

LÁTKY S ESTROGENNÍM ÚČINKEM VE VODÁCH

HANA KUJALOVÁ, VLADIMÍR SÝKORA
a PAVEL PITTER

Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
hana.kujalova@vscht.cz

Došlo 25.8.06, přepracováno 19.2.07, přijato 15.3.07.

Klíčová slova: estrogeny, estrogenní aktivita, endokrinní disruptory

Obsah

1. Úvod
2. Přehled látek estrogenního charakteru
3. Chemická struktura estrogenních sloučenin
4. Zdroje estrogenů
5. Účinky exogenních estrogenů na organismy
6. Kvantitativní vyjádření estrogenity
7. Biodegradace estrogenních sloučenin na čistírnách odpadních vod
8. Estrogenita a biodegradabilita alkylfenolů
9. Kontaminace povrchových vod
10. Metody stanovení látek s estrogenní aktivitou

1. Úvod

Sloučeniny vykazující estrogenní aktivitu se běžně vyskytují v odpadních a povrchových vodách. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek antropogenního i přírodního původu, které mají určité strukturální rysy podobné jako hormon estrogen a v důsledku toho jsou schopné jej imitovat. Patří do skupiny endokrinních disruptorů, které EPA (Environmental Protection Agency – Úřad pro ochranu životního prostředí) definuje jako exogenní látky, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem, nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázi, reprodukci, vývoj nebo chování¹. Některé endokrinní disruptory jsou účinné i při koncentracích podstatně nižších, než jaké se projevují toxicitou, což koresponduje s extrémně nízkou koncentrací hormonů v krvi a s jejími minimálními změnami, které postačují k regulaci orgánů². Proto i stopové koncentrace endokrinních disruptorů v životním prostředí mohou mít významný dopad na živé organismy. Vztah mezi expozicí člověka endokrinními disruptory a rostoucím výskytem některých nemocí, poruch reprodukčního systému nebo

vývojových vad plodu je v současné době předmětem výzkumu.

Dosud bylo identifikováno asi 50 různých sloučenin, které lze zařadit do kategorie endokrinních disruptorů³. Z hlediska výskytu ve vodách jsou tyto látky téměř všudypřítomné⁴.

2. Přehled látek estrogenního charakteru

Mezi endogenní estrogeny, které jsou syntetizovány v těle živočichů, patří 17 β -estradiol, estron a estriol⁵. Ostatní látky vykazující estrogenní aktivitu, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému, se označují jako environmentální (nebo též exogenní) estrogeny. Podle původu se rozdělují na fytoestrogeny (rostlinný původ), mykoestrogeny (produkt některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje).

Fytoestrogeny jsou obsaženy v mnoha druzích rostlin (celkem asi 300), např. v obilninách, luštěninách, listové zelenině, travinách, některém ovoci aj. (podrobněji viz cit.^{5–8}). Mezi nejběžnější fytoestrogeny patří isoflavonoidy (např. genistein, equol, daidzein, biochanin A), lignany (enterodiol, matairesinol), kumestany (kumestrol), laktony, steroly, naringeniny^{5,7,9}. Zvláštní pozornost si zaslouží rostlina ploštičník (*Cimicifuga*) z čeledi priskyňkovitých, která obsahuje fytoestrogen formononetin (na bázi triterpenových glykosidů)^{6,10}. Extrakt z oddenků ploštičníku hroznatého (*Cimicifuga racemosa*) je účinnou složkou léčiv Menofem a GS Merilin, užívaných k potlačení příznaků klimakteria^{7,10}.

Jako příklad mykoestrogenů lze uvést zearalenon a jeho deriváty α - a β -zearalanol, což jsou toxiny produkováné plísněmi *Fusarium*, které napadají některé druhy obilnin⁸. Zearalenon se někdy používá jako růstový hormon pro hospodářská zvířata⁸.

