29.
- 146 Esplugas, S., Bila, D.M., Krause, L.G.T., Dezotti, M., 2007. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials* 149, 631-642.
- 147 Huber, M.M., Ternes, T.A., von Gunten, U., 2004. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology* 38, 5177-5186.
- 148 Hwang, S., Lee, D.-I., Lee, C.-H., Ahn, I.-S., 2008. Oxidation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with Mn(III) and product. *Journal of Hazardous Materials* 155, 334-341.

- 149 Rosenfeldt E.J., Linden K.G., 2004. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinylestradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology* 38, 5476-5483.
- 150 Coleman H.M., Abdullah M.I., Eggins B.R., Palmer F.L., 2005. Photocatalytic degradation of 17 $\alpha$ -oestradiol, oestrin and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in water monitored using fluorescence spectroscopy. *Applied Catalysis B-Environmental* 55, 23-30.
- 151 Liu, X.L., Wu, F., Deng, N.S., 2003. Photodegradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in aqueous solution exposed to a high-pressure mercury lamp (250 W). *Environmental Pollution* 126, 393-398.
- 152 Liu, X.L., Wu, F., Deng, N.S., 2003. UV-light induced photodegradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 98, 311-316.
- 153 van der Bruggen, B., van de Castele, C., 2003. Removal of pollutants from surface water and groundwater by nanofiltration: overview of possible applications in the drinking water industry. *Environmental Pollution* 122, 435-445.
- 154 Nghien L.D., Manis A., Soldenhoff K., Schäfer A.I., 2004. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science* 242, 37-45.
- 155 Johnson A.C., Sumpter J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemical in activated sludge treatment works. *Environmental Science & Technology* 35, 4697-4703.
- 156 Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N., 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56, 843-851.
- 157 Andersen, H.R., Hansen, M., Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T., Halling-Sørensen, B., 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61, 139-146.
- 158 Janex-Habibi, M.-L., Huyard, A., Esperanza, M., Bruchet, A., 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. *Water Research* 43, 1565-1576.
- 159 Ternes, T.A., Kreckel, P., Müller, J., 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of the Total Environment* 225, 91-99.
- 160 Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants - conception of a database and first results. *Environmental Pollution* 157, 1721-1726.
- 161 Kanda, R., Churchley, J., 2008. Removal of endocrine disrupting compounds during conventional wastewater treatment. *Environmental Technology* 29, 315-323.
- 162 Mes, T.Z.D.D., Kujawa-Roeleveld, K., Zeeman, G., Lettinga, G., 2008. Anaerobic biodegradation of estrogens – hard to digest. *Water Science and Technology* 57, 1177-1182.
- 163 Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A., 2008. Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions. *Water Environment Research* 80, 47-52.
- 164 Hung, N.V., Tateda, M., Ike, M., Fujita, M., Tsunoi, S., Tanaka, M., 2004. Sorption of biodegradation end products of nonylphenol polyethoxylates onto activated sludge. *Journal of Environmental Sciences* 16, 564-569.
- 165 Ejlertsson, J., Nilsson, M.L., Kylin, H., Bergman, A., Karlson, L., Öquist, M., Svensson, B.H., 1999. Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethoxylates in digested sludge, landfill municipal solid waste, and landfilled sludge. *Environmental Science & Technology* 33, 301-306.
- 166 Fernandez, M.P., Ikonou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment* 373, 250-269.
- 167 Fürhacker, M. 2003. Bisphenol A emission factors from industrial sources and elimination rates in a sewage treatment plant. *Water Science and Technology* 47, 117-122.

- 168 Corvini, P.F.X., Schäffer, A., Schlosser, D., 2006. Microbial degradation of nonylphenol and  
other alkylphenols - Our evolving view. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 223-243.
- 169 Chen, X., Nielsen, J.L., Fungal, K., Liu, Y., Lolas, I.B., Bester, K. 2011. Biodegradation of triclosan  
and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions. *Chemosphere*  
84, 452-456.
- 170 Heidler, J., Halden, R.U., 2007. Mass balance assessment of triclosan removal during  
conventional sewage treatment. *Chemosphere* 66, 362-369.
- 171 Singer, H., Muller, 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* 36, 4998-  
5004.
- 172 Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T., Kikuchi, S., 2003. *Novosphingobium*  
*tardaogens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a  
sewage treatment plant in Tokyo. *International Journal of Systematic and Evolutionary*  
*Microbiology* 53, 47-52.
- 173 Ke, J., Zhuang, W., Gin, K.Y.-H., Reinhard, M., Hoon, L.T., Tay, J.-H., 2007. Characterization of  
estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered  
secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1163-1171.
- 174 Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K.,  
Saino, H., Sawada, H., Omura, H., 2004. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and  
*Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Applied and*  
*Environmental Microbiology* 70, 5283-5289.
- 175 Shi, J.H., Suzuki, Y., Lee, B.-D., Nakai, S., Hosomi, M., 2002. Isolation and characterization of  
the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. *Water*  
*Science and Technology* 45, 175-179.
- 176 Pieper, C., Rotard, W., 2011. Investigation on the removal of natural and synthetic estrogens  
using biofilms in continuous flow biofilm reactors and batch experiments analysed by gas  
chromatography/mass spectrometry. *Water Research* 45, 1105-1114.
- 177 Tanghe, T., Dhooge, W., Verstraete, W., 1999. Isolation of a bacterial strain able to degrade  
branched nonylphenol. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 746-751.
- 178 Ushiba, Y., Takahara, Y., Ohta, H., 2003. *Sphingobium amiense* sp nov., a novel nonylphenol-  
degrading bacterium isolated from a river sediment. *International Journal of Systematic and*  
*Evolutionary Microbiology* 53, 2045-2048.
- 179 Gabriel, F. L. P., Heidlberger, A., Rentsch, D., Giger, W., Guenther, K., Kohler, H. P. E., 2005. A  
novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by  
*Sphingomonas xenophaga* Bayram: ipso-hydroxylation and intramolecular rearrangement.  
*Journal of Biological Chemistry* 280, 15526-15533.
- 180 Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., 2000. Profile of a nonylphenol-degrading microflora and its  
potential for bioremedial applications. *Journal of Biochemistry* 128, 909-916.
- 181 Sasaki, M., Maki, J., Oshiman, K., Matsumura, Y., Tsuchido, T., 2005. Biodegradation of  
bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp strain AO1. *Biodegradation* 16, 449-  
459.
- 182 Kim, Y.M., Murugesan, K., Schmidt, S., Bokare, V., Jeon, J., Kim, E.Y., Chang, Y.S., 2011.  
Triclosan susceptibility and cometabolism- A comparison for three aerobic pollutant-  
degrading bacteria. *Bioresource Technology* 102, 2206-2212.
- 183 Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K., Miyamoto, K., 2003.  
Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions. *Journal of*  
*Bioscience and Bioengineering* 95, 200-203.
- 184 Ishihara, K. and Nakajima, N., 2003. Improvement of marine environmental pollution using  
eco-system: Decomposition and recovery of endocrine disrupting chemicals by marine phyto-  
and zooplanktons. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 23, 419-424.

- 185 Liu, Y., Guan, Y., Gao, Q., Tam, N.F.Y., Zhu, W., 2010. Cellular responses, biodegradation and bioaccumulation of endocrine disrupting chemicals in marine diatom *Navicula incerta*. *Chemosphere* 80, 592-599.
- 186 Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology* 31, 285-311.
- 187 Choudhary, M.I., Musharraf, S.G., Ali, R.A., Atif, M., Atta-ur-Rahman, 2004. Microbial transformation of antifertility agents, norethisterone and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences* 59, 319-323.
- 188 Bhatti, H.N., Khera, R.A., 2012. Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids* 77, 1267-1290.
- 189 Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashref, M., Legge, R.L., 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19, 771-783.
- 190 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* 37, 1972-1975.
- 191 Okazaki, S. Y., Michizoe, J., Goto, M., Furusaki, S., Wariishi, H., Tanaka, H., 2002. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 227-232.
- 192 Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, Č., Šašek, V., Mougín, C., 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiologica* 53, 289-294.
- 193 Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D., 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228, 1434-1436.
- 194 Lugaro, G., Carrea, G., Cremonesi, P., Casellato, M.M., Antonini, E., 1973. The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 159, 1-6.
- 195 Slavíková-Amemori, A., 2012. Aplikace ligninolytických hub na pevných substrátech pro degradace endokrinních disruptorů. Diplomová práce, Ústav pro životní prostředí, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- 196 Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S., Nishida, T., 2006. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65, 97-101.
- 197 Blaquez, P., Guieysse, B., 2008. Continuous biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* 150, 459-462.
- 198 Lee, S.M., Koo, B.W., Choi, J.W., Choi, D.H., An, B.S., Jeung, E.B., Choi, I.G., 2005. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 28, 201-207.
- 199 Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 1958-1962.
- 200 Kum, H., Lee, S., Ryu, S., Choi, H.T. 2011. Degradation of endocrine disrupting chemicals by genetic transformants with two lignin degrading enzymes in *Phlebia tremellosa*. *Journal of Microbiology* 49, 824-827.
- 201 Kang, A.-R., Choi, H.T., Song, H.-G., 2008. Optimization of bisphenol A biodegradation by *Trametes versicolor*. *Korean Journal of Microbiology* 44, 37-42.
- 202 Martin, C., Corvini, P.F.X., Vinken, R., Junghanns, C., Krauss, G., Schlosser, D., 2009. Quantification of the influence of extracellular laccase and intracellular reactions on the isomer-specific biotransformation of the xenoestrogen technical nonylphenol by the aquatic hyphomycete *Clavariopsis aquatica*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4398-4409.

- 203 Hundt K., Martin D., Hammer E., Jonas. U., Kindermann, M.K., Schauer, F., 2000. Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied and Environmental Microbiology 66, 4157-4160.
- 204 Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., Noguerol, T.-N., Piña, B., 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. Chemosphere 70, 445-452.
- 205 Demarche, P., Junghanns, C., Nair, R.R., Agathos, S.N., 2012. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. Biotechnology Advances 30, 933-953.
- 206 Tanaka, T., Yamada, K., Tonosaki, T., Konishi, T., Goto, H., Taniguchi, M., 2000. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. Water Science and Technology 42, 89-95.
- 207 Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S., Danieli, B., 2004. Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 $\beta$ -estradiol in organic solvents. Tetrahedron Asymmetry 15, 2927-2931.
- 208 Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T., 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. Chemosphere 42, 271-276.
- 209 Cabana, H., Jiwan, J.-L.H., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2007. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriopsis polyzona*. Chemosphere 67, 770-77.
- 210 Murugesan, K., Chang, Y.-Y., Kim, Y.-M., Jeon, J.-R., Kim, E.-J., Chang, Y.-S., 2010. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. Water Research 44, 298-308.
- 211 Kim, Y.-J., Nicell, J.A., 2006. Laccase-catalysed oxidation of aqueous triclosan. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81, 1344-1352.
- 212 Inoue, Y., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T., 2010. Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. Journal of Hazardous Materials 180, 764-767.
- 213 Lloret, L., Eibes, G., Feijoo, G., Moreira, M.T., Lema, J.M., 2012. Degradation of estrogens by laccase from *Myceliophthora thermophila* in fed-batch and enzymatic membrane reactors. Journal of Hazardous Materials 213-214, 175-183.
- 214 Kim, Y., Yeo, S., Kim, M.K., Choi, H.T., 2008. Removal of estrogenic activity from endocrine-disrupting chemicals by purified laccase of *Phlebia tremellosa*. FEMS Microbiology Letters 284, 172-175.
- 215 Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17beta-estradiol and ethynylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. Water Research 37, 1972-1975.
- 216 Cabana, H., Alexandre, C., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2009. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. Bioresource Technology 100, 3447-3458.
- 217 Mao, L., Huang, Q., Luo, Q., Lu, J., Yang, X., Gao, S., 2010. Ligninase-mediated removal of 17 $\beta$ -estradiol from water in the presence of natural organic matter: Efficiency and pathways. Chemosphere 80, 469-473.
- 218 Oakazaki, S.-Y., Furusaki, S., Goto, M., Tanaka, H., Wariishi, H., Kimura, M., Michizoe, J., 2004. Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles. Biotechnology and Bioengineering 88, 495-501.
- 219 Taboada-Puig, R., Junghanns, C., Demarche, P., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., Agathos, S.N. 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* 102, 6593-6599.
- 220 Songulashvili, G., Jimenéz-Tobón, G.A., Jaspers, C., Penninckx, M.J., 2012. Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal Biology* 116, 883-889.
- 221 Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., Mita, L., Diano, N., 2011. Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* 22, 673-683.
- 222 Črešnar, B., Petrič, Š., 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1814, 29-35.
- 223 Mori, T., Nakamura, K., Kondo, R., 2009. Fungal hydroxylation of polychlorinated naphthalenes with chlorine migration by wood rotting fungi. *Chemosphere* 77, 1230-1235.
- 224 Doddapaneni, H., Yadav, J.S., 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 559-565.
- 225 Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C.E., 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 292-295.
- 226 Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., Kelly, S.L., 1996. Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus. *FEMS Microbiology Letters* 135, 51-55.
- 227 Dlu-goński, J., Bartnicka, K., Zemełko, I., Chojecka, V., Sedlaczek, L., 1991. Determination of cytochrome P-450 in *Cunninghamella elegans* intact protoplasts and cell-free preparations capable of steroid hydroxylation. *Journal of Basic Microbiology* 31, 347-356.
- 228 Marco-Urrea, E., Perez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G., 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765-772.
- 229 Kasai, N., Ikushiro, S.-I., Shinkyō, R., Yasuda, K., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Sakaki, T., 2010. Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 773-780.
- 230 Autrup, H., 1990. Carcinogen metabolism in cultured human tissue cells. *Carcinogenesis* 11, 707-712.
- 231 Arcaro, K.F., O'Keefe, P.W., Yang, Y., Clayton, W., Gierthy, J.F., 1999. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. *Toxicology* 133, 115-127.
- 232 Vitas, M., Rozman, D., Komel, R., Kelly, S.L., 1995. P450-mediated progesterone hydroxylation in *Cochliobolus lunatus*. *Journal of Biotechnology* 42, 145-150.
- 233 Smith, K.E., Ahmed, F., Williams, R.A.D., Kelly, S.L., 1994. Microbial transformations of steroids - VIII. Transformation of progesterone by whole cells and microsomes of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 49, 93-100.
- 234 Kamei, I., Kogura, R., Kondo, R., 2006. Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 566-575.
- 235 Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y., 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 582-594.
- 236 Shim, S.-S., Kawamoto, K., 2002. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research* 36, 4445-4454.
- 237 Karimi, A., Vahabzadeh, F., Mohseni, M., Mehranian, M., 2009. Decolorization of maxilon-red by kissiris immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a trickle-bed bioreactor-involvement of ligninolytic enzymes. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 28, 1-13.



- 238 Deguchi, T., Kakezawa, M., Nishida, T., 1997. Nylon degradation by lignin-degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology 63, 329-334 .
- 239 Povedič, J., Hasal, P., Novotný, Č., 2009. Decolorization of organic dyes by *Irpex lacteus* in a laboratory trickle-bed biofilter using various mycelium supports. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84, 1031-1042.
- 240 Liang, H., Gao, D-W., Zeng Y-G, 2012. Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on different carries. Bioprocess and Biosystem Engineering 35, 1179-1184.
- 241 Ortega-Clemente, A., Marín-Mezo, G., Ponce-Noyola, M.T., Montes-Horcasitas, M.C., Caffarel-Méndez, S., Barrera-Cortés, J., Poggi-Varaldo, H.M., 2007. Comparison of two continuous fungal bioreactors for posttreatment of anaerobically pretreated weak black liquor from kraft pulp mills. Biotechnology and Bioengineering 96, 640-650.
- 242 Field, J.A., Sierra-Alvarez, R. , 2008. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. Environmental Pollution 155, 1-12.
- 243 Brown, J.F., Bedard, D.L., Brennan, M.J., Carnahan, J.C., Feng, H., Wagner, R.E., 1987. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments. Science 236, 709-712.
- 244 Furukawa, K., Tomizuka, N., Kamibayashi, A., 1979. Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. Applied and Environmental Microbiology 38, 301-310.
- 245 Kobayashi, K., Katayama-Hirayama, K., Tobita, S., 1996. Isolation and characterization of microorganisms that degrade 4-chlorobiphenyl to 4-chlorobenzoic acid. Journal of General and Applied Microbiology 42, 401-410.
- 246 Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., Demnerová, K., 1997. Bakteriální degradace PCB. Chemické Listy 91, 858-866.
- 247 Vyas, B.R.M., Šašek, V., Matucha, M., Bubner, M., 1994. Degradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by selected white rot fungi. Chemosphere 28, 1127-1134.
- 248 Kubatova, A., Erbanova, P., Eichlerova, I., Homolka, L., Nerud, F., Sasek, V., 2001. PCB congenerselective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. Chemosphere 43, 207-215.
- 249 Yadav, J.S., Quensen, J.F., Tiedje, J.M., Reddy, C.A., 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. Applied and Environmental Microbiology 61, 2560-2565.
- 250 Kamei, I., Sonoki, S., Haraguchi, K., Kondo, R., 2006. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. Applied Microbiology and Biotechnology 73, 932-940.
- 251 Keum, Y.S., Li, Q.X., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. Chemosphere 56, 23-30.
- 252 Fujihira, S., Higuchi, R., Hisamatsu, S., Sonoki, S., 2009. Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. Applied Microbiology and Biotechnology 82, 853-860.
- 253 Ning, D., Wang, H., Zhuang, Y., 2010. Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. Biodegradation 21, 297-308.
- 254 Ogawa, N., Miyashita, K., Chakrabarty, A.M., 2003. Microbial genes and enzymes in the degradation of chlorinated compounds. Chemical Record 3, 158-171.
- 255 Haggblom, M.M., 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. FEMS Microbiology Letters 103, 29-71.
- 256 Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroids hormones from water: A review. Environmental Pollution 165, 38-58.

## PŘÍLOHA A

Příloha A obsahuje doplňující informace ke kapitole 5.4.1 a 5.7.3.

**Tabulka 9** Aktivity ligninolytických enzymů studovaných kmenů kultivovaných na tekutém komplexním médiu bez přídavku (BK) a s přídavkem EE2. Hodnoty jsou uvedeny ve formě průměru z 3 paralel ± směrodatná odchylka. ND – nedetekováno, NM - nestanoveno

Kmen		den kultivace – BK				den kultivace – EE2			
		2 mU/ml	4 mU/ml	6 mU/ml	8 mU/ml	2 mU/ml	4 mU/ml	6 mU/ml	8 mU/ml
<i>P. ostreatus</i>	Lakáza	75,7±4,3	75,7±4,3	75,0±6,2	46,9±2,2	45,5±2,1	45,5±2,1	44,9±8,2	22,4±8,2
	MnP	0,4±0,2	0,4±0,2	31,7±7,6	9,6±2,4	1,7±0,7	1,7±0,7	20,0±4,1	10,2±5,2
	MiP	8,3±2,6	8,3±2,6	7,9±2,5	1,2±0,2	7,0±1,2	7,0±1,2	1,9±0,4	1,2±1,2
<i>T. versicolor</i>	Lakáza	1,0±0,1	17,3±2,3	10,7±2,9	NM	45,5±2,1	45,5±2,1	44,9±8,2	22,4±8,2
	MnP	2,7±1,0	2,1±0,5	8,7±1,6	NM	0,4±0,1	4,4±1,1	1,6±0,7	10,2±5,2
	MiP	0,1±0,0	1,8±0,7	0,1±0,0	NM	0,4±0,0	ND	ND	1,2±0,0
<i>D. squalens</i>	Lakáza	4,8±0,8	14,1±6,1	21,1±4,6	NM	0,8±0,2	8,6±2,3	5,6±0,1	11,5±1,4
	MnP	ND	0,9±0,0	ND	NM	ND	ND	0,6±0,0	ND
	MiP	ND	ND	ND	NM	ND	ND	ND	ND
<i>P. cinnabarinus</i>	Lakáza	6,2±2,3	8,9±1,2	6,4±2,1	9,9±3,2	ND	ND	11,5±3,1	7,5±1,0
	MnP	ND	ND	1,4±0,5	3,0±0,2	ND	1,1±0,1	1,0±0,3	ND
	MiP	ND	ND	ND	ND	ND	0,1±0,0	0,4±0,0	ND
<i>B. adusta</i>	Lakáza	ND	ND	ND	0,3±0,1	ND	ND	ND	3,4±1,0
	MnP	13,4±2,3	13,4±3,2	2,9±0,9	0,2±0,0	14,0±4,1	3,6±1,2	ND	ND
	MiP	16,0±4,6	6,6±2,0	0,3±0,1	ND	16,2±2,6	5,5±2,7	ND	ND
<i>I. lacteus</i>	Lakáza	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MnP	6,3±1,0	0,5±0,2	10,7±2,1	ND	6,1±0,3	0,9±0,6	9,7±0,2	ND
	MiP	1,5±0,3	4,6±1,5	1,6±1,1	ND	3,4±0,7	4,2±2,3	2,0±0,1	ND
<i>P. tigrinus</i>	Lakáza	31,3±1,5	28,2±2,6	16,5±1,3	18,5±8,5	38,8±2,8	41,3±4,3	27,6±2,6	26,3±2,3
	MnP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MiP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

**Tabulka 10** Reziduální množství ED ( $\mu\text{g}/\text{system}$ ) po 9 denní kultivaci kmenů hub na slámových substrátech v prostředí uměle kontaminované pitné (KV) a reálné odpadní (OV) vody. Hodnoty jsou průměrem ze 3 paralel.

	<i>I. lacteus</i>			<i>P. ostreatus</i>			<i>P. tigrinus</i>			<i>T. versicolor</i>		
	KV ED	OV ED	HKC	KV ED	OV ED	HKC	KV ED	OV ED	HKC	KV ED	OV ED	HKC
	$\mu\text{g}/\text{system}$			$\mu\text{g}/\text{system}$			$\mu\text{g}/\text{system}$			$\mu\text{g}/\text{system}$		
<b>E1</b>	11,27	13,43	83,50	5,33	5,00	76,39	4,29	13,81	82,34	8,42	0,00	75,30
std	1,13	0,96	3,60	1,50	2,00	7,64	1,40	1,38	8,23	0,84	0,00	7,53
<b>E2</b>	5,44	15,79	56,63	7,53	8,08	55,30	4,66	6,87	53,56	4,76	1,22	45,60
std	0,71	2,05	7,36	2,60	1,05	12,50	0,61	0,89	5,60	0,62	0,16	5,93
<b>E3</b>	18,28	10,00	64,50	6,07	6,50	61,30	10,28	8,95	52,30	0,00	0,00	42,69
std	2,74	1,50	9,68	0,91	0,98	9,20	1,90	1,34	9,80	0,00	0,00	6,40
<b>EE2</b>	0,96	22,72	61,67	4,94	0,00	59,84	0,00	58,25	57,32	6,55	0,00	75,57
std	0,21	5,00	16,50	1,09	0,00	13,16	0,00	4,20	12,61	2,30	0,00	10,50
<b>NP</b>	37,33	32,65	58,76	6,56	4,90	56,54	47,53	69,97	79,00	2,67	1,47	66,30
std	3,36	2,94	5,29	0,48	0,44	5,09	4,28	7,60	7,11	0,24	0,13	5,97
<b>BPA</b>	2,40	8,84	80,20	7,66	8,60	70,92	2,38	2,65	73,53	1,96	0,00	49,57
std	0,31	1,15	10,43	2,60	1,12	9,22	0,31	0,34	9,56	0,25	0,00	6,44
<b>IRG</b>	9,77	64,30	67,15	12,74	9,36	69,40	9,59	65,36	72,50	9,70	3,99	65,30
std	0,98	6,43	6,71	1,27	0,94	6,94	0,96	6,54	7,25	1,47	0,40	6,53

## PODĚKOVÁNÍ

V prvé řadě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za vedení této práce a dále také za trpělivost, cenné rady a poskytnutí výborných pracovních podmínek při vypracování a sepisování. Moje velké poděkování patří také Dr. Monice Möder, Ph.D. za zasvěcení do oboru hmotnostní spektrometrie. Děkuji také Mgr. Kateřině Svobodové a Ph.D., Stefanu Covinovi, Ph.D. za konzultace, rady a pomoc při experimentech a dále RNDr. Martinovi Ezechiášovi za vypracování vzorků estrogenních aktivit, Mgr. Monice Čvančarové za rady ohledně statistiky a Bc. Aleně Filipové za kultivace mikroorganismů.

Moje velké poděkování patří všem bývalým i současným členům Laboratoře environmentální biotechnologie za vynikající, inspirující a přátelské prostředí a všem dalším kamarádům z Mikrobiologického a Fyziologického ústavu AVČR.

Nejvíce však chci poděkovat své rodině za podporu.



## PŘÍLOHA B – PUBLIKACE 1-8

PUBLIKACE 1.....	<b>93</b>
PUBLIKACE 2 .....	<b>101</b>
PUBLIKACE 3.....	<b>113</b>
PUBLIKACE 4 .....	<b>119</b>
PUBLIKACE 5.....	<b>129</b>
PUBLIKACE 6 .....	<b>137</b>
PUBLIKACE 7.....	<b>147</b>
PUBLIKACE 8.....	<b>155</b>



## MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE ENDOKRINNĚ DISRUPTIVNÍCH LÁTEK

ZDENA KŘESINOVÁ, KATEŘINA SVOBODOVÁ  
a TOMÁŠ CAJTHAML

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

Došlo 16.1.08, přijato 10.4.08.

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

### Obsah

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

### 1. Úvod

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

## 4. Odbourávání endokrinních disruptorů

### 4.1. Fyzikální a chemické odstraňování endokrinních disruptorů

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

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

### 4.2. Degradace v čistírnách odpadních vod

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

Rada autorů popsala mechanismus degradace neiontových detergentů alkylnol-polyethoxylátů při zpracování

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

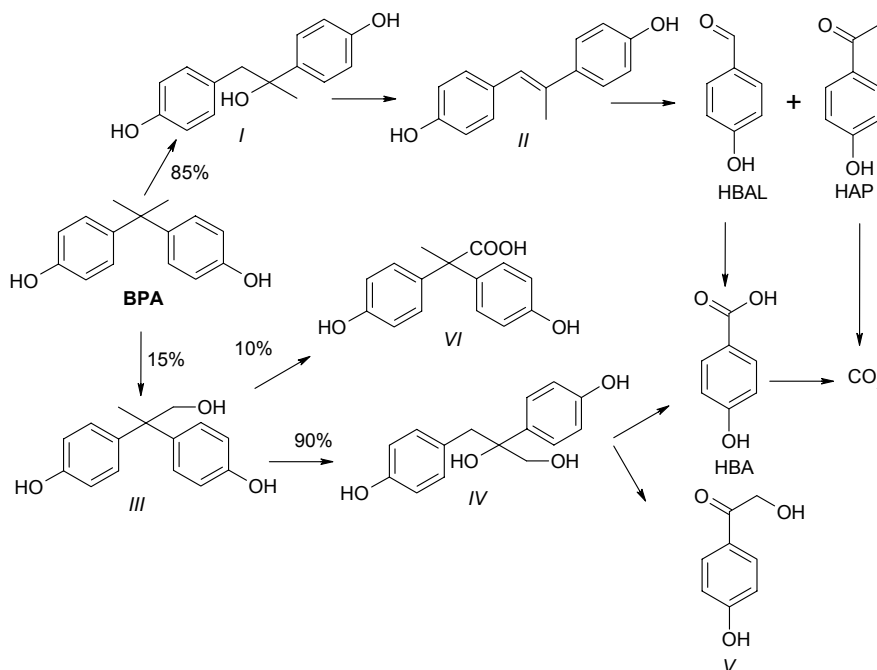
Značný zájem vyvolávají ve vodních tocích zjištěné estrogenní hormony (např. cit.<sup>4</sup>) 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, které byly detegovány všudypřítomně ve výpustích z ČOV a je jim přisuzována odpovědnost za většinu estrogenních efektů<sup>9,70</sup>. Přestože některé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

#### 4.3. Bakteriální zpracování endokrinních disruptorů

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

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

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



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

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

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

#### 4.4. Plankton a degradace endokrinních disruptorů

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

#### 4.5. Degradace pomocí hub

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5. Závěr

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

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

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

## LITERATURA

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

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

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

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

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

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

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



## Review

Microbial transformation of synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol

Tomáš Cajthaml\*, Zdena Křesinová, Kateřina Svobodová, Karel Sigler, Tomáš Řezanka

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

Current knowledge of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol microbial transformation is summarized.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 March 2009

Received in revised form

10 June 2009

Accepted 16 June 2009

## Keywords:

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol

Microbial biodegradation

Ligninolytic fungi

Endocrine disrupters

## ABSTRACT

Natural estrogens such as estrone, 17 $\beta$ -estradiol, estriol, and the particularly recalcitrant synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol used as oral contraceptive, accumulate in the environment and may give rise to health problems. The processes participating in their removal from soil, wastewater, water-sediments, groundwater-aquifer material, and wastewater or sewage treatment plant effluents may involve the action of bacterial and microbial consortia, and in some cases fungi and algae. This review discusses the different efficiencies of bacterial degradation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol under aerobic and anaerobic conditions, the role of sulfate-, nitrate-, and iron-reducing conditions in anaerobic degradation, and the role of sorption. The participation of autotrophic ammonia oxidizing bacteria and heterotrophic bacteria in cometabolic degradation of estrogens, the estrogen-degrading action of ligninolytic fungi and their extracellular enzymes (lignin peroxidase, manganese-dependent peroxidase, versatile peroxidase, laccase), and of algae are discussed in detail.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Synthetic and natural estrogens are a group of environmental pollutants known for their negative influence, particularly on aquatic organisms. Due to the widespread presence in the environment and endocrine activity even at low concentrations e.g. as low as 0.1 ng L<sup>-1</sup> of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) that induces vitellogenesis in male rainbow trout (Purdom et al., 1994; Aerni et al., 2004), these endocrine disrupters have received increased attention in water quality management and health care (Colborn et al., 1993). Many studies demonstrated that certain chemicals called endocrine disrupting compounds (EDCs) are able to mimic hormones or interfere with the action of endogenous hormones. The natural estrogens estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), estriol (E3), and particularly the synthetic estrogen EE2; which is hugely used as an oral contraceptive, bind to the estrogen receptor and can misregulate or interfere with normal biological responses. By mimicking natural hormones or disrupting signal pathways as endocrine disrupters, estrogens can stimulate the growth of human breast cancer cells (Soto et al., 1991), or induce the expression of

vitellogenin in fish (Kwak et al., 2001); both mechanisms are used to prove estrogen activity in bioassays. Non-metabolized EE2 and its conjugates are excreted into wastewater. During sewage treatment, EE2 is released from the corresponding conjugates by hydrolysis and reaches the environment via the effluents of wastewater treatment plants (Tyler and Routledge, 1998). Due to incomplete removal during the waste treatment process, synthetic and natural estrogens are considered to be major contributors to the estrogenic activity associated with wastewater treatment plant effluents (Gutendorf and Westendorf, 2001; Pauwels et al., 2008a, reviewed in Clouzot et al., 2008).

This increasing environmental and public health risk requires the development of novel approaches to eliminate these compounds from the environment. However, due to certain persistency, particularly of EE2 towards microbial transformation, it is necessary to carefully identify microorganisms that are able to transform this compound and to clarify metabolic processes that can lead to the loss of estrogenic activity.

The aim of this article is to summarize current knowledge about microbial transformation of mainly EE2 by bacteria, fungi, algae and consortia of microbes during wastewater treatment processes that have been studied from this aspect.

## 2. Bacterial transformation

Table 1 reports the summary of degradation processes of EE2 and other EDCs; the type of treatment, the matrix in which the treatment was performed, and the removal rates are specified.

List of abbreviations: EE2, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol; EDCs, endocrine disrupting compounds; E1, estrone; E2, 17 $\beta$ -estradiol; E3, estriol; AOB, ammonia oxidizing bacteria; LiP, lignin peroxidase; MnP, manganese-dependent peroxidase; VP, versatile peroxidase; Lac, laccase; HRP, horseradish peroxidase; PPCPs, pharmaceuticals and personal care products; WWTPs, wastewater treatment plants; SRT, sludge retention time; MBR, membrane bioreactor.

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.

E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).



**Table 1**  
Transformation of EE2 and other EDCs with various treatments.

Type of degradation	EDCs studied	EE2 degradation	Degradation conditions	Notes	References
Cultures established from lake water and sediments	EE2, and E2	no anaerobic degradation of EE2 (initial concentration 5 mg L <sup>-1</sup> ) over long incubation period (over three years)	methanogenic, sulphate-, iron-, and nitrate-reducing anaerobic conditions	E2 transformed to estrone	Czajka and Londry, 2006
Water-sediments, groundwater-aquifer material	EE2, E2, bisphenol A, and 4-n-nonylphenol	rapid degradation of all EDCs in both media with >90% of them within the first 2–4 d under both conditions	aerobic conditions and sulfate-, nitrate-, and iron-reducing anaerobic conditions	90% dissipation time under anaerobic conditions >1000 d (EE2)	Sarmah and Northcott, 2008
Water-sediments, groundwater-aquifer material	EE2, E2, bisphenol A, 4-tert-octylphenol, 4-n-nonylphenol	no degradation of EDCs under anaerobic condition, under aerobic condition EE2 concentration decreased within 70 d from 1 to 0.62 µg g <sup>-1</sup> in the aquifer material	aerobic and anaerobic conditions, sorption test at room temperature	highest sorption to the aquifer material had 4-n-Nph, E2 and EE2 had modest sorption	Ying et al., 2003
Groundwater-aquifer material	E2, EE2, bisphenol A, 4-tert-octylphenol and 4-n-nonylphenol	under aerobic conditions rapid degradation of EDCs except EE2 (initial conc. 5 mg L <sup>-1</sup> ), the EE2 half-lives about 26d in groundwater and 15d in the effluent microcosm	microcosm with aquifer material and groundwater mixture or effluent mixture in the presence of glucose under both aerobic and anoxic conditions	under anoxic conditions biodegradation only of E2 in either water type	Ying et al., 2008a
<i>Nitrosomonas europaea</i> from nitrifying activated sludge	E1, E2, E3, and EE2	first order reaction kinetics 0,035h <sup>-1</sup> for EE2, 0,030 h <sup>-1</sup> for E3, 0,056 h <sup>-1</sup> for E1, and 1.3 h <sup>-1</sup> for E2 (initial conc. 0.4 mg L <sup>-1</sup> )	batch experiment using nitrifying activated sludge from Tokio and using isolated strain <i>N. europaea</i>	addition of allylthiourea reduced the estrogen-degrading activity	Shi et al., 2004
<i>Nitrosomonas europaea</i> and <i>Nitrosospira multififormis</i> from nitrifying activated sludge	EE2	EE2 (initial concentration 300 mg L <sup>-1</sup> ) removal via nitration	batch tests with NH4-N addition (200–500 mg L <sup>-1</sup> )	nitrate degradation products, at high NH4-N concentration degradation by AOB, or to abiotic nitration, at low concentration due to heterotrophic bacteria	Gaulke et al., 2008
Ammonium monooxygenase containing culture extract	EE2	biotransformation via EE2-hydroxylation on an A ring	nitrifying bioreactor with sludge recycle operated at HRT of 0.75d and SRT of 20d	relationship between nitrification and EE2 removal in enriched nitrifying cultures	Yi and Harper, 2007
Nitrifying activated sludge	E1, E2, and EE2	high biological stability of EE2 compared to with E1	activated sludge from sequencing batch reactor (stored max. three weeks at 5–8 °C)	involvement of ammonia monooxygenase in biotransformation of EE2 into EE2-OH	Ren et al., 2007b
Nitrifying activated sludge	EE2	biodegradation of EE2 more important than biosorption under the condition of the high initial ammonia concentration (>48 mg L <sup>-1</sup> )	sorption and biodegradation in laboratory scale bioreactors	relationship between biomass particle size, hydrophobicity, and sorption capacity	Yi et al., 2006
<i>Acinetobacter</i> , <i>Agromyces</i> , and <i>Sphingomonas</i>	E1, E2, E3, and EE2	under aerobic conditions, degradation rates of estrogens increased with the initial concentration (range 50–200 µg L <sup>-1</sup> )	aerobic and anoxic conditions in microcosm constructed with marine sand and ultra filtered secondary effluent	EE2 remained stable during cultivation with all the three isolates	Ke et al., 2007
<i>Rhodococcus zopfii</i> and <i>R. equi</i>	E1, E2, E3 and EE2	<i>R. zopfii</i> removed completely 100 mg L <sup>-1</sup> of EE2 within 24 h	cultivation under aerobic conditions in test tubes at 25 °C for 24 h	enrichment culture of activated sludge from Japanese STWs	Yoshimoto et al., 2004
<i>Sphingobacterium</i> sp. JCR5	E1, E2, E3, EE2 and mestranol	removal of 87% of the substrate added (30 mg L <sup>-1</sup> ) within 10 days	bacterial strain isolated from STW of an oral contraceptives producing factory in China in a test tube and a rotating reactor	metabolic pathway for EE2 degradation	Ren et al., 2007a
Laccase from <i>Trametes</i> sp. and <i>Pycnoporus coccineus</i>	EE2 adsorbed on sea sand	removed EE2 within 48 h in the test tube to the extent of 90%	in a test tube and a rotating reactor	laccase activity of 0.8 U mL <sup>-1</sup>	Tanaka et al., 2001
Manganese peroxidase and the laccase from <i>P. chrysosporium</i> and from <i>T. versicolor</i> cultures	E2, and EE2	E2 and EE were completely transformed within 1 h, estrogenic activity disappeared within 1h also	mediator system with 1-hydroxybenzotriazole	MnP activity of 10 nkat mL <sup>-1</sup> , monitored also the course of estrogenic activities	Suzuki et al., 2003
Horseradish peroxidase	E1, E2, E3, and EE2	at pH 8 removed 96–100% of E2, E3, and EE2 within 1 h	effect of temperature and pH on enzymatic kinetics	HRP activity of 0.017 U mL <sup>-1</sup>	Auriol et al., 2006
Laccase	Steroid estrogens	laccase was able to achieve complete removal	synthetic water and municipal wastewater	laccase (20 U mL <sup>-1</sup> ), 1-hydroxy-benzotriazole - mediator, improved laccase-catalyzed system efficiency	Auriol et al., 2007a
<i>Trametes versicolor</i> laccase and HRP	E1, E2, E3, and EE2	estrogens (100 ng L <sup>-1</sup> ) were completely oxidized with both the enzymes in the wastewater reaction mixtures after a 1h treatment	batch reaction at 25 °C with the buffered (pH 7) reaction mixture or wastewater	laccase activity of 20 U mL <sup>-1</sup> HRP activity of 8–10 U mL <sup>-1</sup>	Auriol et al., 2008

Table 1 (continued)

Type of degradation	EDCs studied	EE2 degradation	Degradation conditions	Notes	References
<i>T. versicolor</i>	EE2, and E2	EE2 removal in the batch 0.44 mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> (initial conc. 7.3 mg L <sup>-1</sup> ) in the bioreactor 0.09 mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> (initial conc. 10 mg L <sup>-1</sup> )	experiments in the batch, and the bioreactor	the technical feasibility of fungal treatment (estrogens) using continuous bioreactor with suspended fungal biomass	Blázquez and Guieysse, 2008
<i>Irpex lacteus</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Phanerochaete chryso sporium</i> , <i>Phanerochaete magnoliae</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> 3004, <i>Trametes versicolor</i> , <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , <i>Dichomitus squalens</i>	EE2, bisphenol A, irgasan, 4-n- nonylphenol, and 4-nonylphenol	<i>I. lacteus</i> and <i>P. ostreatus</i> totally degraded EE2 within 3 days (initial concentration 10 mg L <sup>-1</sup> )	static cultures incubated with EDCs and harvested after 3, 7 and 14 days	determination of estrogenic activity using a recombinant yeast assay	Cajthaml et al., 2009
<i>Cephalosporium aphidicola</i> <i>Cunninghamella elegans</i>	EE2, and norethisterone	EE2 initial concentration 0.2 mg mL <sup>-1</sup> media	experiment in a liquid medium	work focused on identifying metabolites of EE2 and norethisterone	Choudhary et al., 2004
pathogenic ascomycete <i>Fusarium proliferatum</i> strain HNS-1	EE2	97% of the EE2 removed from the culture after 15 days (initial concentration 25 mg L <sup>-1</sup> )	batch experiment	isolating EE2 degrading microorganism	Shi et al., 2002
17 different natural soils	E1, E2, and EE2 (unlabeled and <sup>14</sup> C- labelled)	E2 and E1 degraded with much greater degree than EE2 (initial concentrations 120, 60, 12, 6 and 1.2 µg g <sup>-1</sup> ) in all tested soils	laboratory microcosm incubations with addition of ammonium nitrate, alanine, glucose, catechol or streptomycin	two grassland soils, two forest and 14 agricultural soils	Stumpe and Marschner, 2009
Agricultural land	E1, E2, and EE2 (E1, E2 were <sup>14</sup> C labelled compounds)	E2 and EE2 were rapidly removed in soil conditions typical of a temperate growing season (initial concentrations from 0.1 to 10 mg kg <sup>-1</sup> )	three soils varying widely in texture and properties, a sandy loam, and silt loam were used in laboratory microcosm incubations	EE2 stability was evaluated in the absence of oxygen	Colucci and Topp, 2001a,b
Agricultural land	E1, E2, EE2, and 4-nonylphenol	half-lives ranging from a few hours to a few days	soil microcosms in laboratory incubation with the C <sup>14</sup> or H <sup>3</sup> labelled compounds	estrogens were rapidly removed from aerated soils under temperate growing conditions	Lorenzen et al., 2006
Four various soils	E1, E2, E3, EE2 and other EDs	under aerobic conditions degradation within 7 d, under anaerobic no degradation of the chemicals except for E2	sorption test using a batch equilibrium method, biodegradation experiments under aerobic and anaerobic conditions	estrogens were adsorbed on soils in the order EE2, E2, E1, E3	Ying and Kookana, 2003
WWTP and activated sludge	E1, E2, E3, EE2, and nonylphenol	the highest estrogen removal in the STW which only used primary treatment	estrogens in the effluent of 17 STW included primary chemical treatment only, submerged aerated filter, oxidation ditch, activated sludge, and trickling filter combined with activated sludge	EE2 was detected only in effluents of two STWs	Johnson et al., 2005
WWTPs	E1, E2, E3, and EE2	E1 and EE2 were more persistent during the treatment than the other estrogens	four South Australian STWs with different technologies	the least efficient STWs was consisted of a series of anaerobic and aerobic lagoons	Ying et al., 2008b
WWTP	E1, E2, E3, EE2, and nonylphenols	EE2 removal only 3% (24 h), during the 7 day treatment period removal increased only up to 5.6%.	nitrifying activated sludge plant in England	excellent removal for other estrogens and nonylphenols (97–99%) and 98% removal of estrogenic activity	Kanda and Churchley, 2008
WWTP and receiving water	E1, E2, and EE2	higher estrogens removal linked to higher biomass concentration	relationship between the equivalent biomass concentration and estrogens degradation rate constant in various environments	The EE2 correlation R <sup>2</sup> = 0.73 between the logarithm of the rate constant and the corresponding logarithm equivalent biomass concentration	Cao et al., 2008
WWTP	E1, E2, E3, EE2 and their conjugates form	>90% removal estrogen concentration and estrogenicity during biological treatment, E1, E2 and EE2 persisted in the treat water below 10 ng L <sup>-1</sup>	estrogens inlet concentration 200–500 ng L <sup>-1</sup> , estrogenic activity between 25 and 130 ng L <sup>-1</sup> of E2 equivalents	small fraction sorbed to the sludge, the main vehicle of estrogen elimination was biodegradation	Muller et al., 2008
Activated and inactivated sludge	biphenol A, E2, and EE2	high adsorption affinity of the compounds to the adsorbent (initial concentration 2.5 0 × 10 <sup>-5</sup> to 50 mg L <sup>-1</sup> )	inactivation of the sludge with 0.5 ml L <sup>-1</sup> mercury(II)sulphate	the adsorption was found to depend on pH	Clara et al., 2004
Municipal WWTPs	E1, and EE2	the efficiency (>90%) of E1 and EE2 removal	various redox conditions in batch experiment	the importance of aerobic conditions for the removal of all estrogens	Joss et al., 2004

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Type of degradation	EDCs studied	EE2 degradation	Degradation conditions	Notes	References
Municipal WWTP and industrial WWTP	<sup>14</sup> C-labelled estrogenic compounds	the mineralization of EE2 in MTP during 24 h, with only 40% mineralized to <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (25–75 fold less than that of E2)	biosolids from four municipal treatment plants and one industrial plant	the mineralization of estrogens in MTP 70–80% during the 24 h, in ITP only 4%	Layton et al., 2000
Activated sludge	E1, E2, and EE2	no significant loss of the sum of estrogens	under strictly anaerobic conditions	adsorption to sludge accounted for a 32–35% loss from the liquid phase	Mes et al., 2008
Activated sludge biomass	EE2	spontaneous sorption EE2 to activated sludge (initial concentration 100–500 µg L <sup>-1</sup> ) primary due to physisorption and low-level chemisorption	experiments with biomass from membrane bioreactor and sequencing batch over a range of temperatures in short time frame (0–25 min)	to prevent biodegradation sodium azide addition	Xu et al., 2008
Activated sludge	EE2	under aerobic conditions 22% removal, under anoxic conditions EE2 persistent	relationship between availability of oxygen, nitrification rate, and estrogen removal	the higher removal of estrogens associated with higher nitrification rate	Dytczak et al., 2008
Nitrite-accumulating sequencing batch reactors	E1, E2, and EE2	EE2 removal adversely affected with SRT shorter than 5.7 days and significantly lower when SRT longer than 7.5 days	two nitrite-accumulating sequencing batch reactors with different sludge ages operating under aerobic conditions and anoxic/anaerobic/aerobic conditions	cause of nitrite toxicity and the inhibition of the monooxygenase (AMO) and the microbial population	Pholchan et al., 2008
Aerated nitrifying submerged fixed bed bioreactors	E2, and EE2	complete EE2 removal from the synthetic STWs at loading rates 11 µg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> (initial concentration from 11 to 143), 90% removal of EE2 (80 µg L <sup>-1</sup> ) in reactor within 12 days	lab-scale reactors (volume 1.4 l) with a flow velocity 1 m h <sup>-1</sup> and continues aeration and the batch reactors	in the batch test, no or little removal of EE2 in heat-treated effluent, EE2 removal by AOB continued also after several months of starvation	Forrez et al., 2009a
Membrane bioreactor	two differently labelled radioactive forms of EE2	radioactivity mainly remained sorbed in the reactor (removal of 80%), the real mineralization <1%, EE2 conc. 8 g L <sup>-1</sup>	a membrane bioreactor (MBR) operating with 25 days SRT during the whole experimental period (35 days)	elimination pathway does not involve the removal of the ethinyl group from EE2 molecule	Cirja et al., 2007
11 microalgae strains	EE2	<i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>S. vacuolatus</i> and <i>Ankistrodesmus braunii</i> were able to biotransform the substrate	10 mg of EE2 to 50 mL of axenic algal cultures with an initial concentration of 160 mg L <sup>-1</sup> dry weight	identified several transformation products	Della Greca et al., 2008

To assess the role of bacterial degradation in the fate of estrogenic steroids in the environment, the transformation of estrogens was studied under both aerobic and anaerobic conditions. Czajka and Londry (2006) investigated the potential for anaerobic biodegradation of EE2 and E2 using cultures established from lake water and sediments. No anaerobic degradation of EE2 (5 mg L<sup>-1</sup>) was observed in their experiments. Although E2 could be transformed to estrone, the complete degradation of estrogens was minimal, suggesting that they accumulate in anoxic environments. On the contrary, a rapid degradation of four estrogens, including EE2, was observed in river water-sediments and groundwater-aquifer material under aerobic conditions (Sarmah and Northcott, 2008). The 90% dissipation time values for all compounds ranged from 0.9 to 2.8 days under both conditions. Under anaerobic conditions, however, the 90% dissipation time values for EE2 exceeded 1000 days. Anaerobic degradation of estrogenic compounds in this study was attributed to the sulfate-, nitrate-, and iron-reducing conditions. It was also postulated that overall degradation of the compounds was influenced by abiotic factors accounting for up to 40% degradation. The authors suggested that these abiotic factors could include hydrolysis, chemical reduction, photolysis, irreversible sorption or volatilization. Furthermore, they stated that E2, EE2 can also undergo surfaced-induced abiotic transformation due to the catalytic effect of various clay minerals.

