

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Chování reziduí syntetických estrogenů v půdě v interakci
s půdní mikrobiotou**

Diplomová práce

**Bc. Sára Cemperová
Technologie odpadů**

prof. Ing. Jiřina Száková, CSc.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Chování reziduí syntetických estrogenů v půdě v interakci s půdní mikrobiotou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Jiřině Szákové, CSc., za její trpělivost a ochotu. Dále mé konzultantce Alexandře Christině Dumitriu, která se mnou pracovala na všech laboratorních pracích a byla mým dohledem i oporou.

Chování reziduí syntetických estrogenů v půdě v interakci s půdní mikrobiotou

Souhrn

Estron je ženský hormon, který se ve velkém měřítku používá v zemědělství, a to především v intenzivním zemědělství, což v posledních desetiletích vedlo ke znečištění vody a půdy právě tímto hormonem. Výzkum jeho chování v životním prostředí se obecně zaměřuje na znečištění vody a méně na půdu. Ještě méně se výzkumy zaměřují na to, jak různé typy půdy ovlivňují jeho přeměnu. Tato práce se zabývá třemi půdními typy z České republiky: kambizemí, fluvizemí a černozemí, a tím, jak jejich vlastnosti ovlivňují degradaci estronu prostřednictvím enzymatické aktivity prováděné půdními mikroorganismy. Jako výchozí koncentrace estronu v půdě bylo v při pokusu použito 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (50 μg estronu/1 kg půdy). Pro každou půdu bylo připraveno 18 nádob s naváženými 100 g půdy ve třech kontrolních vzorcích a třech opakováních (celkem použito a naplněno 117 nádob). Půda byla udržována na 60 % vodní kapacity (WHC), z níž bylo na začátku pokusu do každé nádoby rozděleno 10 ml jako roztok estronu (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), zbytek byl přidán jako destilovaná voda. Při pokusu bylo odebráno 7 vzorků, a to při: 4 h, 12 h, 24 h, 3 dnech, 7 dnech a 28 dnech. Tyto vzorky byly analyzovány pomocí LC/MC analýzy. Enzymatická aktivita byla měřena pro lakázu, Mn-oxidázu a Mn-peroxidázu a porovnávána s koncentracemi estronu ze spektroskopické analýzy a s vlastnostmi půdy. Výsledky ukázaly, že mezi půdami byly rozdíly jak ve výsledné koncentraci estronu, tak v typu převládajícího enzymu, a tyto rozdíly korelovaly s půdními vlastnostmi, především s živinami.

Klíčová slova: estrogeny, půda, půdní mikrobiom, degradace

The fate of synthetic estrogen hormones in soil in the interaction with soil microbiota

Summary

Estrone is a female hormone used on a large scale in farming, which has resulted into water and soil pollution in the last decades. Research into its behaviour in the environment has been generally focused on water pollution, and less on soil; even less on how different soil types influence its transformation. This work deals with three soils from the Czech Republic – cambisol, fluvisol, and chernozem – and how their characteristics influence estrone degradation through enzymatic activity carried out by soil microorganisms. 50 µg/kg soil of estrone was used as initial concentration in a pot greenhouse experiment. There were 18 pots of 100 g soil for each soil with three controls and three replicates at every sampling time (total of 117 pots). Soils were kept at 60 % water holding capacity (WHC), from which 10ml were distributed in each pot as estrone solution (0.5 µg/ml) at the beginning of the experiment, the rest being added as distilled water. There were 7 samples taken, at: 4 h, 12 h, 24 h, 3 days, 7 days and 28 days, and analysed in LC/MC column. Enzymatic activity was measured for laccase, Mn Oxidase and Mn Peroxidase and compared with the estrone concentrations from the spectroscopic analysis and soil properties. Results showed that there were differences between soils both in estrone concentration as well as the type of predominant enzyme, and these differences were correlated with the soil characteristics, mainly the nutrients.

Keywords: estrogens, soil, soil microbiome, degradation

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Přehled literatury	10
3.1	Estrogeny jako steroidní hormony	10
3.1.1	Chemická struktura estrogenů	10
3.1.2	Biologický vliv estrogenů	11
3.1.3	Ekotoxicita estrogenů a dalších hormonů	12
3.1.3.1	Ekotoxicita estrogenů	12
3.1.3.2	Ekotoxicita androgenů	14
3.1.3.3	Ekotoxicita progestagenů	16
3.2	Estrogeny a další hormony v životním prostředí	17
3.2.1	Zdroje estrogenů a dalších hormonů v životním prostředí	17
3.2.1.1	Kontaminace zemědělskou činností	20
3.2.1.2	Kontaminace přes čistírny odpadních vod	21
3.2.2	Stabilita hormonů	23
3.2.2.1	Stabilita hormonů ve statkovém hnoji a močůvce	23
3.2.2.2	Stabilita hormonů v půdách a půdách hnojených statkovými hnojivy	23
3.2.3	Pohyb hormonů v půdním sloupci	24
3.3	Metody využívané pro separaci a kvantifikaci estrogenních látek	25
3.3.1	HPLC	26
3.3.2	LC/MS	26
4	Metodika	27
4.1	Odběr vzorků	27
4.2	Příprava půdních vzorků	27
4.3	Přidání estronu (E1) do půdních vzorků	27
4.4	Stanovení vodní kapacity	28
4.5	Stanovení pH	28
4.6	Stanovení elektrické konduktivity	28
4.7	Stanovení textury půdních vzorků	28
4.8	Stanovení živin	29
4.9	Stanovení enzymatické aktivity	29
4.10	LC/MS analýza	29
5	Výsledky	30
5.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy	30
5.2	Stanovení živin	31

5.3	Koncentrace estronu	33
5.4	Enzymatická aktivita	37
5.5	Korelace enzymatické aktivity a přítomnosti estronu	40
5.6	Porovnání výsledných hodnot všech tří půdních typů.....	41
6	Diskuze	44
7	Závěr.....	46
8	Literatura.....	47
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	52
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Díky rychlému pokroku analytických metod a možnosti detekování stále nižších hodnot hormonálních látek v půdním a vodním prostředí se těmto látkám v životním prostředí začala věnovat stále větší pozornost. Jako zdroje steroidních hormonů v těchto systémech mohou působit zemědělské a jiné antropogenní činnosti (např. vypouštění komunálních odpadních vod a průmyslová výroba léčiv).

Posun zemědělské činnosti k vysoce intenzivnímu výrobnímu procesu, který se snaží o co nejvyšší zisk za využití co nejmenší plochy, vedl také k produkci relativně velkého množství odpadů odpovídající této malé ploše. To představuje řadu potencionálních rizik pro ekosystém. Bylo zjištěno, že tato rizika představují i únik hormonálních látek, jejichž velké množství projde přes organismy zvířat chovaných v intenzivním zemědělství, přímo do životního prostředí (ŽP). Hormony jsou v těchto systémech používány a zvířatům aplikovány pro podporu růstu a kontrolu reprodukce. Většina vyloučených hormonů zvířaty chovaných v intenzivním zemědělství však vzniká přirozeně. Původ těchto hormonů je především v tělech březích dojnic.

Dalším zdrojem hormonálních látek v ŽP je lidský organismus. Rozdíl představuje zpracování moče a výkalů, které tyto hormony či jejich metabolity obsahují. Na rozdíl od intenzivního zemědělství nejsou do ŽP vpouštěny přímo, a tedy v nedotčeném stavu, ale téměř vždy procházejí přes čistírny odpadních vod (ČOV). Přes ty jsou do ŽP vypouštěna rezidua léčiv (i hormonálních) v koncentracích v rozmezí ng/l – mg/l. Dále se koncentrace těchto látek snižují v důsledku ředění odpadní vody a působení degradačních procesů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce je popsat v modelovém inkubačním pokusu sorpci či degradaci těchto látek v půdě v závislosti na koncentraci hormonálních látek, půdních vlastnostech a aktivitě půdních mikroorganismů.

Hypotéza: Půdní mikroorganismy degradují rezidua hormonálních látek v půdě v závislosti na jejich koncentraci a půdních vlastnostech.