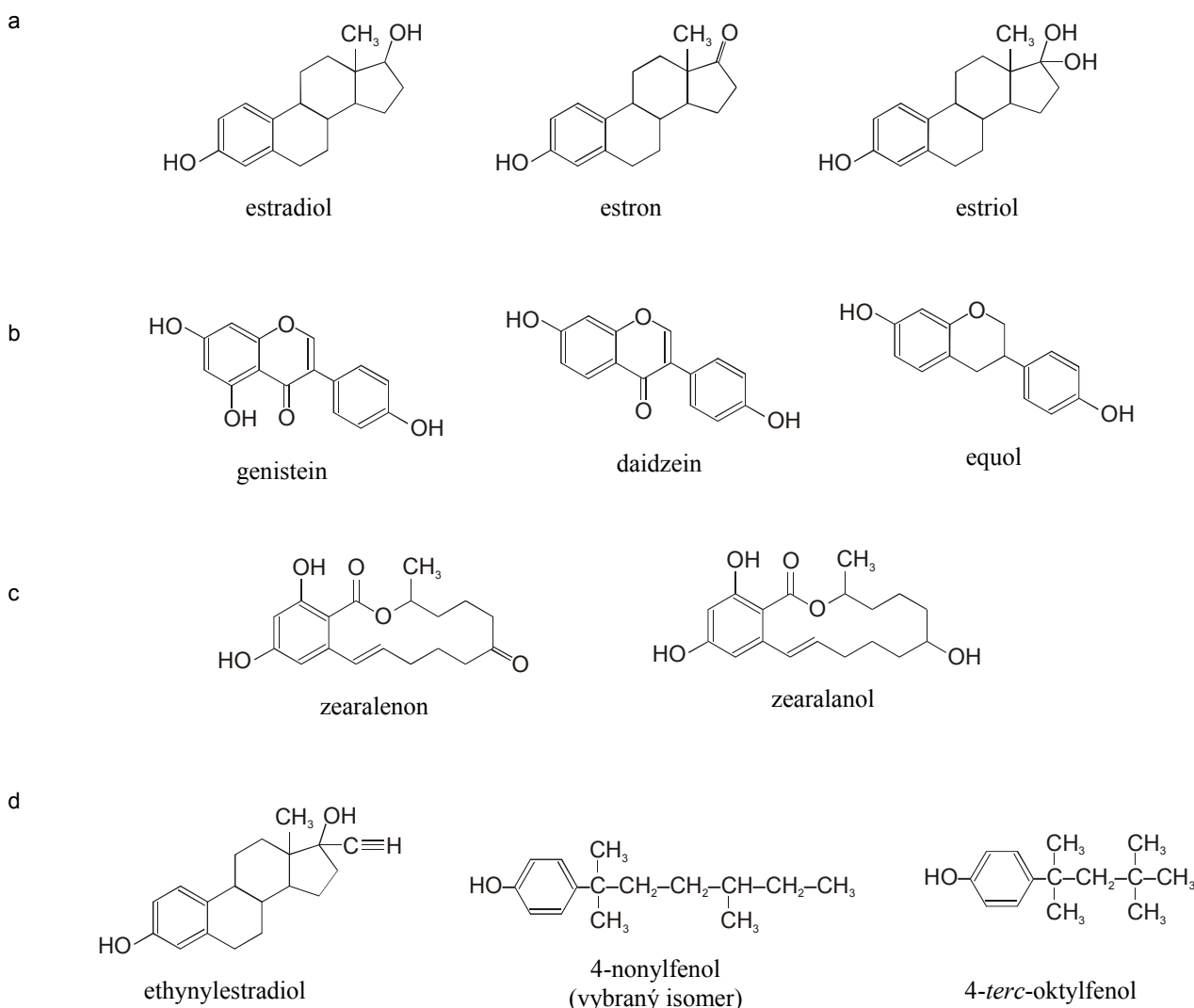
Mezi xenoestrogeny patří průmyslově vyráběné produkty nebo jejich metabolity: některé pesticidy (DDT, endosulfan, atrazin), bisfenol A, deriváty stilbenu, některé ftaláty, alkylfenoly (oktylfenol, nonylfenol), nízkochlorované polychlorované bifenoly, některé acidobazické indikátory (fenolftalein), polyaromatické uhlovodíky, dioxiny, furany, kadmium^{5,8,11}. Bisfenol A a ftaláty se vyluhují z obalů potravin; alkylfenoly jsou biodegradacním produktem neionogenních tenzidů alkylfenoethoxylátového typu, které jsou obsaženy v mnohých detergentech, nátěrových hmotách, pesticidech, kosmetických přípravcích apod.⁹. Dalším významným zdrojem xenoestrogenů jsou farmaceutické preparáty na bázi estrogenů – hormonální antikoncepce, jejíž účinnou látkou je nejčastěji 17 α -ethynylestradiol, vzácně mestranol (tj. methylethynylestradiol) nebo estradiolvaleran¹², a specifické léky obsahující např. diethylstilbestrol⁵.

3. Chemická struktura estrogenních sloučenin

Řada látek vykazujících estrogenní aktivitu má společné strukturální rysy, které lze zjednodušeně nastínit jako přítomnost fenolu nebo jeho funkčního ekvivalentu, zpravidla s volnou polohou *ortho* a s poměrně objemnými hydrofóbními skupinami v polohách *meta* nebo *para*⁵. Toto však není nutnou podmínkou estrogenního působení. Estrogenní receptory jsou schopné vázat velmi širokou škálu různých nesteroidních látek, které mohou, ale nemusí, být strukturálními analogy 17 β -estradiolu^{8,11}. Vzhledem k velké rozmanitosti dosud známých environmentálních estrogenů

nelze zobecnit strukturální nositele estrogennosti¹³. Strukturu nejběžněji se vyskytujících sloučenin s estrogenní aktivitou je možné porovnat na obr. 1. Obecně se jedná o látky lipofilního charakteru, odolné vůči rozkladu, schopné bioakumulace v tukové tkáni a v biomembránách^{5,7}.

V případě alkylfenolů estrogenní účinek silně závisí na velikosti a stupni rozvětvenosti alkylu a na jeho pozici na aromatickém jádře; maximální estrogenní odezvu vykazuje terciární oktylfenol¹¹. Výraznou estrogenní látku lze očekávat obecně u fenolů substituovaných v *para* poloze jediným alkylem sestávajícím ze 6 až 8 atomů uhlíku, z nichž ten nejbližší aromatického jádra je terciární¹⁴.