Similarly, Ying et al. (2003) reported an aerobic degradation of E2 and 4-n-nonylphenol in the aquifer material with a half-life of the chemicals equal to 2 and 7 days. EE2 was degraded slowly with an estimated half-life of 81 days, with little or no degradation of estrogens observed within 70 days under anaerobic conditions in native groundwater. In another experiment Ying et al. (2008a)

described faster degradation of EE2 under aerobic conditions in effluent supplemented or unsupplemented aquifer material. EE2 had a half-life of 15 days compared with 26 days in the aquifer material and groundwater microcosm. Biodegradation was not significant under anoxic conditions. Higher resistance of EE2 to biodegradation, when compared to E2, was proven also with microorganisms from water samples of English and Japanese rivers (Jurgens et al., 2002; Matsuoka et al., 2005). Aerobic degradation of five endocrine disrupting compounds – bisphenol A, E2, EE2, 4-tert-octyl phenol, and 4-n-nonylphenol – in seawater collected from the coastal area of South Australia demonstrated that the chemicals could be degraded by aerobes in seawater once the microbes in water became acclimated to the chemicals (Ying and Kookana, 2003). The study showed that EE2 (together with bisphenol A and E2) was degraded in water within 56 days with a lag phase preceding its fastest degradation. EE2 was also found to be degraded in the marine sediment under aerobic conditions (t<sub>1/2</sub> > 20 d) while under anaerobic conditions no degradation was noted.

In comparison with aquifer and marine environments, relatively fast EE2 degradation was reported in agricultural soils and nitrifying activated sludge (Vader et al., 2000; Colucci and Topp, 2001a,b). Shi et al. (2004) demonstrated the link between the ammonia oxidizing bacteria (AOB) from nitrifying activated sludge and biodegradability of natural and synthetic estrogens, including EE2. The addition of allylthiourea, an ammonia oxidation inhibitor, significantly reduced the estrogen-degrading activity of activated sludge and inhibited the growth of AOB. These results suggested that other microorganisms apart from AOB are also involved in estrogen degradation by nitrifying activated sludge. The estrogen

degradation potential of AOB was further demonstrated with an isolated strain of *Nitrosomonas europaea* when the strain was able to decompose  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of EE2 within 96 h during a batch experiment. Its ability of estrogen degradation was also inhibited by allylthiourea (Shi et al., 2004). Later tests in a stirred tank bioreactor showed a linear relationship between nitrification and EE2 removal by enriched cultures of autotrophic ammonia-oxidizers; this implied cometabolic transformation of EE2 by the organisms (Yi and Harper, 2007). The cometabolism of AOB dominated also the degradation of estrone and estradiol in nitrifying activated sludge (Ren et al., 2007b). The appearance of EE2-OH as a metabolite then provided evidence for an involvement of ammonia monooxygenase in AOB EE2 transformation. The role of the enzyme in the process was proven under in vitro conditions when EE2 was degraded in the presence of an ammonium monooxygenase-containing culture extract (Yi and Harper, 2007). Gaulke et al. (2008) isolated two ammonia oxidizing bacterial strains, *N. europaea* and *Nitrosospira multiformis*, and described EE2 removal under  $\text{NH}_4$  supplemented conditions. On the basis of their results they suggested that EE2 removal at low nitrogen ( $\text{NO}_2$ ) concentration, usually found in municipal treatment activated sludge systems, is most likely due to organotrophic bacteria rather than the ammonia oxidizing bacteria. In experiments testing EE2 sorption to nitrifying activated sludge, biosorption of EE2 by the biomass was shown to be affected by the initial ammonia concentration (Yi et al., 2006). At higher initial ammonia concentrations the role of biodegradation became more important in EE2 removal than its biosorption.

Recently, several studies characterized the estrogen degradation potential of various isolated bacterial strains. The first E2 degrading bacterium *Novosphingobium tardagens* was isolated from activated sludge (Fujii et al., 2002). However, not all estrogen-degrading bacteria were shown to degrade recalcitrant EE2. Ke et al. (2007) isolated three strains that belonged to genera *Acinetobacter*, *Agromyces*, and *Sphingomonas*, and were able to degrade E1, E2, and E3 under both aerobic and anoxic conditions. Nevertheless, EE2 remained stable during cultivation with all the three isolates. On the other hand, *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolated from activated sludge of Japanese wastewater treatment plants were shown to degrade all the four principal estrogens (E1, E2, E3 and EE2) (Yoshimoto et al., 2004). *R. zopfii* Y50158 showing the strongest degradation activities removed completely  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of EE2 within 24 h in this study. Another EE2-degrading bacterium, isolated from activated sludge of a wastewater treatment plant in China, was identified as *Sphingobacterium* sp. JCR5 (Ren et al., 2007a). It grew on EE2 as the sole source of carbon and energy and metabolized up to 87% of the substrate added ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) within 10 d. In addition to EE2, the strain could be cultivated on other estrogens such as E1, E2, E3, and mestranol. Analysis of EE2 degradation showed that in the first step it was oxidized to E1 with a subsequent ring cleavage to 2-hydroxy-2,4-dienevaleric acid and 2-hydroxy-2,4-diene-1,6-dioic acid, which were the main catabolic intermediates (Ren et al., 2007a). The metabolic pathway for EE2 degradation by *Sphingobacterium* sp. JCR5 suggested in that work shared a certain analogy with previously reported testosterone degradation by *Comamonas testosteroni* (Horinouchi et al., 2003). In the latest study, six strains of *Proteobacteria* were added to the list of strains capable of EE2 transformation (Pauwels et al., 2008b). Bacterial strains isolated from compost cometabolized EE2 at low  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels when metabolizing E1, E2, or E3. No other metabolites beside E1, E2, E3 and EE2 were detected, suggesting that total degradation and fission of aromatic rings occurred.

Generally it can be summarized that bacterial EE2 transformation is significantly effected by oxygen with higher degradation efficiency under aerobic conditions. Relatively fast bacterial degradation was recorded in agriculture soils and nitrifying

activated sludge. In this case, the key role in transformation process could be attributed to AOB showing highest removal at high initial ammonia concentrations. Even higher degradation efficiencies (tens  $\text{mg L}^{-1}$  of EE2) were recorded with *Rhodococcus* and *Sphingobacterium* sp. isolated from activated sludges.

### 3. Ligninolytic fungi, ligninolytic enzymes and other peroxidases

Ligninolytic fungi produce extracellular enzymes with low substrate specificity, which makes them suitable for degradation of various aromatic compounds, even those with low water solubility. The ligninolytic system consists of four major enzymes: lignin peroxidase (LiP, E.C. 1.11.1.14), manganese-dependent peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13), versatile peroxidase (VP, E.C. 1.11.1.16) and laccase (Lac, E.C. 1.10.3.2). The physiology of the production of the enzymes together with their application for transformation of estrogenic compounds has been studied in the recent years.

In an early study from 1973, Lugaro et al. (1973) demonstrated the ability of laccase from *Polyporus versicolor* in a biphasic system to oxidise E1, E2, and E3. These authors detected several transformation products of E1 and E3 but their structures were not elucidated. Laccases from *Trametes* sp. and *Pycnoporus coccineus* ( $0.8 \text{ U mL}^{-1}$ ) were tested for transformation of EE2 ( $2 \text{ mol kg}^{-1}$  of sand) adsorbed on sea sand in a test tube and a rotating reactor (Tanaka et al., 2001). The enzyme from *Trametes* sp. and *P. coccineus* removed EE2 within 48 h in the test tube to the extent of 90% and 80% respectively. The laccase from *Trametes* sp. was then tested in the rotating reactor, reaching 80% degradation efficiency within 8 h. Tanaka et al. (2001) studied biodegradation of E1 and E3 ( $3 \text{ mol g}^{-1}$ ) with laccases purified from *P. coccineus* ( $0.8 \text{ U mL}^{-1}$ ) on a model sediment in a rotating reactor. EE2 and E1 were degraded in the system within 48 h to 80% and 60%, respectively.

Suzuki and co-authors (2003) investigated the removal of the steroidal hormones E2 and EE2 with manganese peroxidase (MnP) ( $10 \text{ nkat mL}^{-1}$ ), by the laccase-mediator system with 1-hydroxy benzotriazole prepared from *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 and *Trametes versicolor* IFO-6482 cultures in organic solvent and under biphasic conditions. They also monitored the course of estrogenic activities. The authors found that  $10^{-5} \text{ M}$  E2 and EE2 were completely transformed within 1 h when estrogenic activity dropped to approx 10% of the original values and the activity disappeared in 8 h. This residual activity could be caused by the presence of active transformation products, however, the authors did not succeed in detecting them using HPLC technique. Laccases from a species of the imperfect fungus *Myceliophthora* ( $27.5 \text{ U mL}^{-1}$ ) and from the ligninolytic strain *Trametes pubescens*, both adsorbed on glass beads, were used for the transformation of natural estrogen E2 ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) (Nicotra et al., 2004). The reaction products were tentatively identified as C–C dimeric products with coupling between either 4'-4, or 2'-2, and C–O (phenolic ring) at 4' or 2' positions and the structures are shown in Fig. 1. Tamagawa et al. (2006) tested degradation of the natural hormone E1 ( $10^{-4} \text{ M}$ ) by the ligninolytic fungus *Phanerochaete sordida* under ligninolytic conditions in low-nitrogen and high-carbon culture medium. They recorded 95% transformation within 5 days of incubation. The authors treated E1 ( $10^{-5} \text{ M}$ ) also with MnP and laccase from the same fungus and found a complete disappearance of E1 after 1 h. Complete removal of the estrogenic activity of E1 after 2 h was confirmed using the yeast two-hybrid assay system. Also in this case the remaining activity (1–3%) after 1 h treatment could be caused by formation of active transformation products or by residual concentration of original compounds that were already below the detection limit of the used HPLC method.

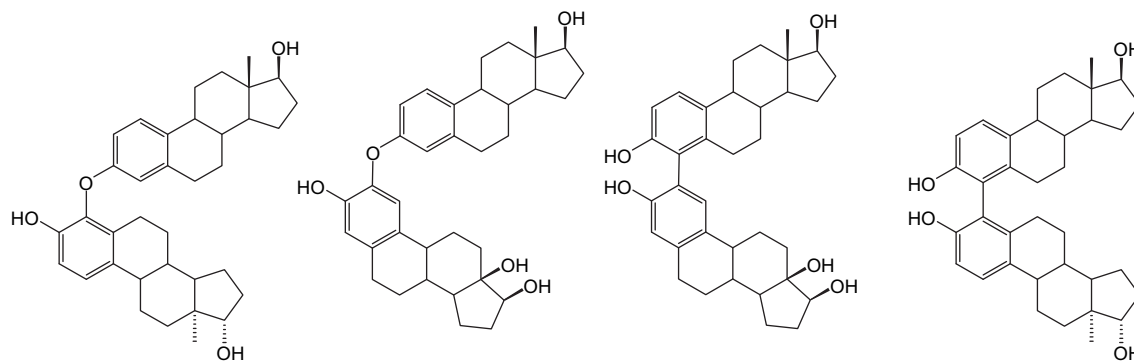


Fig. 1. Fungal laccase-mediated oxidation products of E2 in organic solvent (Nicotra et al., 2004).

Auriol and co-workers (2006) tested the feasibility of application of another peroxidase from horseradish (HRP) for biodegradation of E1, E2, E3, and EE2 (400 nM). They investigated the effect of temperature and pH on enzyme kinetics. With an HRP activity of  $0.017 \text{ U mL}^{-1}$  at pH 7 and  $25^\circ\text{C}$  they found that the enzyme was able to transform 92–100% of the compounds within 1 h. They also conducted other degradation experiments in pure and filtered wastewater from activated sludge, assessing the impact of wastewater constituents on estrogen removal during enzymatic oxidation. These results showed that HRP ( $0.068 \text{ U mL}^{-1}$ ) at pH 8 removed 96–100% of E2, E3, and EE2 within 1 h, whereas the E1 removal was only 73%. Moreover, they demonstrated that the fastest degradation was in the case of EE2. For wastewater samples lower removals were achieved for E1, E2, E3, and EE2, specifically 29%, 19%, 28%, and 37%, respectively. The same authors performed a similar study with laccase-catalyzed conversion (*T. versicolor*) of these estrogens (Auriol et al., 2007a). The optimal pH for each studied steroid estrogen oxidation was approximately 6 in synthetic water. This research also focused on the wastewater matrix effect on developed enzymatic treatment. At pH 7.0 and  $25^\circ\text{C}$ , the experiments showed that the laccase-catalyzed system for the removal of steroid estrogens was not significantly affected by the municipal wastewater matrix. The authors tested several laccase initial activities, and  $20 \text{ U mL}^{-1}$  was sufficient to achieve a complete removal of studied steroid estrogens in both synthetic water and municipal wastewater. Moreover, 1-hydroxy-benzotriazole, when used as a mediator, improved laccase-catalyzed system efficiency. The same group of authors optimized HRP enzyme-catalyzed process in a real wastewater matrix from a municipal wastewater treatment plant (Auriol et al., 2007b). The impacts of the reaction conditions, mainly including enzyme and  $\text{H}_2\text{O}_2$  doses were investigated. The optimum molar  $\text{H}_2\text{O}_2$ /estrogens ratio in both synthetic water and actual wastewater was approximately equal to the theoretical ratio of 0.5. A kinetic study showed that the oxidative conversion of steroid estrogens catalyzed by HRP followed Michaelis–Menten kinetics in the substrate concentration range studied. The determination of  $K_M$  for each estrogen showed that HRP had an increasing affinity for E1, E3, E2, and EE2 ( $K_M = 7.47; 5.25; 1.44; 1.32 \mu\text{M}$  in the same order) under the experimental conditions. In real activated sludge process effluent, an HRP dose of  $8\text{--}10 \text{ U mL}^{-1}$  was required to completely remove all of the studied estrogens, while only  $0.032 \text{ U mL}^{-1}$  of HRP was necessary to treat synthetic water containing the same estrogen concentrations (from 1.1 to  $17.8 \text{ ng L}^{-1}$ ). Removal of estrogenic activity and transformation with *T. versicolor* laccase ( $20 \text{ U mL}^{-1}$ ) and HRP ( $8\text{--}10 \text{ U mL}^{-1}$ ) of E1, E2, E3, and EE2 in a municipal wastewater were studied by Auriol et al. (2008). The authors found that these steroid estrogens were completely oxidized with both the enzymes in the wastewater reaction mixtures after a 1 h

treatment.  $K_M$  values were determined also for laccase at pH 7 and  $25^\circ\text{C}$ : E1 3.40, E2 3.99, E3 2.65, and EE2 3.78  $\mu\text{M}$ . It was also demonstrated that the enzymatic treatments were very efficient in removing the estrogenic activity of the steroid estrogens using the recombinant yeast assay.

*T. versicolor* was also demonstrated to be able to remove EE2 in batch and continuous cultures (Blázquez and Guieysse, 2008). In batch, E2 and EE2 initially supplied at  $10 \text{ mg L}^{-1}$  were removed from more than 97% in 24 h, which corresponded to removal rates of 0.43 and  $0.44 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectively. A bioreactor inoculated with *T. versicolor* pellets was then continuously operated during 26 days at a hydraulic retention time of 120 h. E2 and EE2 were completely removed at removal rates of 0.16 and  $0.09 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectively, when fed at 18.8 and  $7.3 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. The authors attributed the degradation mainly to laccase activity of *T. versicolor*. Removal of several compounds with endocrine disrupting activity including EE2 in static cultures using *T. versicolor*, and other seven white rot fungi strains were described (Cajthaml et al., 2009). The most efficient degraders were found to be *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus*, and *Pycnoporus cinnabarinus*, which were able to completely remove EE2 from the initial concentration  $10 \text{ mg L}^{-1}$  within the first 3 days of incubation. Estrogenic activity generally decreased with the progress of degradation; however, in some cases during the metabolism of EE2 the results showed a residual (*I. lacteus*, *P. ostreatus* and *P. cinnabarinus*) or increased (*Phanerochaete magnoliae*) estrogenic activity, suggesting the production of metabolic intermediates with estrogenic activity.

#### 4. Other fungi

Choudhary et al. (2004) performed a metabolic study on transformation of norethisterone by *Cephalosporium aphidicola* and subsequently of EE2 by the zygomycete *Cunninghamella elegans* in a liquid medium. The authors identified several metabolites of EE2 by *C. elegans* (Fig. 2). The transformation reactions included several hydroxylations of EE2 and in one case a subsequent methoxylation of the hydroxyl derivative. The pathogenic ascomycete *Fusarium proliferatum* was selected from sediments via a set of enrichment experiments with EE2 as the sole source of carbon (Shi et al., 2002). In a subsequent batch experiment, the fungus was proved to be able to utilize EE2 ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) and 97% of the compound was removed from the culture after 15 days with a first-order rate constant  $0.6 \text{ d}^{-1}$ .

#### 5. Transformation in soil

Colucci and Topp (2001a,b) evaluated the persistence and pathways of dissipation of E1, E2, and EE2 in soil by means of laboratory microcosm incubations. In the case of E1 and E2 they

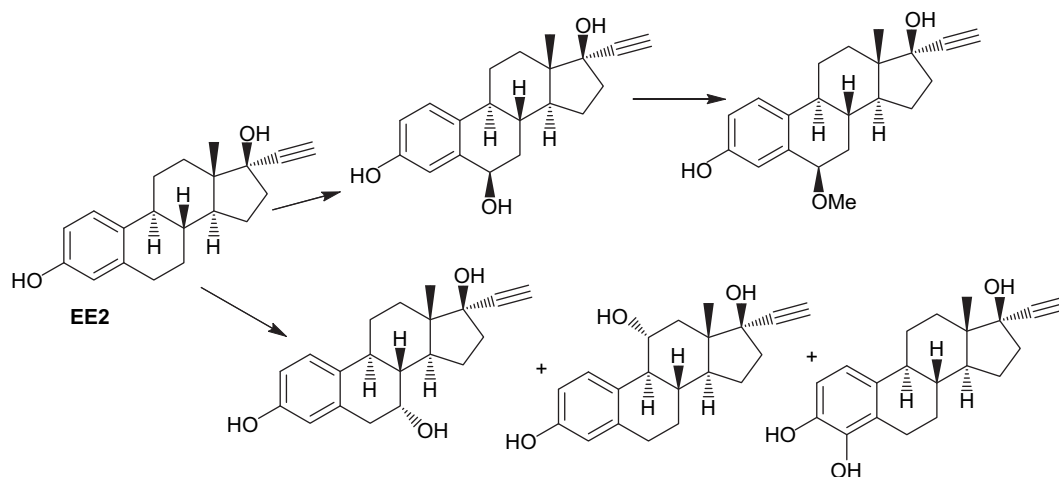


Fig. 2. Transformation products of EE2 by *C. elegans* (Choudhary et al., 2004).

used  $^{14}\text{C}$  labelled compounds. The dissipation and mineralization rates were determined in a range of temperatures and moistures. E2 and EE2 were rapidly removed in soil conditions typical of a temperate growing season. E2 compound was oxidized to estrone in both autoclaved and nonsterile loam, silt loam, and sandy loam soils, suggesting an abiological transformation. In contrast, E1 was stable in autoclaved soil, suggesting that its removal was microbially mediated. Both E2 and E1 formed non-extractable residues, and soil-bound residues were only slowly mineralized, suggesting that their bioavailability was low. This was proved by the loss of estrogenic activity. EE2 stability was also evaluated in the absence of oxygen, and the response of dissipation kinetics to variation in temperature and moisture suggested that the removal was microbially mediated.

In a recent study from 2009, Stumpe and Marschner (2009) characterized mineralization of radiolabelled estrogens in 17 different soils under various conditions. Although sorption parameters in this study varied greatly for E2 ( $K_F = 21.9\text{--}317.5\text{ mL}^{-1}$ ), for E1 ( $K_F = 46.0\text{--}517.5\text{ mL}^{-1}$ ) and for EE2 ( $K_F = 29.9\text{--}326.1\text{ mL}^{-1}$ ) this apparently did not control estrogen bioavailability since it showed no effects on hormone mineralization. Soil supplementation with glucose, ammonium nitrate, streptomycin etc. had a stimulating or inhibiting effect on estrogen mineralization depending on the type of the soil. On the basis of these experiments with various added substrates it is clear that white rot fungi were responsible for EE2 degradation while bacteria were responsible for E2 degradation.

A study was undertaken by Lorenzen et al. (2006) to assess the persistence of estrogenic substances in soil that could reach agricultural land via fertilization with organic amendments containing E1, E2, and EE2. The compounds rapidly dissipated in soils with half-lives ranging from a few hours to a few days. The authors concluded that the risk of these chemicals to water was low. The compounds were rapidly removed from aerated soils under temperate growing conditions; this indicates that application methods that minimize preferential flow, or runoff, of animal or human wastes should protect adjacent water from contamination.

Ying and Kookana (2003) tested sorption behaviour of several endocrine disrupting compounds including E1, E2, E3, and EE2 on four various soils. They characterized the biotransformation of E2–E1 in the loam soil under aerobic and anaerobic conditions. Sorption test using a batch equilibrium method demonstrated that estrogens were adsorbed onto soils in the order EE2, E2, E1, and E3. This laboratory study showed that the compounds were degraded

rapidly in the soil within 7 days under aerobic conditions. However, during the 70-day study under anaerobic conditions in the soil, little or no degradation of the chemicals was recorded except for E2. The calculated half-lives for E2, which was found to be bio-transformed to E1 under both aerobic and anaerobic conditions, were 24 d in the soil.

## 6. Wastewater treatment plants and sludge degradation

Most recently, Miège et al. (2009, see references therein) summarized the data about the fate of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater treatment plants (WWTPs). The authors took into account the dissolved aqueous phase without batch experiments, and created a database in order to quantitatively assess the occurrence and removal efficiency of PPCPs including natural hormones and EE2 in WWTPs. Various WWTP processes were evaluated and it was found that EE2 was highly removed (70%) in the dissolved aqueous phase by a fixed biomass reactor with high sludge retention time and waste stabilisation ponds. The processes using activated sludge with nitrogen treatment were substantially more efficient than treatments. They also found a tendency between higher EE2 influent concentrations and removal extents.

Earlier, Johnson et al. (2005) compared 17 WWTPs in Europe based on the concentrations of nonylphenol and steroid estrogens in effluents. Treatment processes included primary chemical treatment only, submerged aerated filter, oxidation ditch, activated sludge, and trickling filter combined with activated sludge. The lowest estrogen removal was observed in the WWTP which only used primary treatment. In this study EE2 was detected only in effluents of two WWTPs.

Similarly, Ying et al. (2008b) described the degradation of EE2 and other estrogens in four South Australian WWTPs with different technologies. The removal rates for the estrogens were variable but consistent with the plant performance parameters such as biochemical oxygen demand, suspended solids and ammonia, and the least efficient WWTP was that which consisted of a series of anaerobic and aerobic lagoons. The study showed that E1 and EE2 were more persistent during the treatment than the other estrogens. A poor EE2 removal was also detected in a WWTP with nitrifying activated sludge system situated in England (Kanda and Churchley, 2008). The results of a 24-h treatment experiment showed excellent removal for other estrogens and nonylphenols (97–99%), and a 98% removal of estrogenicity. However, the

removal of EE2 was only 3% which during the 7-day treatment period only increased to a mere 5.6%.

Braga et al. (2005a) reported a poor removal in an enhanced primary WWTP compared to an advanced WWTP in Australia. The difference between those two plants was primarily linked to plant performance, but the extent to which the removal of steroid estrogens was due to bacterial metabolism rather than adsorption to the bacterial biomass remained unclear. EE2 was not detected during the study period in the influent or effluent of either WWTP. Concentrations at ng g<sup>-1</sup> levels of EE2 were detected in the waste activated sludge of the two WWTPs (Braga et al., 2005b), but not in the raw sewage, suggesting that EE2 is resistant to biological treatment and is primarily removed due to sorption to sludge biomass. This agreed with previously reviewed data (Johnson and Sumpter, 2001). Muller et al. (2008) surveyed E1, E2, EE2 and their conjugated forms throughout an advanced WWTP. The authors quantified estrogen concentrations in water and sludge samples and investigated also the estrogenic activity using estrogen-responsive reporter cell lines. Estrogen concentrations and estrogenicity measured in the inlet and in primary treated sewage showed a weak impact of primary treatment; however they observed a decrease of both estrogen concentration and estrogenicity during biological treatment. The removal was >90% of original concentration ranging between 200 and 500 ng/L. On the base of analysis of estrogens sorbed into the sludge they suggested that biodegradation was the main vehicle for estrogen elimination.

In spite of the application of very high initial concentrations ( $2.5 \times 10^{-5}$  to 50 mg L<sup>-1</sup>), experiments using bisphenol A, E2, and EE2, as well as activated and inactivated sludge, showed a high adsorption affinity of the compounds to the adsorbent (Clara et al., 2004). The adsorption in this work was also found to depend on pH, where the authors observed increasing solubility of adsorbed EE2 with elevated pH from 7 to 12. Correlation of EE2 sorption to activated sludge biomass and temperature was described (Xu et al., 2008).

The efficiency (>90%) of E1 and EE2 removal studied in municipal WWTPs under various redox conditions, demonstrated the importance of aerobic conditions for the removal of all estrogens (Joss et al., 2004). The importance of adaptation of microbial populations for the removal of estrogens (mainly E2), was shown by dramatic differences in mineralization of <sup>14</sup>C-labelled estrogenic compounds when working with biosolids from four municipal treatment plants and one industrial plant (Layton et al., 2000); in the municipal WWTP the mineralization was 70–80% during the 24 h, while in the industrial WWTP it reached only 4%. The mineralization of EE2 was 25–75-fold less than that of E2 and, in addition, it did not reach completion in 24 h, with only 40% mineralized to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Changes in temperature during the process significantly affected mineralization of E2 but had no effect on the rate of EE2 metabolism (Layton et al., 2000).

Several years of research have been focused on factors involved in the removal of estrogenic compounds from WWTPs, where the efficiency of the biological processes involved is highly dependent on operating parameters such as sludge retention time, redox potential, etc. – reviewed in Koh et al. (2008). Cao et al. (2008) reported a relationship between the equivalent biomass concentration and the estrogen degradation in WWTPs.

Under anaerobic conditions E1 was reduced to E2 but the extent of this reduction depended on the type of inocula (Mes et al., 2008). No significant loss of the sum of E1 and E2, or of EE2 was observed in activated sludge during the experiment under strictly anaerobic conditions. In the effluent, however, there was still a large fraction of E1 and E2 (adsorption to sludge accounted for a 32–35% loss from the liquid phase) but no EE2.

A work focused on potential relationship between the availability of oxygen, nitrification rate, and estrogen removal

demonstrated that EE2 was persistent under anoxic conditions in activated sludge (Dytczak et al., 2008). Under aerobic conditions, the observed level of EE2 removal was 22% within 7 h. The higher removal of estrogens was associated with higher nitrification rate, thus nitrifying biomass could be responsible for their removal. The fate of E1, E2, and EE2 under different redox settings was also investigated in two nitrite-accumulating sequencing batch reactors, with different sludge ages operating under aerobic conditions and anoxic/anaerobic/aerobic conditions (Pholchan et al., 2008). The removal of EE2 under anaerobic conditions was considered to be mainly the result of sorption; however, the binding of estrogens to the sludge was apparently not as strong as the binding observed in the sludge under strictly aerobic conditions. Probably because of nitrite toxicity and the inhibition of the monooxygenase (AMO) and the microbial population generally, EE2 removal was adversely affected when the reactor operated with sludge retention time (SRT) shorter than 5.7 days and it was significantly lower when SRT was longer than 7.5 days. In contrast, during anaerobic digestion of estrogens by sewage sludge, no influence of temperature or SRT on the process was observed (Carballa et al., 2007).

Distribution coefficients ( $K_d$ ) between water and activated sludge particles were used to estimate the fraction of the total estrogen concentration which is expected to be sorbed in the activated sludge under aerobic conditions (Andersen et al., 2005). Estimations based on the measured sorption constants predict that about 50–75% of steroid estrogens will be sorbed to activated sludge during activated sludge treatment in a WWTP.

Taking into account also the results of previous studies, the scenario of EE2 removal under aerobic conditions could be more mixed. Ternes et al. (1999) showed that E2 was oxidized and further eliminated by activated sludge from WWTP in Germany, while EE2 was principally persistent under selected conditions. Similarly, Weber et al. (2005) reported persistency of EE2 in batch experiments with activated sludge from two different types of WWTP. Further culture enrichment and isolation led to a defined mixed culture consisting of two strains, which were identified as *Achromobacter xylosoxidans* and *Ralstonia* sp. The culture used E1 and E2 as growth substrates, but not the EE2. In contrast, Forrez et al. (2009a) recorded 90% EE2 removal in an aerated nitrifying batch reactor and a complete biological EE2 removal from the synthetic effluent in a fixed bed reactor. They also demonstrated that once established nitrifiers could maintain the EE2 degradative activity, even without further addition of ammonium (Forrez et al., 2009a,b).

Cirja et al. (2007) studied the metabolism of two differently labelled radioactive forms of EE2 (concentration 8 g L<sup>-1</sup>) in a membrane bioreactor (MBR), operating with 25 days SRT during the whole experimental period (35 days). Balancing of radioactivity demonstrated that the real mineralization was <1%, while radioactivity mainly remained sorbed in the reactor, resulting in a removal of approximately 80%. The result showed that the elimination pathway does not involve the removal of the ethinyl group from EE2 molecule. Despite its efficiency in bisphenol A removal, the additional disinfection of MBR effluent provided no further significant removal of E1, EE2, or E2 (Spring et al., 2007).

## 7. Algae

Only one publication is available dealing with biotransformation of EE2 by algae. Della Greca and co-workers (Della Greca et al., 2008) tested the biotransformation capability of 11 microalgae strains on EE2. Out of the tested strains, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Ankistrodesmus braunii* were able to biotransform the substrate. Several transformation products were identified (Fig. 3). These results are

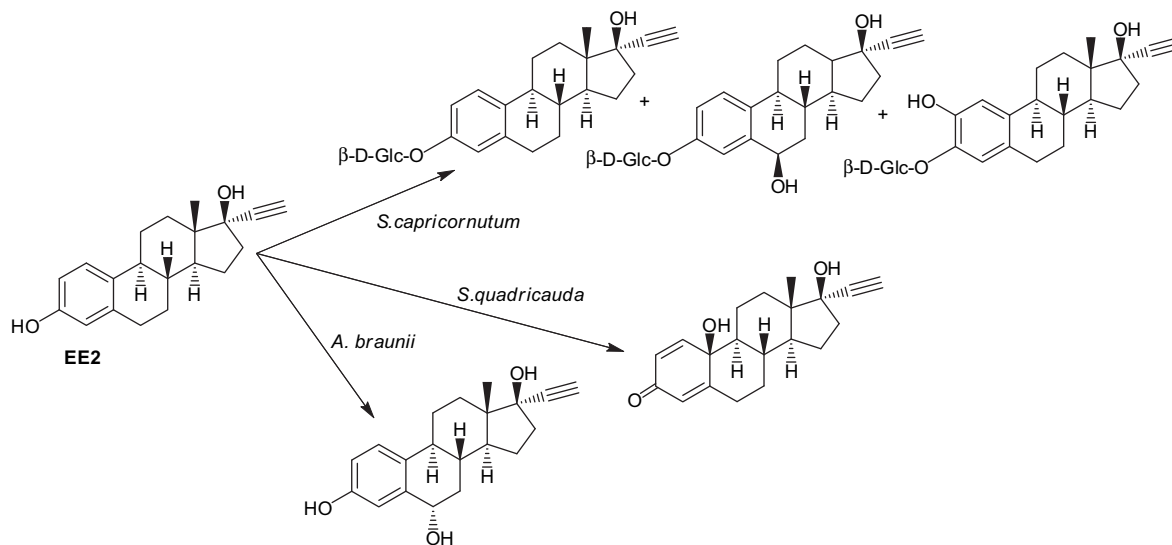


Fig. 3. Transformation products of EE2 by microalgae (Della Greca et al., 2008).

in agreement with previous studies on sterols and phenols that were degraded by *S. quadricauda* indicating the ability of the strain to perform regio- and stereo-selective hydroxylation of steroidal substrates (Della Greca et al., 1996, 1997). Whereas *A. braunii* showed another strategy during bioconversion of sinapic acid to 3,6-dihydroxy-2,4-dimethoxy-7H-benzocyclohepten-7-one via thomasidioic acid (Della Greca et al., 2003).

## 8. Conclusions

EDCs tend to accumulate in aquatic organisms and to be adsorbed on sediments and on particles in the aquatic environment. Due to their high bioactivity, ubiquitous nature, toxicity and persistence, it is of extreme importance to investigate and study organisms that have the ability to reduce these substances in the environment.

EE2 was found to be slowly decomposed by bacteria under anaerobic conditions. The dissipation time can exceed 1000 days and the degradation is attributed to sulfate-, nitrate-, and iron-reducing conditions. However, abiotic factors can also play an important role in the removal. Faster degradation can be recorded for dissolved EE2 by bacteria under aerobic conditions and also seawater microbes were found to degrade EE2 after acclimation. More rapid degradation of EE2 was also linked to the presence of AOM bacteria from activated sludge. EE2 was found to be more resistant to bacterial biodegradation than natural estrogens, but its highly hydrophobic nature makes sorption a significant removal factor in WWTPs. Using also batch experiments, it was found that WWTP processes based on activated sludge are more effective in the EE2 removal; however, the results are strongly dependent on the operating parameters (e.g. temperature, SRT, redox potential etc.) and only few authors have so far evaluated changes in estrogenic activity in the WWTP process.

Another promising alternative for EE2 decomposition could be an application of ligninolytic fungi. A number of fungal strains were shown to degrade efficiently EE2 and other estrogens, and also a direct application of ligninolytic enzymes was proved to be successful in the EE2 degradation within a relatively short time. These systems were also able to remove estrogenic activities of the samples.

Recently, several studies have been performed to evaluate the persistency of EE2 in soil. Although some of the works showed

apart from sorption also possible microbial degradation, the fate of EE2 in soil remains unclear.

As yet, the mechanisms of these degradations have not been elucidated and only several authors detected EE2 transformation products from fungi, bacteria and microalgae. The conclusions of this review therefore emphasize the need for further research and the future tasks that emerge from the data gathered here can be summarized as follows:

1. Search for microbial (bacteria, white rot fungi) species and strains with high (either compound-specific or general) estrogen-degrading activity and their use in wastewater treatment in a way that would allow a flexible and efficient degradation;
2. Study of degradative reactions and pathways that do not yield metabolites with estrogenic activity;
3. Investigations of material matrices and conditions ensuring efficient abiotic removal of estrogens (hydrolysis, chemical reduction, photolysis, sorption or volatilization);
4. Optimization of the application of enzymes in degradative processes;
5. Designing WWTP systems that would integrate all the above factors.

## Acknowledgements

This work was funded by grant No. LC06066 of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, by grant KJB600200613 of the Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic; and also by Institutional Research Concept No. AV0Z50200510.

## References

- Aerni, H.R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schonenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.L.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 688–696.
- Andersen, H.R., Hansen, M., Kjølholt, J., Stuer-Lauridsen, F., Ternes, T., Halling-Sørensen, B., 2005. Assessment of the importance of sorption for steroid estrogens removal during activated sludge treatment. *Chemosphere* 61, 139–146.



- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007a. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Research* 41, 3281–3288.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., Noguero, T.N., Pin, B., 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70, 445–452.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C.D., Tyagi, R.D., 2006. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Research* 40, 2847–2856.
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., 2007b. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater. *Chemosphere* 68, 1830–1837.
- Blázquez, P., Guieysse, B., 2008. Continuous biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Material* 150, 459–462.
- Braga, O., Smythe, G.A., Schafer, A.I., Feltz, A.J., 2005a. Steroid estrogens in primary and tertiary wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* 52, 273–278.
- Braga, O., Smythe, G.A., Schafer, A.I., Feitz, A.J., 2005b. Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants. *Environmental Science & Technology* 39, 3351–3358.
- Cao, Q., Yu, Q., Connell, D.W., 2008. Degradation rate constants of steroids in sewage treatment works and receiving water. *Environmental Technology* 29, 1321–1330.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M., 2009. Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750.
- Carballa, M., Omil, F., Ternes, T., Lema, J.M., 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research* 41, 2139–2150.
- Choudhary, M.I., Musharraf, S.G., Ali, R.A., Atif, M., Atta-ur-Rahman, 2004. Microbial transformation of Antifertility agents, norethisterone and 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol. *Zeitschrift für Naturforschung* 59b, 319–323.
- Cirja, M., Zuehlke, S., Ivashechkin, P., Hollender, J., Schaffer, A., Corvini, P.F.X., 2007. Behavior of two differently radiolabelled 17 $\alpha$ -ethynylestradiols continuously applied to a laboratory-scale membrane bioreactor with adapted industrial activated sludge. *Water Research* 41, 4403–4412.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N., 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 beta-estradiol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56, 843–851.
- Clouzet, L., Marrot, B., Doumenq, P., Roche, N., 2008. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol: an endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environmental Progress* 27, 383–396.
- Colborn, T., Saal, F.S.V., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101, 378–384.
- Colucci, M.S., Topp, E., 2001a. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 $\beta$ -estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality* 30, 2070–2076.
- Colucci, M.S., Topp, E., 2001b. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: II. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Journal of Environmental Quality* 30, 2077–2080.
- Czajka, C.P., Londry, K.L., 2006. Anaerobic biotransformation of estrogens. *Science of the Total Environment* 367, 932–941.
- Della Greca, M., Pinto, G., Pistillo, P., Pollio, A., Previtiera, L., Temussi, F., 2008. Biotransformation of ethynylestradiol by microalgae. *Chemosphere* 70, 2047–2053.
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Guerriero, I., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., 1997. Biotransformation of adrenosterone into 11-ketotestosterone by *Scenedesmus quadricauda* grown in myxotrophic conditions. *Biotechnology Letters* 19, 1123–1124.
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., 1996. Biotransformation of progesterone by the green alga *Chlorella emersonii* C211-8H. *Phytochemistry* 41, 1527–1529.
- Della Greca, M., Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Temussi, F., 2003. Biotransformation of sinapic acid by the green algae *Stichococcus bacillaris* 155LTAP and *Akistrodesmus braunii* C202. *Tetrahedron Letters* 44, 2779–2780.
- Dytczak, M.A., Londry, K.L., Oleszkiewicz, J.A., 2008. Biotransformation of estrogens in nitrifying activated sludge under aerobic and alternating anoxic/aerobic conditions. *Water Environment Research* 80, 47–52.
- Forrez, I., Carballa, M., Boon, N., Verstraete, W., 2009a. Biological removal of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in aerated nitrifying fixed bed reactor during ammonium starvation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84, 119–125.
- Forrez, I., Carballa, M., Noppe, H., De Brabander, H., Boon, N., Verstraete, W., 2009b. Influence of manganese and ammonium oxidation on the removal of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2). *Water Research* 43, 77–86.
- Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N., Morita, N., 2002. Degradation of 17 beta-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2057–2060.
- Gaulke, L.S., Strand, S.E., Kalhorn, T.F., Stensel, H.D., 2008. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol transformation via abiotic nitration in the presence of ammonia oxidizing bacteria. *Environmental Science and Technology* 42, 7622–7627.
- Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166, 79–89.
- Horinouchi, M., Hayashi, T., Yamamoto, T., Kudo, T., 2003. A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consist of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 4421–4430.
- Johnson, A.C., Aerni, H.R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K., Jurgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M.J.F., Svenson, A., Wettstein, F.E., 2005. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research* 39, 47–58.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental Science & Technology* 35, 4697–4703.
- Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Rihle, P.R., Siegrist, H., 2004. Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization. *Environmental Science & Technology* 38, 3047–3055.
- Jurgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J., 2002. The potential for estradiol and ethynylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 480–488.
- Kanda, R., Churchley, J., 2008. Removal of endocrine disrupting compounds during conventional wastewater treatment. *Environmental Technology* 29, 315–323.
- Ke, J.X., Zhuang, W.Q., Gin, K.Y.H., Reinhard, M., Hoon, L.T., Tay, J.H., 2007. Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1163–1171.
- Koh, Y.K.K., Chiu, T.Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2008. Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. *Environmental Technology* 29, 245–267.
- Kwak, H.I., Bae, M.O., Lee, M.H., Lee, Y.S., Lee, B.J., Kang, K.S., Chae, C.H., Sung, H.J., Shin, J.S., Kim, J.H., Mar, W.C., Sheen, Y.Y., Cho, M.H., 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 787–795.
- Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W., Saylor, G.S., 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee USA. *Environmental Science & Technology* 34, 3925–3931.
- Lorenzen, A., Burnison, K., Servos, M., Topp, E., 2006. Persistence of endocrine disrupting chemicals in agricultural soils. *Journal of Environmental Engineering - ASCE* 5, 211–219.
- Lugaro, G., Carrea, G., Cremonesi, P., Casellato, M.M., Antonini, E., 1973. The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1, 1–6.
- Matsuoka, S., Kikuchi, M., Kimura, S., Kurokawa, Y., Kawai, S., 2005. Determination of estrogenic substances in the water of Muko River using in vitro assays, and the degradation of natural estrogens by aquatic bacteria. *Journal of Health Science* 51, 178–184.
- Mes, T.Z.D.D., Kujawa-Roevelde, K., Zeeman, G., Lettinga, G., 2008. Anaerobic biodegradation of estrogens – hard to digest. *Water Science and Technology* 57, 1177–1182.
- Miège, C., Choubert, J.M., Ribeiro, L., Eusèbe, M., Coquery, M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environmental Pollution* 157, 1721–1726.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemnach, K., Budzinsky, H., Barcelo, D., De Alda, M.L., Kuster, M., Delgenes, J.P., Hernandez-Raquet, G., 2008. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1649–1658.
- Nicotra, S., Intra, A., Ottolina, G., Riva, S., Danieli, B., 2004. Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 $\beta$ -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetry* 15, 2927–2931.
- Pauwels, B., Noppe, H., De Brabander, H., Verstraete, W., 2008a. Comparison of steroid hormone concentration in domestic and hospital wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Engineering - ASCE* 134, 933–936.
- Pauwels, B., Wille, K., Noppe, H., De Brabander, H., de Wiele, T.V., Verstraete, W., Boon, N., 2008b. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estriol. *Biodegradation* 19, 683–693.
- Pholchan, P., Jones, M., Donnelly, T., Sallis, P.J., 2008. Fate of estrogens during the biological treatment of synthetic wastewater in a nitrite-accumulating sequencing batch reactor. *Environmental Science & Technology* 42, 6141–6147.
- Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8, 275–285.
- Ren, H.Y., Ji, S.L., Ahmad, N.U.D., Dao, W., Cui, C.W., 2007a. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere* 66, 340–346.
- Ren, Y.X., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N., Nishimura, O., 2007b. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Research* 41, 3089–3096.
- Sarmah, A.K., Northcott, G.L., 2008. Laboratory degradation studies of four endocrine disruptors in two environmental media. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 819–827.
- 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* 38, 2323–2330.
- Shi, J.H., Suzuki, Y., Lee, B.D., Nakai, S., Hosomi, M.I., 2002. Isolation and characterization of the ethynylestradiol-biodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. *Water Science and Technology* 45, 175–179.

- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environmental Health Perspectives* 92, 167–173.
- Spring, A.J., Bagley, D.M., Andrews, R.C., Lemanik, S., Yang, P., 2007. Removal of endocrine disrupting compounds using a membrane bioreactor and disinfection. *Journal of Environmental Engineering and Science* 6, 131–137.
- Stumpe, B., Marschner, B., 2009. Factors controlling the biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in different natural soils. *Chemosphere* 74, 556–562.
- Suzuki, K., Hiraia, H., Muratab, H., Nishida, T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research* 37, 1972–1975.
- Tamagawa, Y., Yamaki, R., Hirai, H., Kawai, S., Nishida, T., 2006. Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65, 97–101.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T., Taniguchi, M., 2001. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp in a rotating reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 312–316.
- 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* 225, 91–99.
- Tyler, C.R., Routledge, E.J., 1998. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry* 70, 1795–1804.
- Vader, J.S., van Ginkel, C.G., Sperling, F.M.G.M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J.S., van der Most, M., Stokman, P.G.W., 2000. Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 41, 1239–1243.
- Weber, S., Leuschner, P., Kampfer, P., Dott, W., Hollender, J., 2005. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 106–112.
- Xu, K., Harper Jr., W.F., Zhao, D., 2008. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol sorption to activated sludge biomass: thermodynamic properties and reaction mechanism. *Water Research* 42, 3146–3152.
- Yi, T., Harper, W.F., 2007. The link between nitrification and biotransformation of 17 alpha-ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology* 41, 4311–4316.
- Yi, T.W., Harper, W.F., Holbrook, R.D., Love, N.G., 2006. Role of particle size and ammonium oxidation in removal of 17 alpha-ethinyl estradiol in bioreactors. *Journal of Environmental Engineering-ASCE* 132, 1527–1529.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., 2003. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environmental Science & Technology* 37, 1256–1260.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Dillon, P., 2003. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* 37, 3785–3791.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Kumar, A., 2008b. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 87–94.
- Ying, G.G., Toze, S., Hanna, J., Yu, X.Y., Dillon, P.J., Kookana, R.S., 2008a. Decay of endocrine-disrupting chemicals in aerobic and anoxic groundwater. *Water Research* 42, 1133–1141.
- Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H., Omura, H., 2004. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5283–5289.





## Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi

Tomáš Cajthaml<sup>a,\*</sup>, Zdena Křesinová<sup>a</sup>, Kateřina Svobodová<sup>a</sup>, Monika Möder<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Division of Ecology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 November 2008

Received in revised form 9 January 2009

Accepted 12 January 2009

Available online 24 February 2009

#### Keywords:

Biodegradation  
Endocrine disrupters  
White rot fungi  
Nonylphenol  
Ethinylestradiol

### ABSTRACT

Endocrine-disrupting compounds (EDCs) represent a large group of substances of natural and anthropogenic origin. They are widely distributed in the environment and can pose serious risks to aquatic organisms and to public health. In this study, 4-n-nonylphenol, technical 4-nonylphenol, bisphenol A, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, and triclosan were biodegraded by eight ligninolytic fungal strains (*Irpex lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/1, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595, *Dichomitus squalens* CCBAS 750). The results show that under the used conditions the fungi were able to degrade the EDCs within 14 d of cultivation with exception of *B. adusta* and *P. chrysosporium* in the case of triclosane and bisphenol A, respectively. *I. lacteus* and *P. ostreatus* were found to be most efficient EDC degraders with their degradation efficiency exceeding 90% or 80%, respectively, in 7 d. Both fungi degraded technical 4-nonylphenol, bisphenol-A, and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol below the detection limit within first 3 d of cultivation. In general, estrogenic activities assayed with a recombinant yeast test decreased with advanced degradation. However, in case of *I. lacteus*, *P. ostreatus*, and *P. chrysosporium* the yeast assay showed a residual estrogenic activity (28–85% of initial) in 17 $\alpha$ -ethinylestradiol cultures. Estrogenic activity in *B. adusta* cultures temporally increased during degradation of technical 4-nonylphenol, suggesting a production of endocrine-active intermediates. Attention was paid also to the effects of EDCs on the ligninolytic enzyme activities of the different fungi strains to evaluate their possible stimulation or suppression of activities during the biodegradation processes.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Endocrine-disrupting compounds (EDCs) are a group of environmental pollutants known for their negative influence, particularly on aquatic organisms. Several studies demonstrated that these chemicals mimic hormones or interfere with the action of endogenous hormones (White et al., 1994; Ishibashi et al., 2004). Due to their widespread presence in the environment and toxic activity even at low concentrations, EDCs have received increased attention in water quality management and health care.

Typical EDCs of anthropogenic origin with estrogen-like action include 4-nonylphenols (NPs), bisphenol A (BPA), and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2). Mimicking natural hormones or disruption of biological pathways by these chemicals can stimulate the growth of human breast cancer cells (Soto et al., 1991) or induce the expression of vitellogenin in fish (Kwak et al., 2001). As a consequence, both mechanisms are used to prove estrogen activity by bioassays. NPs mainly occur in the environment as degradation products of

nonylphenolpolyethoxylates, which are used widely as non-ionic surfactants in many industrial applications. Due to their hydrophobic properties, these compounds are considered to be slowly biodegraded under aerobic conditions (Ying et al., 2002). BPA is a raw material of some polycarbonates and epoxy resins and it is widespread used as food packaging material (Biles et al., 1997). Moreover, the compound leaches also from dental materials and it was also found in waste landfill leachates (Yamamoto et al., 2001).

Synthetic estrogens, such as EE2, are used as oral contraceptives. Non-metabolized EE2 and its conjugates are excreted into wastewater. During sewage treatment, EE2 is then released from the corresponding conjugates by hydrolysis and reaches the environment via the effluents of wastewater treatment plants (Tyler and Routledge, 1998). Due to their incomplete removal during the waste treatment process, synthetic and natural estrogens are considered as major contributors to the estrogenic activity associated with waste water treatment plant effluents (Gutendorf and Westendorf, 2001).

Among the EDCs present in the environment, increasing interest is being given to antibiotics suspected of creating multiresistant germs. Triclosan (TRC) is an established bacteriostatic compound

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.  
E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).

and widely used as fungicide in topical and dental preparations. It is known to be absorbed in the gastrointestinal tract and through the skin (Dayan, 2006).

EDCs tend to accumulate in aquatic organisms and to be adsorbed by sediments and on particles in the aquatic environment (Adolfsson-Erici et al., 2002). The role that the mixture of bacteriocides and EDCs plays in the environment is currently not well understood. Due to their high bioactivity, ubiquitous nature, toxicity and persistence, it is of extreme importance to investigate and study organisms that have the ability to reduce these substances in the environment. A promising way to do so is the application of ligninolytic fungi or isolated fungal enzymes for the biodegradation of these compounds.

Ligninolytic fungi produce extracellular enzymes with low substrate specificity, which makes them suitable for degradation of various aromatic compounds, even with low water solubility. Their advantage in many cases over bacteria is attributed to the extracellular nature of the ligninolytic enzymes. In addition, they secrete low molecular weight mediators that enlarge the spectrum of compounds they are able to oxidize (Pointing, 2001). The ligninolytic system consists of four major enzymes: lignin peroxidase (LiP, E.C. 1.11.1.14), manganese-dependent peroxidases (MnP, E.C. 1.11.1.13), versatile peroxidases (VP, E.C. 1.11.1.16) and laccases (Lac, E.C. 1.10.3.2). *In vivo* and *in vitro* experiments with purified enzymes proved that ligninolytic enzymes were able to extensively degrade EDCs (Tanaka and Taniguchi, 2003; Keum and Li, 2004; Corvini et al., 2006; Cabana et al., 2007a,b; Shin et al., 2007). On the other hand, there are not many studies comparing degradation abilities of different strains of ligninolytic fungi on EDCs. It was also shown that presence of aromatic pollutants can influence production of the enzyme activities in fungal cultures (Cajthaml et al., 2008). Moreover, only a few authors monitored changes in the endocrine-disrupting activity during the fungal biodegradation (Cabana et al., 2007b).

The aim of this paper is to investigate abilities of whole cultures of eight ligninolytic fungal strains to degrade several typical representatives of EDCs and to evaluate changes in the estrogenic activity of the samples. Attention was also paid to the effect of EDCs on ligninolytic enzyme activities in order to evaluate a possible stimulation or suppression of the activities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Technical nonylphenol mixture (ring and chain isomers) and 4-n-nonylphenol (4-n-NP,  $\geq 98\%$ ), BPA ( $\geq 99\%$ ), EE2 ( $\geq 98\%$ ), and TRC ( $\geq 97.0\%$ ) were used as substrates for degradation experiments and were purchased from Aldrich, Germany. Other chemicals (pure or of higher purity) used as standards were supplied by Fluka, Aldrich or Merck-Schuchardt. All solvents of trace analysis quality or gradient grade were purchased from Chromservis (Czech Republic).

### 2.2. Organisms and cultivation

The ligninolytic fungal strains *Irpex lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595, *Dichomitus squalens* CCBAS 750 were obtained from the Culture Collection of Basidiomycetes of the Academy of Science, Prague.

Static cultures of the tested fungi were incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks in five parallels at 28 °C. Twenty millilitre of malt extract-glucose medium (5 g malt extract, 10 g glucose, pH 4.5) was inoculated with 5% suspension of homogenized mycelia,

grown for 1 wk. Fungal inoculum corresponded to initial fungal dry weight of 2–3 mg for *T. versicolor*, *B. adusta*, and *P. cinnabarinus*, and 4–5 mg for the remaining strains. The samples for biodegradation experiments were spiked with 100  $\mu\text{L}$  of N,N-dimethylformamide (DMF, final concentration 0.5 %, v/v) containing individual representatives of EDCs at the time of inoculation. Biotic controls were spiked with 100  $\mu\text{L}$  of DMF only. The influence of DMF (applied to dissolve the reference compounds) on the enzyme activities was found to be negligible (data not shown). The abiotic controls were realized with mycelia grown for one week and killed in an autoclave.

Final concentrations of EDCs in the flasks were 10 mg L<sup>-1</sup> of BPA, 10 mg L<sup>-1</sup> of EE2, 3 mg L<sup>-1</sup> of NPs, 2.5 mg L<sup>-1</sup> of 4-n-NP and TRC. The concentrations of NPs, 4-n-NP and TRC were lower compared to BPA and EE2 due to the significant toxic effect on the fungal cultures at higher concentrations. The biodegradation samples were harvested after 3, 7 and 14 d.

### 2.3. Enzyme activities

LiP was assayed with veratryl alcohol as the substrate (Tien and Kirk, 1988) and MnP was determined with 3-dimethylaminobenzoic acid and 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone as the chromogen (Vyas et al., 1994). Manganese-independent peroxidase activity (MiP) was calculated from the peroxidase activity of MnP assay detected in the absence of Mn<sup>2+</sup> ions (Vyas et al., 1994). Lac was estimated with 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid as the substrate (Niku-Paavola et al., 1988). One unit of enzyme produced 1  $\mu\text{mol}$  of the reaction product per min under the assay conditions at room temperature.

### 2.4. Chemical analysis

The whole content (mycelium with medium) of each culture was homogenized with Ultraturrax and acidified to approximately pH 2. It was then extracted with five 10 mL portions of ethyl acetate. Afterwards, the extracts were dried with sodium sulphate and concentrated using a rotary evaporator to a final volume of 10 mL. The extraction recoveries of all pollutants were about or better than 75% except for NPs that reached 60%. To enable HPLC analysis, an aliquot of the ethyl acetate extract was mixed with acetonitrile at a ratio of 1:10 (v/v), and the mixture was used for injection (Cajthaml et al., 2006).

The samples containing BPA, NPs, 4-n-NP and EE2 were analyzed using an HPLC-UV system (Waters 2695 Separations Module) equipped with a diode-array detector (Waters 2996). Isocratic programs were applied for all analyzed compounds. NP was analyzed at 35 °C, using 85% of methanol and 15% of water (v/v) with detection at 224 nm and 4-n-NP with 90% of methanol. BPA and EE2 were separated with 48% of acetonitrile at 38 °C. An isocratic program was used with 65% of acetonitrile and 35% of formic acid (0.1% in water). The compounds were separated on a LichroCart column filled with LichroSphere RP-18e (250 mm  $\times$  5 mm, particle diameter 5  $\mu\text{m}$ ), provided by Merck (Germany), with a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Due to UV interference with an unknown compound in the extract, TRC was analyzed using HPLC-MS (LCQ Advantage, Thermo) with the same HPLC conditions. The mass spectrometer was operated in negative mode electrospray ionization. The discharge voltage was set 3 kV, capillary voltage maintained at -12.5 V and the capillary temperature was 300 °C. The sheath and sweep gas were supplied with nitrogen. The sheath and sweep gases were adjusted to 52 and 3 arbitrary units, respectively. The data were collected in SIM mode when ion 287 amu was monitored. The detection limits for BPA, EE2, NPs, 4-n-NP and TRC were 0.23, 0.44, 0.21, 0.20 and 0.1 mg L<sup>-1</sup>, respectively.

## 2.5. Determination of estrogenic activity

Estrogenic activity of ethyl acetate extracts was assessed using a recombinant yeast screen according to [Routledge and Sumpter \(1996\)](#). The assay uses *Saccharomyces cerevisiae* with the integrated human estrogen receptor into the DNA sequence of the yeast genome, which also contained expression plasmids carrying estrogen-responsive sequences controlling the expression of the reporter gene *lacZ* (encoding the enzyme beta-galactosidase). Thus, in the presence of estrogens,  $\beta$ -galactosidase is synthesized and secreted into the medium, where it causes a color change from yellow to red. For assaying EE2 samples, the ethylacetate extracts were diluted 2000 times in methanol and 5  $\mu$ L were used for the test. In cases of other EDCs, 20  $\mu$ L of the extracts were applied directly for the assay. The concentrations were then fitting to the linear part of respective calibration curves when regression coefficient were better than 0.93 for all the compounds. Concurrently, EDC representatives (same amounts as added to the cultures) were tested using the same dilution and their endocrine activity was compared to that of 17 $\beta$ -estradiol (E2). Estrogenic activity of the samples was then expressed as a percentage of the estrogenic activity of the original EDCs. Biotic controls cultivated without EDCs showed no estrogenic activity (data not shown).

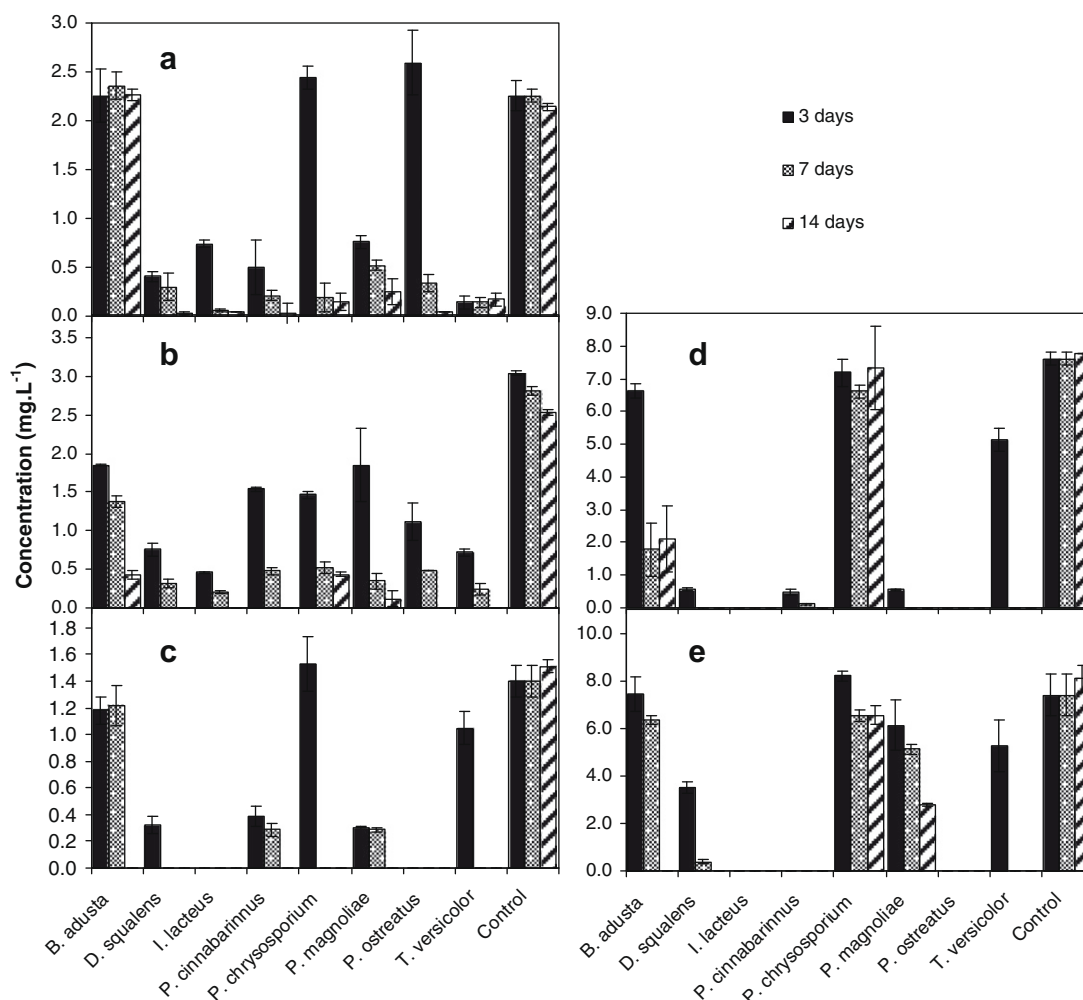
## 2.6. Data analysis

The data were tested with Student's *t*-test. Means were considered to be significantly different when the *P* value was  $\leq 0.01$ .

## 3. Results and discussion

As mentioned above, the applied concentrations of the tested EDCs varied in some cases due to their significant toxic effects. Especially NPs suppressed the growth of the fungi already at concentrations of about 5 mg L<sup>-1</sup> and TRC at 3 mg L<sup>-1</sup> (data not shown). The comparison of EDC estrogenic activity showed that EE2 was 1.5-fold more potent than E2. That corresponds to results of [Anderson et al. \(1999\)](#). All the other compounds were of approximately equal potency with 10<sup>6</sup> lower activity than E2.

The course of the biodegradation of individual EDCs with the studied fungi is shown in [Fig. 1](#). Except *B. adusta*, all the tested fungi strains were able to remove the antimicrobial compound TRC efficiently under the conditions chosen ([Fig. 1a](#)). After 14 d of cultivation, most of the fungal cultures reduced this pollutant to 1–12% of the initial concentration despite the different ratios and levels of ligninolytic enzymes activities measured ([Table 2](#)). The data are in accordance with results of [Hundt et al. \(2000\)](#), who reported the ability of ligninolytic fungal strains *T. versicolor* and *P.*



**Fig. 1.** Detection of EDCs ((a) triclosan, (b) 4-nonylphenol, (c) nonylphenols, (d) bisphenol A, (e) 17 $\alpha$ -ethinylestradiol) after biodegradation with the studied fungal strains.

*cinnabarinus* to metabolize TRC efficiently. They identified mono-saccharide conjugates after transformation and determined a reduced toxicity of the samples. In our work, we used a recombinant yeast assay to detect estrogenic activity and the results are shown in Table 1. Currently, TRC is considered not to be estrogen-active (Forana et al., 2000). Only metabolites found in fish were confirmed to be weak estrogens (Ishibashi et al., 2004). In our study, using the yeast bioassay, an estrogenic activity of TRC similar to those of the NPs was measured. The test assay indicated a relevant decrease of the activity which corresponded with the removal of TRC during the biodegradation.

In the case of fungi with detectable Lac activity, a decrease of the activity was observed for all the tested strains in the presence of TRC. The activity of LiP was suppressed by TRC in the culture in *T. versicolor* and an increase was detected for MnP in the same culture. TRC has a stimulating effect on the activity of MnP and MiP of *I. lacteus*.

NPs were degraded by all fungi studied (Fig. 1b). Degradation of NPs or 4-n-NP has already been reported for cultures of *P. chrysosporium*, *Bjercandera* sp., *T. versicolor* and *P. ostreatus* (Soares et al., 2005, 2006; Dubroca, 2005) and several papers deal with isolated

enzyme degradation (see Cabana et al., 2007b). However, compared with the studied and described strains, the cultures of *I. lacteus* and *P. ostreatus* in our experiments were able to remove a technical mixture of NPs to below the detection limit, even within the first 3 d. On the other hand, the results from the yeast bioassay showed a residual (*I. lacteus*, *P. ostreatus*, *P. chrysosporium*) or temporally increased (*B. adusta*) estrogenic activity over the time course of NP degradation. Such results can be explained by the production of degradation intermediates that also show estrogenic activity. Several authors published fungal Lac transformations of NP that led to the formation of products with higher molecular masses than that of the parent compound, without decomposition of phenol ring (Junghanns et al., 2005; Cabana et al., 2007a).

The addition of 4-n-NP decreased the Lac activity in the cultures of *T. versicolor*, *P. ostreatus*, *I. lacteus*, and *P. cinnabarinus* significantly. The same compound also caused a drop in the level of *I. lacteus* MnP activity and an increase in MiP production in *I. lacteus* and *B. adusta* cultures. In contrast, the technical mixture of NPs, as well as 4-n-NP, induced significant Lac activity in the *T. versicolor* and *P. ostreatus* cultures. A considerably higher amount of MiP was detected in *B. adusta* when NPs were added to the cultures. Soares et al. (2006) detected an increased activity of *T. versicolor* LiP and *B. adusta* MnP in a complex liquid medium under the presence of technical NP, however, only in agitated cultures. In contrast, Lac activity of *T. versicolor* was stimulated (Soares et al., 2006) in static cultures.

*P. chrysosporium* is the only fungus out of the tested strains that was not able to degrade BPA significantly under the conditions used. However, previous reports indicate the abilities of free MnP and LiP from this fungus to degrade BPA (Tsutsumi et al., 2001; Kimura et al., 2004). All the other tested fungi removed BPA completely from the solution, except *B. adusta*. The degradation rates showed in this work are in accordance with the result published by Shin et al. (2007). The authors showed *I. lacteus* and *P. ostreatus* to be the most efficient BPA degraders among other tested ligninolytic strains. Lee et al. (2005) described the degradation of BPA by *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare* together with the elimination of estrogenic activity as well.

The presence of BPA in the cultures influenced the enzymatic activities of Lac and Lip of *D. squalence* slightly. The estrogenic activities detected in the BPA treated cultures of *T. versicolor*, *D. squalens*, *P. cinnabarinus*, and *P. magnoliae* were similar to the values obtained from *B. adusta* cultures. It is very likely that estrogenic active intermediates were formed during biodegradation. Degradation results of EE2 are shown in Fig. 1d. In these experiments, *I. lacteus*, *P. ostreatus* and *P. cinnabarinus* were the most efficient degraders since these strains removed EE2 to below the detection limit within the first 3 d of incubation. *P. chrysosporium* was not able to degrade EE2 significantly. The EE2 degradation was accompanied by a decrease in the estrogenic activity of the solution, except in the case of *P. magnoliae*. Although this strain was able to degrade about 60% of the compound, the estrogenic activity was still about 100% of the original value. It is assumed that a highly estrogen-active metabolite was formed during the transformation.

EE2 caused an induction of laccase and MnP activity in *T. versicolor* cultures.

Several authors have reported biodegradation of EE2 in soil or liquid media with only isolated enzymes from ligninolytic fungal strains, including *P. chrysosporium* MnP (Suzuki et al., 2003), *Pycnoporus coccineus* Lac (Tanaka et al., 2000), *Trametes* sp. Lac (Tanaka et al., 2001) and *T. versicolor* Lac (Suzuki et al., 2003). Suzuki et al. (2003) evaluated estrogenic activity with the yeast two hybrid assay system. They also recorded a very efficient degradation with a proportional decrease of the activity.

**Table 1**  
Detection of estrogenic activity during biodegradation of EDCs using recombinant yeast assay.

ED	Fungus	Estrogenic activity recovery <sup>a</sup> % ± SD		
		3 d	7 d	14 d
Triclosan	<i>P. ostreatus</i>	78 ± 11	28 ± 7	2.0 ± 1
	<i>T. versicolor</i>	32 ± 6	14 ± 7	2.1 ± 1
	<i>D. squalens</i>	28 ± 10	6.4 ± 4	2.7 ± 1
	<i>P. cinnabarinus</i>	15 ± 8	30 ± 5	1.6 ± 0
	<i>P. magnoliae</i>	8.2 ± 7	25 ± 7	2.1 ± 1
	<i>B. adusta</i>	80 ± 6	84 ± 12	78 ± 5
	<i>P. chrysosporium</i>	74 ± 9	20 ± 6	2.5 ± 1
	<i>I. lacteus</i>	28 ± 1	9.9 ± 7	2.2 ± 1
	4-n-Nonylphenol	<i>P. ostreatus</i>	0.5 ± 0	7.7 ± 1
<i>T. versicolor</i>		0.5 ± 0	8.1 ± 2	6.7 ± 0
<i>D. squalens</i>		7.0 ± 1	6.4 ± 0	5.8 ± 1
<i>P. cinnabarinus</i>		6.1 ± 0	6.9 ± 0	7.1 ± 0
<i>P. magnoliae</i>		6.0 ± 0	7.8 ± 1	7.5 ± 1
<i>B. adusta</i>		7.4 ± 1	6.7 ± 1	5.9 ± 0
<i>P. chrysosporium</i>		6.0 ± 0	7.3 ± 0	6.6 ± 0
<i>I. lacteus</i>		9.0 ± 3	6.9 ± 0	6.5 ± 0
4-Nonylphenols		<i>P. ostreatus</i>	1.2 ± 0	6.5 ± 5
	<i>T. versicolor</i>	50 ± 24	32 ± 14	0.0 ± 0
	<i>D. squalens</i>	5.9 ± 4	2.9 ± 2	2.4 ± 2
	<i>P. cinnabarinus</i>	3.0 ± 1	1.0 ± 1	−0.8 ± 1
	<i>P. magnoliae</i>	0.9 ± 1	1.3 ± 1	1.9 ± 1
	<i>B. adusta</i>	55 ± 17	106 ± 11	16 ± 5
	<i>P. chrysosporium</i>	79 ± 23	63 ± 24	36 ± 7
	<i>I. lacteus</i>	83 ± 18	61 ± 18	21 ± 8
	17α-Ethinylestradiol	<i>P. ostreatus</i>	14 ± 6	11 ± 7
<i>T. versicolor</i>		81 ± 10	20 ± 20	6.0 ± 3
<i>D. squalens</i>		107 ± 2	41 ± 25	22 ± 11
<i>P. cinnabarinus</i>		36 ± 20	17 ± 4	14 ± 6
<i>P. magnoliae</i>		109 ± 6	104 ± 4	101 ± 9
<i>B. adusta</i>		82 ± 12	86 ± 7	38 ± 13
<i>P. chrysosporium</i>		83 ± 5	70 ± 20	85 ± 6
<i>I. lacteus</i>		14 ± 4	7.5 ± 2	28 ± 16
Bisphenol A		<i>P. ostreatus</i>	7.2 ± 6	1.6 ± 10
	<i>T. versicolor</i>	13 ± 10	2.2 ± 0	−0.7 ± 4
	<i>D. squalens</i>	13 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
	<i>P. cinnabarinus</i>	15 ± 1	14 ± 1	15 ± 2
	<i>P. magnoliae</i>	15 ± 1	14 ± 1	15 ± 2
	<i>B. adusta</i>	63 ± 4	7.9 ± 1	10 ± 9
	<i>P. chrysosporium</i>	68 ± 15	67 ± 6	58 ± 27
	<i>I. lacteus</i>	40 ± 4	6.8 ± 4	2.1 ± 2

<sup>a</sup> Estrogenic activity is expressed as percentage of activity detected in relevant controls.

**Table 2**

Maximal activities of ligninolytic enzymes of the studied fungi in liquid nutrient media and in the presence of EDC.

Fungus	EDC	Lac		MiP		MnP		Lip	
		Max (U L <sup>-1</sup> )	Day	Max (U L <sup>-1</sup> )	Day	Max (U L <sup>-1</sup> )	Day	Max (U L <sup>-1</sup> )	Day
<i>T. versicolor</i>	Control <sup>a</sup>	41–47	3–5	ND		6	5	13	3
	Nonylphenol	87–79	3–5	ND		7–15	3–5	5–7	7–10
	4-n-Nonylphenol	6–7	6–14	ND		7	10	4	3
	Bisphenol A	62–49	3–5	ND		3–1.7	3–5	17	3
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	102–50	3–5	ND		4	5	81	3
	Triclosan	3–3.4	7–9	ND		12–20	7–11	1–6	4–11
<i>P. ostreatus</i>	Control	237–153	3–5	ND		5	5	ND	
	Nonylphenol	320–138	5–7	ND		3	5–7	ND	
	4-n-Nonylphenol	9–10	10–14	ND		2	14	ND	
	Bisphenol A	240–232	3–5	ND		4	5	ND	
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	162	3–5	ND		3	5–7	ND	
	Triclosan	39–44	4–11	ND		2	4	ND	
<i>B. adusta</i>	Control	3	5	0	7	1	3	9–8	10–12
	Nonylphenol	3	10–12	2	7	1	3	10–9	10–12
	4-n-Nonylphenol	ND		14	8	3	6	7–9	10–14
	Bisphenol A	2–3	10–12	3	5	2	12	9–11	12–14
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	2	7	3	5	1	7	8	3
	Triclosan	ND		ND		3	11	8–6	4–7
<i>I. lacteus</i>	Control	10–8	7–10	6–5	12–14	23–27	5–14	ND	
	Nonylphenol	10–11	7–10	7–5	12–14	20–33	5–14	ND	
	4-n-Nonylphenol	2	7	6–18	10–14	2	6	ND	
	Bisphenol A	9–10	7–10	5	12–14	21–35	10–12	ND	
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	9	7–10	7	12–14	27	12	ND	
	Triclosan	2	7	14–11	4–9	54–74	9–14	ND	
<i>P. chrysosporium</i>	Control	ND		ND		1	3–5	6	8–10
	Nonylphenol	ND		ND		2	3–5	5	7–11
	4-n-Nonylphenol	ND		ND		1	3–6	4	8–10
	Bisphenol A	ND		ND		1	3–6	5	8–10
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	ND		ND		2	3–5	7	8–11
	Triclosan	ND		ND		1	3–5	6	7–11
<i>D. squalens</i>	Control	12–17	6–10	ND		18–11	8–10	ND	
	Nonylphenol	13	6	ND		6	6	ND	
	4-n-Nonylphenol	15–11	6–8	ND		7	6	ND	
	Bisphenol A	6–4	3–8	ND		4	3	ND	
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	11–5	3–10	ND		5	3–6	ND	
	Triclosan	5.5–5	4–11	ND		1	4	ND	
<i>P. cinnabarinus</i>	Control	11–18	8–14	ND		3	10–14	ND	
	Nonylphenol	36–46	3–14	ND		10	8	ND	
	4-n-Nonylphenol	8–9	8–14	ND		1	8	ND	
	Bisphenol A	13–10	8–14	ND		ND		ND	
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	10	8–14	ND		6	14	ND	
	Triclosan	ND		ND		ND		ND	
<i>P. magnolia</i>	Control	ND		ND		3	8	5–3	6–14
	Nonylphenol	ND		ND		2	8	2	10
	4-n-Nonylphenol	ND		ND		4	6–8	1	10–14
	Bisphenol A	ND		ND		2	3	1	6–10
	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	ND		ND		6	6	6	6
	Triclosan	ND		ND		ND		5–3	4–14

<sup>a</sup> Cultivation without EDCs.

#### 4. Conclusions

In this study, we investigated the abilities of eight ligninolytic fungal strains to degrade several typical representatives of EDCs and a bactericide, Trc. Attention was also paid to the effect of EDCs on ligninolytic enzyme activities, and changes in estrogenic activity of the samples during biodegradation were also evaluated. The results discussed above show that almost all the fungi were able to degrade the tested EDCs under the used conditions. *I. lacteus* and *P. ostreatus* in particular were found to be the most efficient EDC degraders. However, we did not find any clear link between enzyme activities and the degradation rate. Especially in the cases of *T. versicolor*, *P. ostreatus* *P. cinnabarinus*, Lac was detected and an induction of activity was found in presence of NPs while, in general, enzyme activities were inhibited when 4-n-NP and TRC were added to the cultures.

Estrogenic activities generally decreased with the progress of degradation. However, in some cases the results from the yeast bioassay showed a residual (*I. lacteus*, *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* – EE2) or temporally increased (*B. adusta* – NPs) estrogenic activity over the course of degradation, suggesting the production of degradation intermediates with estrogenic activity.

The results from this study emphasize the need for further research, especially to identify metabolites, intermediates, and degradation products, in order to improve the understanding of the degradation mechanisms and to assess the toxicological risks related to the degradation processes of EDC.

#### Acknowledgements

This work was funded by Grants Nos. LC06066 and 2B06156 of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic,



by Grant KJB600200613 of the Grant Agency of the Academy of Science of the Czech Republic; and also by Institutional Research Concept No. AV0Z50200510.

## References

- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J., 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46, 1485–1489.
- Anderson, H.R., Andersson, A.-M., Arnold, S.F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N.A., Bjerregaard, P., Christiansen, L.B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E.B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J.B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K.L., Perez, P., Skakkeboek, N.E., Sonnenschein, N., Soto, A.M., Sumpter, J., Thorp, S.M., Grandjean, P., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Persp.* 107 (Suppl. 1), 89–108.
- Biles, J.E., Mcneal, T.P., Begley, T.H., Hollifield, H.C., 1997. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J. Agr. Food Chem.* 45, 3541–3544.
- Cabana, H., Jiwan, J.L.H., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2007a. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770–778.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N., 2007b. Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: a review. *Eng. Life Sci.* 7, 429–456.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Šašek, V., Moeder, M., 2006. Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64, 560–564.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, Č., Šašek, V., Mouglin, C., 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53, 289–294.
- Corvini, P.F.X., Schaffer, A., Schlosser, D., 2006. Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols – our evolving view. *Appl. Microbiol. Biot.* 72, 223–243.
- Dayan, A.D., 2006. Risk assessment of triclosan [Irgasan®] in human breast milk. *Food Chem. Toxicol.* 45, 125–129.
- Dubroca, J., 2005. Biotransformation of nonylphenol surfactants in soil amended with contaminated sewage sludges. In: Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D. (Eds.), *Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 305–315.
- Forana, C.M., Bennett, E.R., Benson, W.H., 2000. Marine Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Environ. Res.* 50, 153–156.
- Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166, 79–89.
- Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M.K., Schauer, F., 2000. Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microb.* 66, 4157–4160.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* 67, 167–179.
- Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin, C., Schlosser, D., 2005. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiol.-SGM* 151, 45–57.
- Keum, Y.S., Li, Q.X., 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56, 23–30.
- Kimura, M., Michizoe, J., Oakazaki, S., Furusaki, S., Goto, M., Tanaka, H., Wariishi, H., 2004. Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 495–501.
- Kwak, H.I., Bae, M.O., Lee, M.H., Lee, Y.S., Lee, B.J., Kang, K.S., Chae, C.H., Sung, H.J., Shin, J.S., Kim, J.H., Mar, W.C., Sheen, Y.Y., Cho, M.H., 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 787–795.
- Lee, S.M., Koo, B.W., Choi, J.W., Choi, D.H., An, B.S., Jeung, E.B., Choi, I.G., 2005. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 201–207.
- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., Raunio, V., 1988. Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem. J.* 254, 877–883.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biot.* 57, 20–33.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241–248.
- Shin, E.H., Choi, H.T., Song, H.G., 2007. Biodegradation of endocrine-disrupting bisphenol A by white rot fungus *Irpex lacteus*. *J. Microbiol. Biotech.* 17, 1147–1151.
- Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2005. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biot.* 66, 719–725.
- Soares, A., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2006. Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp. *BOL* 13, *Biotechnol. Lett.* 28, 139–143.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ. Health Persp.* 92, 167–173.
- Suzuki, K., Hirai, H., Murata, H., Nishida, T., 2003. Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* 37, 1972–1975.
- Tanaka, T., Taniguchi, M., 2003. Treatment of phenolic endocrine-disrupting chemicals by lignin-degrading enzymes. In: Sakurai, A. (Ed.), *Wastewater Treatment Using Enzymes*. Research Signpost, pp. 125–148.
- Tanaka, T., Yamada, K., Tonosaki, T., Konishi, T., Goto, H., Taniguchi, M., 2000. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *Water Sci. Technol.* 42 (7–8), 89–95.
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T., Taniguchi, M., 2001. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 312–316.
- Tien, M., Kirk, T.K., 1988. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Method. Enzymol.* 161, 238–248.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T., 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42, 271–276.
- Tyler, C.R., Routledge, E.J., 1998. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* 70, 1795–1804.
- Vyas, B.R.M., Bakowski, S., Šašek, V., Matucha, M., 1994. Degradation of anthracene by selected white-rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 14, 65–70.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135, 175–182.
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O., 2001. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42, 415–418.
- Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environ. Int.* 28, 215–226.

# Mechanistic Study of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol Biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: Tracking of Extracellular and Intracellular Degradation Mechanisms

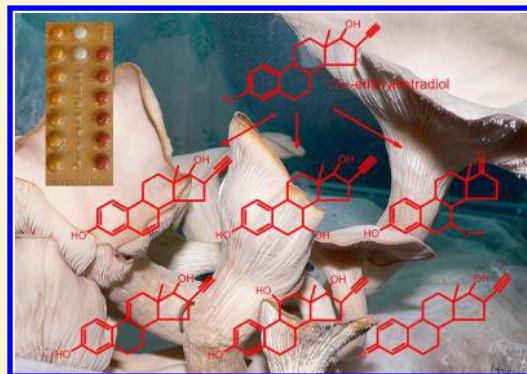
Zdena Křesinová,<sup>†,‡</sup> Monika Moeder,<sup>§</sup> Martin Ezechiáš,<sup>†,‡</sup> Kateřina Svobodová,<sup>†</sup> and Tomáš Cajthaml<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>‡</sup>Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, CZ-128 01 Prague 2, Czech Republic

<sup>§</sup>Department of Analytical Chemistry, Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

**ABSTRACT:** The white rot fungus *Pleurotus ostreatus* is able to completely remove the synthetic hormone 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2, 200  $\mu$ g in 20 mL) from a liquid complex or mineral medium in 3 or 14 days, respectively. Its efficiency has also been documented in the removal of estrogenic activity that correlated with the EE2 degradation. A set of in vitro experiments using various cellular and enzyme fractions has been performed and the results showed that EE2 was degraded by isolated laccase (about 90% within 24 h). The degradation was also tested with concentrated extracellular liquid where degradation reached 50% mainly due to the laccase activity; however, after a supplementation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Mn<sup>2+</sup>, residual manganese-dependent peroxidase activities (40 times lower than Lac) raised the degradation to 100%. Moreover, the intracellular fraction and also laccase-like activity associated with fungal mycelium were found to be efficient in the degradation too. Isolated microsomal proteins appeared to also be involved in the process. The degradation was completely suppressed in the presence of cytochrome P-450 inhibitors, piperonylbutoxide and carbon monoxide, indicating a role of this monooxygenase in the degradation process. Attention was also paid to monitoring of changes in the estrogenic activity during these particular in vitro experiments when mainly degradations related to ligninolytic enzymes were found to decrease the estrogenic activity with EE2 removal proportionally. Several novel metabolites of EE2 were detected using different chromatographic method with mass spectrometric techniques (LC-MS, GC-MS) including also [<sup>13</sup>C]-labeled substrates. The results document the involvement of various different simultaneous mechanisms in the EE2 degradation by *P. ostreatus* by both the ligninolytic system and the eukaryotic machinery of cytochromes P-450.



## INTRODUCTION

Synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) is widely used in oral contraceptive pills.<sup>1</sup> Trace concentrations (from ng to  $\mu$ g per liter) of EE2 and its conjugates, have been detected in wastewater treatment plants,<sup>2,3</sup> their effluents,<sup>4–6</sup> rivers,<sup>7–9</sup> groundwaters,<sup>10,11</sup> and also in a drinking water reservoir.<sup>7</sup> To reduce ecological as well as human health risks, development of novel approaches for removing EE2 from the environment are required.

A possible approach in estrogens elimination consists of physicochemical treatment (advanced oxidation processes, granulated activated carbon adsorption, etc.).<sup>6,12,13</sup> Some of the methods are very effective, but their high cost for maintenance or safety requirements limit their widespread use in water purification. Moreover, the tendency of EE2 to adsorb onto sludge, together with low biodegradation efficiency of wastewater treatment processes, leads to its accumulation. The sludge is used as fertilizers (biosolids) representing another source of the pollution.<sup>1,6,10</sup> In general, controlling and

optimization of biodegradation processes require the knowledge of the occurring degradation mechanisms, including characterization of the transformation products and their biological effects.