3 Přehled literatury

3.1 Estrogeny jako steroidní hormony

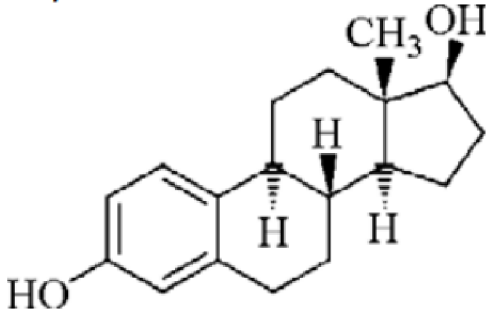
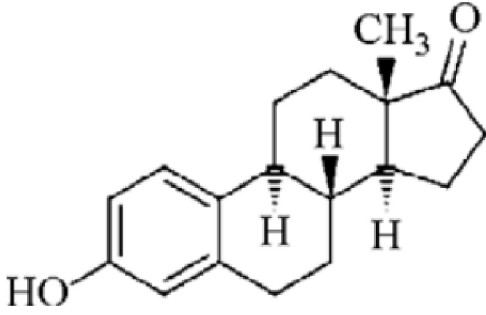
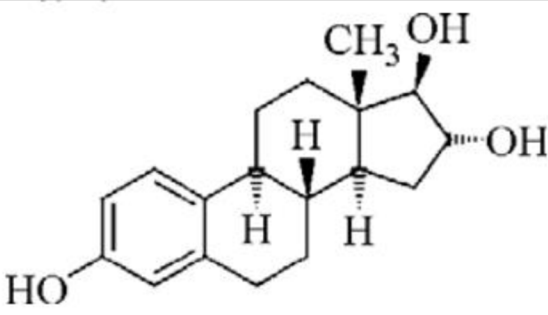
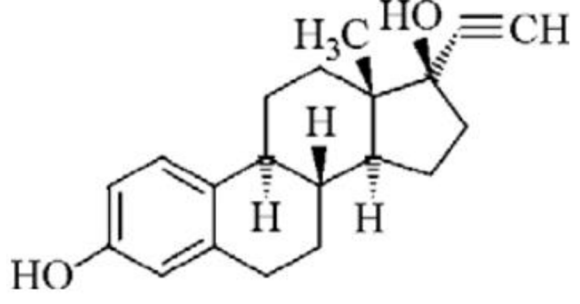
Ženské pohlavní hormony, tedy estrogeny, progestiny a androgeny patří mezi steroidní hormony, což jsou látky vznikající biotransformací cholesterolu. Steroidy působí jako regulátory mnoha vývojových a fyziologických procesů a jsou produkovány endokrinními žlázami. Biosyntetickými prekurzory všech steroidů jsou cholesterol a ostatní steroly. Mateřskou sloučeninou cholesterolu je cholestan, který obsahuje steroidní jádro s metylovou skupinou na uhlících C10 a C13 a osmičlenný postranní řetězec na uhlíku C17 (Tapiero & Tew 2002). V případě estronu jsou funkčními skupinami hydroxyl (-OH) a keton (=O) (Takigami et al. 2011) viz tabulka č. 1.

Žlázy, které produkují steroidní hormony u savců, jsou kůra nadledvin (produkuje kortikosteroidy), vaječníky (produkují estrogeny a progestiny) a varlata (produkují androgeny). Čtvrtým zdrojem steroidních hormonů je placenta, která se vyskytuje pouze během těhotenství. Pohlavní steroidy, jak už jejich název napovídá, řídí všechny aspekty reprodukce tím, že ovlivňují diferenciaci a růst reprodukčního systému, navozují a udržují pohlavní znaky a regulují reprodukční chování (Tapiero & Tew 2002).

3.1.1 Chemická struktura estrogenů

Ženské pohlavní hormony estrogeny jsou někdy označovány jako C18 steroidy, jelikož ve svém skeletu obsahují 18 uhlíků, které jsou uskupeny do 4 kruhů, viz tabulka č. 1. Jako u ostatních steroidních hormonů je u estrogenů základní strukturou steran. Na třetím uhlíku A cyklu mají estrogeny lokalizovanou typickou hydroxylovou skupinu, která je esenciální pro biologickou aktivitu. Tato základní struktura může být u estrogenů modifikována dalšími funkčními skupinami. Těmi jsou hydroxylové, karbonylové skupiny a ethinylová funkční skupina. Ta je součástí synteticky vytvořeného 17 β -ethinylestradiolu (EE2). Řecké písmeno β označuje, že funkční skupiny směřují nad rovinu molekuly, naopak skupiny směřující pod rovinu molekuly se označují písmenem α (Lee et al. 2007).

Mezi nejvýznamnější estrogeny patří 17 β -estradiol, estron a estriol, viz tabulka č. 1. 17 β -estradiol je přirozeně se vyskytující estrogen, který obsahuje 17 β -hydroxylovou a 3-hydroxylovou skupinu. Estrony mají namísto hydroxylové skupiny na C17 (jako je tomu u 17 β -estradiolu) skupinu ketonovou. U estriolů je navíc přidána 16 α -hydroxylová skupina (Tapiero & Tew 2002).

Název	Chemický vzorec
17 β -estradiol	
estron	
estriol	
17 α -ethynyl estradiol	

Tab. č. 1: Nejvýznamnější estrogény a jejich struktura, zpracováno podle: Lee et al. (2007)

3.1.2 Biologický vliv estrogenů

Estrogeny jsou skupinou steroidních hormonů produkovaných primárně vaječníky, ale dále také nadledvinami a tukovou tkání. Estrogeny, po jejich vyloučení do krve, ovlivňují fyziologické funkce, které jsou důležité pro samičí úspěšnou reprodukci. U samic koordinují vývoj sekundárních pohlavních znaků, dále růst endometria a regulují menstruační cyklus. Přestože byly estrogeny dlouhou dobu brány jako primárně samičí pohlavní hormony, ukázalo se, že důležitou roli hrají také v samčím reprodukčním chování (Adeoya-Osiguwa- et al. 2003).

3.1.3 Ekotoxicita estrogenů a dalších hormonů

Hormonální narušení endokrinního systému

Změny v reprodukční fyziologii a endokrinologii byly u vodních organismů vystavených působení EDC (endokrinní disruptory) rozsáhle zdokumentovány. Seznam chemických látek, o nichž je známo, že ovlivňují endokrinní a reprodukční systém bezobratlých živočichů i obratlovců je rozsáhlý a zahrnuje těžké kovy, pesticidy, perzistentní halogenované znečišťující látky a syntetické a přírodní steroidy, které se nacházejí i v odpadních vodách uvolňovaných z čistíren odpadních vod. Komplexní chemické analýzy těchto odpadních vod identifikovaly několik estrogeně aktivních sloučenin, včetně přirozeně se vyskytujících (estron, 17 β -estradiol, estriol) ale také syntetických steroidních estrogenů (17 α -ethynylestradiol), které jsou do odpadních systémů uvolňovány ženami užívajícími hormonální antikoncepci (Björlenius & Wahlberg 2006).

Již delší dobu je známo, že živočišné odpady z intenzivního zemědělství mohou být významným zdrojem přirozeně se vyskytujících i syntetických pohlavních steroidů. I přes to je o jejich vlivu na životní prostředí stále málo známo. Bylo ale potvrzeno, že vystavení organismů živočišným odpadům má potenciál vyvolat významné reprodukční účinky. Následující kapitoly jsou zaměřeny na účinky, které byly vyvolány u vodních organismů, především u ryb. Tyto organismy byly vystaveny hormonálními látkami, o nichž je známo, že jsou přítomny v živočišných odpadech z intenzivního zemědělství (Lee et al. 2007).

3.1.3.1 Ekotoxicita estrogenů

Termín environmentální estrogenu je používán pro označení environmentálních činitelů, jako jsou perzistentní organochlorové látky, změkčovadla, léčiva a přírodní a syntetické hormony, které pozměňují endokrinní systém. (McLachlan 2001). Vystavení životního prostředí vlivu estrogenů je spojováno se sníženým počtem spermií u mužů, zvýšeným výskytem rakoviny varlat, rakoviny prostaty a prsu a reprodukčními poruchami (Lee et al. 2007).

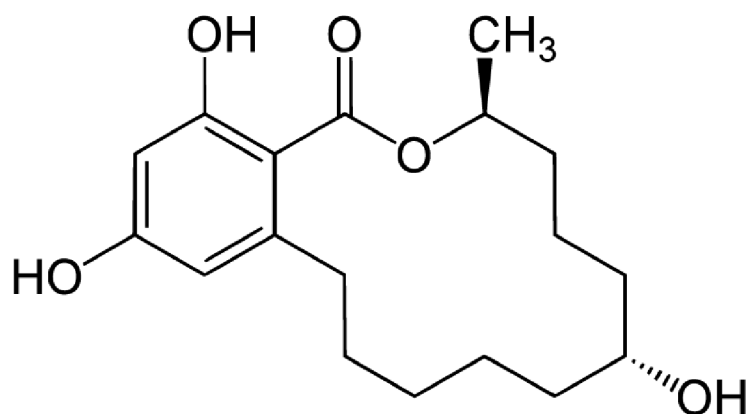
V živočišných odpadech jsou ve znatelném množství obsaženy přirozené steroidní estrogení hormony, zejména 17 β -estradiol a estron. Kontaminace vodních toků 17 β -estradiolem je znepokojující, protože již koncentrace 10-100 ng/l může nepříznivě ovlivnit reprodukční biologii ryb a jiných živočichů (Oberdorster & Cheek 2001). Estrogeny patří mezi nejsilnější EDCs, které byly kdy nalezeny v životním prostředí a které mají prokazatelně vliv na reprodukci ryb. Příklady těchto vlivů jsou popsány v následujících odstavcích.