Obr. 1. Struktura vybraných látek s estrogenním účinkem; (a) endogenní estrogenní, (b) fytoestrogenní, (c) mykoestrogenní, (d) xenoestrogenní

4. Zdroje estrogenů

Hlavní podíl látek estrogenního charakteru v městských odpadních vodách pochází z lidské moči¹⁵. Moč žen obsahuje estriol, estradiol, estron, případně ethynylestradiol (při užívání hormonální antikoncepce)¹⁵. Ethynylestradiol bývá v odpadních vodách přítomen v koncentracích řádově 10^1 ng l^{-1} až 10^2 ng l^{-1} (cit.¹⁶). Městské odpadní vody obsahují také rezidua léků na bázi estrogenů¹⁷.

Převážná část estrogenů se z těla vylučuje v konjugovaných formách jako glukuronidy nebo sírany, které jsou biologicky podstatně méně aktivní než formy volné¹⁵. Avšak již během transportu odpadních vod dochází k dekonjugaci, která dále pokračuje při kontaktu s aktivovaným kalem na čistírnách odpadních vod^{4,15}. Za dekonjugaci jsou zodpovědné zejména bakterie *Escherichia coli*^{15,18}.

Městské odpadní vody dále obsahují širokou škálu syntetických chemikálií s estrogení aktivitou, které pocházejí z detergentů, prostředků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků, potravin, pesticidů aj.¹⁷. Běžně lze v odpadní vodě detegovat např. nonylfenol, oktylfenol, bisfenol A a další látky^{13,17}.

Vydatným zdrojem steroidních estrogenů jsou odpady z chovu hospodářských zvířat, jejichž fekálie obsahují v závislosti na původu 17α -estradiol, 17β -estradiol, estron a estriol, a to konjugované i volné¹⁹. Kontaminovány bývají také nádrže s užitkovou vodou na farmách nebo v blízkosti pastvin²⁰.

5. Účinky exogenních estrogenů na organismy

Environmentální estrogены většinou imitují hormony, vážou se místo nich na estrogení receptory a vyvolávají odezvu (stejnou nebo jinou než endogenní hormony); existuje několik různých mechanismů účinku^{3,5}. Některé xenoestrogeny na receptory působí chemicky a aktivují je, některé je naopak inaktivují, jiné narušují metabolismus hormonů apod.^{5,8}. Existují dva typy estrogenních receptorů: α a β (cit.³). Např. 17β -estradiol, 17α -ethynylestradiol a diethylstilbestrol se přednostně vážou na receptory α , xenoestrogeny a fytoestrogeny mají zpravidla stejnou afinitu k receptorům α i β (výjimkou jsou např. isoflavonoidy, které preferují receptor β)^{3,21}.

Estrogenní účinek environmentálních estrogenů bývá ve srovnání s přirozenými hormony nižší (estrogení potenciál se liší až o několik řádů), což ovšem často bývá kompenzováno vyšší koncentrací těchto látek ve vodách. Některé studie (např. cit.⁵) navíc uvádějí, že se environmentální estrogены mohou na estrogení receptory vázat přednostně před 17β -estradiolem. V případě současného výskytu více xenoestrogenů se jejich účinky mohou pravděpodobně i násobit.

V těle ryb exponovaných estrogením látkám dochází k nepřiměřené indukci tvorby vitellogeninu^{16,22}. Vitellogene-

nin je fosfolipoglykoprotein, který slouží jako prekurzor bílkovin vaječného žloutku nižších obratlovců, syntetizuje se v játrech a krví se transportuje do vaječníků, kde z něj vznikají bílkoviny a stávají se součástí vyvíjejících se vajíček^{5,20}. Tvorba vitellogeninu je regulována estrogenem a je indukovatelná nejen u samic, ale i u samečků, jsou-li exponováni látkám s estrogením účinkem²⁰. K indukci postačuje např. koncentrace ethynylestradiolu ve vodě $0,1 \text{ ng l}^{-1}$ (cit.¹²). Nadměrná syntéza vitellogeninu představuje pro organismy metabolický stres, riziko poškození jater a ledvin, event. úbytek vápníku z kostí²³.

S kontaminací životního prostředí endokrinními disruptory bývá dáván do souvislosti narůstající výskyt vývojových poruch člověka^{12,24}. Estrogení látky pro člověka totiž znamenají potenciální riziko vzniku různých abnormalit v estrogeních cílových tkáních plodu^{5,24}. Některá fakta dokonce nasvědčují tomu, že u lidské populace na různých místech světa postupně dochází k poklesu produkce spermií, a předpokládá se, že příčinou je expozice environmentálním estrogenům²⁵. Avšak znalostí o vlivu endokrinních disruptorů na lidské zdraví je dosud velice málo. V divokých populacích vodních i některých suchozemských organismů byl prokázán vliv kontaminace vody xenoestrogeny a přirozenými estrogény na plodnost, sexuální diferenciaci a vývoj^{3,5,12,17,26}. Příkladem je extrémní výskyt vývojových poruch aligátorů v jezeře Apopka na Floridě, téměř kompletní úhyn určitého vývojového stádia pstruha v jezeře Ontario v Kanadě nebo poruchy reprodukce ryb v mnoha jiných lokalitách³. Udává se²⁶, že chronická expozice ryb a vodních bezobratlých živočichů exogenním estrogenům může způsobovat vývojové a reprodukční poruchy již při koncentracích řádově ng l^{-1} . V případě nonylfenolu byla při pokusech s potkany jednoznačně prokázána jeho testikulární toxicita, v jejímž důsledku dochází k narušení spermatogeneze; analogické účinky lze očekávat i u člověka²⁵.