Ligninolytic (white rot) fungi have been studied from this point of view as well. They possess a unique degrading enzyme apparatus and it has been documented that they are able to biodegrade a wide range of organic pollutants. This is mainly due to their ability to excrete low-substrate specific extracellular enzymes: lignin peroxidase (LiP), manganese-dependent peroxidases (MnP), manganese-independent (versatile) peroxidases (MiP), and laccase (Lac).<sup>14</sup> However, other enzymes could also be involved in the biodegradation of EE2, e.g. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in reduction of steroids.<sup>15</sup> It is

Received: July 20, 2012

Revised: November 14, 2012

Accepted: November 14, 2012

Published: November 14, 2012

also known that the degradation of organic pollutants could also be attributed to fungal microsomal enzymes, e.g. cytochrome P-450 monooxygenase.<sup>16,17</sup>

Degradation of EE2 by whole cultures of white rot fungi has been described.<sup>18,19</sup> Several studies investigated applications of white rot fungal Lac<sup>20–23</sup> and MnP<sup>24</sup> for EE2 removal. A certain role of fungal intracellular enzymes, such as cytochrome P-450, in the biodegradation of some natural steroids as well as other xenobiotics, has been also suggested.<sup>25–27</sup> Nonetheless, only a limited number of articles deal with the characterization and localization of enzyme machineries responsible for EE2 degradation or elucidation of intracellular vs extracellular enzymes participation in the EE2 decomposition. Several authors also monitored estrogenic changes during the fungal EE2 biodegradation.<sup>18,24,28</sup> Estrogenic activities generally decreased as the degradation process progressed. However, in some cases, the results from the bioassays showed a residual or temporally increased estrogenic activity over the course of the degradation, suggesting the production of degradation intermediates with estrogenic activity. Thus, monitoring of changes in the endocrine-disrupting activity could be another useful tool for understanding and evaluating the biodegradation efficiency. The identification of EE2 metabolites can provide an additional insight into the degradation mechanism and can help to elucidate the enzyme participation in the transformation processes and moreover to assess the toxicological risks related to the degradation processes of EE2. However, limited information is available about biotransformation products of EE2 and only several abiotic EE2 degradation products resulting from chemical-catalytic processes have been reported to date,<sup>29–31</sup> together with a few publications focused on EE2 metabolic studies by bacteria,<sup>32–34</sup> algae,<sup>35</sup> and by filamentous fungi.<sup>36</sup>

This study was performed in order to investigate particular enzyme systems and cell fractions of *Pleurotus ostreatus* with respect to their abilities to degrade EE2. The fungal strain was selected according to our previous study.<sup>18</sup> The result showed *P. ostreatus* was a very efficient and promising microorganism for biodegradation of EE2. The degradation performance of the whole cell cultures was examined in two different model liquid nutrient media and further, *in vitro* experiments were designed and carried out to elucidate the participation of intracellular and extracellular enzymes in the EE2 degradation process. Removal of estrogenic activity was monitored and several EE2 metabolites were identified. To our knowledge, this is the first article describing ligninolytic fungal metabolites of EE2 and characterizing the involvement of particular enzymes in the degradation, including ligninolytic enzymes, intracellular fraction, and possible involvement of cytochrome P-450.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** EE2 (98%) was used as a substrate for degradation experiments and was purchased from Aldrich, Germany. [<sup>13</sup>C]-EE2 (99%) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Other chemicals (pure or of higher purity) used as standards were supplied by Fluka, Aldrich, or Merck (Germany). All the solvents of trace analysis quality or gradient grade were purchased from Chromservis (Czech Republic).

**Organisms and Cultivation.** The ligninolytic fungal strain *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278 was obtained from the Culture Collection of Basidiomycetes of the Academy of Sciences, Prague. Two different liquid media were used in this

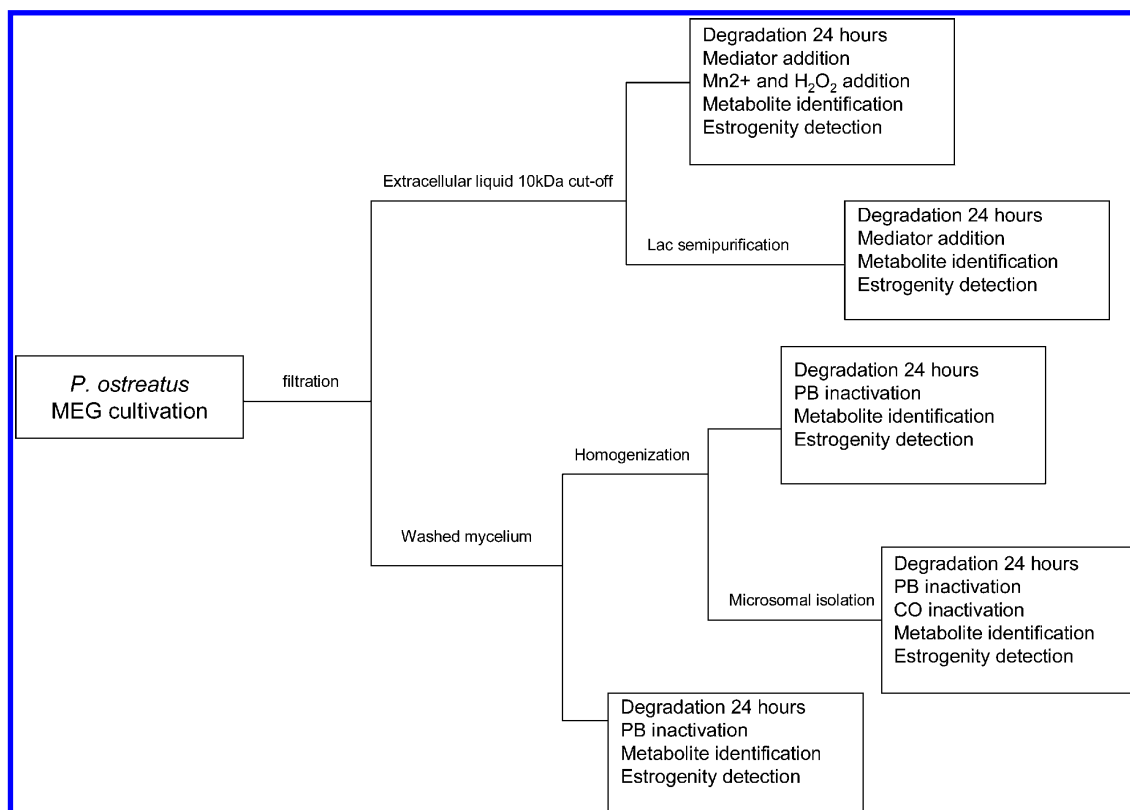
study: N-limited liquid mineral medium (LNMM) containing 2.4 mM diammonium tartrate,<sup>37</sup> and complex malt extract glucose medium (MEG), containing 5 and 10 g·L<sup>-1</sup> of malt extract broth (Oxoid, Basingstoke, UK) and glucose, respectively. Inocula were prepared in 250-mL Erlenmeyer flasks (ErF) containing 20 mL of MEG or LNMM starting from 2 mycelial plugs (0.7 mm Ø). Cultures grown for 7 days at 28 °C were homogenized by Ultraturrax-T25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany), and 5% aliquots of the mycelial suspension were used to inoculate static cultures. The static 20- or 50-mL cultures (MEG or LNMM) were incubated in 250- or 500-mL ErF at 28 °C, respectively.

**Preparation of Mycelium and Extracellular Liquids for *In Vitro* Biodegradation Experiments.** Mycelium and extracellular liquids of 4-day-old cultures (MEG) cultivated in 500-mL ErF were separated using a filter paper. The mycelium was washed with distilled water and homogenized using Ultraturrax-T25 (IKA-Labortechnik, Germany) in 300 mM ammonium acetate buffer (pH 4.5). Extracellular liquids were concentrated using 10 kDa cutoff membrane centrifugal units (Millipore, USA; conditions: 4000g, 10 min, 4 °C).

**Microsomal Fraction Purification for *In Vitro* Biodegradation Experiments.** The microsomal fraction from *P. ostreatus* was isolated from 12-day-old static cultures (500-mL ErF, 120 flasks) in MEG medium.<sup>26</sup> The mycelium was filtered on nylon cloth, washed with cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.2), and disrupted in a Virtis 45 blender at 375 Hz in the same buffer supplemented with glycerol (200 g·L<sup>-1</sup>) and bovine serum albumin (1.5 g·L<sup>-1</sup>). The supernatant was centrifuged twice (10 000g, 15 min, and then 100 000g, 90 min). The pellets from the second centrifugation were then suspended in the same buffer, centrifuged (100 000g, 90 min), suspended again, and stored in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) containing glycerol (300 g·L<sup>-1</sup>), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 0.1 mM), and glutathione (GSH, 0.1 mM). The obtained pellets were referred to as the microsomal fraction and used for *in vitro* biodegradation experiments. The total protein content in the microsomal fraction was determined by the dye-binding method using bovine serum albumine as the standard.<sup>38</sup>

**Laccase Semipurification for *In Vitro* Biodegradation Experiments.** The culture liquid from 12-day-old *P. ostreatus* cultures (500-mL ErF, 60 flasks) was separated from the mycelium by filtration on a paper filter and concentrated 60-fold using a 10 kDa cutoff membrane (Whatman, USA) at 4 °C. The retentate was filtered using cellulose membrane 0.22 µm, Whatman, USA, and further applied to a desalting Hi-Prep column (26/10; GE Healthcare, USA) equilibrated in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 3 mL·min<sup>-1</sup>. The protein fraction was applied to an anion exchange column packed with Mono Q 5/50 GL (Amersham Pharmacia, USA) and Lac was eluted by NaCl gradient (0 mM, 13 min; 0 to 1000 mM, 38 min; and 1000 mM, 10 min) in sodium phosphate buffer (monitoring of 215, 280, and 405 nm). Fractions with Lac activity were pooled and again desalted using a Hi-Prep column, stored in 10% glycerol (v/v), and used for *in vitro* incubations.

**Enzyme Assays and Determination of Estrogenic Activity.** The LiP activity was assayed with veratryl alcohol as the substrate<sup>37</sup> and MnP activity was measured as described by de Jong et al.<sup>39</sup> The MiP activity was calculated from the peroxidase activity of MnP assay detected in the absence of Mn<sup>2+</sup> ions. Lac activity was determined by oxidation of 5 mM



**Figure 1.** Schematic overview of the experimental in vitro setup.

2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid.<sup>40</sup> One unit of enzyme produced 1  $\mu\text{mol}$  of the reaction product per min under the assay conditions at room temperature. Mycelium associated laccase-like enzyme activity was determined according to Svobodová et al.<sup>41</sup> To determine the estrogenic activity, the ethyl acetate extracts were evaporated and redissolved in 30% dimethylsulfoxide (DMSO, in water, v/v) and the activity was further assessed using a recombinant yeast screen according to Routledge and Sumpter.<sup>42</sup>

**Degradation Experiments.** *P. ostreatus* was tested to degrade EE2 in vivo in MEG and LNNM media. A set of in vitro degradation experiments was performed using *P. ostreatus* fractions after cultivation in MEG. An overview of the experimental in vitro approach is described in Figure 1. In all of the degradation experiments we quantified residual EE2 concentration, determined estrogenic activity, and tried to detect degradation products by GC-MS and LC-MS techniques.

The samples for in vivo biodegradation experiments were prepared in two types of liquid media (20 mL in 250-mL EmF) in three parallels and spiked immediately after the inoculation with 100  $\mu\text{L}$  of EE2 (2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in DMSO, final concentration 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2) and harvested after 3, 7, and 14 days of cultivation. Biotic controls (BC) were spiked with only 100  $\mu\text{L}$  of DMSO. The abiotic heat-killed controls (HKC) were performed with mycelium grown for one week and killed in an autoclave.

All the in vitro experiments were performed in triplicate in 4-mL reaction tubes closed with Teflon-lined screw caps. Incubations were performed at 28 °C for 24 h on a rotary shaker (80 rpm) in the dark. Buffer controls were prepared using a spiking solution, 60 mM acetate buffer (pH 4.5), and

only water. HKC were prepared by adding heat-denatured (60 min, 100 °C) fractions.

Mycelial degradation samples were performed in 2-mL reaction mixtures containing 70 mg of wet nonhomogenized or homogenized mycelium, 60 mM acetate buffer (pH 4.5), and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2. The ABTS oxidizing enzyme activity was determined as  $81.9 \pm 7.2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry mycelium and the amount of dry mycelium in the samples was about 21 mg. Controls were performed by addition of piperonylbutoxide (PB) to the reaction mixtures to suppress the intracellular P-450 activity.

Degradation experiments with concentrated extracellular liquid were performed in 2-mL reaction mixtures containing 60 mM acetate buffer (pH 4.5), 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2, and about 10-fold concentrated extracellular liquid containing Lac (activity 1.0 U), MnP (activity 0.02 U). MiP activity was not detected. Another set of samples was incubated with addition of 200 mM  $\text{MnSO}_4$  and 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  to the reaction mixtures.

Lac degradation samples were prepared in 1-mL reaction mixtures containing 1.0 U of Lac, 60 mM acetate buffer (pH 4.5), 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2, and 1 mM hydroxybenzoic acid (HBA) for the mediated samples. The other ligninolytic activities were not detectable in this case.

Degradation samples with microsomal fraction in 1-mL reaction mixtures contained 0.5 mg of microsomal proteins resuspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2), 4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  EE2, 1 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and 2% DMSO (v/v). Controls were inactivated by addition of PB or by carbon monoxide (CO) flux into the reaction mixtures.

**EE2 Quantification.** In vitro degradation samples were acidified by addition of 20  $\mu\text{L}$  of 1 M HCl and extracted by an aliquot of ethyl acetate (EtOAc, 2 mL; 5 times). The extracts

were then dried with sodium sulfate and concentrated to dryness using a nitrogen stream. Samples were diluted in 1 mL of acetonitrile and analyzed using an HPLC-UV system (Alliance, Waters 2695 Separations Module, Waters, Milford, MA) equipped with a diode-array detector (Waters 2996). An isocratic program was used with 70% acetonitrile in water (v/v). EE2 was separated on a XBridge C18 column (250 mm × 4 mm, particle diameter 3.5 μm), provided by Waters, with a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup> at 35 °C. The detection limit for EE2 was 0.44 mg·L<sup>-1</sup>. The extraction recovery of EE2 was better than 85%.

In vivo degradation samples were acidified and measured directly after addition of 0.5 mL of acetonitrile and centrifugation (5 min, 10 000 rpm) using the same HPLC method as described above. The mycelium parts were also extracted with EtOAc to confirm that the removal of EE2 was not caused by adsorption onto the fungal biomass.<sup>43</sup>

**Metabolites Identification: GC/MS.** EtOAc extracts (0.3 mL of each) were derivatized at 50 °C for 60 min using 0.5 mL of N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA): Trimethylsilane (TMS) (99:1, v/v) and 0.3 mL of pyridine. The samples were then evaporated to dryness using a nitrogen stream, and 0.5 mL of EtOAc was added. Analyses for metabolite identification were performed with a Varian 450-GC (USA) instrument equipped with a Combi-Pal injector (CTC Analytics, Sweden) and a Varian 240 MS ion trap detector employing an electron impact ion source. One μL of the sample solution was injected into the GC-MS systems. The analyses were performed with a 30 m long × 0.25 mm I.D., 0.25 mm film thickness, DB-5MS column (Agilent, USA). The GC oven temperature program started from 60 °C (hold 1 min), then heated up to 100 °C at 25 °C·min<sup>-1</sup>, then to 135 °C at 1 °C·min<sup>-1</sup>, and finally to 240 °C at 15 °C·min<sup>-1</sup> and held isothermally for 30 min. Helium (99.999%) was used as the carrier gas, with a constant flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>. The injector was operated in the split/splitless mode, with a splitless time of 1 min. The injector temperature was 240 °C. The source, ion trap, and transfer line temperatures were 250, 220, and 280 °C, respectively. The mass spectra were recorded at 3 scans·s<sup>-1</sup> under electron impact (EI) at 70 eV and mass range 50–450 amu. Methane (99.999%) was used for chemical ionization (CI). Structures were suggested by comparing the mass spectra with the data in the NIST 08 library and independently by interpreting the fragmentation pattern. MS/MS product ion mode experiments and CI were employed for better elucidation of the metabolite structures. [<sup>13</sup>C]-labeled EE2 was also used as the substrate in parallel biodegradation experiments to confirm the relationship between EE2 and the found degradation products.

**Metabolites Identification: LC/MS.** The extracts were evaporated to dryness and redissolved in acetonitrile, and 15 μL aliquots were injected into HPLC-MS system. The apparatus consisted of an 1100 Series pump with an 1100 series autosampler (Hewlett-Packard, Germany) connected to a API 2000 triple-stage quadrupole mass spectrometer operating with an APPI interface (Applied Biosystems, USA) and Analyst 1.4 (Applied Biosystems) software. HPLC separation was performed on an Acqua C18 column (150 mm × 2.0 mm, particle diameter 3.5 μm, Phenomenex) at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup> using water (A) and acetonitrile (B) in a linear gradient (0 min, 20% B; 15 min, 80% B; and 16 min, 20% B). The analytes were detected at negative ion mode. The nebulizer gas, heater gas, curtain gas flow, and collision gas were set at 420.0,

435.5, 20.1, and 20.0 kPa, respectively. The lamp protecting gas was set at 1 mL·min<sup>-1</sup> at APPI mode. The source block was maintained at 200 °C and ion spray voltage was set at -5500 V. Nitrogen was used as curtain and collision gas. For metabolite identification, full scan analysis in the mass range of 80–800 amu was performed and product ion scan analyses were used to investigate EE2 metabolites more in detail.

**Statistical Tests.** The results represent means of the respective parallel analyses. Their significant differences were tested using *t* test (*P* < 0.05). The uncertainties of the means are displayed as their respective standard deviations.

## RESULTS AND DISCUSSION

**In vivo EE2 Degradation and Determination of the Estrogenic Activities.** As previously reported in MEG cultures, EE2 and other EDCs are able to influence enzyme activity profiles.<sup>18</sup> In the current study, a significant decrease in the Lac activity of about 50% was observed in the MEG cultures in the presence of EE2 (Table 1; *t* test, *P* < 0.05),

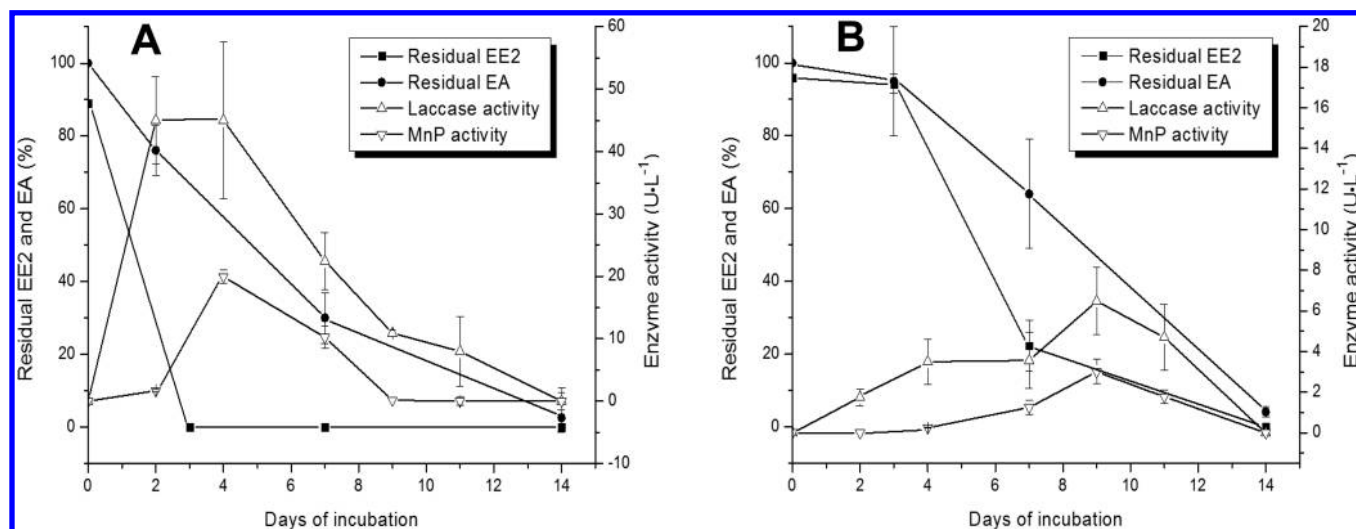
**Table 1. Detected Maximum Ligninolytic Enzyme Activities (U·L<sup>-1</sup>) in Extracellular Liquid Measured during Biodegradation Experiments (Supplemented with EE2) and in Cultivations without EE2 (Control)<sup>a</sup>**

	Lac		MiP		MnP	
	max	day	max	day	max	day
control MEG	75 (4)*	2–4	8 (3)	2–4	32 (9)	4
EE2MEG	45 (13)*	2–4	8 (2)	2	20 (2)	4
control LNMM	4 (2)	9	ND		37 (7)*	14
EE2 LNMM	6 (2)	9	ND		3 (1)*	9

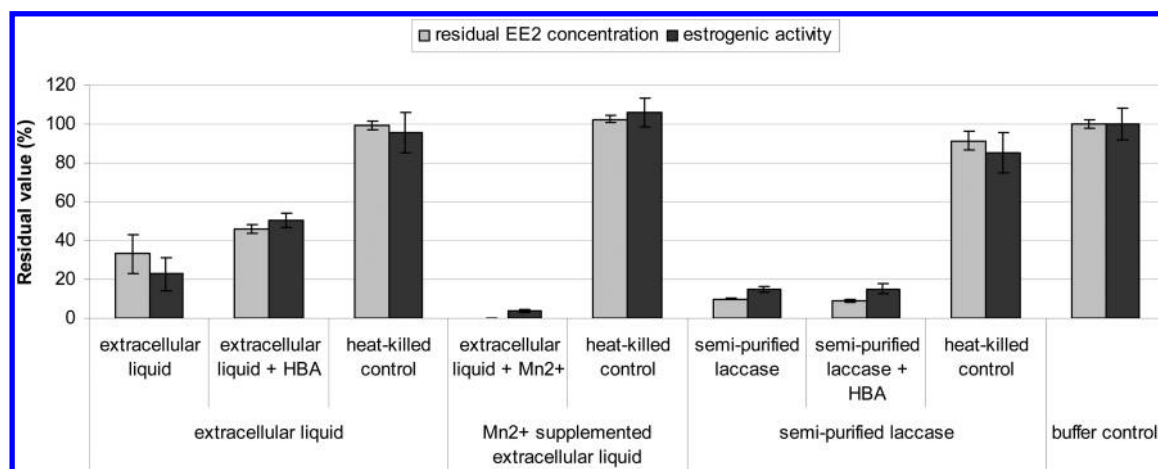
<sup>a</sup>The values are the means of three replicates, and the values in brackets are the standard deviations. ND = not detected. The values labeled with an asterisk were found to be significantly different (*t* test, *P* < 0.05).

similarly to the previous study.<sup>18</sup> In addition, strong suppression of MnP activity was recorded after EE2 addition to the LNMM cultures (about 10 times) and the enzyme activity peak maximum shifted from day 14 to day 9.

*P. ostreatus* is able to degrade EE2 in liquid media (Figure 2). The data indicate that the degradation in LNMM medium is slower in comparison with that in MEG medium. While the EE2 concentration in the MEG medium decreased below the respective limit of detection (0.2 μg·mL<sup>-1</sup>) within the first 3 days of cultivation, a significant degradation in the LNMM medium was not observed in this period (*t* test, *P* < 0.05). A decrease to about 20% of the initial EE2 concentration occurred after the first 7 days of cultivation in LNMM medium and the total EE2 removal was recorded after 14 days. The media represent very different cultivation conditions (mineral N-limited and complex) and despite the differences between the results, the data document ability of *P. ostreatus* to efficiently degrade EE2 under both of the conditions. To make metabolite identification more reliable, [<sup>13</sup>C]-labeled EE2 was degraded in the same way and finally, the degradation course of the labeled EE2 in MEG medium was the same as for the unlabeled substrate (data not shown). The profile of estrogenic activities during the biodegradation did not perfectly correlate with the EE2 concentration decrease (Figure 2, correlation coefficient for MEG 0.73, for LNMM 0.92). The level of estrogenic activity in the 3 d and 7 d samples is higher than the observed EE2 levels in both cases. The delay in the decrease in



**Figure 2.** In vivo EE2 degradation by *P. ostreatus* in MEG (A) and LNMM (B) media (20 mL in 250 mL EmF): residual concentration of EE2, estrogenic activity (EA), and the course of ligninolytic enzyme activities during biodegradation. The left axis (100%) represents  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2 and original estrogenic activity of the samples (maximal response of the test).



**Figure 3.** Extracellular in vitro EE2 degradation (24 h) and estrogenic activity determination in samples with extracellular liquid, extracellular liquid supplemented with Mn<sup>2+</sup> and hydrogen peroxide and semipurified Lac. HBA = hydroxybenzoic acid. 100% represents  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2 and its corresponding estrogenic activity.

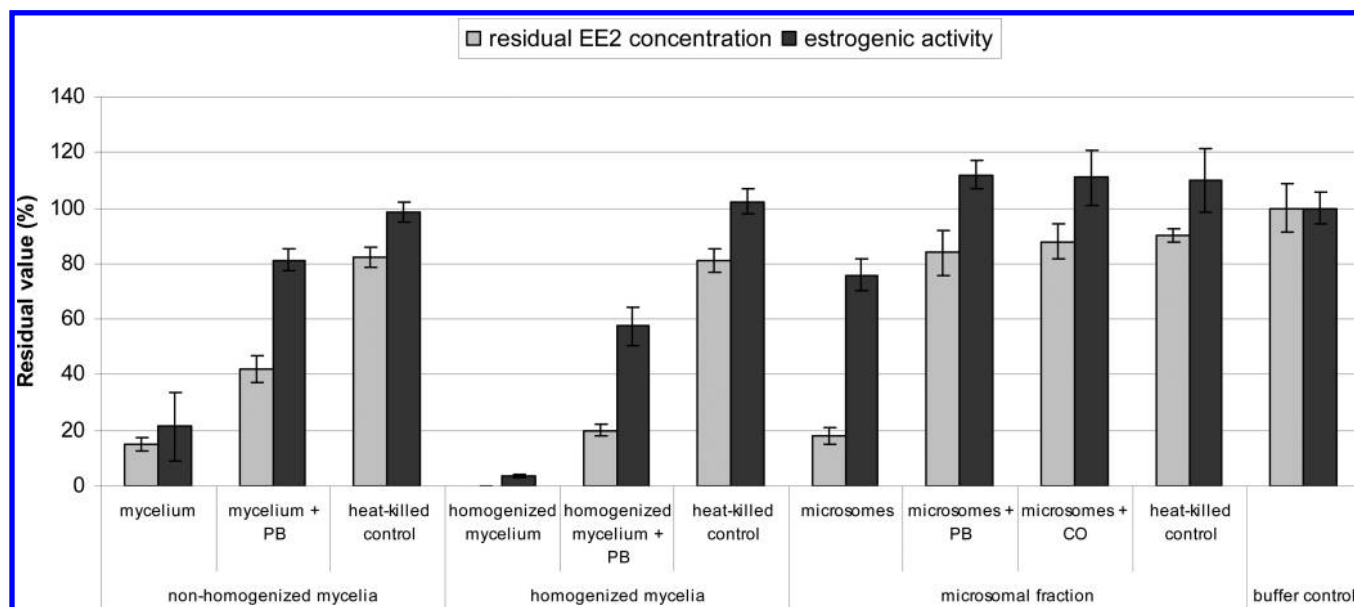
the estrogenic activities suggests a temporal formation of metabolites possessing estrogenic activity during the initial phases of biodegradation by *P. ostreatus*.

**Extracellular in Vitro EE2 Degradation.** During the degradation experiments in MEG, high extracellular activities of Lac were detected (Table 1) whereas peroxidase activities were detected at lower level. Thus, a possible involvement of Lac in EE2 degradation was investigated employing (i) the concentrated extracellular liquid with mainly Lac activity (with detectable MnP and without detectable MiP activities, further, (ii) the semipurified Lac (without detectable MnP and MiP activities), and also (iii) the laccase-redox mediator hydroxybenzoic acid in the degradation experiments (Figure 3). These degradation experiments were performed without any EE2 induction during the fungal incubation. However, EE2 was not completely removed in any of these treatments within 24 h of incubation. To the contrary, total EE2 removal was observed in the samples supplemented with Mn<sup>2+</sup> and hydrogen peroxide despite the substantially lower MnP activity in the extracellular liquid. The tested Lac and MnP activities in the extracellular liquid samples were 1.0 U and 0.025 U, respectively, and the

activity in the semipurified Lac degradation samples was 1.0 U. The results indicate simultaneous biodegradation of EE2 by laccase and residual MnP. We also performed experiments where Lac was induced by the presence of EE2; however, the degradation efficiency with this EE2 induced Lac was about 50% lower (data not shown).

The estrogenic activity changes correspond to the decrease in the EE2 concentrations as displayed in Figure 3. This finding suggests that ligninolytic extracellular enzymes decompose EE2 in such a way that the formed metabolites lack activity or these intermediates are rapidly transformed further into other less active compounds. These results are in accordance with findings of other authors<sup>24</sup> who recorded almost complete removal of estrogenic activity simultaneously with EE2 degradation by MnP and Lac from *P. chrysosporium* and *T. versicolor*, respectively. Other authors have also reported biodegradation of EE2 with isolated enzymes from ligninolytic fungal strains such as Lac originated mainly from *Trametes versicolor*,<sup>21,22</sup> *P. ostreatus*, and *Pycnoporus coccineus*.<sup>22</sup>

**Mycelium-Mediated and Intracellular in Vitro EE2 Degradation.** The most effective (total) degradation of EE2



**Figure 4.** Intracellular and mycelial in vitro EE2 degradation (24 h) and estrogenic activity determination with washed mycelium, homogenized mycelium, and microsomal fraction. PB = piperonylbutoxide; CO = carbon monoxide. 100% represents  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2 for mycelial samples and buffer control and its corresponding estrogenic activity. Microsomal degradation was performed with  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of EE2.

**Table 2. Characterization and Structural Assignment of the Detected EE2 Metabolites; the EI Spectra Belong to the Trimethylsilylated Derivatives of the Original Compounds**

Metabolite assignment	Formula	Suggested metabolite structure	Metabolite related structure	Origin	Mw (CI)	EI characteristics Ions: m/z (% intensity)	Methods of characterization	Literature
1		<b>19-nor-17α-pregna-1,3,5(10),6-tetraen-20-yne-3,17β-diol</b>	dehydrogenated EE2	MEG cultivation	294	438 (21,3), 423 (12,9), 348 (1,3), 283 (16,0), 281 (14,0) 207 (21,2) 73 (99,9)	GC-MS, GC-MS <sup>2</sup> , <sup>13</sup> C	
2		<b>19-nor-17α-pregna-1,3,5(10),9(11)-tetraen-20-yne-3,17β-diol</b>	dehydrogenated EE2	MEG cultivation	294	438 (99,9), 423 (22,5), 333 (16,2), 283 (31,2), 229 (39,8), 207 (29,1), 73 (95,6)	GC-MS, GC-MS <sup>2</sup> , LC-MS	
3		<b>19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,7(or 6)-17β-triol</b>	hydroxylated EE2	MEG cultivation; mycelial degradation	312	513 (10,2), 439 (9,2), 318 (56,8), 355 (19,5), 73 (99,9)	GC-MS, GC-MS <sup>2</sup> , <sup>13</sup> C	36
4		<b>19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,1(or 2)-17β-triol</b>	hydroxylated EE2	MEG cultivation; mycelial degradation	312	513 (13,8), 355 (22,3), 217 (15,2), 73 (99,9)	GC-MS, GC-MS <sup>2</sup>	35, 36
5		<b>6-methoxy-estrone</b>	methoxylated E1	LNMM cultivation	300	372 (99,9), 357 (10,2), 197 (38,1), 126 (26,3), 73 (20,8)	GC-MS	35
6		<b>19-nor-17α-pregna-4(10)-en-17-hydroxy-1,3-dione</b>	dioxo-E2	Semipurified Lac	288	360 (89,3), 345 (97,7), 285 (82,1), 270 (76,5)	GC-MS	

was recorded with homogenized mycelium where the laccase-like (ABTS oxidizing) activity was found to be associated with the mycelium (91.2 U per dry mycelium) and readily available microsomal intracellular fraction (Figure 4). In this experiment, we also detected the highest removal of estrogenic activity (residual 4%). After an application of piperonylbutoxide (PB), which is supposed to be an inhibitor of cytochrome P-450, we detected a drop in the degradation efficiency and a substantially

higher residual estrogenic activity (58%) was recorded. A significantly lower degradation extent (*t* test,  $P < 0.05$ ) was observed after the application of nonhomogenized mycelium, when 20% of the initially applied amount of EE2 was found. In this case, the degradation of EE2 seems to be performed mainly via extracellular enzyme activity; however, inhibition by PB again suggests the participation of intracellular cytochrome P-450. The difference between the degradation rates of

homogenized and nonhomogenized mycelium could be attributed to EE2 transport through the cell-wall and the membrane. The slight discrepancies between the recoveries in the heat-killed controls and their respective estrogenic activities could be caused by matrix effects to both of the assays. However, regarding this issue, heat-killed controls were realized in parallel for all of the conditions under study.

The ability of the intracellular microsomal fraction to degrade EE2 is documented in the third set of experiments where the isolated microsomes from *P. ostreatus* removed more than 80% of the applied amount of EE2. This reaction was completely inhibited by carbon monoxide or PB. It is worth noting that the results of the microsomal degradation were obtained independently of the addition of NADPH. However, Sono et al.<sup>46</sup> described unusual forms of P-450 containing an electron donor in one of their protein domains that can finally support the possible participation of P-450 cytochrome in the degradation as observed in our case. Recently published results showed that the degradation of various organic pollutants by white rot fungi could be attributed to the function of cytochrome P 450.<sup>28,44–46</sup>

**Metabolite Identification.** Table 2 lists the electron impact (EI) mass spectral characteristics, methods of detection, and the type of degradation experiment where the EE2 metabolites were determined. In all the degradation experiments, the intermediates and products appeared only at trace levels. All of the compounds were detected with GC-MS techniques after trimethylsilylation and the EI spectra were used for structural suggestions. Most of the EI spectra were explored using MS/MS (product ion scan) to clarify the fragmentation sequence and to increase the probability of structural assignment. Chemical ionization using methane was employed to find the molecular weight of unknown metabolites. In one case, the respective metabolite (no. 2) was also confirmed using the LC-APPI-MS technique of the non derivatized degradation mixture. The EE2 origin of metabolites 1 and 3 were confirmed in a parallel degradation experiment using [<sup>13</sup>C]-labeled EE2. The structures of the detected degradation products are shown in Table 2. The results indicate that *P. ostreatus* was able to convert EE2 into several more polar metabolites.

The structures of the intermediates again suggest that the transformation of EE2 is mediated by several enzyme mechanisms. The dehydrogenated EE2 intermediates (1, 2) could be formed by the enzyme 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase or an enzyme with similar action. This enzyme is known to be involved in steroid degradation by *P. ostreatus* culture.<sup>47</sup> In this work, metabolites 1 and 2 were proven to be formed during the cultivation with [<sup>13</sup>C]-labeled EE2. Oxidation of the phenolic functional group in the case of metabolite 6 could be attributed to a laccase-catalyzed reaction. As copper-containing enzymes, Lac are able to efficiently oxidize phenols and anilines in the presence of oxygen.<sup>14</sup> The transformation of EE2 into E1 has already been observed by other authors after degradation using unspecified biofilm bacterial isolates from a river system and after degradation using *Sphingobacterium* sp.<sup>33,34</sup> Further methoxylation on the benzene ring of estrone (metabolite 5) could be caused by the consequent methylation of hydroxyl derivatives as it was observed for various other aromatic endocrine disrupting pollutants degraded by *P. ostreatus*.<sup>50,51</sup> This sequence probably requires hydroxylation by cytochrome P-450 and further action of methyl transferases. Hydroxylated EE2 (metabolites 3 and 4) were previously

described and identified using NMR by Choudhary et al.<sup>36</sup> The authors identified several metabolites resulting from degradation of norethisterone by the nonligninolytic fungus *Cephalosporium aphidicola*, which transformed this steroid to EE2 and consequently to hydroxylated EE2. This fungus is also well-known for its ability to hydroxylate and modify other steroids and sesquiterpenoids.<sup>48</sup> Choudhary et al.<sup>36</sup> also found methylation of the hydroxyl EE2 metabolite by *Cephalosporium*. Moreover, they detected several other hydroxylated EE2 metabolites by zygomycete *Cunninghamella elegans*.<sup>36</sup> Likely, the majority of the fungal steroid hydroxylation reactions are catalyzed probably by cytochrome P450-dependent monooxygenases,<sup>17</sup> where all the stereogenic centers of steroids, are attacked quite nonspecifically and frequently in high yields.<sup>49</sup> In the case of *P. ostreatus*, P-450 may play an important role in the EE2 metabolism, but our results also documented that other enzyme apparatuses are involved. Thus the yields of simple hydroxylated products occur only at trace concentrations that do not allow any further isolation and application of spectrometric methods other than MS.

In summary, the presented data of the investigations suggest that a synergic action of several metabolic mechanisms is supporting an efficient EE2 degradation by *P. ostreatus*. Possible roles of the metabolic mechanisms could be attributed to intracellular degradation via microsomal enzymes, mycelium associated laccase-like activity, extracellular degradation via manganese-dependent peroxidase, and extracellular Lac activity. The possible contribution of the individual degradation activities is indicated and each degradation step was evaluated according to its ability to individually remove estrogenic activity. The data document that despite recalcitrance of EE2, this compound is efficiently degraded by ligninolytic system; additionally, also by the more general present eukaryotic machinery of cytochromes P-450. To our knowledge, this is the first article describing EE2 biodegradation products and the mechanisms possibly involved in the process by a ligninolytic fungus. This physiological group of basidiomycetes represents one of a few microorganisms representatives that are able to effectively decompose EE2.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +4202241062498; fax: +4202241062384; e-mail: cajthaml@biomed.cas.cz.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by grants TA01020804 and Competence Centre TE01010218 of the Czech Technology Agency and also by 503/10/0408 of the Czech Science Foundation.

## REFERENCES

- (1) Cajthaml, T.; Křesinová, Z.; Svobodová, K.; Sigler, K.; Řezanka, T. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 3325–3335.
- (2) Miège, C.; Choubert, J. M.; Ribeiro, L.; Eusèbe, M.; Coquery, M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 1721–1726.
- (3) Ying, G. G.; Kookana, R. S.; Kumar, A. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27*, 87–94.



- (4) Johnson, A. C.; Aerni, H. R.; Gerritsen, A.; Gibert, M.; Giger, W.; Hylland, K.; Jurgens, M.; Nakari, T.; Pickering, A.; Suter, M. J. F.; Svenson, A.; Wettstein, F. E. Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. *Water Res.* **2005**, *39*, 47–58.
- (5) Tyler, C. R.; Routledge, E. J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1795–1804.
- (6) Clouzot, L.; Marrot, B.; Doumenq, P.; Roche, N. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environ. Prog.* **2008**, *27*, 383–396.
- (7) Morteani, G.; Möller, P.; Fuganti, A.; Paces, T. Input and fate of anthropogenic estrogens and gadolinium in surface water and sewage plants in the hydrological basin of Prague (Czech Republic). *Environ. Geochem. Health* **2006**, *28*, 257–264.
- (8) Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1202–1211.
- (9) Belfroid, A. C.; Van der Horst, A.; Vethaak, A. D.; Schäfer, A. J.; Rijs, G. B. J.; Wegener, J.; Cofino, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* **1999**, *225*, 101–108.
- (10) Campbell, C. G.; Borglin, S. E.; Green, F. B.; Grayson, A.; Wozei, E.; Stringfellow, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* **2006**, *65*, 1265–1280.
- (11) Adler, P.; Steger-Hartmann, T.; Kalbfus, W. Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2001**, *29*, 227–241.
- (12) Esplugas, S.; Bila, D. M.; Krause, G. L. T.; Dezotti, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *149*, 631–642.
- (13) Liu, Y.; Kanjo, Y.; Mizutani, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 731–748.
- (14) Pointing, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 20–33.
- (15) Rižner, T. L.; Žakelj-Mavrič, M. Characterization of fungal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Comp. Biochem. Phys. B* **2000**, *127*, 53–63.
- (16) Doddapaneni, H.; Yadav, J. S. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *65*, 559–565.
- (17) Van den Brink, H. J. M.; Van Gorcom, R. F. M.; Van den Hondel, C. A. M. J. J.; Punt, P. J. Cytochrome P-450 enzyme systems in fungi. *Fungal Gen. Biol.* **1998**, *23*, 1–17.
- (18) Cajthaml, T.; Křesinová, Z.; Svobodová, K.; Möder, M. Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* **2009**, *75*, 745–750.
- (19) Blánquez, P.; Guieysse, B. Continuous biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by *Trametes versicolor*. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *150*, 459–462.
- (20) Tanaka, T.; Tonosaki, T.; Nose, M.; Tomidokoro, N.; Kadomura, N.; Fujii, T.; Taniguchi, M. Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 312–316.
- (21) Auriol, M.; Filali-Meknassia, Y.; Tyagi, R. D.; Adams, C. D. Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Res.* **2007**, *41*, 3281–3288.
- (22) Tanaka, T.; Yamada, K.; Tonosaki, T.; Goto, H.; Taniguchi, M. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. *Water Sci. Technol.* **2000**, *45*, 89–95.
- (23) Lloret, L.; Eibes, G.; Lu-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Lema, J. M. Laccase catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *51*, 124–131.
- (24) Suzuki, K.; Hirai, H.; Murata, H.; Nishida, T. Removal of estrogenic activities of 17 $\alpha$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res.* **2003**, *37*, 1972–1975.
- (25) Hirose, S.; Tazaki, M.; Hiratsuka, N.; Yanai, S.; Kabumoto, H.; Shikyo, R.; Arisawa, A.; Sakaki, T.; Tsunekawa, H.; Johdo, O.; Ichinose, H.; Wariishi, H. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of versatile monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 118–123.
- (26) Cajthaml, T.; Erbanová, P.; Kollmann, A.; Novotný, Č.; Šašek, V.; Mougín, C. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* **2008**, *53*, 289–294.
- (27) Subramanian, V.; Yadav, J. S. Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 5570–5580.
- (28) Cabana, H.; Jones, J. P.; Agathos, S. N. Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Eng. Life Sci.* **2007**, *7*, 429–456.
- (29) Skotnicka-Pitak, J.; Garcia, E. M.; Pitak, M.; Aga, D. S. Identification of the transformation products of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -estradiol by mass spectrometry and other instrumental techniques. *TrtAC, Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 1036–1052.
- (30) Hwang, S.; Lee, D.; Lee, C.; Ahn, I. Oxidation of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol with Mn(III) and product identification. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *155*, 334–341.
- (31) Li, C.; Li, X. Z.; Graham, N.; Gao, N. Y. The aqueous degradation of bisphenol A and steroid estrogens by ferrate. *Water Res.* **2008**, *42*, 109–120.
- (32) Ren, Y. X.; Nakano, K.; Nomura, M.; Chiba, N.; Nishimura, O. Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Res.* **2007**, *41*, 3089–3096.
- (33) Pieper, C.; Rotard, W. Investigation on the removal of natural and synthetic estrogens using biofilms in continuous flow biofilm reactors and batch experiments analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. *Water Res.* **2011**, *45*, 1105–1114.
- (34) Haiyan, R.; Shulan, J.; Ahmad, N. u. d.; Dao, W.; Chengwu, C. Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. *Chemosphere* **2007**, *66*, 340–346.
- (35) Della Greca, M.; Pinto, G.; Pistillo, P.; Pollio, A.; Previtiera, L.; Temussi, F. Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere* **2008**, *70*, 2047–2053.
- (36) Choudhary, M. I.; Musharraf, S. G.; Ali, R. A.; Atta-ur-Rahman, A. M. Microbial transformation of antifertility agents, norethisterone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59b*, 319–323.
- (37) Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **1988**, *161*, 238–248.
- (38) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (39) de Jong, E.; Cazemier, A. E.; Field, J. A.; Delbont, J. A. M. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized *de-novo* by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 271–277.
- (40) Matsumura, E.; Yamamoto, E.; Numata, A.; Kawano, T.; Shin, T.; Murao, S. Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-

ethylbenzothiazoline-6-sulfatic acid)). *Agric. Biol. Chem. Tokyo* **1986**, *50*, 1355–1357.

(41) Svobodová, K.; Majcherczyk, A.; Novotný, Č.; Kúes, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in decolorization of synthetic dyes. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 463–471.