Jedním ze způsobů, jak zjistit, zda byl organismus vystaven přítomnosti estrogenů je sledování tvorby vitellogeninu. Ten působí jako citlivý indikátor u rybích samců. Známe několik proteinů, které jsou regulovány estrogenem, včetně právě zmíněného žloutkového proteinu vitellogeninu. Ten je normálně exprimován v játrech pohlavně zralých samic pod vlivem tělu vlastního estrogenu. Vitellogenin je pak krví přenášen do rostoucích vaječných folikulů, kde se vstřebává a tvoří žloutek. Samci a mladé ryby mají obvykle nízkou hladinu

nebo nezjistitelné hladiny estrogenu i vitellogeninu v krvi, pokud jsou však vystaveni působení estrogenů, začnou játra produkovat vitellogenin, který pak lze měřit v krevní plazmě. Vitellogenin se proto často používá jako biomarker expozice estrogenům. Například, již koncentrace 30 ng/l estronu nebo 17 β -estradiolu ve vodě mohou po 21 dnech vyvolat syntézu vitellogeninu a abnormální růst pohlavních orgánů u samců *Pimephales promelas* a jiných rybích druhů (Panter et al. 2000). V jiné studii bylo prokázáno, že samci úhoře (*Zoarces viviparous*) reagovali zvýšením tvorby vitellogeninu při injekčním podání 17 β -estradiolu (Tyler et al. 1998). Indukce vitellogeninu u rybích samců byla spojena se snížením růstu a velikosti varlat. Po vystavení vodních organismů estrogenům byl tedy zaznamenán abnormální vývoj varlat, ale i vaječnicků, což znamená, že vystavení estrogenům může vést k nevratným strukturálním změnám, vedoucím ke změně reprodukčního výkonu a trvale (nevratné) maskulinizaci nebo feminizaci. Pokud však dojde k expozici až po diferenciaci gonád, jsou tyto změny obvykle reverzibilní. Například, účinky vedoucí k částečné feminizaci byly zaznamenány u rybích larev vystavených koncentracím 17 β -estradiolu ve vodě v rozmezí od 25 do 1000 ng/l zatímco úplné změny pohlaví byly zaznamenány u rybích larev krmených potravou obsahující 5 až 60 mg/kg 17 β -estradiolu (Gorshkov et al. 1999).

Expozice estrogenům může také vést k nižší úspěšnosti rozmnožování, změněnému průběhu tření a také ke změnám ve vývoji mláďat. Dospělí samci karase zlatého (*Carassius auratus*) vystavení 17 β -estradiolu prostřednictvím požití (1-100 mg/g potravy) a vody (1-10 μ g/l) po dobu 28-74 dnů reagovali závažnými reprodukčními změnami, např. změnami sexuálního chování a tření (Bjerselius et al. 2001).

Pokud jde o syntetické estrogény, matečná sloučenina zearanolu (nebo také α -zearalanolu) je zearalenon. Ten je produkován houbami rodu *Fusarium*, a je známo, že má silné estrogenní účinky vedoucí k poruchám plodnosti, ke změně spermatogeneze, ovulace u skotu a prasat (Čonková et al. 2003). U potkanů byl zearanol (chemickou strukturu viz na obrázku č. 1.) také spojován se závažným poklesem funkce vaječnicků (Yuri et al. 2004). Estrogenní účinnost zearalenonu a jeho derivátů byla porovnávána s estrogenní účinností jiných estrogenů prostřednictvím in vitro studií. Tyto studie zjistily, že estrogenní účinnost těchto sloučenin mohou být seřazeny v tomto pořadí: α -zearalenol > α -zearalanol > zearalenon > β -zearalenol. Z in vitro studií je také známo, že zearanol je schopen vázat se na estrogenové receptory pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a lososa obecného (*Salmo salar*) (Arukwe et al. 1999).



Obr. č. 1.: chemická struktura zeranolu, syntetického estrogenu (Lee et al. 2007).

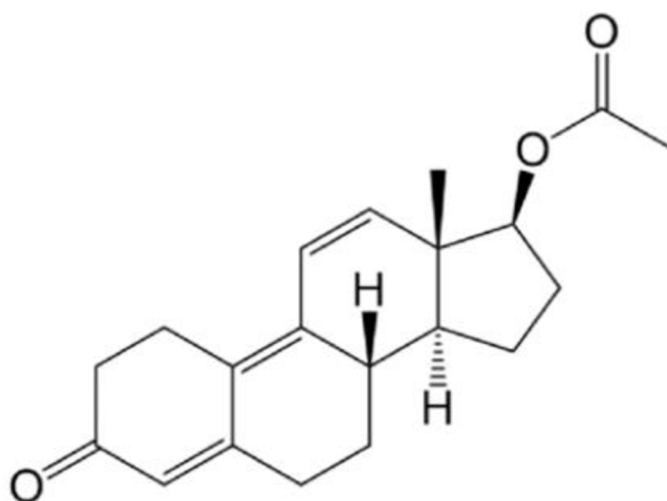
Kromě přirozených a syntetických estrogenů byly v moči některých hospodářských zvířat nalezeny také metabolity fytoestrogenů (např. formononetin, daidzein a equol). Je dobře známo, že fytoestrogeny mohou u ryb působit jako EDCs, i když s mnohem slabšími účinky ve srovnání se syntetickými a přírodními estrogeny (Burnison et al. 2003).

Co se týče biologické dostupnosti syntetických versus přírodních steroidů, odhaduje se, že přibližně 98 % endogenního 17β -estradiolu je vázáno na proteiny, zejména na globulin vázající pohlavní hormony SBGH (globulin vázající hormony v séru), což má za následek, že pouze malé procento je dostupné buňkám. Zeranol a další hormony podporující růst však vykazují omezenou nebo žádnou vazbu na nosné proteiny (Nagel et al. 1998) To má velký toxikologický význam, jelikož jejich potenciální účinnost je mnohem větší než účinnost naznačená jejich skutečnou koncentrací (potenciální účinnost může být až 50krát vyšší) (Lee et al. 2007).

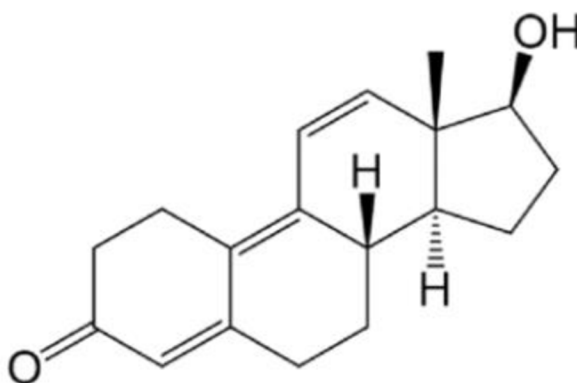
3.1.3.2 Ekotoxicita androgenů

Trenbolon ve formě trenbolon acetátu (struktura na obrázku č. 2), který se podává skotu prostřednictvím implantátů, uvolňuje acetátovou formu tohoto steroidu do krevního oběhu, kde je hydrolyzován za vzniku aktivní formy, 17β -trenbolonu. 17β -trenbolon se později epimerizuje na 17α -trenbolon, jejich chemická struktura a rozdíl mezi nimi jsou zobrazené na obrázcích č. 3 a č. 4. Oba izomery jsou zvířaty vylučovány ale α forma a převažuje nad formou β v poměru přibližně 10:1 (Schiffer et al. 2001).

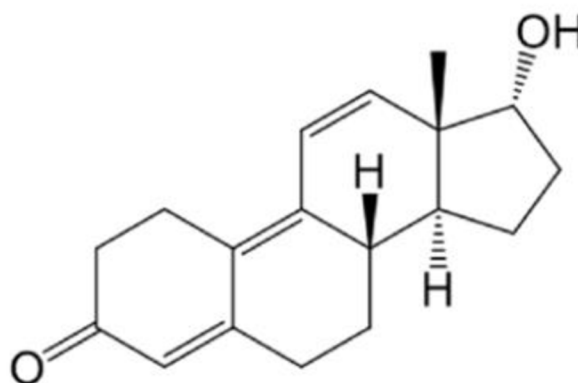
Je dobře známo, že 17β -trenbolon působí jako silný agonista savčích androgenních receptorů 17β -trenbolon se také u některých rybích organismů váže na androgenní receptor s vyšší afinitou než testosteron. Na rozdíl od většiny androgenů, které jsou aromatizovány (tj. přeměňují se na estrogény pomocí enzymů), 17β -trenbolon není aromatizovatelný, a má tedy čistě androgenní vlastnosti. 17β -trenbolon je také schopen vázat se na estrogenní receptory u ryb a u samců vyvolat produkci vitellogeninu (Ankley et al. 2003).



Obr. č. 2.: Chemická struktura trenbolon acetátu, v krevním oběhu hydrolyzovaný na aktivní formu 17 β -trenbolonu (Lee et al. 2007).



Obr. č. 3.: Chemická struktura 17 β -trenbolonu (Lee et al. 2007).



Obr. č. 4.: Chemická struktura 17 α -trenbolonu (Lee et al. 2007).

U dospělých samic jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) vystavených působení 17 β -trenbolonu (v koncentracích vyšších než 0,027 mg/l) po dobu 21 dnů se vyvinuly samčí

sekundární pohlavní znaky (hřbetní nupciální tuberkule) a byla u nich snížena plodnost a koncentrace pohlavních steroidů. Tyto účinky na reprodukci byly později zahrnuty do prediktivního populačního modelu. Tento model předpověděl, že nepřetržité vystavení populaci jelečka velkohlavého působení 17β -trenbolonu o koncentraci $\geq 0,027$ mg/l by vyvolalo velké ztráty populace během dvou let, což by následně vedlo k jejímu vymření (Ankley et al. 2003).

Expozice dánia pruhovaného (*Danio rerio*) a medaky japonské (*Oryzias latipes*) 17β -trenbolonu v koncentraci 50 ng/l od 1 do 60 dnů po vylíhnutí vedlo k významnému poklesu koncentrací vitellogeninu. Maskulinizace byla pozorována pouze u dánia pruhovaného, avšak oba druhy reagovaly na expozici zvýšením procenta zralého spermatozoa (Örn et al. 2006).