Naopak působení fytoestrogenů na lidský organismus bývá hodnoceno pozitivně. Přisuzují se jim preventivní účinky proti rakovině, antioxidační efekt, kardioprotektivní vlastnosti, ochranné účinky před osteoporózou aj.^{5,7,21}. Při konzumaci přiměřeného množství potravin bohatých na fytoestrogeny se není třeba obávat odezvy organismu na estrogení stimulaci, protože fytoestrogeny disponují relativně nízkou estrogení aktivitou, obecně jsou rozpustnější než ostatní skupiny látek s estrogením účinkem a nekumulují se ve tkáních⁷.

6. Kvantitativní vyjádření estrogenity

Porovnáním intenzity estrogeních účinků látek lze stanovit jejich tzv. relativní estrogení potenciál, přičemž jednotkový estrogení potenciál náleží 17β -estradiolu³. V literatuře³ lze nalézt hodnoty estrogeního potenciálu vybraných látek, stanovené různými metodami. Je-li estrogení potenciál 17β -estradiolu roven 1, pak průměrné estrogení potenciály činí: diethylstilbestrol 3,0; 17α -

ethynylestradiol 2,2; estriol 0,18; estron 0,03; genistein $6,6 \cdot 10^{-3}$; kumestrol $4,9 \cdot 10^{-3}$; 4-*terc*-oktylfenol $1,6 \cdot 10^{-4}$; bisfenol A $6,1 \cdot 10^{-4}$; 4-nonylfenol $5,2 \cdot 10^{-4}$ (cit.³). Srovnáním výsledků získaných jednotlivými metodami lze zjistit, že se liší afinita některých látek k estrogením receptorům α a β . V rámci jiné studie¹² byly na základě hodnot EC_{50} vypočítány následující relativní estrogení potenciály: 1,15 pro 17 α -ethynylestradiol, 0,25 pro estron a 0,08 pro estriol.

Koncentrace estrogeních látek ve vodách se často vyjadřuje v tzv. estradiolových ekvivalentech EEQ (cit.^{3,13}). Hodnota EEQ vzorku se vypočítá jako suma koncentrací jednotlivých látek estrogeního charakteru násobených jejich relativním estrogením potenciálem³, nebo jako podíl hodnot EC_{50} 17 β -estradiolu a vzorku¹³.

7. Biodegradace estrogeních sloučenin na čistírnách odpadních vod

Biodegradace estradiolu jsou schopny rozličné druhy mikroorganismů¹⁹, z aktivovaného kalu se podařilo izolovat²⁷ např. gram-negativní bakterie *Novosphingobium sp.* Mechanismus biodegradace (nejen) během aktivačního procesu spočívá v oxidaci na estron^{15,19}, pak následuje hydroxylace aromatického kruhu a jeho štěpení a/nebo hydroxylace cyklu na opačném konci molekuly¹⁹.

Biodegradace ethynylestradiolu je podmíněna nitrifikační kapacitou aktivovaného kalu²⁸. Nitrifikační bakterie totiž ethynylestradiol spolu s dalšími organickými látkami kometabolizují²⁸. Vzhledem ke značnému rozšíření nitrifikačních bakterií v půdě i ve vodách lze předpokládat, že biodegradace ethynylestradiolu pokračuje i po opuštění ČOV²⁸. Data publikovaná v práci¹² ovšem naopak svědčí o biologické stabilitě ethynylestradiolu v povrchových vodách.

Ve splaškových odpadních vodách se koncentrace steroidních estrogenů obvykle pohybuje v rozmezí od 1 ng l⁻¹ do 80 ng l⁻¹ (cit.^{17,18}). Koncentrace vybraných

estrogeních látek v přítocích na čistírny byly monitorovány např. na souboru ČOV v Římě a byly zjištěny následující dlouhodobé průměry: estron 15 ng l⁻¹ až 60 ng l⁻¹, estradiol 10 ng l⁻¹ až 31 ng l⁻¹, estriol 23 ng l⁻¹ až 48 ng l⁻¹, bisfenol A 332 ng l⁻¹ až 339 ng l⁻¹, nonylfenol 4194 ng l⁻¹ až 8767 ng l⁻¹ (cit.⁸). Na vybraných ČOV v Paříži byly zaznamenány¹² hodnoty pohybující se spíše při spodním okraji těchto rozsahů: estron 9,6 ng l⁻¹ až 17,6 ng l⁻¹, estradiol 11,1 ng l⁻¹ až 17,4 ng l⁻¹, estriol 11,4 ng l⁻¹ až 15,2 ng l⁻¹, navíc je uveden ethynylestradiol 4,9 ng l⁻¹ až 7,1 ng l⁻¹, naopak nebyla sledována koncentrace bisfenolu A ani nonylfenolu.

Ze studie¹⁷, která pojednává o odstraňování estrogenity během čistícího procesu na dvaceti městských ČOV ve Švédsku, vyplývají následující poznatky:

- nejvyšší účinnosti dosahují ČOV s aktivací,
- nízkou účinnost vykazují biofiltry,
- při chemickém srážení prakticky nedochází k poklesu estrogenity,
- účinnost lze zvýšit prodloužením doby zdržení v aktivační nádrži,
- příznivý vliv má zařazení anoxického stupně.