(42) Routledge, E. J.; Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* **1996**, *15*, 241–248.

(43) Covino, S.; Svobodová, K.; Křesinová, Z.; Petruccioli, M.; Federici, F.; D'Annibale, A.; Čvančarová, M.; Cajthaml, T. *In vivo* and *in vitro* polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3004–3012.

(44) Marco-Urrea, E.; Pérez-Trujillo, M.; Cruz-Morató, C.; Caminal, G.; Vicent, T. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* **2010**, *78*, 474–481.

(45) Kamei, I.; Kogura, R.; Kondo, R. Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 566–575.

(46) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841–2887.

(47) Rizner, T. L.; Zakelj-Mavric, M. Characterization of fungal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Comp. Biochem. Phys. B* **2000**, *127*, 53–63.

(48) Bhatti, H. N.; Zubair, M.; Rasool, N.; Hassan, Z.; Ahmad, V. U. Microbial transformation of sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1155–1168.

(49) Pellissier, H.; Santelli, M. Chemical and biochemical hydroxylations of steroids. *Org. Prep. Proc. Int.* **2001**, *33*, 1–58.

(50) Muzikář, M.; Křesinová, Z.; Svobodová, K.; Filipová, A.; Čvančarová, M.; Cajthamlová, K.; Cajthaml, T. Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *196*, 386–394.

(51) Čvančarová, M.; Křesinová, Z.; Filipová, A.; Covino, S.; Cajthaml, T. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere* **2012**, *88*, 1317–1323.





## Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products

Monika Čvančarová<sup>a,b</sup>, Zdena Křesinová<sup>a,b</sup>, Alena Filipová<sup>a</sup>, Stefano Covino<sup>a</sup>, Tomáš Cajthaml<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, CZ-128 01 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 October 2011

Received in revised form 16 March 2012

Accepted 31 March 2012

Available online 29 April 2012

#### Keywords:

Polychlorinated biphenyls

PCBs

Biodegradation

White rot fungi

*Pleurotus ostreatus*

*Irpelex lacteus*

### ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the degrading capabilities of eight ligninolytic fungal representatives towards a technical mixture of polychlorinated biphenyls (Delor 103). Axenic cultures of the fungi, either in complex or N-limited liquid media, were spiked with the technical mixture of Delor 103. All of the fungal strains were able to degrade the pollutant significantly after 6 weeks of incubation in both media. Outstanding results were achieved by the treatment with *Pleurotus ostreatus*, which removed 98.4% and 99.6% of the PCB mixture in complex and mineral media, respectively. This fungus was the only one capable of breaking down penta- and hexachlorinated biphenyls in the complex medium. Ecotoxicological assays performed with the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* demonstrated that all of the fungal strains employed in this study were able to remove the toxicity only temporarily (e.g., after 28 d of incubation), while *P. ostreatus* was capable of suppressing the toxicity associated to PCBs along the whole incubation period in both media. We also performed an extensive set of qualitative GC/MS analyses and chlorinated derivatives of hydroxy- and methoxy-biphenyls were detected along with monoaromatic structures, i.e. chlorobenzoic acids, chlorobenzaldehydes and chlorobenzyl alcohols. This results indicate that both intracellular (cytochrome P-450 monooxygenase, aryl-alcohol dehydrogenase and aryl-aldehyde dehydrogenase) and extracellular (ligninolytic enzymes) enzymatic systems could be involved in the biotransformation of PCB by ligninolytic fungi. The data from this work also document that the fungi are able to degrade further the main metabolites on the PCB pathway (i.e. chlorobenzoic acids) simultaneously with PCBs.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Polychlorinated biphenyls belong amongst persistent organic pollutants because of their environmental recalcitrance and ecotoxicity. Although their production was prohibited a long time ago, they still persist in the environment and represent a serious environmental problem. One of the few available techniques to decontaminate PCB-polluted matrices consists in thermal physico-chemical methods that represent technically and financially demanding approaches. Alternatively, bioremediation has attracted greater public interest as an effective and economically feasible strategy for the removal of various pollutants. PCBs can be degraded by aerobic bacteria via several pathways, the most important and widely studied of which is a co-metabolic process performed by biphenyl catabolic enzymes encoded by the *bph* gene cluster (Field and Sierra-Alvarez, 2008; Furukawa and Fujihara, 2008). Unfortunately, this pathway leads to the formation of chlorobenzoic acids (CBAs), which tend to accumulate as dead-end

products, since PCB-degrading bacteria are usually not able to grow on these substrates (Kobayashi et al., 1996). The build up of CBAs in the growth medium, in fact, may result in feed-back inhibition and impede or slow down PCB biotransformation (Adebusoye et al., 2008). Rieske-type biphenyl dioxygenases encoded by *bph* operone are enzymes with high substrate specificity and only a fraction of PCB congeners can be transformed by these enzymes. Another great limitation of organopollutant degradation by prokaryotes is the fact that bacterial degrading enzymes are usually intracellular and intake represents an important rate-limiting step. Therefore, it is worth looking for other microorganisms that are able to degrade PCBs.

Ligninolytic fungi (LF), with their extracellular, low-substrate-specificity enzymes, represent a promising alternative for the biodegradation of various aromatic pollutants (Cajthaml and Svobodová, 2011). The ligninolytic system consists of three major peroxidases: lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), versatile peroxidases (VP) and laccase, which belongs to phenol oxidases. LF can effectively degrade various recalcitrant organopollutants, e.g., chlorophenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, dioxins, furans, endocrine disruptors (Kamei et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.

E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).

2006a; Field and Sierra-Alvarez, 2008; Cajthaml et al., 2009; Kasai et al., 2010). LF were also shown to be capable of degrading PCBs, see Field and Sierra-Alvarez (2008) and references therein. Moreover, fungi were shown to be capable of splitting the aromatic ring of various persistent aromatic pollutants (Cajthaml et al., 2006; Pinedo-Rivilla et al., 2009) and, to some extent, of mineralizing PCBs (Thomas et al., 1992; Beaudette et al., 1998). In addition, a few works documenting the *in vitro* degradation of PCBs using isolated ligninolytic enzymes can be found in the literature (Krčmář et al., 1999; Takagi et al., 2007), although their exact role in the general degradation process has not yet been fully elucidated (Field and Sierra-Alvarez, 2008). Little is known about PCB degradation products after treatment with either LF or their extracellular enzymes, or about their possible eco-toxicity. In this respect, Kamei et al. (2006b) reported the formation of methoxy metabolites of several toxic PCB congeners by *Phlebia brevispora*. In another work (Kamei et al., 2006a) dealing with one single PCB (4,4'-dichlorobiphenyl), ring fission of the PCB was observed, while several other metabolites were characterized.

In contrast to a large number of articles dealing with bacterial degradation of PCB, only a few papers have been published describing the degradation potential of fungi towards these compounds. The mechanisms, transformation products of the degradation and main limiting factors for possible bioremediation applications remain unclear.

The aim of this work was to compare several promising ligninolytic fungal strains for degradation of a technical mixture of PCBs in two different liquid media. The mixture of pollutants employed in this study, i.e. Delor 103, includes compounds with various degree of chlorination and, therefore, a detailed congener specific analysis was performed in order to monitor the degradation process. The detection of PCB transformation products was also considered and they were mainly analyzed using GC-MS and related techniques. Since the degradation of hazardous pollutants might be accompanied by either a decrease or an increase in toxicity and numerous polar metabolites have been found, this work was also concerned with determining the eco-toxicity of samples after incubation with the above-mentioned fungi.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The investigation was performed using the PCB commercial mixture Delor 103 with an average of 3 chlorosubstituents, obtained from a former Czechoslovak producer (Chemko Strážské, Slovakia). The analytical standards of individual PCB congeners were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). All the solvents were purchased from Merck, Germany or Chromservis (Prague, Czech Republic) and were of p.a. quality, trace analysis quality or gradient grade. All the chemicals used for the biochemical studies were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Microorganisms, inocula preparation and measurement of enzyme activities

All of the ligninolytic fungal strains used in this study (*Irpex lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595 and *Dichomitus squalens* CCBAS 750) were obtained from the Culture Collection of Basidiomycetes of the Academy of Science, Prague. Fungal inocula were grown under stationary conditions for 7 d at 28 °C either in complex malt

extract-glucose medium (MEG) or in low-nitrogen mineral medium (LNMM), as described elsewhere (Cajthaml et al., 2008). The cultures were then homogenized with Ultraturrax-T25 (IKA-Labor-technik, Staufen, Germany) and this suspension was used for inoculation in the degradation experiments.

LiP (E.C. 1.11.1.14) was assayed with veratryl alcohol as the substrate (Dejong et al., 1994) and MnP (E.C. 1.11.1.13) was determined with 2,6-dimethoxyphenol (Matsumura et al., 1986). Laccase (Lac, E.C. 1.10.3.2) was estimated with 2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid as the substrate (Covino et al., 2010). Manganese-independent peroxidase (MIP) was calculated from the peroxidase activity of the MnP assay detected in the absence of Mn<sup>2+</sup> ions.

### 2.3. Degradation of PCB in liquid media

The liquid media degradation experiments were performed as static cultures, incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks in five parallel experiments at 28 °C. The details can be found in Cajthaml et al. (2009). Briefly, the cultures containing 20 mL of media were spiked with a solution of the PCBs (Delor 103) in dimethyl formamide (DMF, 100 µL) reaching 200 µg of Delor 103 per flask. In an additional experiment with *P. ostreatus*, we applied larger amounts of PCBs reaching 1000 and 2000 µg of Delor 103 per flask. The heat-killed controls were performed with 1-week growth of fungal cultures, which were killed in an autoclave before addition of the PCB solution. All of the cultures were incubated in the darkness at 28 °C in five replicates and harvested after 28 and 42 d.

### 2.4. Extraction and quantitative analyses of PCBs

The extraction of liquid cultures was performed according to Cajthaml et al. (2006). Briefly, the whole content of each liquid culture was homogenized and acidified to pH 2. It was then extracted with five 10 mL portions of ethyl acetate and the extracts were dried with sodium sulfate. Then the extracts were concentrated with a rotary evaporator to a final volume of 10 mL. This solution was used directly for quantitative GC-MS analyses or derivatized in order to perform qualitative analysis of PCB metabolites.

Quantitative analyses of PCBs were performed with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS; 450-GC, 240-MS ion trap detector, Varian, Walnut Creek, CA). The GC instrument was equipped with a split/splitless injector maintained at 240 °C. A DB-5MS column (Agilent, Prague, Czech Republic) was used for the separations (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 mm film thickness). The temperature program started at 60 °C and was held for 1 min in the splitless mode. Then the splitter was opened with ratio 1:50. The oven was heated to 115 °C at a rate of 25 °C min<sup>-1</sup> with a subsequent temperature ramp up to 240 °C at a rate of 1.5 °C min<sup>-1</sup>, where this temperature was maintained for 20 min. The solvent delay time was set at 5 min and the transfer line temperature was set at 240 °C. The mass spectra were recorded at 3 scans s<sup>-1</sup> under electron impact at 70 eV and mass range 50–450 amu.

### 2.5. Qualitative analyses of PCB transformation products

Qualitative analysis of the PCB degradation products was performed from liquid cultures in that the degradation intermediates were separated and characterized or identified by the same GC-MS instrumentation with the same temperature program. The ethyl acetate extracts were injected both directly without any derivatization and also after trimethylsilylation with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Merck, Germany) and methylation with diazomethane (Cajthaml et al., 2006). MS/MS experiments and chemical ionization (CI) were employed for better elucidation of the metabolite structures. The excitation potential for the MS/

MS product ion mode employed was 0.2 V and was increased to 0.8 V for more stable ions. Acetonitrile was used as the medium for CI, where the ionization maximum time was 2000 and 40  $\mu$ s for the reaction.

## 2.6. Toxicity assay

The ecotoxicity test of samples after degradation in liquid media was performed with the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (strain NRRL-B-11177) according to the standard procedure ISO 2007 (ISO 11348-3: 2007). Aliquots of the ethyl acetate extracts (0.5 mL) were evaporated to dryness and dissolved again in dimethyl sulfoxide, which was directly applied to the test (2% of DMSO in the reaction mixture). The luminescence readings were obtained with a Lumino M90a luminometer (ZD Dolní Újezd, Czech Republic) at a temperature of  $15 \pm 0.2$  °C. The inhibition of bioluminescence was recorded after 15-min exposure.

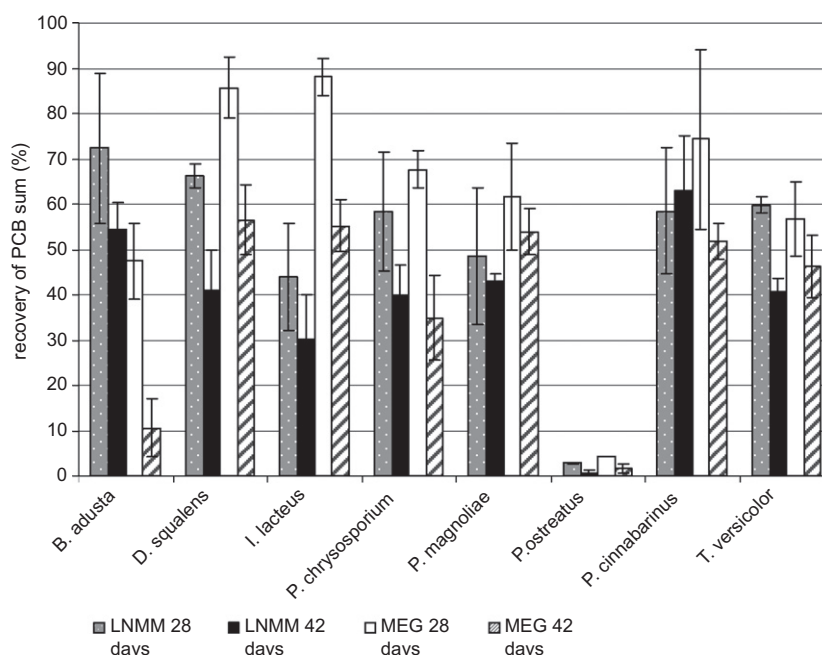
## 3. Results and discussion

### 3.1. Degradation of PCBs

As mentioned above, the fungal strains being studied were incubated in liquid media together with the commercial mixture Delor 103, which is similar to Aroclor 1242. As the PCB mixture was added to the cultures at the time of inoculation, mycelia were exposed to the toxic influence of both PCBs and their metabolites for the whole incubation period. We tried to estimate this toxic effect by weighing the fungal biomass produced either in the presence or in the absence of the pollutants. However, we did not observe any significant differences ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ) between samples spiked with PCBs and their respective biotic controls, i.e. cultures spiked with pure DMF (data not shown). This result indicates that, under our experimental conditions, the mixture of PCBs displayed low acute toxicity toward the fungi. The two nutrient media were selected according to our experience as model examples of two different physiological conditions, i.e. low nitrogen mineral and complex rich media (Cajthaml et al., 2009). Under these

cultivation conditions, it is possible to demonstrate the influence of nutrient availability on PCB degradation abilities. This is important especially in the case of some LF, the ligninolytic system of which is affected by the nitrogen and carbon concentrations (Pointing, 2001). The efficiency of PCB degradation (0.2 mg of Delor 103) by the tested fungi is shown in Fig. 1. The results are displayed as the sums of 25 dominant congeners of Delor 103 compared with heat-killed controls. All of the strains were able to decompose at least some of the congeners; however, *P. ostreatus* was found to be much more effective than the other strains. This strain was able to decompose 98.4% and 99.6% of PCBs in MEG and LNNM media, respectively. The data are in accordance with the literature where this strain has already been repeatedly shown to be effective in PCB degradation (Moeder et al., 2005; Field and Sierra-Alvarez, 2008). In addition, we performed congener-specific analyses of the PCB mixture and found that, in the LNNM medium, all of the strains being studied were able to significantly degrade PCBs from tri- to hexachlorinated representatives (data not shown). In contrast, in MEG medium, *P. ostreatus* was the only fungus capable of breaking down penta- and hexachlorinated congeners (Fig. 2, Electronic Supplementary Material). These degradation experiments were performed with 0.2, 1.0 and 2.0 mg of PCB mixture per flask, theoretically representing concentrations of 10, 100 and 200 ppm of Delor 103, respectively. The results show that the capacity of *P. ostreatus* to remove PCBs is somehow limited and, with larger amounts of PCBs, we were not able to detect any significant removal of several tetra-, penta- and hexachlorinated biphenyls ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ). These results document that the efficiency of the PCB congener degradation by the fungus is selective, which was discussed in the review by Field and Sierra-Alvarez (2008).

Because it is thought that the ligninolytic system could be involved in the degradation of PCBs by these fungi (Köller et al., 2000), we monitored the extracellular enzyme activity during the whole incubation period. However, we found out that there was absolutely no correlation between the activities of Lac, MnP, Lip and MiP and the degradation effectiveness (data not shown) (Haritash and Kaushik, 2009; Covino et al., 2010). During the monitoring, we observed only a certain influence of PCB addition on the time course of the Lac activity during the cultivation. In this regard,



**Fig. 1.** Recovery of the sum of PCBs (25 congeners) after biodegradation with the studied fungal strains. The values are the means of five replicates and the error bars represent the standard deviations and the extraction recoveries where the controls were better than 86% for each congener.

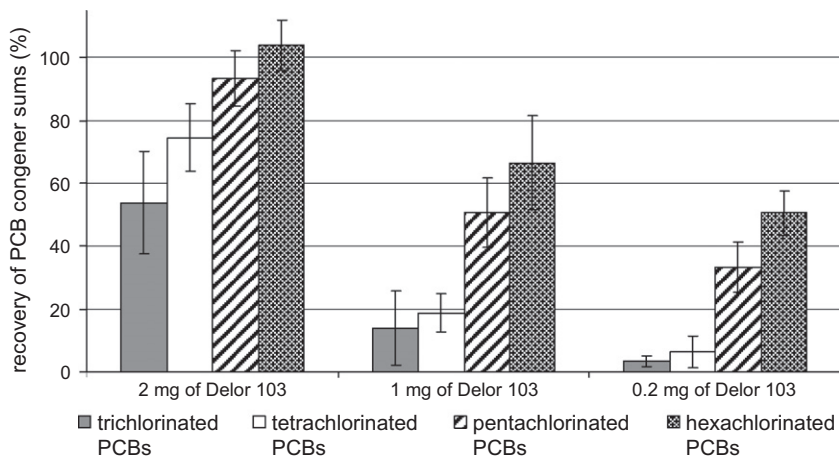


Fig. 2. Recovery of particular groups of PCBs after initial spiking of 0.2, 1.0 and 2.0 mg of Delor 103 and 42 d incubation with *P. ostreatus* in MEG.

the addition of Delor 103 promoted an increase in the Lac activity of *P. cinnabarinus* and *T. versicolor* in LNNM (from 10 to 118 and from 4 to 183 U L<sup>-1</sup>, respectively). In both cases, however, activity peaks were reached after 28 d of cultivation. The mentioned increase in the Lac activity of *T. versicolor* has already been observed in our previous work. The activity was enhanced by the presence of CBAs (Muzikář et al., 2011), which appeared to be important fungal metabolites of PCBs (see below). The same effect was observed for *D. squalens* in MEG medium, whose Lac activity increased from 11 to 82 U L<sup>-1</sup>; however, the maxima was attained after 10 d of incubation in the presence of PCBs compared to the relative biotic control (24 d). Another situation was observed in the case of *P. ostreatus*. The only activity of the fungus in MEG medium that we detected was Lac and this reached 103 U L<sup>-1</sup> (10 d). This activity was completely suppressed by the addition of Delor 103. It should be noted that some influence on ligninolytic enzyme activities has been repeatedly observed with other pollutants when, e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons and probably their transformation products were demonstrated to act as inducers or inhibitors of the ligninolytic system (Kollmann et al., 2005; Canas et al., 2007; Cajthaml et al., 2008; Covino et al., 2010).

### 3.2. Acute toxicity detection

In order to evaluate the real efficiency of microorganisms in biodegrading organic pollutants, it is necessary to monitor the biodegradation process from other perspectives than only determination of the original compounds (Brassington et al., 2007). The quantification of PCBs enables only observation of the first transformation step; however, it provides no information about the possible production of other toxic compounds. This is especially true for lipophilic compounds, which often have very low acute toxicity. Therefore, we performed a toxicity test employing luminescent bacterium *V. fischeri*. The results of the test are shown in Fig. 3. The samples were diluted (see above) in such a way that inhibitions of heat-killed controls reached values between 35% and 50% to enable monitoring of a possible increase in the toxicity. The results revealed that *P. ostreatus* was the only fungus that was able to decrease the toxicity significantly (*t*-test, *P* < 0.05). Other fungi that temporarily reduced the toxicity in LNNM after 28 d were *B. adusta*, *I. lacteus* and *D. squalens*; however, the toxicity increased again during the second period of the cultivation. Surprisingly, we detected an increase in inhibition even in samples with *B. adusta* in

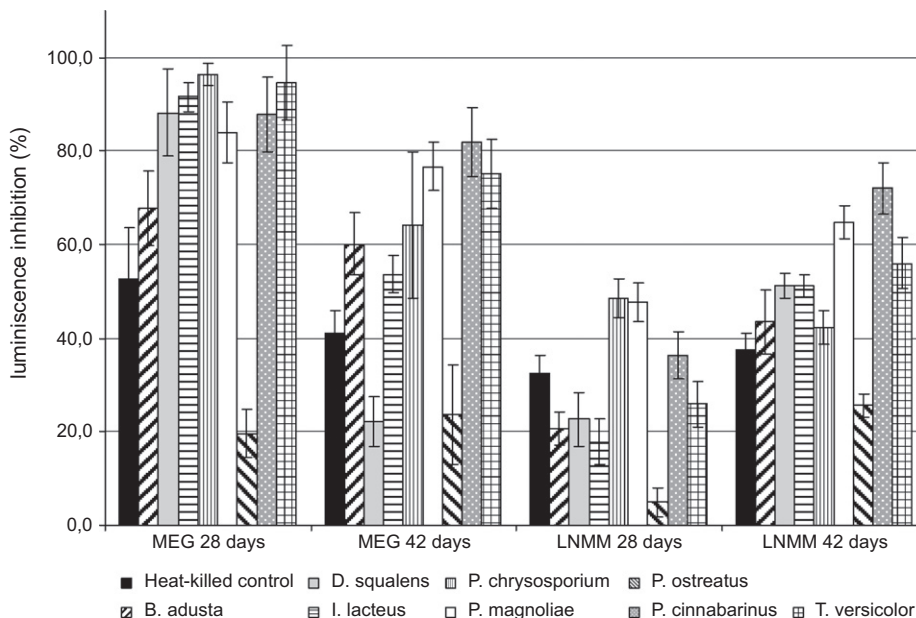


Fig. 3. Luminescence inhibition in heat-killed controls and after incubation of the tested fungal strains in LNNM and MEG media after 28 and 42 d of incubation with 0.2 mg of Delor 103. The results are the means of the replicates and the error bars represent the standard deviations.

**Table 1**  
Retention data and electron impact mass spectral characteristics of PCB metabolites. The structures labeled with an asterisk were confirmed using authentic standards. Derivatization was performed either as methylation with diazomethane (Met) or as trimethylsilylation with BSTFA (TMS). Question marks represent the positions of the respective substituents which were not specified.

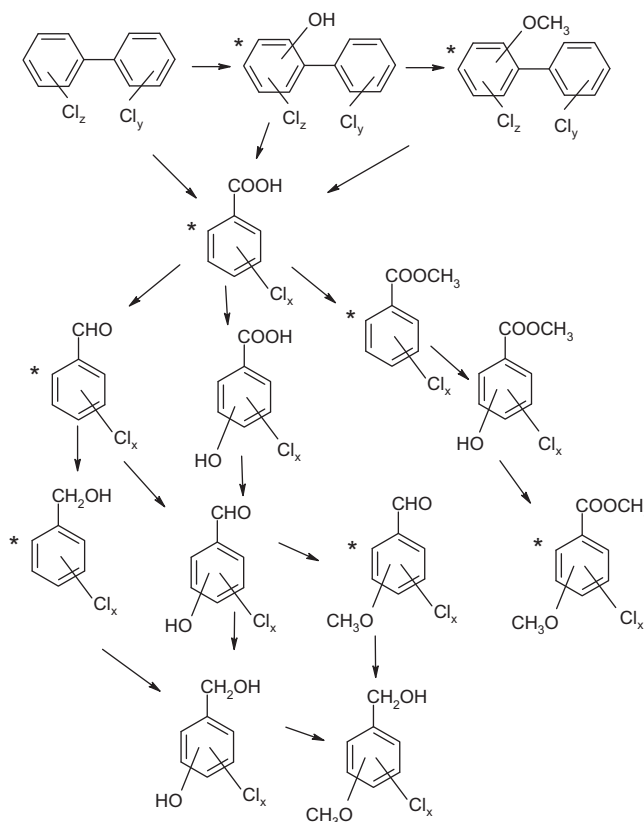
<i>t<sub>R</sub></i> (min)	MW according to CI	<i>m/z</i> of fragment ions (relative intensity)	Possible structure	Type of derivatization
12.76	170	172 (7.0), 170 (20.5), 139 (100), 141 (32.2), 111 (44.5), 113 (14.8)	2-chlorobenzoic acid methyl ester*	Met
12.86	170	172 (19.4), 171 (35.0), 170 (56.3), 169 (100), 141 (6.8), 126 (13.6), 111 (11.7), 77 (15.5)	?-chloro-?-methoxybenzaldehyde	Met
13.09	174	176 (62.4), 174 (70.3), 173 (100), 145 (47.0), 139 (54.2), 111 (50.1), 75 (61.1), 74 (52.6)	3,5-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
13.09	170	172 (14.1), 170 (38.3), 139 (100), 141 (34.8), 111 (58.9), 113 (16.2)	?-chlorobenzoic acid methyl ester	Met
13.25	174	176 (39.5), 175 (70.2), 174 (61.4), 173 (100), 147 (16.9), 145 (25.9), 75 (18.0), 74 (15.0)	2,4-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
13.32	174	176 (38.2), 175 (68.4), 174 (61.3), 173 (100), 111 (25.0), 75 (61.0), 74 (45.9), 50 (25.3)	2,5-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
13.87	174	176 (37.5), 175 (69.0), 174 (62.8), 173 (100), 147 (21.9), 145 (37.4), 75 (36.4), 74 (26.3)	2,3-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
14.11	174	176 (38.9), 175 (69.5), 174 (64.9), 173 (100), 147 (28.1), 145 (43.0), 75 (29.1), 74 (24.9)	3,4-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
16.64	204	206 (32.5), 204 (43.4), 177 (9.9), 175 (63.4), 173 (100), 147 (9.6), 145 (7.9), 109 (7.8), 75 (33.9)	2,6-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
17.01	204	208 (2.0), 206 (14.1), 204 (20.5), 177 (8.9), 175 (63.1), 173 (100), 147 (21.1), 145 (33.2), 109 (17.8), 75 (16.0)	3,5-dichlorobenzoic acid methyl ester	Met
17.72	204	208 (5.4), 206 (12.9), 204 (20.7), 177 (9.9), 175 (61.1), 173 (100), 147 (15.5), 145 (29.0), 109 (16.2), 75 (95.6)	2,4-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
17.87	204	208 (3.7), 206 (18.3), 204 (25.7), 177 (11.9), 175 (62.1), 173 (93.3), 147 (6.4), 145 (19.3), 109 (17.1), 75 (100)	2,5-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
18.49	204	208 (2.7), 206 (19.8), 204 (32.4), 177 (10.3), 175 (64.6), 173 (100), 147 (19.7), 145 (35.1), 109 (22.9), 74 (27.6)	3,4-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
18.98	204	208 (1.3), 206 (16.3), 204 (19.0), 177 (19.0), 175 (56.9), 173 (100), 149 (29.4), 147 (47.7), 145 (19.0), 109 (14.4), 75 (97.4)	2,3-dichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
19.10	248	235 (62.2), 233 (78.5), 161 (67.2), 159 (100), 123 (10.7), 103 (32.1), 73 (15.3)	TMS 2,6-dichlorobenzyl alcohol*	TMS
19.15	170	172 (19.4), 171 (35.0), 170 (56.3), 169 (100), 141 (6.8), 126 (13.6), 111 (11.7), 77 (15.5)	?-chloro-?-methoxybenzaldehyde	Met
19.51	248	235 (67.6), 233 (100), 205 (18.5), 203 (25.6), 161 (41.4), 159 (64.2), 123 (18.4), 103 (18.9)	TMS 2,5-dichlorobenzyl alcohol*	TMS
19.70	248	235 (58.0), 233 (84.2), 161 (61.1), 159 (100), 123 (13.8), 103 (29.1), 73 (12.7)	TMS 2,4-dichlorobenzyl alcohol*	TMS
20.68	238	242 (6.4), 240 (19.3), 238 (19.7), 211 (29.3), 209 (95.0), 207 (100), 183 (3.4), 181 (14.1), 179 (14.5), 143 (11.0), 109 (12.8), 74 (12.9)	2,4,6-trichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
22.67	238	242 (7.1), 240 (25.7), 238 (25.1), 211 (31.5), 209 (98.1), 207 (100), 183 (5.7), 181 (12.6), 179 (14.5), 143 (10.5), 109 (11.7), 74 (14.1)	2,3,6-trichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
23.30	238	242 (9.3), 240 (29.4), 238 (29.5), 211 (29.7), 209 (95.4), 207 (100), 183 (6.8), 181 (21.6), 179 (20.7), 143 (14.2), 109 (15.6), 74 (14.5)	2,3,5-trichlorobenzoic acid methyl ester*	Met
23.50	208	177 (60.1), 175 (100), 147 (19.8), 145 (23.9), 109 (26.4)	?-?-dichlorobenzoyl chloride	Met
23.72	238	242 (8.6), 240 (26.2), 238 (25.5), 211 (32.1), 209 (97.1), 207 (100), 183 (6.8), 181 (16.8), 179 (19.2), 143 (11.7)	?-?-trichlorobenzoic acid methyl ester	Met
24.97	234	238 (4.3), 236 (41.1), 234 (67.2), 207 (15.4), 205 (84.6), 203 (100), 162 (14.1), 160 (18.6), 111 (15.0), 97 (31.9)	?-?-dichloro-?-methoxybenzoic acid methyl ester	Met
29.39	242	211 (31.3), 209 (91.3), 207 (100), 181 (27.3), 179 (32.9), 143 (14.4), 109 (15.8)	?-?-trichlorobenzoyl chloride	Met
36.24	238	240 (65.9), 238 (100), 168 (21.3), 139 (60.3)	?-?-dichloro-?-hydroxybiphenyl	Met
37.35	272	276 (27.7), 274 (93.7), 272 (100), 173 (39.2)	?-?-trichloro-?-hydroxybiphenyl	Met
40.36	252	254 (68.1), 252 (100), 237 (25.6), 239 (18.4), 211 (27.2), 209 (40.7), 173 (13.9), 139 (28.6)	?-?-dichloro-?-methoxybiphenyl	Met
41.71	272	276 (26.0), 274 (86.7), 272 (100), 173 (27.9)	?-?-trichloro-?-hydroxybiphenyl	Met
42.27	286	290 (37.2), 288 (95.0), 286 (100), 290 (59.6), 273 (33.4), 271 (32.6), 245 (63.3), 243 (49.0), 173 (51.2)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
42.85	272	276 (25.6), 274 (86.8), 272 (100), 202 (27.4), 173 (27.8)	?-?-trichloro-?-hydroxybiphenyl	Met
42.95	286	290 (46.5), 288 (93.9), 286 (100), 290 (59.6), 273 (29.7), 271 (31.8), 245 (62.4), 243 (55.9), 173 (42.5)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
43.10	286	290 (71.0), 288 (89.6), 286 (100), 273 (37.5), 271 (53.2), 245 (53.7), 243 (55.7), 173 (64.8)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
43.38	272	276 (27.5), 274 (98.7), 272 (100), 173 (22.6)	?-?-trichloro-?-hydroxybiphenyl	Met
45.33	286	290 (35.4), 288 (95.8), 286 (100), 273 (52.0), 271 (56.1), 245 (56.4), 243 (55.6), 173 (61.7)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
46.18	286	290 (68.0), 288 (88.1), 286 (100), 273 (27.0), 271 (31.9), 245 (41.8), 243 (50.7), 173 (71.2)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
46.63	286	290 (33.1), 288 (93.0), 286 (100), 273 (63.4), 271 (62.0), 245 (63.8), 243 (69.8), 173 (51.1)	?-?-trichloro-?-methoxybiphenyl	Met
49.59	316	320 (26.9), 318 (100), 316 (87.7), 301 (50.4), 303 (54.1), 305 (14.7), 303 (54.1), 301 (50.4), 275 (41.9), 273 (39.5), 260 (32.0), 258 (32.3), 240 (48.0), 238 (75.2)	?-?-trichloro-?-dimethoxybiphenyl	Met
49.81	320	322 (82.5), 320 (66.6), 307 (10.0), 305 (43.2), 281 (71.2), 279 (100), 277 (22.9), 207 (72.8)	?-?-tetracloro-?-methoxybiphenyl	Met
52.65	320	322 (66.1), 320 (59.0), 307 (10.2), 281 (45.6), 279 (100), 277 (74.2)	?-?-tetracloro-?-methoxybiphenyl	Met
53.17	320	322 (39.4), 320 (100), 307 (51.0), 305 (55.2), 281 (43.8), 279 (67.9), 207 (56.5)	?-?-tetracloro-?-methoxybiphenyl	Met



MEG medium despite the fact that this fungus substantially reduced the original concentration of PCBs. Analyzing the data from this experiment led to the suggestion that fungal treatment of PCBs could potentially lead to the formation of toxic metabolites by the fungi; therefore we performed an extensive set of qualitative analyses to detect these, so far not intensely studied, compounds. As already mentioned above, CBAs can play an important role in the acute toxicity level, since these compounds were documented to be highly toxic compounds toward *V. fischeri* and ligninolytic fungi (Muzikář et al., 2011).

### 3.3. Detection of PCB degradation products

The PCB metabolites were analyzed with GC–MS and their structures were suggested by comparing the mass spectra with the data in the NIST 08 library and independently by interpreting the fragmentation pattern. Additionally, unknown structures of metabolites were explored using MS/MS (product ion scan) to clarify the fragmentation sequence. The mass spectral characteristics of the detected PCB degradation products are listed in Table 1. All of these structures were detected after spiking of the fungal cultures with PCBs namely the commercial mixture Delor 103. Some of the metabolites were detected after trimethylsilylation (e.g., chlorobenzyl alcohols) and several of them were confirmed by comparison with the available chemical standards (labeled with an asterisk). All of the detected intermediates were found at only trace levels, suggesting that none of them were substantially accumulated during degradation. Forty-one PCB degradation products have been found in various fungal cultures and in both media. Among them, 16 metabolites represent derivatives of the biphenyl structure while the others are compounds resulting from ring-fission of one of the benzene rings. Additional details are given in the Electronic Supplementary Material. The individual groups of detected intermediates include dichlorinated, trichlorinated and tetrachlorinated derivatives of hydroxy and methoxy biphenyls. Further PCB transformation products that we detected were CBAs, chlorinated benzaldehydes and chlorinated alcohols. Several hydroxylated derivatives of these monoaromatic structures were also observed. The presence of hydroxylated compounds suggests the possible involvement of the monooxygenase system of cytochrome P-450 in the degradation, as was already suggested by other authors (Matsuzaki and Wariishi, 2005; Kamei et al., 2006b). Kamei et al. (2006b) detected several methoxylated metabolites from two pentachlorinated biphenyls degraded by *P. brevispora*; however, they did not find any hydroxylated compounds, which they expected to be present. In another work, Kamei et al. (2006a) performed a degradation experiment with two strains of *Phanerochaete*, which degraded 4,4'-dichloro biphenyl. In this case, the authors detected methoxy and hydroxy derivatives and further transformation to 4-chlorobenzoic acid. Kamei and collaborators suggested its further transformation via a reductive pathway. The possible formation of 4-chlorobenzoic acid had already been suggested by Dietrich et al. (1995). These findings are in agreement with the results presented in this paper and the results in our previous work Muzikář et al. (2011). In that paper, the transformation of 12 representatives of CBAs is described in detail, showing that CBAs were degraded by the same set of ligninolytic fungi as in this manuscript. The degradation products that were identified were mainly methoxy and hydroxy derivatives produced together with the reduced forms of the original acids. These results showed that the fungi were probably able to transform CBAs via several pathways with significant reduction of toxicity during the process. Several of the CBA metabolites found in that paper (Muzikář et al., 2011) are identical to the metabolites detected after the degradation of PCBs from the current work listed in Table 1. Finally, if we take into consideration the data from the



**Fig. 4.** Proposed pathway of PCB degradation by ligninolytic fungi. All of the structures labeled with asterisk have been detected after LF degradation of PCBs within this work (see Table 1). The hydroxylated and methoxylated PCBs were also detected in few cases by Kamei et al. (2006a,b). All of the CBA transformation products were previously detected during CBA degradation by Muzikář et al. (2011). Hydroxylated chlorobenzaldehyde has not been detected and it is just hypothesized.

above-mentioned works and the current paper, we can suggest a possible degradation scheme of PCBs by ligninolytic fungi (Fig. 4). In fact, this scheme is an enlargement of the CBA fungal degradation pathway (Muzikář et al., 2011). The pathway indicates that there are several mechanisms that probably participate in the degradation. An involvement of cytochrome P-450 has already been repeatedly suggested in the degradation of aromatic organo-pollutants (Bezalel et al., 1996; Matsuzaki and Wariishi, 2005; Cajthaml et al., 2008; Covino et al., 2010) and it can be hypothesized that P-450 brings about the first hydroxylation attack on the PCB molecule. Once the initial oxidation of the aromatic structure has occurred, another enzymatic system (e.g., ligninolytic) is assumed to perform the cleavage of the aromatic structure (Baborová et al., 2006; Cajthaml et al., 2006). Moreover, alcohol-dehydrogenase, aryl-aldehyde dehydrogenase and also cytochrome P-450 could be responsible for the transformation (reduction) of the carboxylic group of CBAs (Sono et al., 1996; Matsuzaki et al., 2008; Muzikář et al., 2011).

## 4. Conclusion

In this work, we demonstrated and proved that ligninolytic fungi are efficient degraders of PCBs and performed a comparison of degradation performance of the most studied species under model liquid conditions. *P. ostreatus* appeared to be the most efficient under both types of experimental conditions. This strain was the only one that was able to suppress acute toxicity during the degradation process, observed using the luminescent bacteria toxicity assay.

Using detailed analysis, we found that all the fungi degraded PCB congeners specifically. Attention was also paid to characterization of the degradation products and this study revealed that the fungi probably transform PCBs via hydroxylated and methoxylated derivatives to CBAs that are further transformed via a reductive pathway. This was also demonstrated for variously chlorinated biphenyls. CBAs represent crucial recalcitrant bacterial PCB metabolites; however, as opposed to bacteria, the fungi can efficiently perform the transformation further to form less toxic products. The data from this work prove the ability of the fungi to degrade PCBs with different level of chlorination, from mono to hexachlorinated congeners via the mentioned pathways. Moreover, the fungi have been documented to degrade further the main metabolites on the pathway (i.e. CBAs) simultaneously with PCBs. The promising degradation results in this study emphasize the need for further research, especially to identify the participation of different enzymatic mechanisms, which still remains unclear, in order to improve the understanding of the whole degradation process.

### Acknowledgment

This work was supported by Grant No. 525/09/1058 of the Science Foundation of the Czech Republic.

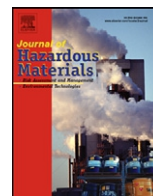
### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.107>.

### References

- Adebusoye, S.A., Picardal, F.W., Ilori, M.O., Amund, O.O., 2008. Influence of chlorobenzoic acids on the growth and degradation potentials of PCB-degrading microorganisms. *World J. Microb. Biotechnol.* 24, 1203–1208.
- Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K., Cajthaml, T., 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res. Microbiol.* 157, 248–253.
- Beaudette, L.A., Davies, S., Fedorak, P.M., Ward, O.P., Pickard, M.A., 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2020–2025.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P.P., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2547–2553.
- Brassington, K.J., Hough, R.L., Paton, G.I., Semple, K.T., Risdon, G.C., Crossley, J., Hay, I., Askari, K., Pollard, S.J.T., 2007. Weathered hydrocarbon 1 wastes: a risk management primer. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 199–232.
- Cajthaml, T., Svobodová, K., 2011. Biodegradation of aromatic pollutants by ligninolytic fungal strains. In: Singh, S.N. (Ed.), *Microbial Degradation of Xenobiotics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 291–316.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Šašek, V., Moeder, M., 2006. Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz(a)anthracene by a ligninolytic fungus. *Chemosphere* 64, 560–564.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, C., Šašek, V., Mougin, C., 2008. Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia Microbiol.* 53, 289–294.
- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M., 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75, 745–750.
- Canas, A.I., Alcalde, M., Plou, F., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Camarero, S., 2007. Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2964–2971.
- Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'Annibale, A., Čvančarová, M., Cajthaml, T., 2010. In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* 101, 3004–3012.
- Dejong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A., Debont, J.A.M., 1994. Physiological-role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de-novo by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microb.* 60, 271–277.
- Dietrich, D., Hickey, W.J., Lamar, R., 1995. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microb.* 61, 3904–3909.
- Field, J.A., Sierra-Alvarez, R., 2008. Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environ. Pollut.* 155, 1–12.
- Furukawa, K., Fujihara, H., 2008. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 433–449.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
- ISO 11348-3: 2007. Water quality – determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – Part 3: method using freeze-dried bacteria. ISO (International Organization for Standardization), Geneva, Switzerland.
- Kamei, I., Kogura, R., Kondo, R., 2006a. Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp MZ142. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 566–575.
- Kamei, I., Sonoki, S., Haraguchi, K., Kondo, R., 2006b. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 932–940.
- Kasai, N., Ikushiro, S., Shinkyo, R., Yasuda, K., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Sakaki, T., 2010. Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 773–780.
- Kobayashi, K., KatayamaHirayama, K., Tobita, S., 1996. Isolation and characterization of microorganisms that degrade 4-chlorobiphenyl to 4-chlorobenzoic acid. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 42, 401–410.
- Köller, G., Möder, M., Czihal, K., 2000. Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study. *Chemosphere* 41, 1827–1834.
- Kollmann, A., Boyer, F.D., Ducrot, P.H., Kerhoas, L., Jolival, C., Touton, I., Einhorn, J., Mougin, C., 2005. Oligomeric compounds formed from 2,5-xylidine (2,5-dimethylaniline) are potent enhancers of laccase production in *Trametes versicolor* ATCC 32745. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 251–258.
- Krčmář, P., Kubatová, A., Votruba, J., Erbanová, P., Novotný, C., Šašek, V., 1999. Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World J. Microb. Biotechnol.* 15, 269–276.
- Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., Murao, S., 1986. Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxyl-benzoic acids in the presence of abts (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). *Agric. Biol. Chem.* 50, 1355–1357.
- Matsuzaki, F., Wariishi, H., 2005. Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1184–1190.
- Matsuzaki, F., Shimizu, M., Wariishi, H., 2008. Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. *J. Proteome Res.* 7, 2342–2350.
- Moeder, M., Cajthaml, T., Koeller, G., Erbanová, P., Šašek, V., 2005. Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere* 61, 1370–1378.
- Muzikář, M., Křesinová, Z., Svobodová, K., Filipová, A., Čvančarová, M., Cajthamlová, K., Cajthaml, T., 2011. Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *J. Hazard. Mater.* 196, 386–394.
- Pinedo-Rivilla, C., Aleu, J., Collado, I.G., 2009. Pollutants biodegradation by fungi. *Curr. Org. Chem.* 13, 1194–1214.
- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20–33.
- Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D., Dawson, J.H., 1996. Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2841–2887.
- Takagi, S., Shiota, C., Sakaguchi, K., Suzuki, J., Sue, T., Nagasaka, H., Hisamatsu, S., Sonoki, S., 2007. Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere* 67, S54–S57.
- Thomas, D.R., Carswell, K.S., Georgiou, G., 1992. Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1395–1402.





## Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi

Milan Muzikář<sup>a,b</sup>, Zdena Křesinová<sup>a,c</sup>, Kateřina Svobodová<sup>a</sup>, Alena Filipová<sup>a</sup>, Monika Čvančarová<sup>a,c</sup>, Kamila Cajthamlová<sup>a</sup>, Tomáš Cajthaml<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Technická 5, CZ-160 28 Prague 6, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, CZ-128 01 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 May 2011

Received in revised form 23 August 2011

Accepted 10 September 2011

Available online 16 September 2011

#### Keywords:

Chlorobenzoic acid

Polychlorinated biphenyls

Biodegradation

White rot fungi

*Irpex lacteus*

### ABSTRACT

We investigated the abilities of several perspective ligninolytic fungal strains to degrade 12 mono-, di- and trichloro representatives of chlorobenzoic acids (CBAs) under model liquid conditions and in contaminated soil. Attention was also paid to toxicity changes during the degradation, estimated using two luminescent assay variations with *Vibrio fischeri*. The results show that almost all the fungi were able to efficiently degrade CBAs in liquid media, where *Irpex lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Dichomitus squalens* appeared to be the most effective in the main factors: degradation and toxicity removal. Analysis of the degradation products revealed that methoxy and hydroxy derivatives were produced together with reduced forms of the original acids. The findings suggest that probably more than one mechanism is involved in the process. Generally, the tested fungal strains were able to degrade CBAs in soil in the 85–99% range within 60 days. Analysis of ergosterol showed that active colonization is an important factor for degradation of CBAs by fungi. The most efficient strains in terms of degradation were *I. lacteus*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* in soil, which were also able to actively colonize the soil. However, in contrast to *P. ostreatus* and *I. lacteus*, *B. adusta* was not able to significantly reduce the measured toxicity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chlorinated organic pollutants are a class of serious environmental contaminants because of their environmental persistence and ecotoxicity. Chlorinated benzoic acids (CBAs) are widespread environmental pollutants resulting primarily from microbial biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs), reviewed, e.g., in Field and Alvarez [1], and some herbicides [2]. CBAs are significantly more soluble than their parent compounds and can therefore enter into the aqueous phase from the contaminated soil of polluted sites. Some mono-, di-, and tri-CBAs have been shown to cause genomic damage to tobacco plants [3], and to be toxic to aquatic organisms such as ciliate, *Daphnia*, algae and fish [4–6]. Several mono, di and trichlorinated isomers were also found to possess estrogenic-disrupting activity [7]. CBAs represent crucial recalcitrant metabolites on the biphenyl pathway during bacterial PCB transformation. Although it was found that CBAs are not very toxic toward bacteria, substantial negative effects of their presence on the bacterial transformation of PCBs have been reported

[8,9]. Moreover, soil bacteria that co-metabolize PCBs via the main biphenyl upper pathway tend to accumulate CBAs as dead-end products because they are generally unable to further transform these substrates [10]. Another great limitation of organopollutant bacterial biodegradation is the fact that bacterial degrading enzymes are usually intracellular and the transfer of the pollutant into the bacterial cell represents an important limiting step.

On the other hand, ligninolytic fungi, with their extracellular low-substrate-specificity enzymes, represent a promising alternative for biodegradation of various aromatic pollutants [11]. The ligninolytic system consists of three major peroxidases: lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), versatile peroxidases and laccase, which belong among phenoloxidases. Their degradative abilities have been documented e.g., for chlorophenols, polycyclic aromatic hydrocarbons, PCBs, dioxins, furans, endocrine disruptors and others [12–15]. Moreover, the fungi were shown to be capable of splitting the aromatic rings of various persistent pollutants [14,16]. In contrast to a number of articles dealing with bacterial CBA degradation, only few papers have been published describing potential degradation of these compounds by fungi. Kamei et al. identified 4-CBA acid after degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl by *Phanerochaete* sp. MZ 142 and suggested its further transformation via a reductive pathway [14]. Other authors showed that *ortho* and *meta* mono-CBAs and benzoic acid (BA)

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.  
E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).

significantly induced the activities of cytochrom P-450 from *Phanerochaete chrysosporium* [17]. BA was then proven to be transformed by microsomes containing P-450 from the same fungus. The role of the monooxygenases of P-450 was clarified earlier by other authors, when the enzyme was heterologically expressed and hydroxyl benzoate and protocatechuic acid were detected as the degradation products of benzoate [18]. Generally, the data published in the literature document was efficiency of fungi to degrade PCBs and suggest possible transformation of PCBs to CBAs. CBAs are critical metabolites on the bacterial degradation pathway mainly, due to high specificity of individual bacterial enzymes. Therefore it is reasonable to investigate also CBA degradation abilities of ligninolytic fungi, especially when these organisms represent a promising alternative to bacterial PCB degradation applications.

The aim of this work was to investigate the abilities of several promising ligninolytic fungal strains to transform 12 representatives of CBAs with various degree of chlorination (mono-, di-, tri-CBAs). The degradation performance was tested in model liquid nutrient media, where the production of CBA degradation products, the activities of ligninolytic enzymes and changes in the acute toxicity were also monitored. Moreover, the applicability of the fungi was also tested in an artificially contaminated soil, where toxicity was also monitored.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

**Standards and chemicals.** 2-CBA; 2,3-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,4,6-CBA and HPLC internal standard 2,3-dichlorophenol were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). 3-CBA; 4-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA and 2,6-CBA were from Merck (Darmstadt, Germany). 2,3,6-CBA was purchased from Supelco (Steinheim, Germany). All the compounds were employed without further purification to prepare stock solutions in dimethyl formamide as described below. All the solvents were purchased from Merck, Germany or Chromservis (Prague, Czech Republic) and were of p.a. quality, trace analysis quality or gradient grade. All the chemicals used for the biochemical studies were from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Microorganisms, inocula preparation and enzyme activities measurement

**Fungal cultures, inocula preparation and degradation experiments.** All of the ligninolytic fungal strains used in this study (*Irpex lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/1, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595, *Dichomitus squalens* CCBAS 750) were obtained from the Culture Collection of Basidiomycetes of the Academy of Science, Prague. Fungal inocula were grown under stationary conditions for 7 d at 28 °C in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of either complex malt extract-glucose (MEG) medium or low-nitrogen mineral medium (LNMM). MEG medium (pH 5.5) contained 5 g malt extract broth (Oxoid, UK) and 10 g glucose per liter of distilled water and LNMM contained 2.4 mM diammonium tartrate [19]. The cultures were then homogenized with the Ultraturrax-T25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) and this suspension was used for inoculation in the degradation experiments.

**Enzyme determination.** LiP (E.C. 1.11.1.14) was assayed with veratryl alcohol as the substrate [20] and MnP (E.C. 1.11.1.13) was determined with 2,6-dimethoxyphenol [21]. Laccase (Lac, E.C. 1.10.3.2) was estimated with

2,2-azinobis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid as the substrate [22]. Manganese-independent peroxidase (MIP) was calculated from the peroxidase activity of MnP assay detected in the absence of Mn<sup>2+</sup> ions. One unit of enzyme produced 1 μmol of the reaction product per minute under the assay conditions at room temperature.

### 2.3. Degradation of CBAs in liquid media

The degradation experiments in the liquid media were performed as static cultures, incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks in five parallel experiments at 28 °C. Twenty milliliters of the respective medium (MEG or LNMM) was inoculated with a 5% suspension of homogenized pre-inocula (1 mL) of the respective fungal strain. The cultures were immediately spiked with a solution of the CBAs in dimethyl formamide (100 μL). The final amount of each CBA was 200 μg per flask. The heat-killed controls were performed with one-week growth of fungal cultures, which were killed in an autoclave before addition of the CBA solution. All of the cultures were incubated in the darkness at 28 °C and harvested after 7, 14 and 21 days.

### 2.4. Fungal treatment of contaminated soil

For preparation of the soil degradation experiment, 1.0 mL aliquots of a mycelia suspension of each fungal strain were added to 16 cm × 3.5 cm test-tubes containing 10 g of commercial straw pellets (ATEA Praha, Prague, Czech Republic), the moisture contents of which had been previously adjusted to 70% (w/w) and subsequently sterilized by autoclaving (121 °C, 45 min). After inoculation, the cultures were closed with cotton-wool stoppers and then grown for 14 d at 28 °C [23]. The colonized substrate was then covered with a layer of soil (20 g), which had been previously artificially spiked with a mixture of CBAs in acetone. The relevant controls were prepared in the same way, however, without fungal inoculation. Main properties of the used sandy-loamy soil were as follows: total organic carbon 0.8%, total organics 1.4%, pH 5.3, water-holding capacity 31% and the granulometric composition was: sand 50.9%, fine sand 31.2%, silt 10.8%, clay 7.1%. The soil was air-dried and sieved through a 2-mm mesh before contamination and the final concentration of each CBA in the soil after contamination was 10 μg/g. The soil samples were then moistened to 15% humidity. The tubes were incubated at 28 °C and the samples were harvested after 30 and 60 d. All the respective controls and samples were performed in five replicates.

### 2.5. Extraction and quantitative analyses of CBAs

The whole content of each liquid culture was homogenized with Ultraturrax and acidified to approximately pH 2. It was then extracted with five 10 mL portions of ethyl acetate, the extracts were dried with sodium sulfate and concentrated using a rotary evaporator to a final volume of 10 mL. The extraction recoveries of all the CBAs were better than 95%. To enable HPLC analysis, an aliquot of the ethyl acetate extract was mixed with acetonitrile in a ratio of 1:10 (v/v), and the mixture was used for injection [16].

The soil samples were submitted to extraction using a Dionex 200 ASE extractor (Palaiseau, France). The soil samples (3 g) were mixed with sodium sulfate before extraction (v/v) and the extraction conditions were: 3 cycles; 150 °C; 10.34 MPa; solvent system hexane–acetone, 1% acetic acid [24]. To avoid CBA volatilization, 500 μL of DMSO was added to the extracts as a solvent stopper and the extracts were concentrated using a vacuum rotary evaporator (60 kPa, 40 °C) to approximately 1.5 mL. 50 μL of internal standard (IS, 2,3-dichlorophenol 0.9 mg/mL in ACN) was added to

each sample and the IS was used to calculate the volume extracts. The mixture was then directly injected into the HPLC.

The quantitative analyses were performed using the Alliance Waters system (Prague, Czech Republic) equipped with a PDA detector and Empower software was used for data processing. Separation of the CBA mixture was performed on an XBridge C18 column (250 mm × 4.6 mm I.D., particle size 3.5 μm) from Waters (Prague, Czech Republic). The separation was carried out with a gradient (v/v) of acetonitrile (B) and water solution (A) of 0.1% TFA. The gradient program was as follows (min/%B): 0/17; 30/17; 60/34; 70/50. The applied flow rate was 0.8 mL min<sup>-1</sup> and temperature was 35 °C [24].

## 2.6. Qualitative analyses of CBA degradation products

Qualitative analysis of the CBA degradation products was performed in that the degradation intermediates were separated and characterized or identified by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS; 450–GC, 240–MS ion trap detector, Varian, Walnut Creek, CA). The ethyl acetate extracts were injected both directly without any derivatization and also after trimethylsilylation with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Merck, Germany) and methylation with diazomethane [25]. The GC instrument was equipped with a split/splitless injector maintained at 240 °C. DB-5MS column (Agilent, Prague, Czech Republic) was used for the separations (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 mm film thickness). The temperature program was started at 60 °C and was held for 1 min in the splitless mode. Then the splitter was opened with ratio 1:50. The oven was heated to 120 °C at a rate of 25 °C/min with a subsequent temperature ramp up to 240 °C at a rate of 2.5 °C/min, where this temperature was maintained for 20 min. The solvent delay time was set at 5 min and the transfer line temperature was set at 240 °C. The mass spectra were recorded at 3 scans s<sup>-1</sup> under electron impact at 70 eV and mass range 50–450 amu. The excitation potential for the MS/MS product ion mode employed was 0.2 V and was increased to 0.8 V for more stable ions. Acetonitrile was used as the medium for chemical ionization (CI), where the ionization maximum time was 2000 and 40 μs for the reaction.

## 2.7. Analyses of ergosterol

The total ergosterol was extracted and analyzed as described previously [23]. Briefly, samples (0.5 g) were sonicated with 3 mL of 10% KOH in methanol at 70 °C for 90 min. Distilled water (1 mL) was added and the samples were extracted three times with 2 mL of cyclohexane, evaporated under nitrogen, redissolved in methanol and analyzed isocratically using a Waters Alliance HPLC system (Waters Milford, MA) equipped with a LiChroCart column filled with LiChrosphere® 100 RP-18e (250 × 4.0 mm; particle size 5 μm; pore size 100 Å) equilibrated with 100% methanol at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Ergosterol was detected at 282 nm and quantified with a 5-point calibration curve over a linear range from 0.5 to 50.0 μg/mL.

## 2.8. Toxicity assay

The luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (strain NRRL-B-11177), which was used for all the toxicity tests, were purchased freeze-dried from the supplier Ing. Musial (Czech Republic). The freeze-dried bacteria were rehydrated and stabilized in 2% (w/v) NaCl solution at 15 °C for 1 h according to the standard procedure ISO 2007 [26]. An acute toxicity test of samples after degradation in liquid media was performed using the corresponding ethyl acetate extracts. Aliquots of the extracts (0.5 mL) were evaporated to dryness and dissolved again in dimethyl sulfoxide, which was directly applied to the test (2% of DMSO in the reaction mixture).

The amount of dimethyl sulfoxide varied between media, due to different sensitivities of the test toward the media matrix (see below). Three replicates for each sample were used to carry out the ecotoxicity test. The luminescence readings were obtained with a Lumino M90a luminometer (ZD Dolní Újezd, Czech Republic) at a temperature of 15 ± 0.2 °C. The inhibition of bioluminescence was recorded after 15-min exposure.

The toxicity of soil samples was measured by a kinetic Flash assay using the luminescent bacterium [27,28]. The samples were prepared by weighing 1.5 g dried soil and 6 mL 2% (w/v) NaCl solution. The sample suspension was mixed continuously and 0.5 mL was placed into the measuring cuvette. The contents of the measuring cuvette were mixed continuously by adapted luminometer LUMINO M90a and 0.5 mL of the bacterial solution was dispensed into the sample. The signal was recorded permanently for 60 s. The light inhibition was calculated as the difference between the height of the peak that was observed immediately after addition of the bacteria to the sample and the luminescence intensity after a contact time of 60 s.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Degradation of CBAs in liquid cultures

The representatives of mono, di and tri-CBAs that were tested in this study were employed at a relatively high concentration of 10 μg/mL. The fact that the compounds are partially soluble in water and their acute toxic properties were confirmed by the observation of fungal biomass development. Generally, the fungal strains were partly affected by CBAs and their biomass reached about 50–70% compared to non toxic controls (data not shown). This finding is in agreement with the observation of Dittmann et al. who tested the development of the mycelia of fungal strains in two liquid nutrient media after the addition of various concentrations of 3-CBA [29]. In contrast to this observation, the fungal strains in our study were very efficient in degradation of CBAs in the liquid media. The time course of the individual CBA degradation in both media is presented in Tables 1 and 2. The results clearly demonstrate that all of the tested strains were at least partially able to transform CBAs. *I. lacteus*, *P. cinnabarinus* and *D. squalens* were found to be the most efficient degraders in complex MEG media. *P. cinnabarinus* and *D. squalens* were able to degrade about 78% and 73% of total CBA, respectively, while *I. lacteus* degraded 92% of total CBAs in complex media compared to the heat-killed controls. Particularly *I. lacteus* removed all of the CBAs from the media except 2,6-CBA and 2,3,6-CBA, which were degraded to approximately 50% of original amount, while *P. cinnabarinus* did not significantly transform 2,6-CBA, 2,3,6-CBA, 2,4,6-CBA and *D. squalens* did not significantly degrade 2,3,6-CBA (ANOVA,  $P=0.05$ ). *B. adusta* exhibited the poorest degradation ability in both the liquid media. The most efficient strains in the LNNM media were once again found to be *I. lacteus*, *P. cinnabarinus* and *D. squalens*. All of the three most efficient strains were able to transform CBAs with percent removals ranging from 76% to 77%. 2,6-CBA, 2,3,6-CBA and 2,4,6-CBA again appeared to be the most recalcitrant compounds where *D. squalens* did not significantly degrade 2,6-CBA and 2,4,6-CBA; *P. cinnabarinus* – 2,6-CBA, 2,3,6-CBA and 2,4,6-CBA; *I. lacteus* – 2,6-CBA and 2,3,6-CBA. These results suggest a possible connection between the substituted *ortho* and *para* positions and persistency toward the fungal degradation mechanism. Only a few publications in journals deal with transformation of CBAs by fungi. The above-mentioned work of Dittmann et al. also included the degradation of 3-CBA by *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *Heterobasidion annosum* and two other ectomycorrhizal fungi [29]. However, in contrast to our results, the authors observed only limited degradation of the compound in the range of several

**Table 1**  
Residual CBA amounts in heat-killed controls and after incubation of the tested fungal strains in LNNM media (ND: not detected).

Amount of CBA (µg per flask)	2-CBA	3-CBA	4-CBA	2,3-CBA	2,4-CBA	2,5-CBA	2,6-CBA	3,4-CBA	3,5-CBA	2,3,5-CBA	2,3,6-CBA	2,4,6-CBA
<b>LNNM – 7 days</b>												
Control	196 ± 4	207 ± 4	207 ± 2	195 ± 3	207 ± 2	193 ± 3	205 ± 2	182 ± 8	196 ± 1	165 ± 2	199 ± 1	185 ± 0
<i>B. adusta</i>	156 ± 5	53 ± 12	41 ± 34	174 ± 5	156 ± 31	141 ± 11	197 ± 8	64 ± 19	77 ± 28	161 ± 2	185 ± 7	176 ± 8
<i>D. squalens</i>	ND	33 ± 4	ND	ND	ND	ND	211 ± 15	ND	ND	ND	ND	207 ± 6
<i>I. lacteus</i>	ND	19 ± 6	ND	45 ± 7	66 ± 2	85 ± 5	179 ± 18	ND	ND	153 ± 2	176 ± 21	128 ± 11
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	94 ± 14	ND	92 ± 15	196 ± 5	ND	ND	136 ± 10	177 ± 7	171 ± 6
<i>P. magnoliae</i>	27 ± 2	ND	ND	133 ± 2	74 ± 4	126 ± 6	189 ± 3	ND	165 ± 2	ND	184 ± 8	180 ± 4
<i>P. ostreatus</i>	156 ± 9	28 ± 3	ND	162 ± 8	105 ± 17	167 ± 8	195 ± 5	87 ± 60	55 ± 1	124 ± 46	172 ± 14	163 ± 13
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	190 ± 8	ND	ND	ND	176 ± 12	173 ± 7
<i>T. versicolor</i>	73 ± 39	25 ± 1	ND	25 ± 3	104 ± 8	46 ± 3	242 ± 11	ND	ND	ND	206 ± 14	140 ± 4
<b>LNNM – 14 days</b>												
Control	170 ± 15	173 ± 14	184 ± 21	168 ± 19	208 ± 17	167 ± 18	181 ± 16	156 ± 17	165 ± 19	138 ± 19	169 ± 17	159 ± 21
<i>B. adusta</i>	124 ± 5	45 ± 2	ND	157 ± 22	85 ± 5	114 ± 7	198 ± 14	46 ± 0	ND	145 ± 5	187 ± 7	179 ± 10
<i>D. squalens</i>	ND	56 ± 4	ND	126 ± 8	ND	ND	189 ± 11	ND	ND	ND	ND	175 ± 11
<i>I. lacteus</i>	ND	ND	ND	13 ± 2	ND	ND	173 ± 7	ND	ND	103 ± 3	171 ± 9	95 ± 4
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	25 ± 1	ND	40 ± 1	188 ± 12	ND	ND	92 ± 0	175 ± 12	165 ± 8
<i>P. magnoliae</i>	ND	ND	ND	100 ± 11	60 ± 19	77 ± 13	182 ± 15	ND	136 ± 23	ND	153 ± 32	151 ± 27
<i>P. ostreatus</i>	105 ± 1	ND	ND	132 ± 1	15 ± 2	159 ± 3	193 ± 11	ND	ND	114 ± 6	188 ± 5	161 ± 13
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	184 ± 6	ND	ND	ND	163 ± 8	136 ± 41
<i>T. versicolor</i>	66 ± 13	47 ± 4	ND	ND	ND	ND	186 ± 34	ND	ND	ND	183 ± 3	136 ± 3
<b>LNNM – 21 days</b>												
Control	196 ± 5	195 ± 9	204 ± 8	189 ± 3	208 ± 6	191 ± 5	203 ± 6	180 ± 15	188 ± 5	170 ± 7	195 ± 7	183 ± 7
<i>B. adusta</i>	112 ± 10	54 ± 5	ND	167 ± 8	89 ± 2	106 ± 5	201 ± 14	ND	ND	130 ± 8	190 ± 13	182 ± 12
<i>D. squalens</i>	ND	71 ± 1	ND	105 ± 3	ND	ND	186 ± 5	ND	ND	ND	ND	191 ± 4
<i>I. lacteus</i>	ND	ND	ND	19 ± 2	22 ± 0	ND	170 ± 1	ND	ND	67 ± 7	183 ± 1	71 ± 6
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	20 ± 2	ND	40 ± 6	185 ± 24	ND	ND	98 ± 4	180 ± 18	168 ± 13
<i>P. magnoliae</i>	ND	ND	ND	24 ± 5	35 ± 5	20 ± 2	176 ± 9	ND	ND	129 ± 7	152 ± 12	153 ± 11
<i>P. ostreatus</i>	70 ± 13	ND	ND	101 ± 19	ND	130 ± 25	182 ± 36	ND	ND	105 ± 18	179 ± 39	157 ± 30
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	196 ± 7	ND	ND	ND	175 ± 9	176 ± 8
<i>T. versicolor</i>	76 ± 5	32 ± 15	ND	ND	ND	ND	195 ± 13	ND	ND	ND	194 ± 8	134 ± 11

percent, even though, in one case, the authors employed a similar concentration (15.6 mg/L) to that used in our study (20 mg/L).

In order to employ the toxicity test, we diluted the samples from the two media in different ways. The theoretical (original) concentrations of the individual CBAs in the reaction mixture for MEG and

LNNM media samples were 0.5 and 0.25 µg/mL, respectively. Since we detected only a decrease in the toxicity in preliminary tests, the dilution of the samples was set to reach about 90% inhibition for the controls. The evaluation of the acute toxicity test with *V. fischeri* was performed by comparison of the inhibition of the sample

**Table 2**  
Residual CBA amounts in heat-killed controls and after incubation of the tested fungal strains in MEG media (ND: not detected).

Amount of CBA (µg per flask)	2-CBA	3-CBA	4-CBA	2,3-CBA	2,4-CBA	2,5-CBA	2,6-CBA	3,4-CBA	3,5-CBA	2,3,5-CBA	2,3,6-CBA	2,4,6-CBA
<b>MEG – 7 days</b>												
Control	211 ± 4	195 ± 4	209 ± 2	197 ± 2	207 ± 6	195 ± 6	206 ± 4	195 ± 5	199 ± 4	175 ± 2	172 ± 6	193 ± 5
<i>B. adusta</i>	201 ± 20	138 ± 64	162 ± 69	200 ± 8	192 ± 25	189 ± 17	200 ± 9	154 ± 39	175 ± 32	166 ± 13	177 ± 8	193 ± 7
<i>D. squalens</i>	ND	97 ± 6	ND	ND	131 ± 11	ND	205 ± 20	ND	ND	ND	151 ± 1	160 ± 13
<i>I. lacteus</i>	ND	ND	ND	ND	46 ± 2	70 ± 27	204 ± 4	ND	ND	86 ± 5	151 ± 4	114 ± 11
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	52 ± 5	ND	ND	209 ± 7	ND	ND	ND	167 ± 8	185 ± 6
<i>P. magnoliae</i>	ND	44 ± 4	ND	56 ± 7	ND	47 ± 10	213 ± 7	ND	ND	76 ± 6	172 ± 7	188 ± 5
<i>P. ostreatus</i>	71 ± 9	ND	ND	127 ± 7	66 ± 5	145 ± 9	214 ± 14	ND	ND	132 ± 10	156 ± 11	150 ± 14
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	201 ± 12	ND	ND	ND	167 ± 18	190 ± 15
<i>T. versicolor</i>	90 ± 22	ND	ND	42 ± 2	89 ± 2	39 ± 1	202 ± 7	ND	ND	ND	154 ± 2	174 ± 3
<b>MEG – 14 days</b>												
Control	210 ± 30	186 ± 32	197 ± 24	199 ± 27	206 ± 26	195 ± 21	212 ± 25	176 ± 26	181 ± 25	164 ± 28	178 ± 26	193 ± 24
<i>B. adusta</i>	208 ± 3	191 ± 2	211 ± 1	162 ± 51	203 ± 7	194 ± 1	202 ± 12	175 ± 3	186 ± 1	151 ± 10	148 ± 28	192 ± 1
<i>D. squalens</i>	ND	ND	213 ± 3	101 ± 6	124 ± 6	ND	ND	ND	ND	ND	145 ± 3	166 ± 1
<i>I. lacteus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	98 ± 10	ND	ND	ND	107 ± 12	ND
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	226 ± 4	ND	ND	ND	161 ± 5	181 ± 2
<i>P. magnoliae</i>	ND	34 ± 1	ND	40 ± 8	39 ± 5	60 ± 15	221 ± 2	ND	ND	86 ± 17	162 ± 4	189 ± 11
<i>P. ostreatus</i>	37 ± 9	ND	ND	91 ± 19	58 ± 3	117 ± 19	231 ± 11	ND	ND	115 ± 15	170 ± 7	150 ± 4
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	188 ± 17	ND	ND	ND	151 ± 25	170 ± 23
<i>T. versicolor</i>	84 ± 16	ND	ND	ND	ND	ND	197 ± 5	ND	ND	ND	150 ± 7	169 ± 6
<b>MEG – 21 days</b>												
Control	209 ± 15	175 ± 17	188 ± 11	186 ± 13	193 ± 9	182 ± 8	213 ± 9	172 ± 10	177 ± 9	157 ± 6	166 ± 12	181 ± 8
<i>B. adusta</i>	140 ± 53	47 ± 2	42 ± 9	173 ± 26	133 ± 46	138 ± 54	200 ± 6	80 ± 13	105 ± 10	137 ± 15	170 ± 4	183 ± 7
<i>D. squalens</i>	ND	ND	197 ± 5	ND	74 ± 14	54 ± 9	ND	ND	ND	ND	140 ± 2	151 ± 14
<i>I. lacteus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	88 ± 20	ND	ND	ND	96 ± 9	ND
<i>P. chrysosporium</i>	ND	ND	93 ± 19	ND	ND	ND	194 ± 23	59 ± 5	75 ± 4	ND	142 ± 19	167 ± 14
<i>P. magnoliae</i>	ND	ND	29 ± 8	55 ± 9	46 ± 1	52 ± 3	236 ± 3	56 ± 0	ND	82 ± 1	174 ± 3	195 ± 2
<i>P. ostreatus</i>	22 ± 1	ND	ND	86 ± 6	61 ± 4	126 ± 14	200 ± 13	ND	ND	119 ± 12	187 ± 23	171 ± 18
<i>P. cinnabarinus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	187 ± 27	ND	ND	ND	150 ± 25	162 ± 34
<i>T. versicolor</i>	121 ± 30	ND	136 ± 22	ND	ND	ND	206 ± 11	ND	ND	ND	160 ± 5	172 ± 6

**Table 3**

Luminescence inhibition in heat-killed controls and after incubation of the tested fungal strains in MEG and LNNM media after 21 days of incubation.

Luminescence inhibition (%)	LNNM	MEG
Control	89.4 ± 8.2	94.5 ± 1.0
<i>B. adusta</i>	72.1 ± 4.3	85.9 ± 12.5
<i>D. squalens</i>	11.9 ± 8.5	35.0 ± 9.4
<i>I. lacteus</i>	27.2 ± 13.9	7.4 ± 3.0
<i>P. chrysosporium</i>	44.9 ± 15.4	38.2 ± 30.7
<i>P. magnoliae</i>	41.9 ± 10.1	52.8 ± 17.7
<i>P. ostreatus</i>	27.5 ± 8.3	34.8 ± 2.8
<i>P. cinnabarinus</i>	11.3 ± 2.7	20.8 ± 5.6
<i>T. versicolor</i>	14.5 ± 4.0	36.3 ± 7.5

luminescence with their respective controls (Table 3). As mentioned above, the toxicity test revealed that the tested fungi were generally able to decrease the measured acute toxicity, suggesting that the degradation products of CBAs were either not accumulated or they were less toxic than the original CBAs.

### 3.2. Detection of CBA degradation products

The CBA metabolites were analyzed with GC–MS and their structures were suggested by comparing the mass spectra with the data in the NIST 08 library and independently by interpreting the fragmentation pattern. Additionally, unknown structures of metabolites were explored using MS/MS (product ion scan) to clarify the fragmentation sequence. The mass spectral characteristics of the detected CBA degradation products are listed in Table 4. Some of the metabolites were detected after trimethylsilylation (e.g., chlorobenzyl alcohols) and several of them were confirmed by comparison with the available chemical standards. All of the intermediates were detected at only trace levels, suggesting that none of them were accumulated during degradation. The group of the detected intermediates includes chlorobenzaldehydes, chlorobenzyl alcohols, chlorobenzoic acid methyl esters and the methoxy or hydroxy derivatives of these structures. The metabolites were found in various fungal strain cultures when representatives of monochloro and dichloro benzaldehydes and alcohols were found in all cultures, as well as methyl esters of di-CBA. Methyl ester representative of tri-CBA was detected only in the culture of *I. lacteus*, however, methoxy derivatives of tri-CBA and di-CBA methyl esters were found in all fungi. Trichlorinated hydroxybenzyl alcohols were detected in all fungal cultures too. A possible scheme of CBA fungal degradation pathway constructed of the detected metabolites is shown in Fig. 1. The results generally correspond to the results of Kamei et al. [14], who studied the transformation of 4,4'-dichlorobiphenyl by *Phanerochaete* sp. MZ 142, where these authors detected the formation of 4-CBA, the methyl ester of 4-CBA and further reduced transformation products: 4-chlorobenzyl alcohol and 4-chlorobenzaldehyde. Such a reduction mechanism could be explained by the action of an intracellular aryl alcohol oxidase system [30]. Matsuzaki et al. showed that the enzymes that are probably involved in the transformation, i.e. aryl alcohol dehydrogenase, aryl aldehyde dehydrogenase and also cytochrome P-450 of *P. chrysosporium* were up-regulated after the addition of BA to the fungal culture [31].

The other types of transformation products, i.e. hydroxyl and methoxy derivatives, which were found in our study, have already been described by Matsuzaki and Wariishi following transformation of BA by *P. chrysosporium* [18]. The detected metabolites include 4-hydroxy, 2-hydroxy and 4-hydroxy-2-methoxy derivatives. In another work, the authors demonstrated that heterologously expressed P-450 cytochromes from the CYP53 family of *P. chrysosporium*, *Aspergillus niger* and *Rhodotorula minuta* were able to hydroxylate BA at the 4-position [32]. P-450-mediated

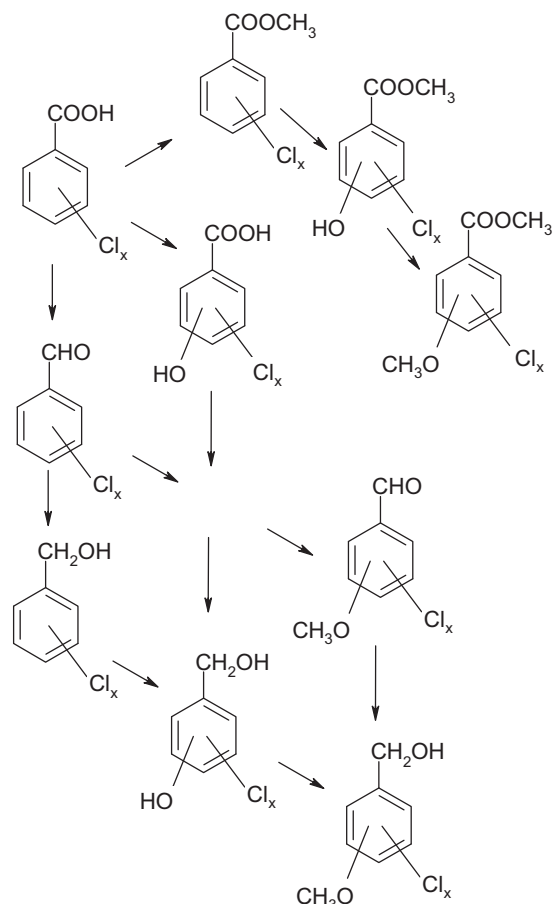


Fig. 1. Proposed pathway of CBA degradation by ligninolytic fungi.

hydroxylation of BA at other positions in fungi has not been reported to date. Moreover, the authors employed quantitative PCR to demonstrate that the expression of the cytochrome is regulated by the presence of BA at the transcription level. The induction of cytochrome P-450 by BA and also by 3 and 4-CBA has been published elsewhere [17].

The measurement of fungal extracellular ligninolytic activities in this study demonstrated that most of the activities were suppressed or the maxima activity peaks were delayed during cultivation by the presence of CBAs. Only rare cases when the situation was different were recorded for the activities of MnP and laccase of *T. versicolor*, which were significantly induced in MEG and LNNM media, respectively. Particularly the laccase activity increased from 20 U/L to 230 U/L. These findings indirectly confirm that ligninolytic enzymes need not play a key role in the degradation of CBAs.

### 3.3. Degradation of CBAs in soil

The soil degradation experiment was monitored after 30 and 60 days and the residual concentrations after the application of the fungal strains are depicted in Fig. 2. The results show that, except for strains *P. cinnabarinus* and *T. versicolor*, which degraded only 30% and 39% of the total CBA, respectively, within 60 days of incubation, all the other strains under study were able to substantially remove CBAs from soil in the range of 85–99% of total CBA. The results are partially contrary to the experiments in liquid cultures, because *P. cinnabarinus* belonged among the most degrading strains in both the liquid media. On the other hand, *B. adusta* appeared to be effective in soil while this strain belonged among the less degrading in the liquid media. *I. lacteus* was found to be the most efficient



**Table 4**  
Retention data and electron impact mass spectral characteristics of CBA metabolites.

$t_R$ (min)	MW according to CI	$m/z$ of fragment ions (relative intensity)	Structural suggestion	Type of derivatization
5.431	140	142 (23.8), 141 (36.6), 140 (73.7), 139 (99.9), 111 (55.0), 75 (32.0), 51 (19.6), 50 (29.8)	o-Chlorobenzaldehyde	
5.494	140	142 (20.6), 141 (36.1), 140 (66.6), 139 (99.9), 113 (18.4), 77 (22.7), 75 (33.5), 74 (19.1)	m-Chlorobenzaldehyde	
5.882	140	142 (16.0), 141 (37.1), 140 (49.4), 139 (99.9), 113 (16.8), 111 (49.6), 77 (15.1), 74 (16.8)	p-Chlorobenzaldehyde	
7.603	174	176 (62.4), 174 (70.3), 173 (99.9), 145 (47.0), 139 (54.2), 111 (50.1), 75 (61.1), 74 (52.6)	3,5-Dichlorobenzaldehyde	
7.724	174	176 (39.5), 175 (70.2), 174 (61.4), 173 (99.9), 147 (16.9), 145 (25.9), 75 (18.0), 74 (15.0)	2,4-Dichlorobenzaldehyde	
7.913	174	176 (38.2), 175 (68.4), 174 (61.3), 173 (99.9), 111 (25.0), 75 (61.0), 74 (45.9), 50 (25.3)	2,5-Dichlorobenzaldehyde	
8.329	174	176 (37.5), 175 (69.0), 174 (62.8), 173 (99.9), 147 (21.9), 145 (37.4), 75 (36.4), 74 (26.3)	2,3-Dichlorobenzaldehyde	
8.875	174	176 (38.9), 175 (69.5), 174 (64.9), 173 (99.9), 147 (28.1), 145 (43.0), 75 (29.1), 74 (24.9)	3,4-Dichlorobenzaldehyde	
9.445	214	201 (34.0), 199 (99.9), 179 (18.5), 163 (30.7), 127 (25.4), 125 (82.5), 89 (25.1), 73 (18.6)	TMS p-chlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
9.685	214	201 (31.8), 199 (90.9), 179 (33.4), 171 (19.9), 169 (60.1), 127 (30.2), 125 (99.9), 89 (32.7)	TMS m-chlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
10.883	204	201 (20.8), 199 (58.7), 179 (24.2), 169 (20.5), 127 (31.9), 125 (99.9), 89 (24.2), 73 (12.5)	TMS o-chlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
11.203	204	206 (32.5), 204 (43.4), 177 (9.9), 175 (63.4), 173 (100), 147 (9.6), 145 (7.9), 109 (7.8), 75 (33.9)	2,6-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
11.729	204	208 (2.0), 206 (14.1), 204 (20.5), 177 (8.9), 175 (63.1), 173 (100), 147 (21.1), 145 (33.2), 109 (17.8), 75 (16.0)	3,5-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
11.894	204	208 (5.4), 206 (12.9), 204 (20.7), 177 (9.9), 175 (61.1), 173 (100), 147 (15.5), 145 (29.0), 109 (16.2), 75 (95.6)	2,4-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
12.308	204	208 (3.7), 206 (18.3), 204 (25.7), 177 (11.9), 175 (62.1), 173 (93.3), 147 (6.4), 145 (19.3), 109 (17.1), 75 (100)	2,5-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
	204	208 (2.7), 206 (19.8), 204 (32.4), 177 (10.3), 175 (64.6), 173 (100), 147 (19.7), 145 (35.1), 109 (22.9), 74 (27.6)	3,4-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
12.651	204	208 (1.3), 206 (16.3), 204 (19.0), 177 (19.0), 175 (56.9), 173 (100), 149 (29.4), 147 (47.7), 145 (19.0), 109 (14.4), 75 (97.4)	2,3-Dichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
12.945	170	172 (19.4), 171 (35.0), 170 (56.3), 169 (100), 141 (6.8), 126 (13.6), 111 (11.7), 77 (15.5)	?-Chloro-?-methoxybenzaldehyde	
13.139	248	235 (67.6), 233 (99.9), 205 (18.5), 203 (25.6), 161 (41.4), 159 (64.2), 123 (18.4), 103 (18.9)	TMS 2,5-dichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
13.27	248	235 (58.0), 233 (84.2), 161 (61.1), 159 (99.9), 123 (13.8), 103 (29.1), 73 (12.7)	TMS 2,4-dichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
13.604	248	235 (70.9), 233 (99.9), 205 (32.3), 203 (45.8), 161 (58.5), 159 (89.7), 147 (27.7), 123 (21.1)	TMS 3,5-dichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
14.091	238	242 (6.4), 240 (19.3), 238 (19.7), 211 (29.3), 209 (95.0), 207 (100), 183 (3.4), 181 (14.1), 179 (14.5), 143 (11.0), 109 (12.8), 74 (12.9)	2,4,6-Trichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
14.288	248	235 (69.6), 233 (99.9), 205 (17.8), 203 (25.3), 161 (46.3), 159 (71.1), 123 (17.5), 103 (22.8)	TMS 2,3-dichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
15	248	235 (68.5), 233 (94.6), 203 (16.7), 161 (67.3), 159 (99.9), 75 (27.5), 73 (28.5), 59 (34.2)	TMS 3,4-dichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
15.801	238	242 (7.1), 240 (25.7), 238 (25.1), 211 (31.5), 209 (98.1), 207 (100), 183 (5.7), 181 (12.6), 179 (14.5), 143 (10.5), 109 (11.7), 74 (14.1)	2,3,6-Trichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
16.391	238	242 (9.3), 240 (29.4), 238 (29.5), 211 (29.7), 209 (95.4), 207 (100), 183 (6.8), 181 (21.6), 179 (20.7), 143 (14.2), 109 (15.6), 74 (14.5)	2,3,5-Trichlorobenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
18.625	310	271 (32.4), 269 (100), 267 (76.8), 241 (15.8), 239 (45.5), 237 (42.8), 197 (13.7), 195 (46.6), 193 (44.2), 157 (14.2), 125 (5.5), 123 (15.8), 93 (15.9)	TMS ?-?-?-trichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
18.699	298	285 (33.2), 283 (100), 281 (99.5), 239 (49.1), 237 (50.6), 209 (80.6), 207 (83.3), 205 (2.8), 165 (13.3), 167 (33.3)	TMS ?-?-?-trichloro-?-hydroxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation
18.741	310	271 (32.8), 269 (100), 267 (87.2), 241 (13.0), 239 (38.3), 237 (37.2), 197 (22.0), 195 (68.5), 193 (65.9), 157 (14.6), 125 (5.6), 123 (15.7), 93 (28.1)	TMS ?-?-?-trichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
19.695	234	238 (4.3), 236 (41.1), 234 (67.2), 207 (15.4), 205 (84.6), 203 (100), 162 (14.1), 160 (18.6), 111 (15.0), 97 (31.9)	?-?-Dichloro-?-methoxybenzoic acid methyl ester	
19.82	186	188 (7.2), 186 (25.8), 157 (31.6), 155 (100), 127 (17.8), 99 (13.7)	?-Chloro-?-hydroxybenzoic acid methyl ester	Methylation
20.46	298	285 (31.5), 283 (100), 281 (98.0), 239 (73.8), 237 (36.1), 209 (68.2), 207 (68.5), 167 (12.6), 165 (33.8)	TMS ?-?-?-trichloro-?-hydroxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation
20.592	310	271 (35.5), 269 (100), 267 (99.1), 241 (10.0), 239 (31.1), 237 (31.1), 197 (26.8), 195 (81.5), 193 (82.1), 157 (16.7), 125 (6.4), 123 (18.0), 93 (39.2)	TMS ?-?-?-trichlorobenzyl alcohol	Trimethylsilylation
20.688	298	285 (31.6), 283 (100), 281 (95.3), 239 (73.8), 237 (34.6), 209 (47.7), 207 (43.3), 167 (14.8), 165 (33.0)	TMS ?-?-?-trichloro-?-hydroxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation
21.057	298	285 (34.4), 283 (100), 281 (98.5), 239 (36.8), 237 (32.4), 209 (51.5), 207 (54.4), 167 (13.2), 165 (35.6)	TMS ?-?-?-trichloro-?-hydroxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation
21.526	234	238 (3.0), 236 (22.3), 234 (30.4), 207 (10.2), 205 (68.4), 203 (100), 162 (5.3), 160 (8.3), 111 (11.2), 97 (17.0)	?-?-Dichloro-?-methoxybenzoic acid methyl ester	
22.693	298	285 (26.1), 283 (100), 281 (90.9), 239 (52.1), 237 (49.7), 209 (74.2), 207 (64.2), 167 (19.7), 165 (48.1)	TMS ?-?-?-trichloro-?-hydroxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation
23.481	234	238 (5.1), 236 (21.3), 234 (29.5), 207 (11.5), 205 (70.5), 203 (100), 162 (10.9), 160 (11.9), 111 (15.4), 97 (19.9)	?-?-Dichloro-?-methoxybenzoic acid methyl ester	
27.313	268	270 (15.1), 268 (15.3), 241 (28.3), 239 (95.8), 237 (100)	?-?-Trichloro-?-methoxybenzoic acid methyl ester	Trimethylsilylation
29.207	312	312 (12.3), 314 (13.6), 301 (42.6), 299 (100), 297 (97.3), 271 (24.3), 269 (76.7), 267 (73.4), 227 (31.8), 225 (75.6), 223 (88.5)	TMS ?-?-?-trichloro-?-methoxybenzyl alcohol	Trimethylsilylation

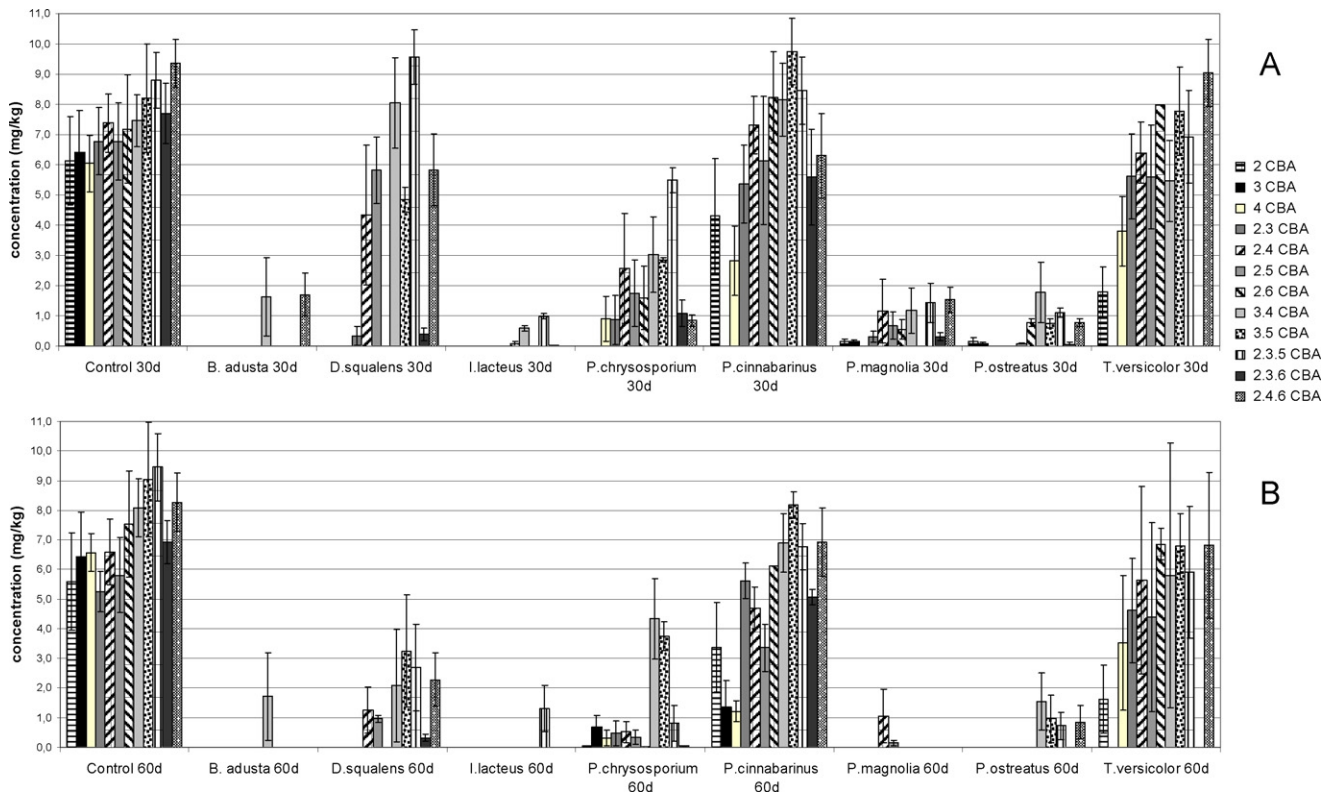


Fig. 2. Residual concentrations of CBAs in contaminated soil after incubation with the tested fungal strains: A – 30 days; B – 60 days.

strain in soil, where this fungus had already depleted 98% of the CBA within 30 days. One probable explanation for the discrepancy between these results and model conditions in the liquid media and the soil degradation experiment lies in the different abilities of fungi to penetrate into contaminated soil [33]. Therefore, we tried to estimate the relative amount of fungal biomass using the analysis of ergosterol in soil samples with CBAs and also without the addition of pollutants (Fig. 3). Despite the high variability of the data, the results indicate that the fungi that showed the highest CBA depletion (*I. lacteus*, *P. ostreatus*, and *B. adusta*), were also the strains that were able to significantly colonize the contaminated soil. The only exception was *P. magnolia*, where we detected a

significantly lower amount of ergosterol despite the high removal of CBAs (99% within 60 days).