Co se týče potenciálních androgenních účinků odpadních vod z farem intenzivního zemědělství, Orlando et al. (2004) zjistili, že volně žijící jedinci druhu jelečka velkohlavého odebrání pod výkrmnou dobytka vykazovali pozměněnou reprodukční biologii, včetně snížené syntézy testosteronu a snížené velikosti varlat u samců, a snížený poměr 17β -estradiolu a testosteronu u samic. Nebylo objasněno, jaké chemické látky tyto změny způsobily, ale autoři studie předpokládali, že androgenní látky za ně byly alespoň částečně zodpovědné (Lee et al. 2007).

3.1.3.3 Ekotoxicita progestagenů

Progesteron, jediný přirozený progestagen, se v těle vyskytuje přirozeně a je produkován z cholesterolu. Progesteron se metabolizuje na testosteron, a proto se často používá v kombinaci s estradiolem v růstových implantátech pro skot. MGA (melengestrol acetát) je perorálně účinný progestin (syntetický progestagen) používaný buď k synchronizaci nebo k indukci říje u skotu. Na trh je také uváděn jako krmná přísada pro jalovice ve výkrmnách, která má zlepšovat účinnost krmiva a rychlost růstu zvířete. Jeho progestační aktivita je asi 125krát vyšší než u progesteronu, což bylo měřeno inhibicí říjového cyklu u skotu, a předpokládá se, že jeho anabolický účinek je způsoben stimulací endogenního 17β -estradiolu. Medroxyprogesteron je další progestin používaný ve veterinární medicíně jako regulátor říje (Schiffer et al. 2001).

3.2 Estrogeny a další hormony v životním prostředí

3.2.1 Zdroje estrogenů a dalších hormonů v životním prostředí

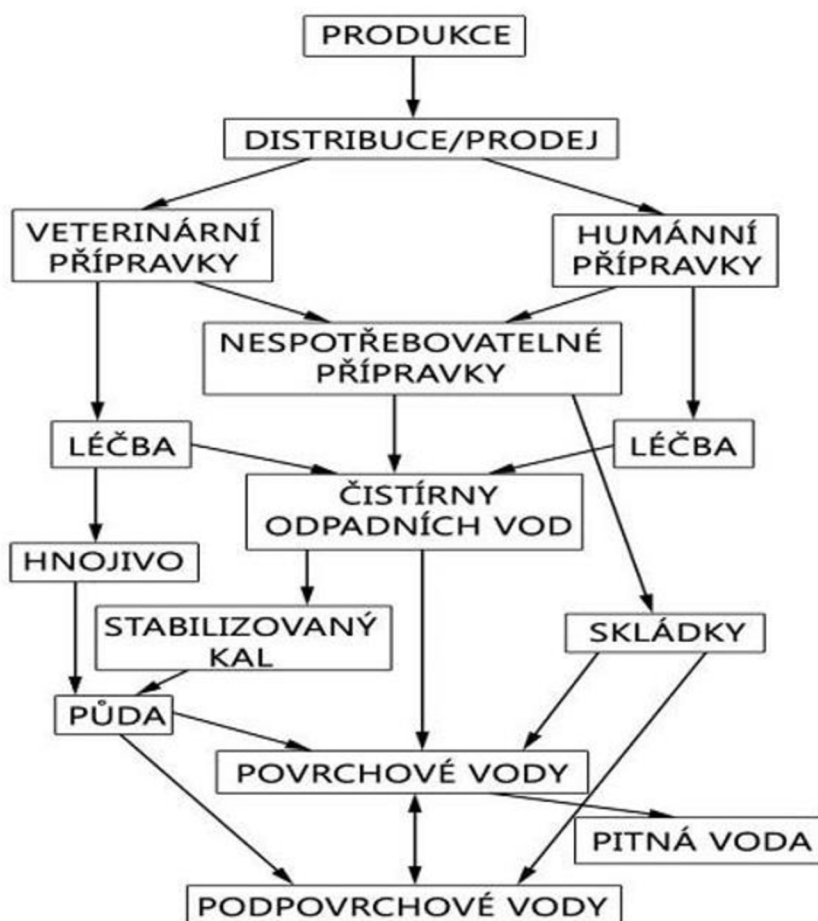
V posledních desetiletích dostupnost údajů o výskytu hormonů v podzemních a povrchových vodách rychle rostla. Průzkumy hlásily již v roce 1977 detekci estradiolu v pramenech a studnách používaných pro pitnou vodu, ale všechny hladiny byly nižší než 1 ng/l (Rurainski et al. 1977).

Při prvním celostátním průzkumu toků na přítomnost léčiv byly v USA detekovány reprodukční hormony nebo jejich metabolity ve 3-21 % zkoumaných tocích. Bylo testováno celkem 70 vzorků. (Kolpin et al. 2002). U vod, ve kterých byla detekována přítomnost hormonů, bylo zjištěno, že hodnoty jejich nejvyšší koncentrace v ng/l jsou následující (hodnoty mediánu jsou uvedeny v závorce): 93 (9) pro 17 β -estradiol, 117 (27) pro estron, 51 (19) pro estriol, 74 (30) pro 17 α -estradiol, 214 (116) pro testosteron a 199 (111) pro progesteron. Přehledně viz tabulka č. 2.

Vybrané hormony	Nejvyšší koncentrace (ng/l)	Hodnota mediánu (ng/l)
17β-estradiol	93	9
estron	117	27
estriol	51	19
17α-estradiol	74	30
testosteron	214	116
progesteron	199	111

Tab č. 2.: Hodnoty nejvyšších koncentrací a mediánu vybraných hormonů detekovaných ve vodních tocích v USA v roce 2002. Zpracováno podle: Kolpin et al. (2002).

Jako hlavní zdroj estrogenů v životním prostředí byla označena produkce velkého množství živočišných odpadů a komunálních biosložek. Ty mohou obsahovat hormony, a byly tak navrženy jako hlavní zdroj estrogenů v životním prostředí (Shore & Shemesh 2003). Zdrojem bývají rezidua léčiv, které odcházejí z těl zvířat jako součást exkrementů a poté jsou aplikována na pole s chlévským hnojem, kejdou a močůvkou (Castensson & Gunnarsson 2006). Tento tok reziduí léčiv v životním prostředí je zobrazen ve schématu viz obrázek č. 5.



Obr. č. 5.: Tok reziduí léčivých látek z produkce do životního prostředí. Zpracováno podle: Castensson & Gunnarsson 2006.

V tabulce č. 3 je uvedeno několik zajímavých hormonů, včetně několika dalších příbuzných sloučenin, o nichž je známo, že jsou chemickými látkami narušujícími endokrinní systém (EDC), společně s vybranými referenčními charakteristikami

Analyt	Třída/komentář	Molekulová hmotnost	Log K_{ow}
17 α -ethynil estradiol	Syntetický steroidní estrogen/k lidskému použití	296,41	4,12
17 β -estradiol	Reprodukční hormon	272,39	3,94
Bisfenol A	Nesteroidní estrogen z plastů	228,29	3,64
Diethylstilbestrol	Syntetický nesteroidní estrogen/lidské použití zakázáno	268,36	5,64
Estriol	Metabolit reprodukčního hormonu	288,39	2,81
Estron	Metabolit reprodukčního hormonu	270,37	3,43
Fuoxymesteron	Syntetický anabolický steroid/k lidskému použití	336,45	2,49
Hexestrol	Syntetický nesteroidní estrogen/zakázán	270,37	5,6
Levonorgestrel	Syntetický steroidní estrogen/ k lidskému použití	312,46	3,48
Melengestrol acetát	Syntetický steroidní estrogen/ k použití zvířaty	354,48	2,69
Mestranol	Syntetický steroidní estrogen/k lidskému použití	310,44	4,68
Methandrostenolon	Syntetický anabolický steroid/zakázán	300,44	3,51
Methyl testosteron	Syntetický anabolický steroid/k lidskému použití	302,46	3,72
Nortestosteron	Anabolický steroid/syntetická forma zakázána	274,41	2,82
Progesteron	Reprodukční hormon	314,47	3,67
Stanozolol	Syntetický anabolický steroid/k použití pro lidi i zvířata	328,5	4,42
Taleranol	Nesteroidní estrogen/použití jako veterinární léčivo	-	4,78
Testosteron	Reprodukční hormon	288,43	3,27
Trenbolon	Syntetický anabolická steroid/k použití pro zvířata	270,37	2,53
Zearalanon	Nesteroidní estrogen/mykotoxin	318,37	3,58
Zeranol	Nesteroidní estrogen/ použití jako veterinární léčivo	322,4	5,37

Tabulka č. 3.: Seznam některých hormonů a látek EDC, jejich molekulová hmotnost a log K_{ow} (rozdělovací koeficient oktanol/voda). Zpracováno podle: Lee et al. (2007).

3.2.1.1 Kontaminace zemědělskou činností

Typy vylučovaných pohlavních hormonů i poměry volných a konjugovaných forem se liší v závislosti na druhu zvířat, pohlaví a stádiu reprodukční schopnosti. Například skot vylučuje více než 90 % estrogenů ve formě 17 α -estradiolu, estronu a estriolu, přičemž většinu tvoří 17 α -estradiol. Naopak v exkretech prasat nebo drůbeže se 17 α -estradiol vyskytuje jen zřídka (Hanselman et al. 2003).