Účinnost odstranění estrogeních sloučenin je na různých ČOV rozdílná a závisí především na složení přítékajících odpadních vod, typu čistírny, technologických parametrech, teplotě aj. Např. účinnost odstranění na jedné z ČOV v Římě se uvádí¹⁵ pro estron 61 %, estradiol 87 %, estriol 95 %, ethynylestradiol 85 %. Relativně malý úbytek estronu lze vysvětlit tím, že současně vzniká oxidací estradiolu¹⁵. Podstatně nižší účinnost odstranění estrogení aktivity byla zaznamenána na skupině vybraných ČOV ve Francii¹²: estron 44 % až 59 %, estradiol 43 % až 60 %, estriol 40 % až 67 %, ethynylestradiol 34 % až 45 %. Na stejném souboru ČOV byla na základě testování estrogení aktivity *in vitro* shledána účinnost odstranění estrogenity v rozmezí 62 % až 97 %, což je však o 20 % až o 40 % vyšší účinnost, než jaká byla vypočtena na základě bilance estrogeních látek v přítoku a v odtoku¹². Tento rozdíl je připisován¹² přítomnosti neidentifikovaných rozložitelných

Tabulka I

Přehled koncentrace vybraných estrogenů v odtocích z různých čistíren odpadních vod

Látka	Koncentrace v odtocích ze sledovaných ČOV [ng l ⁻¹] v zemích					
	V. Británie	Francie	Německo	Itálie	Švédsko	Kanada
Estron	1 až 80	4,3 až 7,2	< ms až 70	5 až 30	5,8	< ms až 48
Estradiol	1 až 50	4,5 až 7,2	< ms až 3	3 až 8	1,1	< ms až 64
Ethynyl-estradiol	< ms až 7	2,7 až 4,5	< ms až 15	x	4,5	< ms až 42
Bisfenol A	x	x	16	13 až 36	490	x
Nonylfenol	< ms až 5400	x	199	1120 až 2235	840	800 až 15000
Literatura	17, 31	12	4, 17	8	22	17, 30

ms – mez stanovení; x – hodnoty nejsou k dispozici

xenoestrogenů v přítoku nebo naopak stabilních kontaminantů s antiestrogenním účinkem v odtoku. Rozdíly mezi estrogenní aktivitou odhadovanou a zjištěnou při testech *in vitro* lze také vysvětlit tím, že nelze předpokládat aditivitu estrogenního účinku.

Na celkové estrogenitě odtoků z ČOV má největší podíl zpravidla estradiol, estron a ethynylestradiol¹⁸. Podle některých pramenů (např. cit.¹⁵) bývá koncentrace estronu v odtocích z ČOV minimálně desetkrát vyšší než estradiolu, proto je v nich estron hodnocen jako nejzávažnější estrogenní disruptor pocházející z ČOV¹⁵. Jiné práce (např. cit.¹⁸) uvádějí, že koncentrace estronu a estradiolu v odtocích je obvykle srovnatelná. Ethynylestradiol zodpovídá např. za 14 % až 19 % estrogenní aktivity odtoků z ČOV (týká se Paříže)¹². Ve srovnání s jinými evropskými zeměmi má Španělsko (resp. některé jeho oblasti) v odtocích z ČOV a následně i v řekách extrémně vysoké koncentrace nonylfenolu, což je dáno jednak hojným používáním alkylfenoethoxylátů, jednak nepříznivým poměrem objemu vypouštěných odpadních vod a průtoku vody v řekách (zvláště v letních měsících)²⁹. Obvyklé střední hodnoty koncentrací estrogenů nejběžněji se vyskytujících v odtocích z ČOV uvádí tabulka I. V přepočtu na estradiolové ekvivalenty EEQ se estrogenita odtoků z městských ČOV pohybuje zpravidla v rozmezí od 2,5 ng l⁻¹ do 25 ng l⁻¹ (zjištěno v Německu)¹³.

V důsledku neúplného odstraňování na ČOV látky s estrogenní aktivitou přecházejí do povrchových vod, případně se adsorbují na sedimenty a mohou kontaminovat podzemní vodu^{4,12}. Odtoky z ČOV jsou hlavním zdrojem estrogenních látek v povrchových vodách¹².

8. Estrogenita a biodegradabilita alkylfenolů

Vzhledem k širokému měřítku použití a současně vysoké biologické stabilitě a nezanedbatelné estrogenní aktivitě patří alkylfenoly mezi nejzávažnější environmentální estrogény.