The parameters of kinetic Flash toxicity assay were adjusted to also include recording of a possible increase in toxicity. The data obtained from this test are depicted in Fig. 4. The best results, in terms of inhibition reduction, were obtained with strains *I. lacteus* and *P. ostreatus*, corresponding to their CBA degradation efficiencies. On the other hand, unexpected results were observed with strains *B. adusta* and *P. magnolia* where, in spite of their high degradation rate, the detected residual toxicity was not significantly different from the controls ( $t$ -test,  $P < 0.05$ ). These results of Flash assay are in agreement with the results from toxicity estimation in

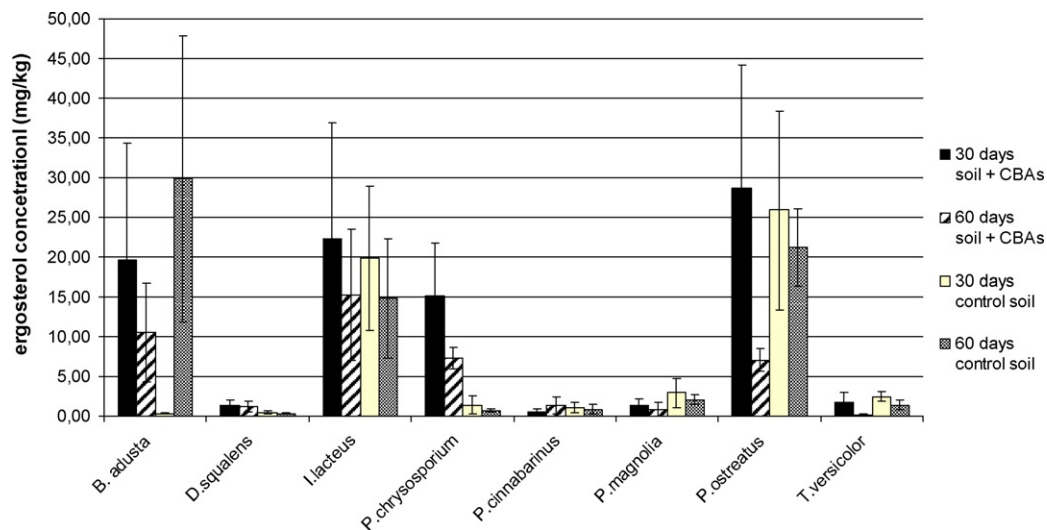


Fig. 3. Ergosterol concentrations in non-contaminated soil and in soil contaminated by CBAs after 30 and 60 days of incubation.

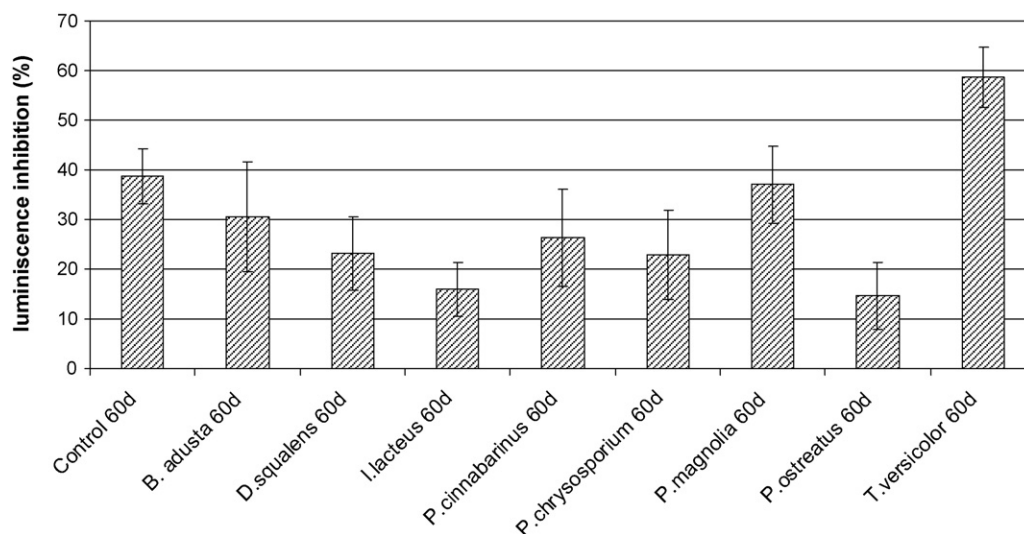


Fig. 4. Luminescence inhibition of the Flash assay in contaminated soil (control) and in soil with the tested fungal strains after 60 days of incubation.

the liquid cultures, where a residual toxicity in these fungal cultures was also detected. This could possibly be explained by the formation and accumulation of toxic metabolites and, probably for the same reason, significantly elevated toxicity was observed for *T. versicolor*.

#### 4. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first paper providing a general description of the ability of ligninolytic fungi to biodegrade CBAs that represent crucial toxic and highly persistent metabolites on bacterial biodegradation pathways of polychlorinated biphenyls. The ability of the fungi has been examined under liquid conditions and also verified in contaminated soil. The tested fungal strains were able to degrade CBAs in soil in the 85–99% range within 60 days when *I. lacteus* was found to be the most efficient degrading strain under both of the tested conditions. Several new degradation products have been identified when mainly methoxy and hydroxy derivatives were produced together with reduced forms of the original acids. The results show that the fungi are probably able to transform CBAs via several pathways with significant reduction of toxicity during the process. The promising degradation results from this study emphasize the need for further research, especially to identify the participation of different enzymatic machineries, in order to improve the understanding of the degradation mechanisms. The results for the liquid media and from the consequent soil experiment show that the presence of a bioremediative organism is of key importance; however, in soil, i.e. under conditions with limited pollutant bioavailability, active colonization of the soil is of equal importance.

#### Acknowledgments

This work was supported by grants no. 2B06156 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and no. 525/09/1058 of the Science Foundation of the Czech Republic and by Institutional Research Concept No. AV0Z50200510.

#### References

[1] J.A. Field, R.S. Alvarez, Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls, *Environ. Pollut.* 155 (2008) 1–12.

- [2] S.R. Sorensen, M.S. Holtze, A. Simonsen, J. Aamand, Degradation and mineralization of nanomolar concentrations of the herbicide dichlobenil and its persistent metabolite 2,6-dichlorobenzamide by *Aminobacter* spp. isolated from dichlobenil-treated soils, *Appl. Environ. Microb.* 73 (2007) 399–406.
- [3] T. Gichner, P. Lovecká, B. Vrchotová, Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids—metabolic products of polychlorinated biphenyls, *Mutat. Res.* 657 (2008) 140–145.
- [4] M. Muccini, A.C. Layton, G.S. Sayler, T.W. Schultz, Aquatic toxicities of halogenated benzoic acids to *Tetrahymena pyriformis*, *B. Environ. Contam. Tox.* 62 (1999) 616–622.
- [5] Y.H. Zhao, G.D. Ji, M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp, *Sci. Total Environ.* 216 (1998) 205–215.
- [6] P.Y. Lee, C.Y. Chen, Toxicity and quantitative structure–activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 156–161.
- [7] K. Svobodová, M. Plačková, V. Novotná, T. Cajthaml, Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two in vitro yeast assays, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 5921–5925.
- [8] D.H. Pieper, M. Seeger, Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls, *J. Mol. Microbiol. Biotech.* 15 (2008) 121–138.
- [9] S.A. Adebuseye, F.W. Picardal, M.O. Ilori, O.O. Amund, Influence of chlorobenzoic acids on the growth and degradation potentials of PCB-degrading microorganisms, *World J. Microb. Biot.* 24 (2008) 1203–1208.
- [10] K. Furukawa, H. Fujihara, Microbial degradation of polychlorinated biphenyls: biochemical and molecular features, *J. Biosci. Bioeng.* 105 (2008) 433–449.
- [11] D.P. Barr, S.D. Aust, Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants, *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994) 78A–87A.
- [12] C. Pinedo-Rivilla, J. Aleu, I.G. Collado, Pollutants biodegradation by fungi, *Curr. Org. Chem.* 13 (2009) 1194–1214.
- [13] N. Kasai, S. Ikushiro, R. Shinkyo, K. Yasuda, S. Hirose, Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450, *Appl. Microbiol. Biot.* 86 (2010) 773–780.
- [14] L. Kamei, R. Kogura, R. Kondo, Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142, *Appl. Microbiol. Biot.* 72 (2006) 566–575.
- [15] T. Cajthaml, Z. Křesinová, K. Svobodová, M. Möder, Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi, *Chemosphere* 7 (2009) 745–750.
- [16] T. Cajthaml, P. Erbanová, V. Šásek, M. Möder, Breakdown products on metabolic pathway of degradation of benz[a]anthracene by a ligninolytic fungus, *Chemosphere* 64 (2006) 560–564.
- [17] D. Ning, H. Wang, Y. Zhuang, Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*, *Biodegradation* 21 (2010) 297–308.
- [18] F. Matsuzaki, H. Wariishi, Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 387–393.
- [19] T. Cajthaml, P. Erbanová, A. Kollmann, Č. Novotný, V. Šásek, Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*, *Folia Microbiol.* 53 (2008) 289–294.
- [20] B.R.M. Vyas, S. Bakowski, V. Šásek, M. Matucha, Degradation of anthracene by selected white rot fungi, *FEMS Microbiol. Ecol.* 14 (1994) 65–70.
- [21] E. De Jong, A.E. Cazemier, J.A. Field, J.A. De Bont, Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1994) 271–277.

- [22] E. Matsumura, E. Yamamoto, A. Numata, T. Kawano, T. Shin, S. Murao, Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS [2,2-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1355–1357.
- [23] S. Covino, M. Čvančarová, M. Muzikář, K. Svobodová, A. D'annibale, M. Petruccioli, F. Federici, Z. Křesinová, T. Cajthaml, An efficient PAH-degrading *Lentinus (Panus) tigrinus* strain: effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices, *J. Hazard. Mater.* 183 (2010) 669–676.
- [24] Z. Křesinová, M. Muzikář, J. Olšovská, T. Cajthaml, Determination of 15 isomers of chlorobenzoic acid in soil samples using accelerated sample extraction followed by liquid chromatography, *Talanta* 84 (2011) 1141–1147.
- [25] T. Cajthaml, M. Möder, P. Kačer, V. Šásek, P. Popp, Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 213–222.
- [26] ISO 11348-3: 2007 Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- [27] J. Lappalainen, R. Juvonen, K. Vaajasaari, M. Karp, A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples, *Chemosphere* 38 (1999) 1069–1083.
- [28] J. Lappalainen, R. Juvonen, J. Nurmi, M. Karp, Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays, *Chemosphere* 45 (2001) 635–641.
- [29] J. Dittmann, W. Heyser, H. Bücking, Biodegradation of aromatic compounds by white rot and ectomycorrhizal fungal species and the accumulation of chlorinated benzoic acid in ectomycorrhizal pine seedlings, *Chemosphere* 49 (2002) 297–306.
- [30] F. Guillen, A.T. Martinez, M.J. Martinez, C.S. Evans, Hydrogen-peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase, *Appl. Microbiol. Biot.* 41 (1994) 465–470.
- [31] F. Matsuzaki, M. Shimizu, H. Wariishi, Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 2342–2350.
- [32] F. Matsuzaki, H. Wariishi, Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334 (2005) 1184–1190.
- [33] P. Baldrian, Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation, *Fungal Ecol.* 1 (2008) 4–12.





## Separation of PCBs by liquid chromatography on reversed phase sub-2-micron particle columns

Jana Olšovská, Zdena Křesinová, Miroslav Flieger, Tomáš Cajthaml\*

*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 May 2009

Received in revised form 7 October 2009

Accepted 15 October 2009

Available online 24 October 2009

#### Keywords:

Ultra high-performance liquid chromatography

PCB

Congener analysis

GC-MS

### ABSTRACT

A new ultra high-performance liquid chromatography method with UV detection was examined for detection and separation of polychlorinated biphenyls. This included optimization of separation conditions for two model mixtures containing seven and fifteen most relevant congeners, comparison of three types of reversed phase sub-2-micron particle sized columns and assessment of system suitability under the optimized conditions. Calibration curves determined in the range from 0.5 to 50.0  $\mu\text{g/mL}$  exhibited correlation coefficients ranging from 0.997 to 0.999. Lower limits of detection ranged from 0.1 to 0.5 ppm. The most efficient Grace C18 column filled with 1.5  $\mu\text{m}$  particles was then tested to separate the complex commercial mixture Delor 103, where the elution order was confirmed by GC-MS. 13 individual congeners were separated and some of the other co-eluting congeners could be resolved using another separation dimension performed with a mass spectrometry detector. The developed method could be directly applied to the separation of less complex mixtures in aqueous sample matrixes, which are used in general for enzyme degradation studies.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Although the industrial use and production of polychlorinated biphenyls (PCBs) has long been banned, the persistency of these compounds means they still represent a serious environmental problem. It has been widely reported that determination of PCBs in environmental samples is a difficult task [1,2].

The complexity of the chromatographic separation of PCBs consists in the number of possible congeners (209) and their physico-chemical similarities, together with the complexity of environmental matrices harboring the PCBs. For this reason, gas chromatography (GC) has always been the method of choice for determination of these compounds [3,4], since it allows the congener-specific analysis of PCBs and the routinely used detectors, ECD, MS and HRMS, to exhibit high sensitivity.

Two-dimensional gas chromatography [5,6] has been investigated by a number of researchers in order to solve certain co-elution problems inherent in single-column analysis. A number of GC column combinations have been used to resolve the co-elution of PCBs [7]. Several authors used two-dimensional chromatography with HPLC as the first separation dimension for fractionation. PCB atropisomers were partially separated using chiral stationary phases (beta-cyclodextrin derivatized silica) [8] and dioxin-like PCBs were

fractionated on an activated carbon-based column [9,10], porous graphitic carbon [11], or (2-(1-pyrenyl)ethyl)dimethylsilylated silica [12]. Other applications of column liquid chromatography described in the literature include the use of various systems for PCB separations from the matrix or other compounds [13,14]. A limited number of publications are available on application of the HPLC technique for determination of PCBs. Andersson and Kaiser [15] tested several modified stationary phases including octadecylsilica for separation of commercial mixture Aroclor. A partial improvement of separation was observed with phenyl butano sulfide stationary phase [15].

Another new technique, ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC), which has been introduced into practice, is based on the HPLC principle but provides separation efficiency attaining GC parameters. According to the Van Deemter equation, when the particle size of the chromatographic sorbent is decreased, the efficiency of the separation process increases and the efficiency does not diminish at higher flow rates or linear velocities [16]. The separation speed, resolution, sensitivity and peak capacity can be improved by using smaller particles. UHPLC technique offers both a high throughput of the analyzed samples and separation of complex mixtures like PCBs. The latter feature is caused by the large peak capacity mentioned above. Another advantage over common HPLC consists in the reduced time of analysis and solvent consumption. Sub-2-micron particle columns provide maximum efficiency, leading to back-pressures of more than 60 MPa, which cannot be achieved by using conventional liquid chromatographic systems or

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.  
E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).

columns [17]. UHPLC systems can work at extreme pressures up to 100 MPa [18] due to hardware adjustments. While the separation of PCB derivatives using HPLC is probably not sufficient, the UHPLC application on special columns with sub-2-micron particle could lead to better separation. A number of producers currently offer reversed phase columns with sub-2-micron particle size sorbents with different properties that are suitable for UHPLC applications. In addition to the original columns provided by Waters that use octadecyl silica Bridged Ethyl Hybrid (BEH) particles with diameter of 1.7  $\mu\text{m}$ , several other producers manufacture UHPLC columns e.g. Zorbax Rapid Resolution High Throughput 1.8  $\mu\text{m}$  from Agilent or C18 Grace 1.5  $\mu\text{m}$  from Alltech.

The aim of this study was to test the ability of liquid chromatography on reversed phase sub-2-micron particle columns, viz. BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters; BEH Phenyl (1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters; Vision HT C18 Grace (1.5  $\mu\text{m}$ ), Alltech, for the separation of the most often monitored PCB congeners in two premixed mixtures and for the separation of the commercial mixture Delor 103.

## 2. Experimental

### 2.1. PCB model mixtures and other chemicals

Two model mixtures of PCBs were used to test the retention behavior and for a quantitative study. Mix A consisted of PCBs 18, 28, 52, 101, 153, 138, 180 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany). Mix B included the most toxic PCB congeners supplemented with several other congeners with three, four and five mainly ortho-chlorine substituents: 18, 28, 37, 45, 77, 81, 91, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 156 and 169. The individual PCB congeners used for the preparation of this mixture were also obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Both of the mixtures contain the most relevant congeners that are commonly monitored [19,20]. The PCB commercial mixture used for the investigation, Delor 103, with an average of 3 chloro substituents, was obtained from a former Czechoslovak producer (Chemko Strážské, Slovakia). The congener composition of Delor 103 has been described in detail in previous investigations [21]. Acetonitrile (Biosolve) and water (Biosolve) used for UHPLC mobile phase preparation were of UHPLC–MS grade and were purchased from Chromservis (Prague, Czech Republic).

### 2.2. UHPLC analysis conditions

An Acquity UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA), equipped with a 2996 photodiode-array detection (DAD) system detector operating at 202 nm, was used for PCB analysis. The data were processed with Empower 2 software (Waters). For elucidation of the UHPLC elution order and identification of the PCB congeners, the mobile phase of the best chromatographic run was collected (4 times per minute) using an automated fraction collector (Labio, Prague, Czech Republic). These fractions were subsequently analyzed using GC–MS to confirm the structures of the individual congeners.

For simplicity, PCBs were monitored at the same wavelength of 202 nm, where all of them display significant absorbance.

Three sub-2micron particle UHPLC analytical columns were compared for their efficiency in PCB separation: BEH C18 (50 mm  $\times$  2.1 mm I.D., particle size 1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters; BEH Phenyl (50 mm  $\times$  2.1 mm I.D., particle size 1.7  $\mu\text{m}$ ), Waters; Vision HT C18 Grace (50 mm  $\times$  2.0 mm I.D., particle size 1.5  $\mu\text{m}$ ), Alltech.

The binary mobile phase consisted of solvent A, 100% acetonitrile, and solvent B, 10% acetonitrile in water was employed under the following linear gradient program (min/%A) 0/15, 6/40, 14/40, 20/45, 30/95, 35/95. This program was used for column comparison and later also for separation of Delor 103.

Each analysis was followed by a column equilibration step (5 min). The column temperature was maintained at 35  $^{\circ}\text{C}$ , and the flow rate was set at 0.4 mL/min. Sample volumes of 5  $\mu\text{L}$  were injected. The total analysis time was 30 min, the data were collected at 20 Hz sample rate and the filter constant was set at 0.5.

### 2.3. UHPLC partial validation (calibration curves, LLOQ, LOD)

Calibration curves obtained with UHPLC technique were determined over a linear range from 0.5 to 50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the selected PCBs (Nos. 18, 28, 37, 45, 52, 77, 81, 91, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 169 and 180). Accurately weighted portions of each solid congener were dissolved in acetonitrile to prepare 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  stock solutions. Then each stock solution was diluted stepwise with acetonitrile to prepare a series of standard solutions, with concentrations of 50.0, 25.0, 10.0, 5.0, 1.0, 0.5 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

The lower limit of quantification (LLOQ) was determined as the lowest concentrations of PCBs quantified with precision (RSD) and accuracy lower than 20% [22]. For quality control (QC), six replicates of all the quantified PCB standards with the concentration 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the case of PCB 101) were measured. At this concentration level, the signal-to-noise ratio was found to be greater than 10.

The limit of detection (LOD) was calculated as follows:  $\text{LOD} = \text{LLOQ}/0.33$ .

### 2.4. UHPLC system suitability

Both model mixtures (Mix A and Mix B) were injected 6 times into a UHPLC system under optimized conditions (Grace column, for chromatographic conditions see Section 2.2, UHPLC analysis conditions). The mean values and RSD (%) of the peak retention times and peak areas of the monitored congeners were calculated to obtain the repeatability. The other parameters to be determined included the peak symmetry, resolution and EP plate count.

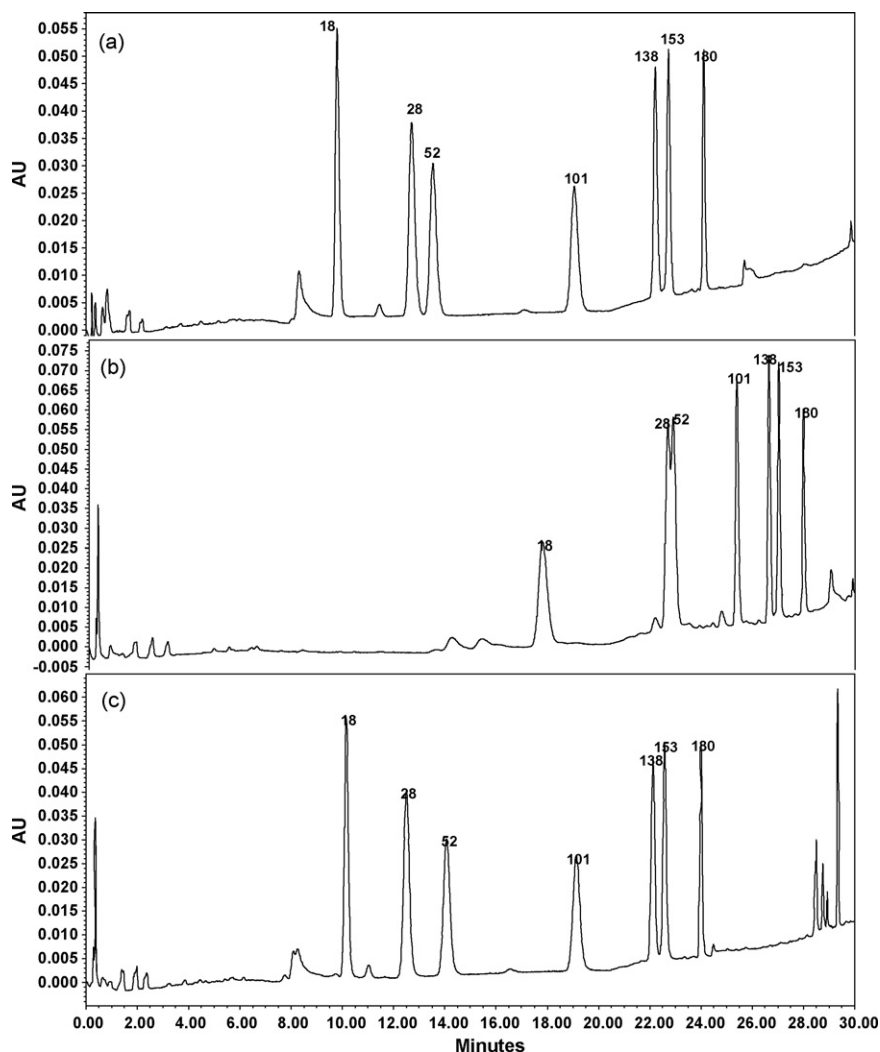
### 2.5. GC–MS analysis conditions

The GC–MS system 450-GC with an ion trap 240-MS (Varian, Walnut Creek, CA, USA) was used for a qualitative PCB analysis. The Varian MS workstation 6.9.1. was used as data processing software.

The column used was a 30 m DB-5MS capillary column of 0.25 mm I.D. and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness (C&W). One microliter of each sample was splitless injected at 240  $^{\circ}\text{C}$ . Helium was used as a carrier gas with a constant flow rate of 1 mL/min. The GC oven temperature program started at 60  $^{\circ}\text{C}$ , was held for 1 min and then increased at 25  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to 120  $^{\circ}\text{C}$ . Further heating followed at 2.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to 240  $^{\circ}\text{C}$ , which was finally maintained for 19 min. The transfer line, manifold and ion chamber temperatures were set at 240, 220 and 240  $^{\circ}\text{C}$ , respectively. The mass spectrometer operated under an external ionization mode and mass spectra were recorded under electron impact at 70 eV.

### 2.6. HPLC analysis conditions

In order to compare the efficiency of the HPLC technique an HPLC system was used for separation of D103, as well. Separation was tested on two conventional reversed phase columns: Xbridge C18 (250 mm  $\times$  4.6 mm I.D., particle size 3.5  $\mu\text{m}$ ), Waters and Synergy Polar RP (250 mm  $\times$  4.6 mm I.D., particle size 4  $\mu\text{m}$ ), Phenomenex. The HPLC system consisted of binary gradient pump 522, autosampler 465, and diode-array detector 540+, (Bio-tek Instruments, Italy). The binary mobile phase consisted of solvent A, 100% acetonitrile, and solvent B, 10% acetonitrile in water, was employed under the following linear gradient programs: Xbridge column (min/%A) 0/65; 30/100; 50/100 and Synergi column 0/65; 60/100; 70/100

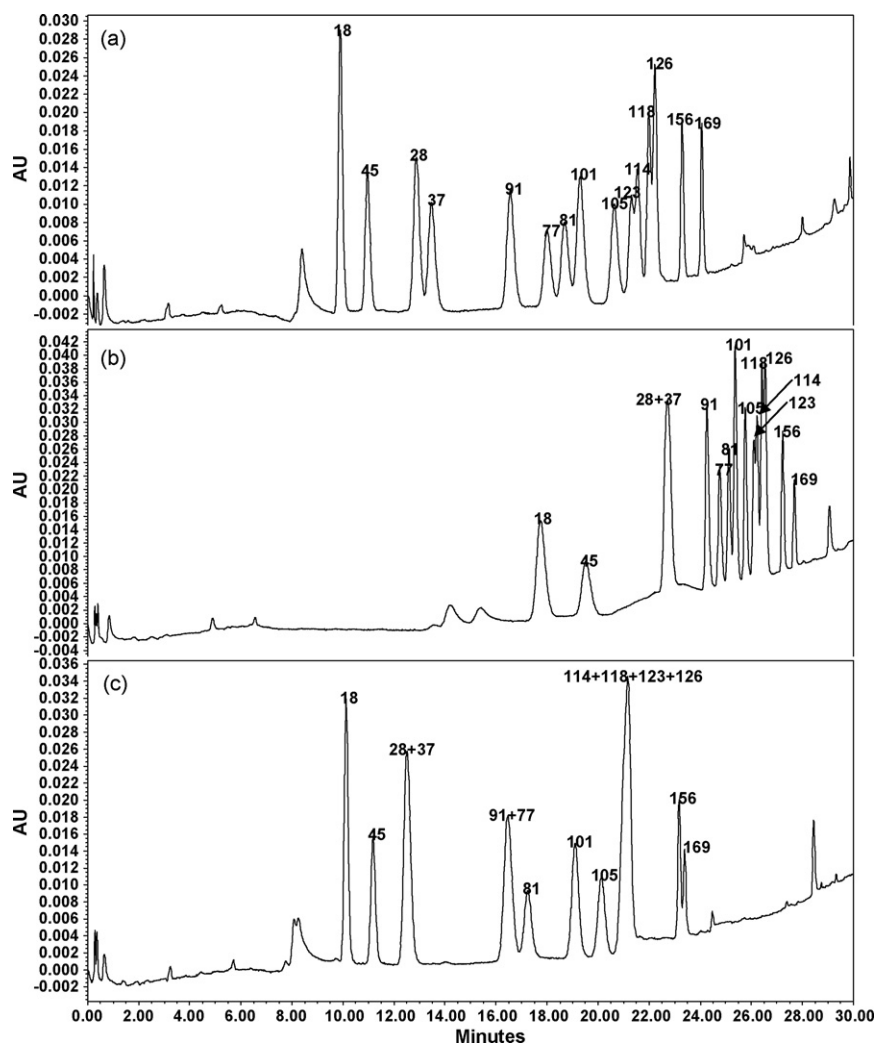


**Fig. 1.** Comparison of Mix A ( $4 \mu\text{g/mL}$  of each congener) separation with three various columns: Vision HT C18 Grace column (a), BEH C18 column (b), BEH Phenyl column (c). Chromatographic conditions: solvent A, 100% acetonitrile, solvent B, 10% acetonitrile, gradient program (min/%A) 0/15; 6/40; 14/40; 20/45; 30/95; 35/95, equilibration step (5 min), column temperature  $35^\circ\text{C}$ , flow rate  $0.4 \text{ mL/min}$ , sample volume  $5 \mu\text{L}$ .

**Table 1**  
Verified values of LLOQ and LOD of the tested PCB congeners separated on the C18 Grace column.

PCB No.	LLOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)	RSD (%)	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Regression equations	$R^2$
18	0.5	$104.1 \pm 0.3$	0.3	0.15	$y = 1.40 \times 10^5 x - 7.26 \times 10^3$	0.999
28	0.5	$113.4 \pm 2.4$	2.1	0.15	$y = 1.11 \times 10^5 x - 1.33 \times 10^4$	0.999
37	0.5	$114.3 \pm 0.4$	0.3	0.15	$y = 7.74 \times 10^4 x - 2.36 \times 10^3$	0.999
45	0.5	$108.0 \pm 1.0$	1.0	0.15	$y = 8.69 \times 10^4 x - 8.90 \times 10^2$	0.999
52	0.5	$106.3 \pm 2.9$	2.8	0.15	$y = 1.24 \times 10^5 x + 2.47 \times 10^2$	0.998
77	0.5	$115.9 \pm 4.2$	3.6	0.15	$y = 5.65 \times 10^4 x - 2.06 \times 10^3$	0.997
81	0.5	$117.9 \pm 1.7$	1.4	0.15	$y = 6.53 \times 10^4 x - 2.65 \times 10^3$	0.998
91	0.5	$109.7 \pm 3.3$	3.1	0.15	$y = 1.08 \times 10^5 x - 5.09 \times 10^3$	0.998
101	0.1	$107.3 \pm 2.1$	1.9	0.03	$y = 1.06 \times 10^5 x - 5.23 \times 10^3$	0.999
105	0.5	$114.2 \pm 1.7$	1.5	0.15	$y = 7.51 \times 10^4 x - 1.06 \times 10^4$	0.999
114	0.5	$92.0 \pm 1.6$	1.7	0.15	$y = 5.57 \times 10^4 x + 4.18 \times 10^3$	0.999
118	0.5	$110.0 \pm 2.9$	2.6	0.15	$y = 6.34 \times 10^4 x - 9.48 \times 10^3$	0.999
123	0.5	$114.0 \pm 4.5$	4.0	0.15	$y = 8.18 \times 10^4 x - 6.75 \times 10^3$	0.999
126	0.5	$102.6 \pm 5.3$	5.1	0.15	$y = 4.19 \times 10^4 x - 5.55 \times 10^2$	0.999
138	0.5	$91.4 \pm 3.3$	3.6	0.15	$y = 1.04 \times 10^5 x + 9.15 \times 10^3$	0.999
153	0.5	$101.6 \pm 3.3$	3.4	0.15	$y = 1.01 \times 10^5 x + 3.44 \times 10^3$	0.999
156	0.5	$109.5 \pm 6.2$	5.7	0.15	$y = 5.25 \times 10^4 x - 3.31 \times 10^3$	0.999
169	0.5	$116.4 \pm 4.0$	2.9	0.15	$y = 3.12 \times 10^4 x - 9.20 \times 10^2$	0.997
180	0.5	$105.7 \pm 1.1$	1.0	0.15	$y = 7.23 \times 10^4 x + 3.76 \times 10^3$	0.999





**Fig. 2.** Comparison of Mix B (2.5 µg/ml of each congener) separation with three different columns: Vision HT C18 Grace column (a), BEH C18 column (b), BEH Phenyl column (c). For chromatographic conditions see Fig. 1.

**Table 2**  
System suitability data for congeners in Mixture A and Mixture B separated on the C18 Grace column.

PCB No.	RT (min)	Resolution	EP plate count	Symmetry factor	RT repeatability (RSD %)	Area repeatability (RSD %)
<b>Mix A</b>						
18	9.90		15 900	1.16	0.0	2.6
28	12.89	7.70	12 431	1.13	0.1	2.4
52	13.73	1.77	12 239	1.11	0.1	3.4
101	19.30	10.09	21 791	1.15	0.0	4.8
138	22.34	7.74	113 887	1.18	0.0	3.6
153	22.84	2.03	156 303	1.09	0.0	4.2
180	24.18	6.62	305 328	1.19	0.0	1.1
<b>Mix B</b>						
18	9.90		6 209	1.15	0.0	2.5
45	10.96	3.18	14 778	1.14	0.0	1.1
28	12.88	4.67	12 452	1.12	0.1	2.3
37	13.47	1.22	11 245	1.11	0.0	0.4
91	16.56	5.97	15 757	1.12	0.1	4.0
77	18.00	2.69	17 259	1.10	0.0	4.5
81	18.69	1.25	17 994	1.10	0.1	4.3
101	19.29	1.11	20 992	1.11	0.0	4.4
105	20.63	2.61	27 363	1.09	0.1	3.3
123	21.30	1.72	100 293	0.85	0.1	4.9
114	21.54	0.97	90 381	1.23	0.0	5.0
118	21.99	1.65	145 100	0.89	0.0	4.8
126	22.22	1.06	133 244	1.27	0.0	4.9
156	23.29	4.06	201 826	1.13	0.0	3.2
169	24.06	3.97	274 867	1.15	0.0	3.7

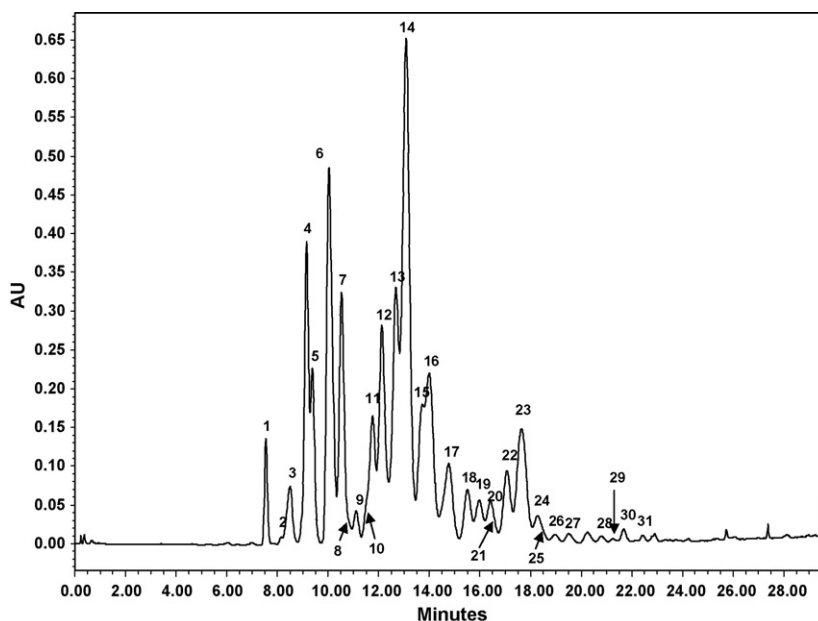


Fig. 3. Chromatogram of Delor 103 (100 µg/mL) UHPLC separation with the C18 Grace column. For peak identification see Table 3, for chromatographic conditions see Fig. 1.

(min/%A). The column temperature was maintained at 35 °C, and the flow rate was set at 1 mL/min. Sample volumes of 5 µL were injected and PCBs were monitored at the wavelength of 202 nm.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. UHPLC

Several gradient programs (approximately 20 for each column, data not shown) based on a multiple, stepwise increase of the acetonitrile ratio were applied to all of the three tested sub-2-micron particle columns in order to obtain the separation of the congeners in the premixed mixtures. All of the three columns yielded sufficient separation of Mixture A (Fig. 1). However, only the C18 Grace column exhibited the ability to separate more complex Mixture B (Fig. 2), while some congeners showed poor or no tendency to separate on columns BEH C18 (1.7 µm), and BEH Phenyl (1.7 µm) (Waters). The optimized gradient program (see Section 2.2) for the C18 Grace column was therefore used with the other columns to demonstrate their selectivity for the PCB congeners in the mixtures. The chromatograms presented in Figs. 1 and 2 show that, under these conditions, the Phenyl BEH column appeared to be almost as efficient in the separation of Mix A as the C18 Grace column while, in Mixture B, it was not able to separate the congeners 28 from 37, 91 from 77 and especially the later-eluting congeners (Nos. 114, 118, 123, 126) (see Fig. 1c). The C18 BEH column, which was the first one routinely used for UHPLC separations [23,24], yielded good separation of most of the peaks in the mixtures (Fig. 1b). However, it was necessary to substantially extend the chromatographic run to attain sufficient separation of congeners Nos. 123, 114, 118 and 126. Also in this case, the early eluting congeners Nos. 28 and 37 were not separated under any of the tested conditions.

The results in Fig. 1 also suggest that, in addition to different analyte–sorbent interactions among phenyl and the octadecylsilica columns, the size of the particles can probably play an important role in the efficacy of the separation [16]. Another explanation for the different selectivity of both C18 columns could be the silica end-capping technology used. Residual silica hydroxyl groups in the Grace column might probably cause higher specificity of this stationary phase for PCB congeners due to a different solute–sorbent interaction.

#### 3.2. Calibration curves

The PCB (except for the congener No. 101) calibration curves were prepared over a linear range from 0.5 to 50.0 µg/mL at six concentration levels, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 with the C18 Grace column. The calibration curve of congener No. 101 was prepared in the range from 0.1 to 50.0 µg/mL at seven concentration levels, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, and 50.0. The relevant regression equations and determination coefficients  $R^2$ , which range from 0.997 to 0.999, are given in Table 1.

#### 3.3. LOD, LLOQ

The LLOQ of the quantified congeners, except for congener No. 101, was 0.5 µg/mL with a precision (RSD) ranging from 0.3 to 5.7% and accuracy from  $91.4 \pm 3.3$  to  $117.9 \pm 1.7\%$  ( $n=6$ ). The LOD for these congeners were 0.15 µg/mL. The LLOQ of congener No. 101 was determined as 0.1 µg/mL with a precision (RSD) of 1.9% and accuracy of  $107.3 \pm 2.1\%$ . The calculated LOD of congener No. 101 was 0.03 µg/mL.

#### 3.4. System suitability

System suitability data are listed in Table 2. The retention time repeatability (RSD) is excellent (maximum of 0.01%). The peak area repeatability ranges from 0.4 to 5.0%. The maximal RSD values were observed for peaks that were not sufficiently separated. Part of this error can be attributed to use of the partial loop injection mode, which was discussed by other authors [25].

The peak symmetry, resolution and EP plate count were calculated for sufficiently separated peaks. Since the mixtures contain PCB congeners without any significant interferences, the resolutions were calculated only between the nearest congeners. The column efficiency expressed as the EP plate counts increases for compounds with higher retention times. This fact corresponds with the band broadening theory. As the content of acetonitrile is higher during the gradient, the later-eluting peaks are sharper since they are focused in a narrower zone. This phenomenon is also visible in the chromatograms depicted in Fig. 1. All the peaks had symmetrical shape with a symmetry factor ranging from 1.09 to 1.18.

**Table 3**  
Delor 103 peak identification after separation on the C18 Grace column.

Peak No.	Retention time (min)	Congener No.	Peak No.	Retention time (min)	Congener No.
1	7.6	4	17	14.8	47,49, 84, 89, 92
2	8.2	19	18	15.6	48
3	8.6	5+8	19	16.0	56
4	9.2	Unknown	20	16.5	55, 60, 91
5	9.4	32	21	16.8	70
6	10.0	18, 24, 27	22	17.1	63, 66, 67, 82
7	10.6	17, 16	23	17.7	74, 76, 83, 148
8	10.8	46	24	18.3	77, 87, 110
9	11.2	45	25	18.4	97, 111
10	11.5	53	26	19.0	101
11	11.8	22	27	19.6	99, 113
12	12.1	33, 40	28	20.8	105
13	12.7	25, 26	29	21.3	123
14	13.1	28, 31, 44	30	21.7	118
15	13.8	37, 42	31	22.47	138, 163
16	14.1	52, 71, 64, 41,72			

### 3.5. Comparison of HPLC and UHPLC for the separation of Delor 103

The UHPLC C18 Grace column was subsequently tested for the separation of PCB congeners in the commercial mixture Delor 103. The chromatogram is depicted in Fig. 3 and the peak identification is given in Table 3. The results show that the UHPLC method was able to separate 13 individual congeners in the D103 mixture. Other compounds were co-eluted in clusters, but some of these co-eluting congeners could be resolved using another separation dimension performed with a mass spectrometry detector e.g. Nos. 37–42, 41, 91, 83, 148. Generally, the elution order of UHPLC is comparable with that of GC, suggesting participation of a similar hydrophobic retention mechanism.

In order to show the reasonability of this study of the UHPLC application we also briefly tested two conventional HPLC packed with 3.5 and 4.0  $\mu\text{m}$  particles, respectively. Several various gradients were also applied in this case and the selected ones (see Section 2.6) were applied to separation of D103 mixture. The chromatograms are shown in Fig. 4. The figure documents substantially lower separation efficiency of the HPLC stationary phases comparing to sub-2-micron particle columns. This is mainly evident for the dominant trichloro congeners. The later-eluting tetra chlorinated representatives that are only partially separated from the main peak cluster.