Relativní množství vyloučených hormonů ve výkalech a v moči zvířat se liší podle jednotlivých druhů. Například u skotu a ovcí se téměř 70 % celkového množství estrogenů vylučuje výkaly, zatímco u prasat se téměř 90 % celkového množství estrogenů vylučuje močí (Lange et al. 2002).

Kromě přirozeně produkovaných hormonů se skotu implantují také hormonální doplňky pro zvýšení rychlosti růstu. Hlavní růstové stimulatory používané ve Spojených státech USA patří androgeny, testosteron a trenbolonacetát (TBA); estrogeny, 17 β -estradiol a zeranol, a progestiny, progesteron a melengestrol acetát (MGA) (Lange et al. 2002).

První syntetickou anabolickou látkou, která vstoupila na trh ve Spojených státech v roce 1987, byla látka TBA. Tato anabolika byla propagována a používána pro různé pozitivní účinky, včetně zlepšení denních přírůstků hmotnosti, konverze krmiva (tj. spotřeba na jednotku krmiva), a zvýšení příjmu sušiny (Song a Choi 2001). Kromě MGA jsou hormony skotu podávány prostřednictvím podkožního ušního implantátu, a to buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými látkami. Kombinacemi mohou být TBA a 17 β -estradiol, estradiol-benzoát a progesteron nebo estradiol-benzoát a testosteron. (Arcand-Hoy et al. 1998). Jakmile je TBA skotu podán, postupně se uvolňuje do krve, kde se později hydrolyzuje za vzniku aktivní formy 17 β -trenbolonu. 17 β -trenbolon je poté epimerizován na 17 α -trenbolon. Oba izomery jsou později vyloučeny z organismu, přičemž forma 17 α -trenbolon převažuje nad formou 17 β -trenbolon v poměru 10:1. Bylo prokázáno, že TBA je pro růst zvířete 8 - 10krát efektivnější než přirozený androgen testosteron.

MGA je perorálně účinný progestin (syntetický progestagen), který se používá pro synchronizaci nebo indukci říje u skotu. Dále je, stejně jako TBA, uváděn na trh jako krmivo pro jalovice ve výkrmnách ke zlepšení účinnosti krmiva a rychlosti růstu hmotnosti.

Tyto dvě látky, TBA a MGA, jsou díky jejich odolnosti vůči rozkladu pravděpodobně nejvýznamnějšími původci hormonů ve statkových hnojivech ve Spojených státech a Kanadě (Lorenzen et al., 2004).

Co se týče hormonů vylučovaných hospodářskými zvířaty, nejvyšší hladiny estrogenů jsou trvale měřeny v odpadech produkovanými prasaty. Hodnoty ukazují, že na základě průměrné hmotnosti sušiny (dwt) se koncentrace estronu pohybují v rozpětí od 200 do 5000 mg/kg, 17 α -estradiolu od 400 do 890 mg/kg a 17 β -estradiolu od 160 do 1200 mg/kg (Hanselman et al. 2003).

Průměrné koncentrace těchto tří hormonů bývají nižší v odpadech mléčného skotu (estron: 203-800 mg/kg, 17 α -estradiol: 139-603 mg/kg a 17 β -estradiol: pod úrovní detekce až 239 mg/kg) i drůbežního steliva (estron: pod detekcí, 17 α -estradiol: pod detekcí a 17 β -estradiol: 14-904 mg/kg), přehledně v tabulce č. 4.

Sledované hormony v produkovaných odpadech	Odpady produkované:		
	prasaty	skotem	drůbeží
estron	200-5000 mg/kg	203-800 mg/kg	pod detekcí
17 α -estradiol	400-890 mg/kg	139-603 mg/kg	pod detekcí
17 β -estradiol	160 do 1200 mg/kg	až 239 mg/kg	14-904 mg/kg

Tab. č. 4.: hodnoty vybraných hormonů sledovaných v odpadech produkovaných různými hospodářskými zvířaty. Zpracováno podle: Hanselman et al. (2003).

Další činitel, který může ovlivnit koncentraci hormonů ve statkových hnojivech, je způsob, jakým je živočišný hnůj skladován a jak je s ním nakládáno. Systémy pro výkrm prasat v halách, které využívají podestýlku ke shromažďování a skladování živočišných odpadů v suchém prostředí po dobu 6 měsíců, měly nejvyšší průměrné koncentrace 17 β -estradiolu (40 mg/kg). Průměrné koncentrace celkového estronu (54 mg/kg) byly na druhém místě pouze v porovnání s porodními boxy pro prasata (57 mg/kg), kde jsou skladovány kaly s vysokým obsahem pevných látek, ve zcela anaerobních podmínkách po dobu delší než 5 let. (Raman et al. 2004). U dojnic však typ skladování hnoje konzistentně nezměnil ani aktivitu estrogenů, ani aktivitu androgenů. Naopak tyto změny způsobil typ krmiva, kterým byla zvířata krmena.

Dále bylo zjištěno, že aktivita genů pro transkripci estrogenních receptorů byla významně vyšší u hnoje z farem, které používaly krmivo obsahující sóju (2000-3050 mg/kg živé hmotnosti) ve srovnání s podniky, které takové krmivo nepoužívaly (<800 mg/kg) (Lorenzen et al. 2004). Můžeme tedy říci, že statková hnojiva skotu krmným krmivem s obsahem sóji, mají vyšší obsah estrogenů. Bylo prokázáno, že krmiva na bázi sóji obsahují také značné množství fytoestrogenů. Přítomnost fytoestrogenů ve hnoji, vodě a půdě může být jedním z důvodů, proč jsou naměřené estrogenní aktivity často vyšší než uváděné koncentrace hormonů. Mezi další důvody patří např. přítomnost rozpuštěného organického materiálu a kvantitativní analýza přítomnosti pouze několika vybraných hormonů a jejich metabolitů (Lee et al. 2007).

3.2.1.2 Kontaminace přes čistírny odpadních vod

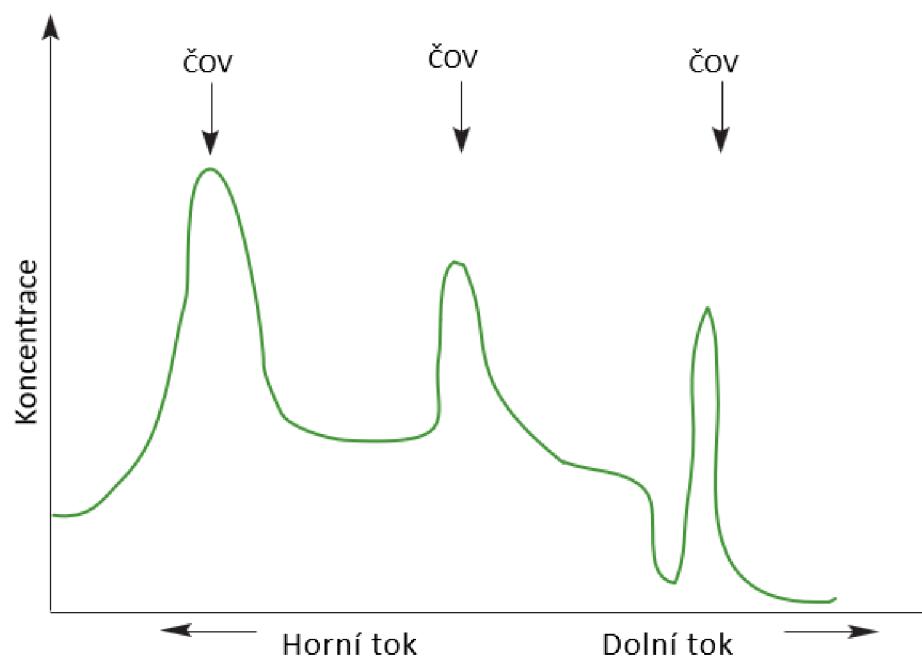
Městské čistírny odpadních vod byly navrženy tak, aby se vypořádaly s odpadními vodami pocházejícími z domácností. Pokud mají být odpadní vody vznikající při jiných činnostech odváděny do komunální čistírny, musí být také domácího charakteru. Tedy musí mít podobné vlastnosti a složení jako odpadní vody produkované domácnostmi. Průmyslová

odvětví napojená na kanalizační síť proto často mají vnitřní čistírny a vyrovnávací nádrže před vypouštěním odpadních vod do sítě (Björlenius & Wahlberg 2006).

Čistírny nejsou určeny k degradaci všech typů léčivých látek. Objektivně lze říci, že léčiva nejsou formulována tak, aby byla rozložitelná v čistírnách odpadních vod. Účinné léčivé látky se z těla obecně vylučují ve formě vodou rozpustných metabolitů nebo konjugátů. Pokud nejsou biologicky rozložitelné, skončí v odtoku odpadní vody. K redukci léčivých látek však částečně dochází právě v biologickém stupni čištění. Studie účinků estrogeneru v odpadní vodě ukázaly, že dochází k lepšímu snižování, tím více, čím delší je doba zdržení vody v biologickém stupni čištění. Systémy využívající aktivovaný kal mají účinnost odstranění estronu z vodní fáze v rozmezí od 40–96 % (Svenson et al. 2003). Čistírny mají však v různých částech světa různé podoby a v důsledku toho se může lišit i redukce léčivých látek.