Nonylfenol obecně vyvolává estrogenní odezvu^{31,32}, avšak rozhodující je struktura nonylu. Autoři práce³¹ zjistili, že estrogenní potenciál směsi rozvětvených isomerů je vyšší než lineárního nonylfenolu. Naopak jiní autoři¹¹ našli téměř stejné interakce s estrogenními receptory 4-*n*-nonylfenolu jako směsi rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu. Záleží tedy na aplikované metodě stanovení estrogenity. Nejvýraznější estrogenní aktivitu vykazuje isomer 4-(1,1,4-trimethylhexyl)fenol (cit.¹⁴). Estrogenní potenciál 4-*terc*-oktylfenolu je vyšší než směsi rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu (cit.¹¹) a lineární 4-oktylfenol estrogenní účinky prakticky nemá³³. Estrogenní působení nonylfenolu na ryby bylo prokázáno např. na lososech *Salmo salar*²³, na kaprech *Cyprinus carpio*³², na halančících *Oryzias latipes* (již od koncentrace 0,1 μg l⁻¹)³⁴. Rovněž byla zaznamenána bioakumulace nonylfenolu v těle ryb³².

Účinného odstranění estrogenity nonylfenolu lze docílit pomocí ligninolytických enzymů^{27,35}. Tyto extracelulární enzymy, produkované některými stopkovými trusnými

houbami, rozkládají rovněž estradiol, ethynylestradiol, bisfenol A a další látky²⁷.

Avšak vůči směsným kulturám mikroorganismů přítomným v aktivovaném kalu, v povrchových vodách nebo v půdě jsou alkylfenoly velmi rezistentní. Ve značné míře se adsorbují na sedimenty, půdní částice a organickou hmotu v kalových agregátech, což snižuje jejich biologickou dostupnost pro mikroorganismy a současně mobilitu v prostředí^{30,36}. Biodegradace alkylfenolů je podmíněna dostatečným přístupem kyslíku³⁰. Proto v sedimentech nebo v půdě rozklad probíhá zpravidla pomaleji než ve vodním sloupci. Anaerobně stabilizovaný kal z ČOV obvykle obsahuje vysoké koncentrace nonylfenolu, který se v případě aplikace kalu v zemědělství dostává do půdy³⁶. V anaerobních podmínkách uvnitř kalových agregátů je nonylfenol rezistentní, biodegradaci podléhá pouze na povrchu agregátů nebo v homogenizované směsi půdy a kalu za dostatečného přístupu kyslíku³⁶.

Biodegradabilita nonylfenolu významně závisí na teplotě, což bylo prokázáno např. pomocí laboratorního modelu SCAS (semi-continuous activated sludge – semi-kontinuální model s aktivovaným kalem): zatímco při teplotě v rozmezí 10 °C až 15 °C bylo dosaženo účinnosti odstranění nonylfenolu 30 % až 50 %, při teplotě kolem 28 °C činil stupeň odstranění až 99 % (cit.³⁷). Rovněž byl sledován³⁸ pozitivní vliv vyšší teploty na rozklad nonylfenolu v sedimentech.

Důležitým faktorem z hlediska biologické rozložitelnosti alkylfenolů je struktura alkyly. Respirometrické testy biodegradability se směsnou kulturou mikroorganismů (podle ČSN EN 29408) prokázaly, že zatímco směs rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu nejvíce za daných podmínek žádné známky rozkladu, lineární 4-nonylfenol podlehl alespoň částečné biodegradaci. Stupeň rozkladu 4-*n*-nonylfenolu, vypočítaný na základě biochemické spotřeby kyslíku za 28 dní činil 60 %, což je právě limitní hodnota pro hodnocení látky jako snadno rozložitelné.

Z aktivovaného kalu byly izolovány³⁹ kvasinky *Candida maltosa*, které jsou schopné rozkládat nonylfenol výhradně s lineárním alkylem. Rozvětvené isomery nonylfenolu za určitých podmínek využívají např. bakterie rodu *Pseudomonas*³⁸ nebo *Sphingomonas*⁴⁰.

9. Kontaminace povrchových vod

Ačkoliv se estrogenní látky značně adsorbují na sedimenty a půdní částice, současně zůstávají dostatečně mobilní na to, aby kontaminovaly vodu¹⁹. Silnou afinitu k sedimentům vykazují např. alkylfenoly, podstatně slabší estrogenní steroidy, prakticky zanedbatelnou bisfenol A (cit.⁴¹).

Koncentrace estrogenních látek v podélném profilu vodních toků klesá po proudu s rostoucí vzdáleností od vyústění odtoků z ČOV (cit.⁴²). Tato skutečnost je dána nejen naředěním a promícháním vyčištěné odpadní vody s povrchovou vodou, ale také pokračujícím rozkladem alespoň některých estrogenních látek, případně jejich sorp-

cí na tuhé částice. Koncentrace se rovněž mění s časem, což pravděpodobně souvisí s proměnlivými srážkami, s kolísáním kvality i průtoku vypouštěné vody z ČOV, s teplotními změnami apod. Nejnižší estrogenitu povrchové vody vykazují obvykle v letních měsících⁴². Zajímavé je, že v mokřadním ekosystému byl shledán⁴² větší úbytek estrogenního potenciálu než na stejně dlouhém úseku v řece.

Např. v řekách v okolí Paříže se koncentrace estrogenů pohybuje řádově v jednotkách ng l^{-1} , přičemž na estrogenním potenciálu vody se asi ze 35 % až 50 % podílí ethynylestradiol (cit.¹²). V některých lokalitách, např. v okolí Barcelony, dominuje nonylfenol, jehož koncentrace v řekách dosahuje až stovek $\mu\text{g l}^{-1}$ (cit.²⁹). V řekách v jižním Německu byly nalezeny⁴ koncentrace steroidních estrogenů i bisfenolu A řádově v jednotkách ng l^{-1} , alkylfenolů v jednotkách až desítkách ng l^{-1} . Srovnatelné hodnoty byly stanoveny⁸ ve vzorcích z italské řeky Tiber, pouze koncentrace nonylfenolu se pohybovala poněkud výše (kolem 1400 ng l^{-1}).