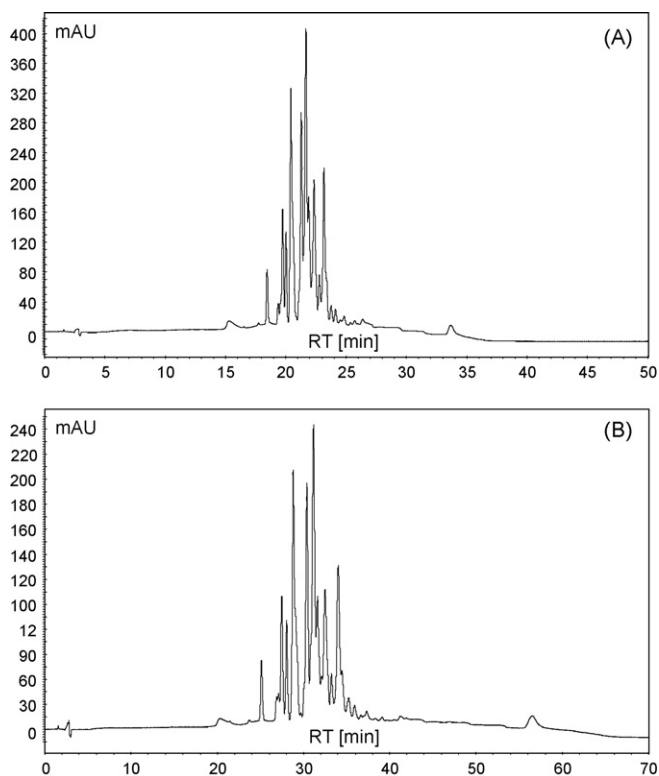
The outcomes of this study imply that UHPLC separation of PCB mixtures cannot be for the meantime a real alternative to the classical GC determination. However, the results show that the technique could be used for specific experiments like biodegradation studies that are carried out with less complex mixtures of PCBs [26]. Another aspect to be pointed out is that the study was performed with commercial UHPLC columns and development of tailor made stationary phases for the separation of chlorinated aromatics could lead to further improvement of PCB separation.

## 4. Conclusion

In this article, three columns were compared under chromatographic conditions optimal for the most efficient column. Two premixed mixtures of PCBs often monitored for their abundance or high toxicity were successfully separated with the Grace C18 column filled with 1.5  $\mu\text{m}$  particles. The fact that the best column was filled with the smallest particles indicates the importance of the sorbent particle size. The newly developed UHPLC method was partially validated and exhibited a linear range of detector response for quantification of PCBs with acceptable correlation coefficients. LLOQ was determined and verified at sub  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations. An attempt was made to separate the commercial PCB mixture Delor 103 under the selected conditions and the mixture was separated with some success. Individual PCB congeners were identified using comparison with standard retentions and also using GC–MS of collected UHPLC fractions.

To our knowledge, this is the first article dealing with UHPLC reversed phase separation of complex PCB mixtures suggesting a new potential direction in UHPLC applications. The combination of high throughput and efficiency of the UHPLC technique with the selectivity and sensitivity of mass spectrometry would be a promising way to enlarge the number of UHPLC applications in the environmental analysis.

The advantage of PCB determination with the liquid chromatography alternative to GC should be not only an enlargement of applications for UHPLC, but also it could be useful for specific sit-



**Fig. 4.** Chromatogram of Delor 103 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) HPLC separation with the C18 Xbridge (A) and Synergi (B) columns. For chromatographic conditions see Section 2.6.

uations such as performing PCB biodegradation experiments. For example enzymatic studies are carried out in liquid water systems and direct analyses of such samples allow to measure kinetics directly from one experimental sample avoiding extraction and purification steps that are necessary for GC and lead to termination of the particular sample [26].

### Acknowledgments

This work was supported by grants no. 2B06156 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, no. 525/09/1058 Grant Agency of the Czech Republic and by Institutional Research Concept No. AV0Z50200510.

### References

- [1] S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer Source, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 161.
- [2] J.W. Cochran, G.M. Frame, J. Chromatogr. A 843 (1991) 323.
- [3] D. Muir, E. Sverko, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 769.
- [4] R. Montes, M. Ramil, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 43.
- [5] J.F. Focant, E.J. Reiner, K. MacPherson, T. Kolic, A. Sjodin, D.G. Patterson Jr., S.L. Reese, F.L. Dorman, J. Cochran, Talanta 63 (2004) 1231.
- [6] J. van Looco, S.P.J. van Leeuwen, P. Roos, S. Carbonnelle, J. de Boer, L. Goeyens, H. Beernaert, Talanta 63 (2004) 1169.
- [7] J.F. Focant, A. Sjodin, D.G. Patterson Jr., J. Chromatogr. A 1040 (2004) 227.
- [8] P. Haglund, J. Chromatogr. A 724 (1996) 219.
- [9] K. Lundgren, B. van Bavel, M. Tysklind, J. Chromatogr. A 962 (2002) 75.
- [10] A. Trost, W. Kleibohmer, K. Cammann, Fresen. J. Anal. Chem. 359 (1997) 249.
- [11] M.C. Pietrogrande, M. Michi, M.N. Plasencia, F. Dondi, Chromatographia 55 (2002) 189.
- [12] A. Jaouen-Madoulet, A. Abarnou, A.M. Le Guellec, V. Loizeau, F. Le Boulenger, J. Chromatogr. A 886 (2000) 153.
- [13] M. Numata, T. Kaneko, Q.D. Mi, M. Ye, S. Kawamata, M. Matsuo, T.J. Yarita, J. Chromatogr. A 1210 (2008) 68.
- [14] M. Numata, Y. Aoyagi, M. Matsuo, K. Ishikawa, N. Hanari, S. Otsuka, Y. Tsuda, T. Yarita, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1985.
- [15] J.T. Andersson, G. Kaiser, Anal. Chem. 69 (1997) 636.
- [16] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klingenberg, J. Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 272.
- [17] D.T.T. Nguyen, D. Guillardme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 105.
- [18] S.A.C. Wren, J. Pharmaceut. Biomed. 38 (2005) 337.
- [19] M. van den Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunström, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.Ch. Larsen, F.X.R. van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Wærn, T. Zacharewski, Environ. Health Perspect. 106 (1998) 775.
- [20] European Standard EN 15308:2008.
- [21] A. Kubátová, M. Matucha, J.G.K. Ševčík, J. Chromatogr. A 752 (1996) 197.
- [22] CDER/CBER, Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, 2001 (May).
- [23] R. Plumb, J. Castro-Perez, J.H. Granger, I. Beattie, K. Joncour, A. Wright, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 2331.
- [24] J. Castro-Perez, R. Plumb, J.H. Granger, I. Beattie, K. Joncour, A. Wright, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 843.
- [25] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Talanta 68 (2006) 908.
- [26] L. Chromá, M. Macková, P. Kučerová, C.I. Wiesche, C. Burkhard, T. Macek, Acta Biotechnol. 22 (2002) 35.





## Determination of 15 isomers of chlorobenzoic acid in soil samples using accelerated sample extraction followed by liquid chromatography

Zdena Křesinová<sup>a,b</sup>, Milan Muzikář<sup>a</sup>, Jana Olšovská<sup>a</sup>, Tomáš Cajthaml<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Vídeňská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Environmental Studies, Faculty of Science, Charles University, Benátská 2, CZ-128 01 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 October 2010

Received in revised form 2 March 2011

Accepted 8 March 2011

Available online 16 March 2011

#### Keywords:

HPLC

Chlorobenzoic acid

Accelerated solvent extraction

Polychlorinated biphenyls

PCB

Biodegradation

### ABSTRACT

A study was conducted to elaborate a fast, simple and efficient method for determination of 15 isomers chlorobenzoic acids (CBAs) in soil using HPLC-UV. Artificially contaminated soil samples were extracted using accelerated solvent extraction (ASE) with 1% acetic acid in a mixture of hexane and acetone (1:1, V/V) under a pressure of 10.34 MPa and temperature of 150 °C. The recovery of the ASE method was above 82%. The extracts were concentrated; dimethyl sulfoxide was used to prevent CBA volatilization and the final analysis was performed with a C18 XBridge HPLC column employing a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid in water. A HPLC procedure with gradient elution and UV detection was developed and validated. The method exhibited a linear range for 2-CBA; 2,6-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,3,6-CBA; 2,5-CBA; and 2,4-CBA from 5 to 120 µg/mL with a limit of quantification (LOQ) of 5 µg/mL, RSD from 2.42 to 9.42% and accuracy from 82 ± 2 to 103 ± 3%. The linear range of determination of 2,4,6-CBA, 3,4-CBA, 2,3,5,6-CBA, 3,5-CBA, 2,3,5-CBA, 2,3,4,5,6-CBA and 2,3,4,5-CBA was 10–120 µg/mL with LOQ 10 µg/mL, RSD from 0.74 to 5.84% and accuracy from 94 ± 1 to 114 ± 1%. The optimized analytical procedure was finally applied on two historically PCB contaminated soils and 9 CBAs were quantified in the samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chlorinated organic compounds are a class of serious environmental pollutants due to their ecotoxicity and environmental persistence. Chlorinated benzoic acids are widespread environmental pollutants resulting primarily from microbial biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCB), reviewed e.g. in Field and Alvarez [1] and some herbicides [2]. CBAs are significantly more soluble than their parent compounds and therefore can enter into the aqueous phase from the contaminated soil of polluted sites. Some mono-, di-, and trichlorobenzoic acids (CBAs) have been shown to cause genomic damage to tobacco plants [3], and to be toxic to aquatic organisms such as ciliate [4], *Daphnia* [5], algae [6] and fish [5]. Zhao et al. and Muccini et al. suggested that the dissociation of CBAs is an important factor in their toxicity and the nonionized forms of CBAs are usually less toxic than the ionized analogues [4,5]. 2,3-CBA, 2,3,6-CBA, 2,4,6-CBA and monochlorinated isomers were also found to possess estrogenic disrupting activity [7]. Although it was found that CBAs are not very toxic toward bacteria, substantial negative effects of their presence on the transformation of PCBs

have been reported [8]. In this way, they can inhibit bioremediation processes and therefore understanding the fate of CBAs is of environmental importance.

In order to determine the concentrations of analytes in environmental matrices using chromatography, it is usually necessary to include an extraction step. Liquid–liquid extraction methods have been described for aqueous samples containing CBAs, using methyl *t*-butyl ether [9] and ethyl acetate [10] as extraction solvents.

Several extraction methods have also been described for extraction of CBAs and other organochlorinated pollutants from solid environmental samples. Gentry et al. described simple liquid extraction of soil containing CBAs using detergent (not specified Zwittergent) with hexametaphosphate [11]. Other articles have dealt with comparisons of the efficiency, time and the material cost of the various extraction methods, such as classical Soxhlet extraction, microwave extraction and accelerated solvent extraction (ASE) for various organochlorinated pollutants in soil matrices [12–14]. Traditional Soxhlet extraction attains acceptable efficiency, but is time-consuming and requires large amounts of solvents. Ultrasound extraction is an alternative method to Soxhlet. Advanced extraction methods, such as supercritical fluid extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction (ASE), are less time-consuming and usually require smaller amounts of solvents. HPLC connected

\* Corresponding author. Tel.: +420 241062498; fax: +420 241062384.  
E-mail address: [cajthaml@biomed.cas.cz](mailto:cajthaml@biomed.cas.cz) (T. Cajthaml).

with UV or MS detection and gas chromatography (GC) belong among classical methods for determination of organic acids, including CBAs. To determine CBAs by GC, it is necessary to derivatize their carboxylic group, usually using diazomethane [15] or bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide [16]. In the HPLC mode, CBAs were separated on a C18 reverse phase [9,17] or ODS-AQ column [18]. The low  $pK_a$  of these organic acids usually requires acidification of the mobile phase used in the HPLC system [9,17,18].

Several chromatographic methods for determination of CBAs are described in the literature. These methods are typically used for quantification of several CBA isomers during degradation experiments or for determination of their residual concentrations in environmental matrices. However, none of the described methods includes an analysis of a wider range of representatives simultaneously including mono-, di-, tri-, tetra- a pentachlorine CBA isomers.

The main objective of our work was to develop a robust and efficient LC method for determination of 15 CBA isomers (mono-, di-, tri-, tetra-, and penta-CBA) and to evaluate different HPLC columns and mobile phases. Another goal of this work was to develop and validate a simple, rapid and efficient extraction method for CBAs from soil samples using ASE. This method represents fast, low-solvent consumption and a reproducible method suitable for soil samples containing a complex matrix. ASE was then employed to determine the presence of CBAs in artificially contaminated soils.

## 2. Experimental

### 2.1. Standards and chemicals

2-CBA; 2,3-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,5,6-CBA; 2,3,4,5,6-CBA were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). 3-CBA; 4-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA and 2,6-CBA were from Merck (Darmstadt, Germany). 2,3,6-CBA was purchased from Supelco (Steinheim, Germany), 2,3,4,5- from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium) and 2,3-dichlorophenol (internal standard, IS) from Reidel-de Haën (Steinheim, Germany).

Acetone and *n*-hexane for residue and pesticide analysis were provided by Chromservis (Prague, Czech Rep.). Methylene chloride for organic trace analysis was obtained from Merck. Anhydrous sodium sulfate ( $Na_2SO_4$ ) was obtained from Lachner (Prague, Czech Republic). Glacial acetic acid and formic acid were obtained from Reidel-de Haën.

Acetonitrile (ACN, gradient grade) was purchased from Fisher Scientific (Leicestershire, UK), trifluoroacetic acid (TFA) from Fluka (Steinheim, Germany) and methanol (Chromapur GG) from Chromservis (Czech Republic). All the other chemicals were of analytical grade and were obtained from Sigma–Aldrich.

### 2.2. Stock solutions

Standard solutions containing 2 mg/mL of each of the 15 benzoic acid compounds were prepared in ACN and stored in a refrigerator. The stock standard solutions with the appropriate concentrations were prepared by mixing all 15 CBAs and diluting the stock solution with ACN.

### 2.3. HPLC conditions

HPLC analyses were performed using the Alliance Waters system (Prague, Czech Republic) equipped with a PDA detector and Empower software was used for data processing. Separation of the CBA mixture was tested on four reversed phase columns: XBridge C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., particle size 3.5  $\mu$ m), Waters; SynergyPolar RP (250 mm × 4.6 mm I.D., particle size 4  $\mu$ m), Phenomenex; LiChroCart – LiChroSphere RP-18e (250 mm × 4 mm I.D.,

particle size 5  $\mu$ m), Merck and LiChroCart – Superspher 100 RP-18e (250 mm × 4 mm I.D., particle size 4  $\mu$ m), Merck. The column temperature was maintained at 35 °C, and the flow rate was tested from 0.8 to 1 mL/min for all the columns. Sample volumes of 10  $\mu$ L were injected. CBAs were detected at the wavelengths corresponding to their absorption maxima: 212.2 nm for 2,3,4,5-CBA; 213.4 nm for 2,3,4,5,6-CBA; 239.9 nm for 4-CBA and 209.9 nm for the other CBAs.

Linear gradient programs using a mobile phase consisting of 10% (V/V) ACN (A) and 100% ACN (B) or MeOH (B) were employed to separate the CBAs. Several additives were used as pH modifiers in order to suppress CBA dissociation: acetic acid (0.1%), formic acid (0.1% and 0.2%), orthophosphoric acid (0.1%), and trifluoroacetic acid (0.05% and 0.1%). Each analysis was followed by a column equilibration step (8 min).

### 2.4. Soil sample preparation

The sandy–loamy soil collected from the garden of the Academy of Sciences of the Czech Republic was used for extraction tests. Its main properties were as follows: total organic carbon 0.8%, total organics 1.4%, pH 5.3, water-holding capacity 31% and granulometric composition: sand 50.9%, fine sand 31.2%, silt 10.8%, and clay 7.1%. 10 g of the homogenized soil was spiked 10 times with 100  $\mu$ L of acetone solutions of the CBAs (100  $\mu$ g/mL of each CBA), resulting in a final concentration 10  $\mu$ g/mL of each CBA. The small volume steps were employed in order to avoid any contact of the solvent with the glassware and the soil was dried at laboratory temperature and was homogenized with a spoon after each step.

Two real historically PCB contaminated soils were collected in the Czech Republic for an application of the optimized analytical method. One of the soils was collected in central Bohemia in a refused heap in the town Lhenice (Soil A) and the second was from a former Soviet army military base Milovice from central Bohemia (Soil B). The soils were provided kindly by AECOM CZ s.r.o. and Dekonta a.s. companies. PCB concentration in the Soil A was 82 mg/kg (sum of PCB congeners 28, 52, 101, 118, 153, 138, 180 according to US EPA method 8082) and the Soil B contained 175 mg/kg of PCBs in dry soil.

### 2.5. Extraction procedure

The extractions were carried out using Dionex 200 ASE extractor (Palaiseau, France). ASE samples were prepared by weighing 3.5 g of spiked soil, humidified with 350  $\mu$ L  $H_2O$  and mixed with 3.5 g of  $Na_2SO_4$  placed in the ASE cell (11 mL volume). In addition, the appropriate amount of washed sand was added at the bottom and on the top of the sample to fill the dead volume in the cell. Glassfiber filters were placed at the bottom and the top of each cell. The extractions were performed at temperatures of 100 °C and 150 °C and pressures of 10.34 MPa and 13.79 MPa with various solvent systems: methylene chloride, hexane/acetone (1:1, V/V), 1% acetic acid in hexane/acetone (1:1, V/V) and 1% formic acid in hexane/acetone (1:1, V/V). The details of the extraction conditions are summarized in Table 1. All the extraction conditions were performed in triplicate.

### 2.6. Pre-chromatographic sample adjustment

500  $\mu$ L of DMSO was added to the collected organic extracts (approximately 20 mL in each vial) to avoid volatilization of the CBA analytes and the extracts were concentrated using a vacuum rotary evaporator at 60 kPa and 40 °C to approximately 1.5 mL. 50  $\mu$ L of internal standard (IS, 2,3-dichlorophenol 0.9 mg/mL in ACN) were added to each sample and the IS was used to calculate the vol-

**Table 1**  
Description of the 3 ASE methods.

	Method A	Method B	Method C
Temperature (°C)	150	100	100
Pressure (MPa)	10.34	13.79	10.34
Cell preheat (min)	Off	Off	1
Cell heat up (min)	5	5	5
Static time (min)	7	7	7
Flush volume (%)	60	60	60
Purge time (s)	60	60	60
Static cycles	3	3	3

ume extracts. 1 mL of each sample was then centrifuged (9000 rpm, 10 min) and analyzed by HPLC.

### 2.7. Method validation

**Selectivity and matrix effect.** The selectivity of the HPLC method was determined by comparing the chromatograms of the CBA standards and a blank sample containing the soil matrix. This blank sample was prepared by extraction of the uncontaminated soil using ASE. The matrix effect was then evaluated by employing the method of analyte additions to an extract of uncontaminated soil at three different concentration levels, 5 (10), 40, and 80 µg/mL for CBAs and at concentration levels of 9, 90, and 180 µg/mL for the IS. The chromatograms were then compared in order to evaluate any possible interfering effect of the sample matrix with CBAs.

**Calibration curve.** The eight-point calibration curves over linear ranges were measured for all 15 CBAs from 5 µg/mL (2-CBA; 2,6-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,3,6-CBA; 2,5-CBA; 2,4-CBA; 2,4,6-CBA) and from 10 µg/mL (3,4-CBA; 2,3,5,6-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,4,5,6-CBA; 2,3,4,5-CBA) to 120 µg/mL. The calibration curve of the IS ranged from 3 to 300 µg/mL. Each point on the calibration curve represents the arithmetic mean of six values.

**Limit of quantification.** LOQ was determined as the lowest calibration standard level for each CBA and IS quantified with precision (relative standard deviation, RSD) and accuracy lower than 20%. Six replicates of CBAs (5 or 10 µg/mL) mixture and IS (9 µg/mL) were measured.

**Accuracy and precision.** To evaluate the precision and accuracy, quality control samples were prepared at concentrations of 5 (10), 20 and 80, 3, 90 and 180 µg/mL for 15 CBA mixtures and the IS, respectively. RSD was taken as a measure of the precision, and the percentage difference between the determined and spiked amounts was considered a measure of the accuracy.

**Table 2**  
Analyte retention characteristics and HPLC method efficiency.

Analyte	$t_R$ (min)	$t_R$ repeatability (%RSD)	Area repeatability (%RSD)	Resolution	Absorption maxima (nm)	LOQ (µg/mL)
2-CBA	12.96	0.15	4.49	–	210	5
2,6-CBA	14.81	0.13	6.64	3.06	210	5
3-CBA	24.00	0.17	4.68	11.42	210	5
4-CBA	25.77	0.11	6.23	2.29	240	5
2,3-CBA	27.70	0.24	6.69	2.64	210	5
2,3,6-CBA	28.89	0.18	7.08	1.45	210	5
2,5-CBA	30.27	0.06	6.60	1.63	210	5
2,4-CBA	37.72	0.19	6.60	8.70	210	5
2,4,6-CBA	39.70	0.25	6.50	2.24	210	10
IS	42.78	0.17	8.04	4.46	210	10
3,4-CBA	49.40	0.10	3.63	10.03	210	10
2,3,5,6-CBA	50.48	0.09	5.29	1.72	210	10
3,5-CBA	52.86	0.09	8.37	4.21	210	10
2,3,5-CBA	54.61	0.09	7.95	3.46	210	10
2,3,4,5,6-CBA	66.17	0.05	3.60	42.04	213	10
2,3,4,5-CBA	68.48	0.04	2.90	9.41	212	10

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of the HPLC conditions

In this paper, four chromatographic columns filled with different sorbents from various providers (Synergy Polar RP, Xbridge C18 and LiChroSphere RP-18e and Supersphere 100 RP-18e) were tested for separation of the 15 CBA isomers. Methanol appeared to not be a suitable component in the mobile phase due to its generally low ability to separate CBAs and a substantial negative effect on the peak shape of CBA that prevented complete separation of several CBAs (data not shown). Therefore, a further optimization was performed with ACN alone. The separation of the target compounds was optimized under acidic pH conditions in order to suppress CBA dissociation. The tested additives were employed at slightly different concentrations due to the pH stability of the tested columns, which was found to be crucial, especially for Lichrosphere and Supersphere columns. Due to the lack of stability of these columns, the data obtained from their application for the separation of CBAs, even at pH above 2, were not reproducible and the separation efficiency decreased rapidly after several chromatographic runs. The modifiers were added to the organic phase (B), to the water phase (A) or to both and the best resolution and peak shapes were generally achieved with 0.1% TFA in the aqueous phase, where other compositions mostly had a negative effect on the peak shapes. The order of suitability of the compounds was as follows: TFA ≥ formic acid > acetic acid > ammonium acetate > orthophosphoric acid. The peak shapes were similar when TFA and formic acid were used; however, formic acid significantly worsened the CBA separation (data not shown). Further testing was performed with XBridge C18 and Supersphere 100 RP-18e columns, because of the satisfactory peak shapes of the separated CBAs. Several gradient programs (approximately 15 for the columns, data not shown), based on a multiple, stepwise increase in the acetonitrile ratio, were applied to the columns in order to obtain the separation of the individual CBAs. The best separation was obtained with the XBridge column when all the analytes were completely separated. A mixture of all 15 CBAs and IS were finally separated with 0.1% TFA in A using the best tested gradient conditions (min/%B): 0/17; 30/17; 60/34; 70/50. The duration of the analysis was 70 min and the applied flow rate was 0.8 mL/min. The results of the separation are displayed in Table 2.

There are a limited number of papers in the literature dealing with chromatographic determination of CBAs and those few published articles described only the HPLC separation of several mono- and dichlorinated derivatives. To our best knowledge, no publication is available on the separation of a larger group of



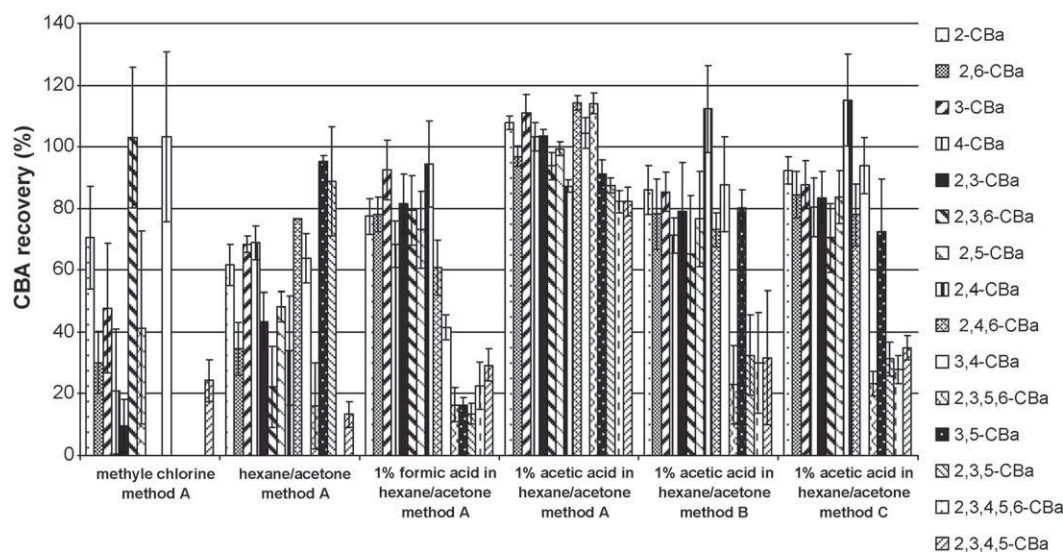


Fig. 1. Comparison of various solvents and various ASE methods for the determination of 15 isomers of chlorobenzoic acid.

CBA isomers. One of the first HPLC methods was published by Dietz et al. [9] where these authors elaborated an HPLC method in order to determine the concentrations of 2-CBA, 3-CBA and 4-CBA together with benzoic acid and chlondic acid in landfill leachate using a Waters Nova-Pak C18 column and mobile phase of 0.2% acetic acid in water and acetonitrile. Another HPLC method for determination of the PCB degradation products including eleven CBAs (mono–tri chlorinated) using a Luna C18 column and methanol–water– $H_3PO_4$  mixture was also described by Macková et al. [17]. However, the authors analyzed CBAs only as single compounds and only an isocratic mode was employed. Adebusoje et al. [18] studied the influence of the presence 2-CBA, 3-CBA, 4-CBA and 2,3-CBA on the growth and degradation potential of PCB-degrading bacterial strains. The CBAs in this study were analyzed

in liquid culture medium using HPLC with YMC-Pack ODS-AQ column and phosphate buffer–methanol–acetonitrile mobile phase. The results of our study showed that the tested classical particle sorbent columns were not able to separate the studied CBA mixture, in contrast to the XBridge column, which uses octadecyl silica Bridged Ethyl Hybrid (BEH) sorbents. This column also provided generally higher back pressure, which finally allowed us to decrease the flow rate to 0.8 mL/min. This caused a certain extension of the chromatographic run, particularly, leading to better separation without any negative influence on the peak shapes, as was observed for the other columns. A possible explanation could be the outstanding endcapping of the sorbent with BEH technology, enabling successful separation of CBAs; however, this was not found to be useful for other chlorinated pollutants, e.g.

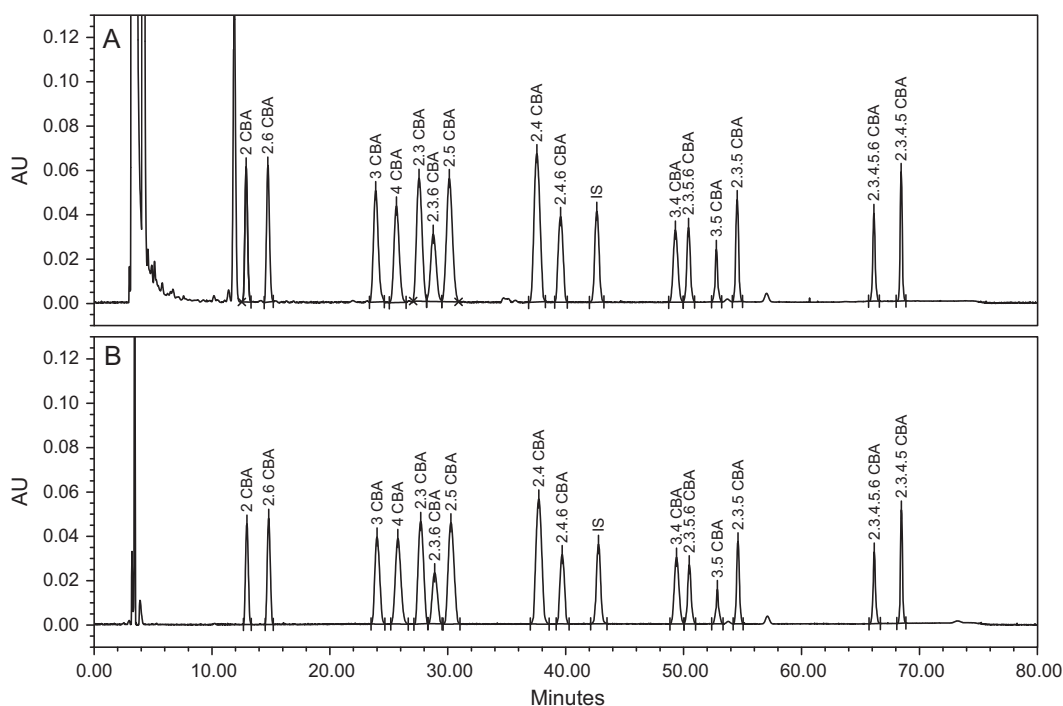


Fig. 2. Chromatogram of a spiked soil extract (A) and standard solution in acetonitrile (B) at the 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  level. The chromatogram is displayed in the MAX Plot mode at its maximal absorption wavelengths (for CBAs see Table 2).

**Table 3**  
Calibration curves, determination coefficients, accuracy and precision of 15 CBAs and IS in the HPLC method.

Analyte	Calibration curve	r <sup>2</sup>	µg/mL	Accuracy (%)	%RSD
2-CBA	$y = 4.13 \times 10^4 x + 2.48 \times 10^4$	0.9996	5	95.4 ± 7.8	8.17
			40	99.1 ± 1.4	1.42
			80	98.5 ± 1.5	1.54
2,6-CBA	$y = 5.06 \times 10^4 x + 2.43 \times 10^4$	0.9997	5	90.9 ± 6.6	7.30
			40	99.8 ± 0.5	0.51
			80	100.1 ± 0.9	0.93
3-CBA	$y = 5.92 \times 10^4 x + 4.84 \times 10^4$	0.9996	5	90.5 ± 6.0	6.66
			40	98.8 ± 2.0	1.98
			80	101.3 ± 1.7	1.68
4-CBA	$y = 6.96 \times 10^4 x - 7.39 \times 10^4$	0.9991	5	95.2 ± 8.1	8.53
			40	101.0 ± 2.1	2.07
			80	102.4 ± 1.9	1.85
2,3-CBA	$y = 9.34 \times 10^4 x + 3.33 \times 10^4$	0.9994	5	96.8 ± 3.6	3.68
			40	100.0 ± 0.8	0.82
			80	98.5 ± 2.3	2.27
2,3,6-CBA	$y = 5.62 \times 10^4 x + 6.93 \times 10^3$	0.9990	5	96.9 ± 9.1	9.42
			40	99.8 ± 1.0	1.03
			80	100.4 ± 1.1	1.12
2,5-CBA	$y = 9.23 \times 10^4 x + 4.77 \times 10^4$	0.9994	5	81.5 ± 1.9	2.28
			40	100.1 ± 0.7	0.66
			80	100.8 ± 1.6	1.56
2,4-CBA	$y = 1.00 \times 10^5 x - 3.74 \times 10^5$	0.9992	5	102.5 ± 2.5	2.42
			40	101.4 ± 1.3	1.28
			80	98.6 ± 2.8	2.78
2,4,6-CBA	$y = 9.35 \times 10^4 x - 5.33 \times 10^5$	0.9990	10	108.6 ± 2.3	5.84
			40	101.1 ± 1.2	1.22
			80	96.7 ± 1.3	1.25
3,4-CBA	$y = 8.69 \times 10^4 x - 7.30 \times 10^5$	0.9989	10	107.5 ± 2.4	2.20
			40	101.3 ± 1.3	1.27
			80	95.0 ± 1.2	1.26
2,3,5,6-CBA	$y = 9.68 \times 10^4 x - 1.03 \times 10^6$	0.9989	10	103.0 ± 1.5	1.42
			40	101.9 ± 1.1	1.08
			80	91.9 ± 1.8	1.91
3,5-CBA	$y = 7.95 \times 10^4 x - 1.08 \times 10^6$	0.9992	10	114.2 ± 1.4	1.22
			40	101.7 ± 1.4	1.41
			80	91.9 ± 4.0	4.34
2,3,5-CBA	$y = 1.10 \times 10^5 x - 1.26 \times 10^6$	0.9989	10	114.3 ± 0.8	0.74
			40	101.8 ± 1.1	1.03
			80	93.0 ± 1.7	1.79
2,3,4,5,6-CBA	$y = 1.06 \times 10^5 x - 1.26 \times 10^6$	0.9993	10	114.4 ± 1.4	1.20
			40	101.7 ± 0.8	0.74
			80	93.3 ± 1.0	1.12
2,3,4,5-CBA	$y = 8.47 \times 10^4 x - 8.45 \times 10^5$	0.9990	10	112.2 ± 0.8	0.85
			40	101.6 ± 0.7	0.70
			80	92.4 ± 1.8	1.90
IS	$y = 8.95 \times 10^4 x - 3.32 \times 10^5$	0.9999	10	94.4 ± 1.0	1.10
			40	93.0 ± 1.2	1.25
			80	90.9 ± 0.3	0.34

polychlorinated biphenyls [19]. Another advantage of this column is its pH stability, which was documented by other authors utilizing XBridge (TM) HPLC columns for method development at extreme pH values [20] and which we found to be crucial for successful CBA separation.

### 3.2. Optimization of sample preparation

Sample preparation to ensure quantitative transfer of the analytes from the sample matrix represents another analytical step that is of equal importance to effective chromatographic separation. The extraction recovery experiments were performed using artificially spiked soil samples (at a level of 20 µg of each CBA per gram of soil).

For the development of the rapid and quantitative extraction method, various solvent systems (methylene chloride, hexane/acetone, 1% acetic acid in hexane/acetone and 1% formic acid in hexane/acetone) and various conditions were employed (see Table 1). It was found that the pressure had a negligible influence on the extraction recoveries in the tested range, in contrast to the temperature, where significantly better results were obtained at 150 °C. However, the selection of the solvents for ASE had a crucial influence on the recovery results. The results were compared on the basis of percent amount yield (amount of CBA in the extract/grams of sample). Fig. 1 shows an overview of the CBA recovery results mainly for the ASE method A (150 °C, 10.34 MPa) and also a comparison of the best solvent system (hexane–acetone, 1% acetic acid) applied at other pressures and temperatures. From

the results it is clear that much better recoveries were generally achieved after acidification of the organic solvents and the best conditions were obtained with hexane–acetone by adding 1% acetic acid. Using methylene chloride led to incomplete extraction of CBAs from the soil, even after addition of formic or acetic acid (data not shown). Using semi-polar solvent mixtures consisting of hexane and acetone led to an increase in the extraction efficiency, but pentachlorobenzoic acid was still absent in the extract. Reducing the extraction temperature during the ASE process had a significant negative impact on the tetra- and pentachlorine substituted benzoic acid recovery. Consistently with US EPA method for pressured fluid extraction [21] it was found that a pressure increase from 10.34 to 13.79 MPa in the extraction process had no or negligible influence on the recovery of the chlorinated analytes. The best results were then obtained at an extraction pressure of 10.34 MPa and temperature of 150 °C (method A). In this case, the recoveries were higher than 82% for all the tested CBAs. Carrying out each determination in triplicate clearly illustrates the variability, which was about 3–5%. The results also indicate that the selection of a pH modifier must be taken into consideration. The pH must be set to as low value in order to suppress CBA dissociation and to improve CBA solubility in the extraction solvent. However, the results show, that a simple selection of a stronger acid (i.e. formic acid), need not necessarily lead to higher recovery yields. This could possibly be because lower pH conditions charge the soil matrix, causing another interaction between the matrix and CBAs. An alternative explanation of the recovery changes after the applications of different modifiers, could lie in the type of matrix–analyte interactions and a possible competition of the modifiers with the analytes for active sites of the soil matrix. Similar behavior of analytes (nitro polycyclic aromatic hydrocarbons) was observed using ASE by other authors [22]. They observed an improvement in the extraction recovery after addition of acetic acid to the extraction solvent, suggesting possible competition between the acid and the analytes for active sites of the matrix.

### 3.3. Method validation and real sample analyses

The method selectivity and the matrix effect study were performed to verify the optimal conditions for quantification of 15 CBAs in the ASE soil extracts. Under the chromatographic conditions described in this paper, all 15 CBAs (including IS) were sufficiently separated (for resolution, see Table 2). On the basis of visual comparison of the two chromatograms alone, it is evident from Fig. 2 that no detectable general matrix effect was observed. Thus, no interfering components of the sample matrix were detected by the UV detector under the chromatographic conditions employed.

The calibrations curves were prepared over a linear range from 5 µg/mL for 2-CBA, 2,6-CBA, 3-CBA, 4-CBA, 2,3-CBA, 2,3,6-CBA, 2,5-CBA, 2,4-CBA and 2,4,6-CBA and from 10 µg/mL for 3,4-CBA, 2,3,5,6-CBA, 3,5-CBA, 2,3,5-CBA, 2,3,4,5,6-CBA, and 2,3,4,5-CBA at eight (seven) concentration levels, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 and 120 µg/mL. The IS calibration curve was prepared over a linear range from 9 to 300 µg/mL at six concentration levels, 9, 20, 40, 80, 150 and 300 µg/mL. The representative regression equations and determination coefficients are given in Table 3.

The accuracy and precision were determined by analyzing CBA samples at three concentrations levels in six replicates and the results are shown in Table 3. The lowest concentration also represents the LOQ.

The recovery of 15 CBAs in the matrix was tested at three concentration levels, LOQ (5 or 10 µg/mL), medium level (60 µg/mL) and high level (120 µg/mL) in six replications for each level. The matrix recovery for LOQ ranged from 85 ± 2 to 116 ± 0, for the medium level from 88.0 ± 1.1 to 116.0 ± 0.4 and for the

**Table 4**

Results of CBA concentrations in real historically contaminated soils.

	Soil A (µg/g)	Soil B (µg/g)
2-CBA	n.q. <sup>a</sup>	n.q.
2,6-CBA	0.09	0.08
3-CBA	0.13	0.05
4-CBA	0.29	0.09
2,3-CBA	0.52	0.02
2,3,6-CBA	0.40	0.12
2,5-CBA	0.07	n.q.
2,4-CBA	0.62	0.08
2,4,6-CBA	0.34	0.64
3,4-CBA	n.q.	n.q.
2,3,5,6-CBA	n.q.	0.35
3,5-CBA	n.q.	n.q.
2,3,5-CBA	n.q.	0.19
2,3,4,5,6-CBA	n.q.	n.q.
2,3,4,5-CBA	n.q.	n.q.

The values were below the respective LOQ.

<sup>a</sup> Not quantified.

high level from 86.9 ± 0.6 to 108 ± 1. The recovery of the IS was tested analogically to CBA at three concentrations levels (9, 90 and 180 µg/mL). The recovery in the sample matrix was for LOQ 94 ± 1, for the medium level 93 ± 1 and for the high level 91 ± 0.

The two real historically contaminated soils were finally extracted and analyzed with the optimized methods. Due to low concentrations of CBA in the samples, we used a higher amount of soil for extraction (30 g) when also the volume of the extraction solvents was proportionally increased. The injection volume was also increased to 50 µL, resulting finally in 100 times concentrations of the samples. The results are displayed in Table 4. The results indicate that during the time of PCB contamination (decades of years) certain amounts of PCBs were transformed into CBAs in the soils. Such information could be taken into consideration when properties and e.g. self-treating potentials of a contaminated area are evaluated.

## 4. Conclusion

In this article, four various HPLC columns were tested for separation of 15 chlorobenzoic acid isomers. The best separation was obtained with the XBridge column when all the analytes were completely separated within 70 min, where the other tested columns generally exhibited poorer separation efficiency or lower stability for the optimized mobile phase. The optimized mobile phase consisted of water–acetonitrile and 0.1 TFA, where the use of other pH modifiers and methanol were found to have negative effects, either on the CBA separation or on the peak shapes. The newly developed HPLC method was partially validated and exhibited a linear range of detector response for quantification of CBAs, with acceptable correlation coefficients. The application of a UV detector allowed us to determine and verify LOQ at concentrations of 5 or 10 µg/mL. The accelerated solvent extraction method was tested with an artificially contaminated soil sample and its parameters were also partially optimized. Finally it was found that the use of hexane–acetone (V/V) as the extraction solvent with addition of 1% acetic acid at 10.34 MPa and 150 °C yielded an extraction recovery of greater than 82%. The extraction method was also verified and it was documented that no soil matrix compound interfered with CBAs during HPLC analysis. Certain problems were found with volatilization of CBAs during concentration of the samples and these difficulties were resolved by adding a small amount of DMSO to the extracts. To our knowledge, this is the first article describing HPLC separation of a larger group of CBAs. The optimized extraction and sample preparation process, together

with the chromatographic determination, allow analysis of CBAs in environmental soil samples, as demonstrated in the cases of two real PCB historically contaminated soils. The method can be used directly, especially by experts studying PCB biodegradation, where the presence of CBAs as “dead-end metabolites” was identified as a substantial problem because of their inhibiting effects on further PCB transformation.

### Acknowledgments

This work was supported by grants no. 2B06156 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and no. 525/09/1058 of the Science Foundation of the Czech Republic and by Institutional Research Concept No. AVOZ50200510.

### References

- [1] J.A. Field, R.S. Alvarez, *Environ. Pollut.* 155 (2008) 1–12.
- [2] S.R. Sorensen, M.S. Holtze, A. Simonsen, J. Aamand, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 399–406.
- [3] T. Gichner, P. Lovecká, B. Vrchotová, *Mutat. Res.* 657 (2008) 140–145.
- [4] M. Muccini, A.C. Layton, G.S. Saylor, T.W. Schultz, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62 (1999) 616–622.
- [5] Y.H. Zhao, G.D. Ji, M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, *Sci. Total Environ.* 216 (1998) 205–215.
- [6] P.Y. Lee, C.Y. Chen, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 156–161.
- [7] K. Svobodová, M. Plačková, V. Novotná, T. Cajthaml, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 5921–5925.
- [8] D.H. Pieper, M. Seeger, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (2008) 121–138.
- [9] E.A. Dietz, N.J. Cortellucci, K.F. Singley, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3331–3347.
- [10] A.J. Lambo, T.R. Patel, *Curr. Microbiol.* 53 (2006) 48–52.
- [11] T.J. Gentry, G. Wang, C. Rensing, I.L. Pepper, *Microb. Ecol.* 48 (2004) 90–102.
- [12] D. Drăgan, S. Cucu-Man, R. Mocanu, A. Covaci, *Rev. Roum. Chim.* 52 (2007) 597–601.
- [13] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, *Anal. Chim. Acta* 602 (2007) 211–222.
- [14] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Fresen. J. Anal. Chem.* 367 (2000) 733–737.
- [15] V. Niedan, H.F. Scholer, *Chemosphere* 35 (1997) 1233–1241.
- [16] I. Kamei, R. Kogura, R. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 566–575.
- [17] M. Macková, B. Vrchotová, K. Francová, M. Sylvestre, M. Tomaniová, P. Lovecká, K. Demnerová, T. Macek, *Eur. J. Soil Biol.* 43 (2007) 233–241.
- [18] S.A. Adebusoye, F.W. Picardal, M.O. Ilori, O.O. Amund, C. Fuqua, *Biodegradation* 19 (2008) 145–159.
- [19] J. Olšovská, Z. Křesinová, M. Flieger, T. Cajthaml, *Talanta* 80 (2010) 1849–1855.
- [20] K. Jenkins, D. Diehl, D. Morrison, J. Mazzeo, *LC GC Eur. – The Application Notebook*, September (2005) 42–43.
- [21] US EPA, Method 3545A, Pressurized fluid extraction (PFE), Environmental Protection Agency, 2007, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3545a.pdf>.
- [22] K. Oukebdane, F. Portet-Kotalo, N. Machour, F. Dionnet, P.L. Desbene, *Talanta* 82 (2010) 227–236.