O separaci moči se diskutuje jako o budoucím řešení pro navrácení živin produkovaných lidským organismem zpět do zemědělství, jelikož rezidua léčiv jsou z lidského organismu vylučována právě močí (Björlenius & Wahlberg 2006).

Rezidua léčiv požívaných lidskou populací jsou čistírnami odpadních vod (ČOV) uvolňovány do životního prostředí v koncentracích obvykle měřených v rozmezí jednotek ng/l-mg/l. Pomocí simulačních modelů lze tok léčivých látek sledovat podél vodního systému a získat tak hrubý odhad koncentrací, které lze očekávat (Schowanek a Webb 2002). Jak ukazuje níže uvedený diagram (viz obrázek č. 6), koncentrace se mění v důsledku různých redukčních účinků nebo ředěním toku.



Obr. č. 6.: Tok léčivých látek (i hormonálních přípravků) sledovaný podél vodního systému. Lze pozorovat měnící se koncentrace daných látek v důsledku ředění apod. Zpracováno podle: Schowanek & Webb (2002).

3.2.2 Stabilita hormonů

Potenciální nepříznivé dopady antimikrobiálních látek a hormonů, které vznikají zemědělskou činností jsou přímo ovlivněny jejich perzistencí a účinností jak ve hnojivech, tak ve vodním a půdním prostředí. Specifické vlastnosti sloučenin, jako jsou hydrofobicita, ionizační potenciál, sorpce a degradace, spolu s různými environmentálními faktory, jako jsou lokální hydrologie, půdní charakteristiky a klimatické podmínky, přispívají k jejich konečnému osudu a potenciálu dostat se k necílové biotě. Při posuzování rizik ekosystémů vodního prostředí, které jsou spojeny s hormony ze statkových hnojiv, je důležité předvídání sorpce dané půdy a sedimentu a identifikace oblastí, které jsou předmětem zkoumání (Lee et al. 2007).

3.2.2.1 Stabilita hormonů ve statkovém hnoji a močůvce

Ve vzorcích moči dobytka Van der Merwe a Pieterse (1994) zaznamenali, že zeranol a taleranol se zdají být stabilní, zatímco trenbolon se výrazně rozkládal. Nicméně, v trusu dobytka, který byl pravděpodobně v anaerobních podmínkách, se 17α -trenbolon a 17β -trenbolon jeví jako relativně persistentní s odhadovaným poločasem rozpadu přibližně 267 a 257 dnů. Trendion, primární metabolit pro trenbolon, byl detekován v čerstvém hnoji a jeho koncentrace se v průběhu času nesnižovaly. MGA byl sledován na substrátu pevných hromad trusu. Ačkoli se počáteční koncentrace MGA lišily v závislosti na poloze odběru vzorku v rámci dané hromady substrátu, horní hladiny MGA se během doby skladování (4,5 měsíce) příliš nezměnily.

3.2.2.2 Stabilita hormonů v půdách a půdách hnojených statkovými hnojivy

V současné době se většina studií o degradaci hormonů týká hormonů přidávaných do půdy přímo bez přidání hnojivové matrice. Ve vlhkém půdním prostředí mikrokosmech se třemi zemědělskými půdami z Ontaria. Ve výzkumu Colucci et al. (2001) byly použity 3 typy zemědělských půdních vzorků a byly uvedeny konstanty rozptylu mezi 0,1 a 3 za den pro 17β -estradiolu a 17α -ethynyl estradiolu, což odpovídá hodnotám poločasu rozpadu v rozmezí od 0,2 do 7 dnů. 17β -estradiol byl oxidován na estron v sterilních (autoklávně ošetřených půdách) i v nesterilních půdách. Nicméně, na základě radioaktivně značeného materiálu, estradiol i jeho primární metabolit estron tvořily neextrahovatelná rezidua, a to pouze v nesterilních půdách. Kompletní mineralizace probíhala pomalu, po 61 dnech nebylo mineralizováno více než 15 % estrogenů (Colucci et al. 2001). Podobné hodnoty poločasu rozpadu pozorovali Lee et al. (2003) pro 17β -estradiol, 17α -ethynyl estradiol a testosteron v kalových suspenzích. Syntetický androgen, 17β -trenbolon, byl za aerobních podmínek rozkládán na trendion jak v saturovaných půdních suspenzích, tak v nesaturovaných vlhkých půdních mikrokosmech s hodnotami poločasu rozpadu nižšími než 1 den. Následná degradace trendionu však probíhala pomaleji, s poločasy rozpadu v rozmezí 3 až 5 dní. Trenbolon je tedy perzistentní v hnojištích (Schiffer et al. 2001), které jsou z většiny anaerobní. Jakmile se však objeví aerobním půdním prostředí, dochází k rozkladu mateřské sloučeniny velmi rychle.

Das et al. (2003) určili koeficienty rozkladu testosteronu a 17 β -estradiolu a jejich několika metabolitů ve studii zahrnující vzorky povrchové vrstvy zemědělské půdy, sedimentů sladkovodních vod a dvou typů písčitých půd. Určené koeficienty rychlosti rozkladu (k) povrchové vrstvy zemědělské půdy a sladkovodního sedimentu se pohybovaly od 0,002 do 0,41 h⁻¹ (poločas rozpadu = 0,07-14 dní), přičemž hodnoty k dvou primárních metabolitů byly určeny jako vyšší než hodnoty k mateřských hormonů. Ačkoliv bylo zjištěno, že sorpce matečného hormonu a jeho metabolitů půdou byla značně vysoká (4-80 l/kg), sorpce degradaci nebránila.

Jacobsen et al. (2005) ve své studii ukázali, že při inkubaci vlhkých půd deseti procenty prasečího hnoje probíhala zvýšená přeměna na metabolity 17 β -estradiolu a testosteronu. Nicméně úplná mineralizace (na CO₂) byla těmito změnami snížena. To bylo v průběhu testování sledováno pomocí radioaktivně značeného 17 β -estradiolu a testosteronu. Tyto výsledky naznačují, že mikroorganismy pocházející z hnoje mohou být lépe aklimatizovány pro přeměnu hormonů na jejich metabolity, které mají typicky nižší potenciál narušení endokrinního systému, i přesto, že půdní mikroorganismy mohou zvýšit celkovou mineralizaci.

3.2.3 Pohyb hormonů v půdním sloupci

Studie týkající se steroidních hormonů, antimikrobiálních látek a jiných silně sorbujících organických sloučenin ukázaly, že desorpce, povrchový odtok, přednostní transport přes půdní makropóry do podzemních vod nebo do kanalizačních stok mohou zvýšit mobilitu kontaminantů (Lee et al. 2007). Haws (2003) provedl ve své disertační práci studie transportu vody a rozpuštěných látek na dvou podpovrchově odvodňovaných zemědělských pozemcích. S použitím několika nereaktivních (chloridy a bromidy) a reaktivních (atrazin aalachlor) stopovacích látek, zjistil, zda byly v případě aplikace chemických látek bezprostředně nad odtokovým systémem náchylné k rychlému transportu. Sledovací látky byly povrchově aplikovány v různých horizontálních vzdálenostech nad odtokovým systémem, který se nacházel 1 m pod povrchem. Bromid aalachlor umístěné 5 m od drénu dorazily do jeho blízkosti současně. Laboratorní studie naznačily, že síť velkých makropórů, tvořených pravděpodobně kořenovými kanálky a nory žížal, slouží jako preferenční cesty proudění v plně či téměř plně satureované půdě. Jakmile úroveň nasycení půdy klesá, dochází k přenosu proudění, a tedy i transportu přes primární síť menších makropórů (Haws et al. 2004).

Das et al. (2003) zkoumali osud a transport testosteronu a 17 β -estradiolu v sérii transportních experimentů s rychlým průtokem. Testy byly prováděny na povrchové půdě, sladkovodního sedimentu na dvou písčitých půdách. Sorpce hormonů i jejich metabolitů byla úměrná půdnímu OC (organickému uhlíku) s hodnotami log K_{oc} (2,77-3,69). Podobné hodnoty pozorovali také Lee et al. (2003), a dále hodnotili sorpci a mobilitu 17 β -estradiolu a testosteronu na hlinitopísčitém a písčitém typu půd. V hlinitopísčité půdě nebyl ani jeden z hormonů po vymývání vodou (objemově bylo použito asi 10x více vody, než bylo volných

pórů v půdě) z půdy vymytý. Z aplikovaného testosteronu a 17 β -estradiolu bylo 80 % a 96 % zachyceno v horních 5 cm půdy. Naproti tomu z písčité půdy bylo při stejném procesu vymyto přibližně 90 % obou hormonálních látek.

Shore et al. (2004) sledovali 15 lokalit po dvě po sobě jdoucí dešťové sezóny roce 2004 v údolí Horního Jordánu, které zahrnovaly malé farmy, pastviny pro dobytek, a rybníky. Koncentrace hormonů byly nejvyšší po prvním silném dešti po nezvykle slabém tříletém období srážek. Testosteron byl detekován nejprve v koncentracích až 6 ng/l, následován estrogenem v podobných koncentracích, které se během 3 měsíců postupně snižovaly až na nedetekovatelné hladiny (<0,3 ng/l). Tyto koncentrace byly přisuzovány odtoku z pastvin pro dobytek a odtoku odpadní vody z rybníků. Dále bylo zjištěno, že estradiol zřejmě podléhá ireverzibilní sorpci nebo transformačním procesům v mnohem větší míře nebo rychleji než testosteron, pravděpodobně v důsledku specifických s fenolovou skupinou na estradiolu.