Snížit přísun estrogenních látek do recipientů lze pomocí legislativních opatření, která omezí nebo dokonce zakážou aplikaci těchto látek v průmyslových produktech. Např. oxyethylenáty alkylfenolů již jsou zařazeny do seznamu nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo omezeno (Vyhláška MŽP č. 221/2004 Sb.). Sdružení větších výrobců pracích prostředků se v rámci dobrovolné dohody s MŽP zřeklo aplikace tenzidů na bázi alkylfenoethoxylátů v detergentech pro domácnost. V nařízení vlády ČR č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod jsou uvedeny imisní limity pro nonylfenoly ($0,33 \mu\text{g l}^{-1}$) a pro oktylfenol ($0,01 \mu\text{g l}^{-1}$).

Pokud se povrchová voda upravuje na pitnou, je třeba vzít v úvahu riziko kontaminace endokrinními disruptory¹². Mohou být přítomny v nezanedbatelných koncentracích – v jisté vodovodní vodě např. bylo stanoveno $2,1 \text{ ng l}^{-1}$ estradiolu a $0,5 \text{ ng l}^{-1}$ ethynylestradiolu (cit.¹²). Autoři práce⁴¹ zjistili, že ve vodonosné vrstvě dochází k poměrně rychlé biodegradaci estradiolu i 4-*n*-nonylfenolu (s poločasem rozpadu 2 d resp. 7 d) a k pomalé biodegradaci ethynylestradiolu (s poločasem rozpadu 81 d), avšak vždy je nezbytným předpokladem aerobní prostředí.

10. Metody stanovení látek s estrogenní aktivitou

Je třeba rozlišovat mezi analytickým stanovením jednotlivých látek a stanovením jejich celkových estrogenních účinků. Analytické metodiky pro stanovení endokrinních disruptorů ve vodách jsou založeny na separaci látek ze vzorku (většinou se používá extrakce tuhou fází) a následném stanovení vhodnou chromatografickou technikou. Podrobnosti o možnostech analytického stanovení estrogenních sloučenin lze nalézt např. v literatuře⁸. Tyto meto-

dy sice umožňují identifikaci a kvantifikaci látek estrogenního charakteru, avšak pro posouzení estrogenity se jeví vhodnější metody využívající biologické materiály, které stanoví estrogenní aktivitu vzorku.

Estrogenitu lze detegovat různými technikami, založenými na aktivaci určitých genů či enzymů, na kontrole proliferace jistých buněk, nebo využívajícími specifické bioindikátory⁵. V praxi se používají jak testy *in vitro*, tak testy *in vivo*. Jednotlivé metody pracují za různých podmínek, vykazují rozdílnou citlivost a výsledky bývají vzájemně obtížně srovnatelné³.

Jako bioindikátor se používá např. vitellogenin^{5,23}, laktoferrin⁵, specifické bílkoviny *Zrp* (bílkoviny *Zona radiata*)²³, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa nebo ornithin dekarboxylasa⁴³. Je-li vitellogenin detegován v krvi samců, dokazuje expozici estrogeny⁵. Laktoferrin je glykoprotein vázající železo, který má mnoho biologických funkcí; k důkazu estrogenů se využívá jeho zvýšená hladina v děloze pokusných myší⁵. Bílkoviny *Zrp* slouží jako obal vyvíjejících se vajíček a jeví se dokonce mnohem citlivějším indikátorem estrogenní stimulace než vitellogenin²³.

Byly vyvinuty také speciální metody pro stanovení estrogenity, které jsou založeny na zkoumání vazby mezi látkou a receptorem (viz např. studie¹¹).

LITERATURA

1. Crisp T. M., Clegg E. D., Cooper R. L., Anderson D. G., Baetcke K. P., Hoffmann J. L., Morrow M. S., Rodier D. J., Schaefer J. E., Touart L. W., Zeeman M. G., Patel Y. M., Wood W. P.: *Risk Assessment Forum US EPA*, Washington D.C., 1997.
2. Bonefeld-Jørgensen E. C.: *Sci. Total Environ.* 331, 215 (2004).
3. Gutendorf B., Westendorf J.: *Toxicology* 166, 79 (2001).
4. Kuch H. M., Ballschmiter K.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 3201 (2001).
5. Holoubek I., Čadová L.: *Klinická onkologie (zvláštní číslo)*, 25 (2000).
6. http://www.pharmanews.cz/2004_03/cimicifuga.htm, staženo 16.7.2004.
7. Kaprál A., Fait T.: *Praktická gynekologie* 4/03, 10 (2003).
8. Laganà A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A.: *Anal. Chim. Acta* 501, 79 (2004).
9. Wober J., Weißwange I., Vollmer G.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1782, 1 (2003).
10. <http://menofem.softis.cz>, staženo 16.7.2004.
11. Hu J.-Y., Aizawa T.: *Wat. Res.* 37, 1213 (2003).
12. Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tami-sier-Karolak S., Levi Y.: *Sci. Total Environ.* 324, 55 (2004).
13. Körner W., Bolz U., Süßmuth, Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H.: *Chemosphere* 40, 1131 (2000).
14. Kim Y.-S., Katase T., Sekine S., Inoue T., Makino M.,