Většina studií monitorujících terén, které se pokoušely propojit aplikaci hnoje na půdu s přítomností veterinárních léčiv v povrchových vodách, se soustředily na měření koncentrací estradiolu, testosteronu, nebo obou těchto látek v odtokových vodách ze zemědělských polí, na které byla dříve aplikována drůbeží podestýlka. (Finlay-Moore et al. 2000, Nichols et al. 1997, Shore et al. 1995). Ve všech těchto studiích byla zjištěna významná množství 17 β -estradiolu a/nebo testosteronu v odtokových nebo drenážních vodách. Finlay-Moore et al. (2000) použili enzymově vázanou imunosorbční analýzu (ELISA) k odhadu koncentrací 17 β -estradiolu a testosteronu jak v odtokové vodě, tak v samotné půdě z pastviny pasené dobyt看em, na kterou byla aplikována drůbeží podestýlka. Koncentrace estradiolu a testosteronu ve odtokových vodách se pohybovaly v rozmezí 20-2330 ng/l (pro estradiol) a od 10 do 1830 ng/l (pro testosteron). Koncentrace estradiolu a testosteronu v samotné půdě dosahovaly (po aplikaci drůbeží podestýlky) na 675 a 165 ng/kg. Jak ve studii Finlay-Moore et al. (2000), tak ve studii Nichols et al. (1997) se ukázalo, že koncentrace hormonů v odtokových vodách jsou silně závislé na množství aplikované drůbeží podestýlky, a také na času uplynulém od aplikace.

3.3 Metody využívané pro separaci a kvantifikaci estrogenních látek

Chromatografie je separační technika v chemické analýze, při níž se složky vzorku oddělují při průchodu chromatografickým médiem. Zahrnuje také interakci se vzorkem, stacionární fází a mobilní fází. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie se používá se jako metoda kapalinové chromatografie v analytické chemii (Grebe & Singh 2011). Kombinace kapalinové chromatografie a hmotnostní spektroskopie (LCMS) byla vyvinuta pro kvantitativní analýzu vybraných biomolekul a ve srovnání s HPLC představuje vysoce citlivý, přesný a specifický postup stanovení. To je klíčový rozdíl mezi HPLC a LCMC (Churchwell et al. 2005).

3.3.1 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační technikou používanou analytické chemii. Používá se především k separaci složek, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek ve směsi. Dříve byla tato metoda známá jako vysokotlaká kapalinová chromatografie, protože závisela na čerpadlech, kterými proudilo kapalné rozpouštědlo pod tlakem obsahující směs vzorků přes kolonu naplněnou pevným adsorpčním materiálem. Každá složka ve směsi vzorků interaguje s pevným adsorpčním materiálem jinak, což má za následek různé průtoky pro různé složky. Míra zadržení ovlivňuje dobu setrvání složky v koloně, a tak dochází k separaci látek. Metoda HPLC je používána k separaci směsí látek, které jsou málo těkavé nebo netěkavé, které jsou termicky labilní, látky iontové povahy a látky vysokomolekulární. Lze separovat sloučeniny polární i nepolární. To může vést k separaci složek při jejich průtoku kolonou HPLC (Grebe & Singh 2011).

HPLC se používá pro různé aplikace, jako je analýza hladiny vitamínu D v krvi, užívání nelegálních drog u sportovců pomocí detekce zbytků drog v jejich moči, třídění složek komplexního biologického vzorku pro výzkumné účely a analýza a výroba léčiv (Churchwell et al. 2005).

3.3.2 LC/MS

Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LCMS) je zahrnována mezi analytické metody. Jsou zde kombinovány fyzikální separační schopnosti kapalinové chromatografie s hmotnostní analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Kapalinová chromatografie je separační metoda a hmotnostní spektrometrie se používá k analýze poměru hmotnosti a náboje nabitých částic. Kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) nabízí analytickou specifickou vyšší než imunoanalýzy nebo konvenční vysokoúčinná/tlaková kapalinová chromatografie (HPLC) pro nízkomolekulární analyty a má vyšší výkon než plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS). LCMS se používá především k separaci, detekci, identifikaci a kvantifikaci biochemických vlastností konkrétního vzorku v přítomnosti složitých chemických směsí (Churchwell et al. 2005).

Ukázalo se však několik omezení LC-MS/MS, která se soustřeďují na vzájemně se ovlivňující trojúhelník tří prvků: citlivosti, specifické a výkonnosti. I když je propustnost vzorků vyšší než u konvenční HPLC nebo GC-MS, v porovnání s automatizovanými imunoanalýzami v této oblasti zaostává. Mezi techniky, které zvyšují propustnost, patří přímé vstříkávání vzorku, LC-multiplexing a samplmultiplexing. Opatření ke zlepšení specifické a citlivosti zahrnují čištění vzorku a optimalizaci chromatografie tak, aby bylo zabráněno interferencím a potlačení iontů v důsledku složek matrice vzorku (Grebe & Singh 2011).

4 Metodika

4.1 Odběr vzorků

Celkem byly odebrány vzorky půd ze tří míst. Šlo o 3 různé půdní typy: černozem, kambizem a fluvizem. Všechny půdní vzorky byly odebrány z lokalit experimentálních pozemků České zemědělské univerzity. Vzorky půdního typu černozem byly odebrány na lokalitě Suchdol, kambizem byla odebrána lokality Humpolec a fluvizem z lokality Pátek.

Vzorky byly připraveny pro mikrobiologické a enzymatické analýzy, jak je popsáno v následujících kapitolách.

4.2 Příprava půdních vzorků

Z každého půdního vzorku bylo odebráno takové množství půdy, aby mohlo být naplněno celkem 117 nádob (39 nádob pro každý půdní typ) 100 g půdy (v sušině), viz tabulka č. 5. Použité půdní vzorky byly předem vysušeny a přesety přes 2 mm síto.

Půdní typ	Počet nádob	Kapacita nádob (g)	Celková hmotnost (kg)	Odběr vzorků	Opakování odběru
Černozem	39	100 g	3,9	13x	3
Fluvisol	39	100 g	3,9	13x	3
Kambisol	39	100 g	3,9	13x	3
Celkem 3 půdní typy	Celkem 117 nádob	100 g/nádoba	Celkem 11,7 kg zeminy	Celkový počet vzorků pro 1 půdní typ = 39	

Tab. č. 5.: Přehledné shrnutí kapacity a počtu nádob, hmotnosti použité zeminy a dalších parametrů potřebných pro započítání pokusu.

4.3 Přidání estronu (E1) do půdních vzorků

Estron (E1), který byl přidán do půdních vzorků, byl objednan Estron (E1) byl objednan u firmy TCI EUROPE N.V. Zwijndrecht Belgie (čistota $\geq 99\%$) a vnitřní standard ^{13}C u firmy Chromservis s.r.o. Praha, Česká republika (čistota 99 %).

Estron byl použit koncentrací 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ podle publikace Mashtare et al (2013). 5 mg E1 bylo nejprve rozpuštěno v 10 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně zředěno destilovanou vodou až do dosažení koncentrace 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Roztok byl rozdělen tak, aby bylo do každé nádoby s obsaženým půdním vzorkem připraveným pro ošetření estronem přidáno 10 ml roztoku. Takto připravený vzorek byl intenzivně promíchán pro dosažení maximální homogenizace. Pokus trval celkem 28 dní a jednotlivé vzorky byly odebrány v sedmi časových rozestupech po inkubaci (0 h, 4 h, 12 h, 24 h, 3 dny, 7 dní a 28 dní). Při každém odběru v daném časovém horizontu šestkrát odebráno přibližně 20 g půdy. Tři odběry sloužily jako opakování vzorku a další tři jako kontrolní vzorky. Ihned po odebrání byly vzorky uloženy do mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Stanovení vodní kapacity

Vodní kapacita (WHC) byla nastavena na 60 % a udržována po celou dobu trvání pokusu. Počáteční WHC se skládala z 10 ml roztoku estronu plus doplnění destilované vody do 60% vlhkosti. Tento postup byl opakován pro každý typ půdy.

4.5 Stanovení pH

Pro stanovení pH jednotlivých vzorků půdních typů bylo nejprve potřeba připravit 1 litr roztoku o koncentraci 0,01 mol/l CaCl_2 . Následně byly použity PVC zkumavky o objemu 8 ml, do každé z nich byl přidán 1 g vysušeného půdního vzorku a 2,5 ml předem připraveného roztoku (0,01 mol/l CaCl_2). Připravená směs byla v nádobách pevně uzavřena a umístěna v třepačce (viz Samostatné přílohy obrázek č.1.). Zde docházelo k promíchání při 180 rpm a 25 °C po dobu 120 minut. Po takto provedeném homogenizování směsi byly vzorky přemístěny na pevnou plochu a nechány k ustálení po dobu 60 min. Na takto připravením roztoku byla následně změřena hodnota pH pomocí předem kalibrovaného pH metru.