- Uchiyama T., Fujimoto Y., Yamashita N.: *Chemosphere* 54, 1127 (2004).
15. D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R.: *Sci. Total Environ.* 302, 199 (2003).
 16. Hill R. Jr., Janz D. M.: *Toxicology* 63, 417 (2003).
 17. Svenson A., Allard A.-S., Ek M.: *Wat. Res.* 37, 4433 (2003).
 18. Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1551 (1998).
 19. Hanselman T. A., Graetz D. A., Wilkie A. C.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471 (2003).
 20. Irwin L. K., Gray S., Oberdörster E.: *Aquat. Toxicol.* 55, 49 (2001).
 21. <http://menostop.sweb.cz>, staženo 16.7.2004.
 22. Parkkonen J., Larsson D. G. J., Adolfsson-Erici M., Pettersson M., Berg A. H., Olsson P.-E., Förlin L.: *Mar. Environ. Res.* 50, 191 (2000).
 23. Arukwe A., Celius T., Walther B. T., Goksøyr A.: *Mar. Environ. Res.* 46, 133 (1998).
 24. Sultan Ch., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris F., Jeandel C., Lumbroso S., Nicolas J.-C.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 99 (2001).
 25. Jager C. de, Bornman M. S., Horst G. van der: *Andrologia* 31, 99 (1999).
 26. Segner H., Caroll K., Fenske M., Janssen C. R., Mack G., Pascoe D., Schafers C., Vandenberg G. F., Watts M., Wenzel A.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302 (2003).
 27. Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T.: *Wat. Res.* 37, 1972 (2003).
 28. Vader J. S., Ginkel C. G. van, Sperling F. M. G. M., Jong J. de, Boer W. de, Graaf J. S. de, Most M. van der, Stokman P. G. W.: *Chemosphere* 41, 1239 (2000).
 29. Solé M., López de Alda M. J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen K., Barceló D.: *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076 (2000).
 30. Ying G.-G., Williams B., Kookana R.: *Environ. Int.* 28, 215 (2002).
 31. Balaguer P., François F., Comunale F., Fenet H., Boussioux A.-M., Pons M., Nicolas J.-C., Casellas C.: *Sci. Total Environ.* 233, 47 (1999).
 32. Villeneuve D. L., Villalobos S. A., Keith T. L., Snyder E. M., Fitzgerald S. D., Giesy J. P.: *Chemosphere* 47, 15 (2002).
 33. Kim K. B., Seo K. W., Kim Y. J., Park M., Park Ch. W., Kim P. Y., Kim J. I., Lee S. H.: *Chemosphere* 50, 1167 (2003).
 34. Kashiwada S., Ishikawa H., Miyamoto N., Ohnishi Y., Magara Y.: *Wat. Res.* 36, 2161 (2002).
 35. Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.: *Chemosphere* 42, 271 (2001).
 36. Hesselsoe M., Jensen D., Skals K., Olesen T., Moltrup P., Roslev P., Mortensen G. K., Henriksen K.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 3695 (2001).
 37. Tanghe T., Devriese G., Verstraete W.: *Wat. Res.* 32, 2889 (1998).
 38. Yuan S. Y., Yu C. H., Chang B. V.: *Environ. Pollut.* 127, 425 (2004).
 39. Corti A., Frassinetti S., Vallini G., D'Antone S., Fichi C., Solaro R.: *Environ. Pollut.* 90, 83 (1995).
 40. Corvini P. F. X., Vinken R., Hommes G., Schmidt B., Dohmann M.: *Biodegradation* 15, 9 (2004).
 41. Ying G.-G., Kookana R. S., Dillon P.: *Wat. Res.* 37, 3785 (2003).
 42. Hemming J. M., Allen H. J., Thuesen K. A., Turner P. K., Waller W. T., Lazorchak J. M., Lattier D., Chow M., Denslow N., Venables B.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 303 (2004).
 43. An B.-S., Choi K.-Ch., Kang S. K., Hwang W. S., Jeung E.-B.: *Reprod. Toxicol.* 17, 311 (2003).

H. Kujalová, V. Sýkora, and P. Pitter (*Department of water technology and environmental engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Estrogenic Substances in Water**

A broad spectrum of substances showing estrogenic activities in aquatic and terrestrial organisms occur in wastewaters. An overwhelming majority of the compounds are insofar biologically stable that their removal by water treatment is incomplete and thus they contaminate the environment. Chronic exposures to estrogens cause reproduction disorders and evolution defects in a number of animals. With humans, it is assumed that inadequate actions of estrogens in organisms can lead to lower fertility and a higher occurrence of evolution abnormalities. Due to the adverse effects of estrogens, the problems of their occurrence, transport and biotransformation are very topical. The review gives substances of estrogenic nature including their chemical structure, origin, occurrence and interactions with organisms. It brings the usual concentration ranges of most important estrogens in waste and surface waters and documents their poor removability in wastewater purifying plants. Their estrogenic potentials are compared and their biodegradability is evaluated.