4.6 Stanovení elektrické konduktivity

Pro měření elektrické konduktivity byl nejprve připraven 1 litr roztoku o obsahu 0,01 mol KCl. Ten byl připraven rozpuštěním 0,7455 g KCl v 1 l destilované vody. Tento roztok byl použit pro kalibraci přístroje, pomocí něhož byla elektrická konduktivita měřena. Následně byly použity zkumavky o objemu 50 ml, a každá byla naplněna 2 g půdního vzorku a doplněna 20 ml destilované vody. Zkumavky byly přemístěny do třepačky (viz Samostatné přílohy obrázek č.1.), kde byly promíchávány za podmínek 180 rpm a 25 °C po dobu 30 min. Poté byly umístěny na pevnou plochu po dobu 30 min pro ustálení zeminy. Na předem kalibrovaném EC-metru (pomocí předem připraveného KCl roztoku) byla změřena elektrická konduktivita každého vzorku.

4.7 Stanovení textury půdních vzorků

Pro každý půdní typ byl odebrán vzorek přibližně 10 g. Každý vzorek byl navlhčen destilovanou vodou tak, aby došlo k soudržnosti zeminy a zároveň, aby se příliš nelepila na ruce. Kontrola správného navlhčení zeminy probíhala tak, že byla hmota naříznuta nožem a vznikl čistý řez. Nejprve bylo vyzkoušeno, zda lze vzniklou hmotu na tvrdé podložce vytvarovat tak, aby vzniklo vlákno přibližně o průměru 3 mm. Tato vlákna byla válena tak, aby vytvořila délku alespoň 10 cm. Pokud bylo vytvořeno 10 cm dlouhé neporušené, nepopraskané vlákno, bylo stočeno do kroužku. Opět nemělo dojít k porušení struktury vlákna. Pokud nedošlo k porušení, bylo z dané hmoty vytvořeno vlákno o průměru 1 mm, přičemž byla z připravené hmoty odstraněna větší zrna písku. Tento postup byl aplikován na všechny tři vzorky jednotlivých půdních typů a jejich textura byla posouzena podle kritérií popsaných v následujícím odstavci.

Vzorky písčité půdy nelze použít k vytvoření vláken o průměru 3 mm. Jejich struktura se při tvoření vláken o průměru 3 mm mění, praská a nedrží při sobě. Se vzorky písčito-

hlinitých a hlinito-písčitých půd je možné vytvořit vlákna o průměru 3 mm, ale ne vlákna užší (1 mm). Vlákna o průměru 3 mm navíc praskají, když je chceme stočit do kroužku. Ze vzorků hlinitých půd můžeme vytvořit vlákna o průměru jak 3 mm, tak 1 mm. Vlákna o průměru 3 mm se však trhají nebo praskají, chceme-li je stočit do kroužku. Se vzorky jílovitých půd můžeme vytvořit vlákna o průměru jak 3 mm, tak 1 mm, a při stáčení do kroužku ani jeden ze dvou typů vláken ani nepraská ani se netrhá.

4.8 Stanovení živin

Obsah dostupných živin (Ca, Mg, K, P, S, Mn, Fe, Cu, Zn, Cr) v půdách byl stanoven následovně: Do uzavíratelné polyethylenové nádoby o objemu 250 ml bylo naváženo 10,0 g upraveného půdního vzorku. Pomocí odměrného válce bylo ke vzorku přidáno 100 ml extrakčního roztoku Mehlich III. Po uzavření nádoby bylo extrahováno na horizontální třepačce po dobu 10 minut. Po ukončení extrakce byla výsledná suspenze ihned přefiltrována přes hustý filtrační papír. Obsah živin v extraktech byl stanoven metodou emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP – OES).

Extrakční roztok Mehlich III, ve kterém byla zemina vyluhována obsahuje: 0,2 mol/l CH_3COOH , 0,015 mol/l NH_4F , 0,013 mol/l HNO_3 , 0,25 mol/l NH_4NO_3 a 0,001 mol/l EDTA.

Celkový obsah uhlíku, dusíku, vodíku a síry v v půdách byl stanoven s využitím přístroje CHNOS Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Německo).

4.9 Stanovení enzymatické aktivity

Enzymatická aktivita byla měřena u lakázy a mangan peroxidázy, peroxidázy a oxidázy. 0,2 g vzorku bylo smícháno s 20 ml fosfátového pufru (50 mM, pH 5) (1:100 wt/v), několik sekund homogenizováno v UltraTurraxu, dále filtrováno Waltmanovými filtračními papíry a nálevkami a shromážděno do 8 ml zkumavek. Poté byl roztok filtrován přes filtrační válce (viz samostatné přílohy obr. č. 2 a 3) a shromážděn pro pipetování (viz samostatné přílohy obr. č. 4). Pipetování probíhalo umístěním vzorků do průhledné destičky s 96 jamkami (viz samostatné přílohy obr. č. 5). Do každé jamky bylo napipetováno 50 μl vzorku a 200 μl specifického substrátu ve čtyřech enzymatických opakováních na vzorek a měřeno v přístroji Tecan INFINITE M PLEX s programem Magellan 7.2 SPI (viz samostatné přílohy obr. č. 6).

4.10 LC/MS analýza

Pro každý vzorek bylo použito 0,5 g zeminy, která byla obohacena o 50 ng, smícháno s 5 ml HPLC methanolu, vortexováno (10 sekund), horizontálně protřepáno (15 minut), opět vortexováno (10 sekund), sonikováno (15 minut), odstředěno (4500 otáček za minutu, 200 °C, 10 minut) a supernatant odebrán. Postup se opakoval dvakrát, a nakonec se odebralo 10 ml supernatantu. 1,5 ml bylo přefiltrováno přes 0,22mm PTFE filtry do HPLC lahvíček a spuštěno v HPLC přístroji.

5 Výsledky

5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy

Naměřené pH všech tří půdních druhů se od sebe zásadně neliší, hodnoty se pohybovaly od 6 do 7, viz tabulka č. 6.

Půdní typ	kambizem	fluvizem	černozem
pH	6	7	6,2

Tab. č. 6.: Výsledné pH všech třech půdních typů.

Postup stanovení textury půdních vzorků byl popsán již v kapitole 4.7. Textury všech třech půdních typů jsou popsány v tabulce č. 7.

Půdní typ	kambizem	fluvizem	černozem
textura	písčito-hlinitá	hlinitý jíl	hlinitá

Tab. č. 7.: výsledná textura určená pro všechny tři půdní typy.

Elektrická konduktivita byla měřena podle postupu popsaném v kapitole 4.6, a její výsledné průměrné hodnoty jsou pro kambizem 0,04 mS, pro fluvizem 0,19333 mS a pro černozem 0,09 mS, viz tabulka č. 8.

Název vzorku	EC (mS)	Průměrné hodnoty (mS)
B1	0,05	0,04
B2	0,04	
B3	0,03	
F1	0,19	0,193
F2	0,19	
F3	0,20	
Z1	0,09	0,09
Z2	0,09	
Z3	0,09	

Tab. č. 8.: Výsledky elektrické konduktivity pro jednotlivé půdní typy. B1-3 reprezentuje půdní typ kambizem, F1-3 fluvizem a Z1-3 černozem.

5.2 Stanovení živin

Živiny v půdních vzorcích byly stanovovány podle postupu popsaného v kapitole č. 4.8. Pro stanovení byly použity vždy tři půdní vzorky pro každý půdní typ ve dvou replikách, jak je zobrazeno v tabulce č. 9a. Bylo tedy použito celkem 18 půdních vzorků. Výsledné hodnoty živin v půdách a jejich poměry jsou zobrazeny v tabulkách č. 9a a č. 9b.

Poměry živin C/N a C/N/P naznačují, že půdní druh fluvisol je ze všech zkoumaných půdních typů nejvhodnější pro mikrobiální činnost. A to proto, že fluvisoli byl naměřen nejvyšší poměr C:N (26:1) a nejnižší obsah P (3 mg/kg). To mělo za následek, že byla nejvhodnější pro činnost mikroorganismů (C:N:P 26:3). Druhou nejlepší půdou byla určena černozem (C:N:P 12:4) a poslední kambizem (C:N:P 10:6) (viz tabulka č. 9). Vhodnost poměrů živin v půdním prostředí na mikrobiální činnost byla posuzována podle publikace Elser a Hamilton (2007), dle níž koncentrace C, N a P zajišťují základní energetické a živinové potřeby půdních mikroorganismů.

Název vzorku	váha [mg]	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	poměr C/N	poměr C/H
F1	30,754	0,28	7,38	0,642	0,067	26,6643	11,49
F1	31,22	0,28	7,57	0,634	0,063	26,7274	11,95
F2	28,522	0,3	7,77	0,64	0,064	25,7815	12,15
F2	32,166	0,29	7,47	0,616	0,059	25,9059	12,13
F3	29,704	0,29	7,93	0,628	0,068	26,9471	12,62
F3	31,353	0,29	7,81	0,655	0,06	26,6796	11,92
B1	34,319	0,21	2,13	0,947	0,019	9,8993	2,24
B1	27,148	0,21	1,96	0,99	0,012	9,3615	1,99
B2	29,194	0,22	2,24	0,962	0,013	9,9562	2,33
B2	30,67	0,21	2,13	0,993	0,012	10,0399	2,15
B3	26,554	0,18	1,86	0,872	*	10,2699	2,13
B3	27,674	0,2	1,94	0,955	*	9,6979	2,03
Z1	27,673	0,24	2,85	0,781	0,015	12,0603	3,64
Z1	30,345	0,24	2,78	0,8	0,014	11,6293	3,47
Z2	29,066	0,22	2,88	0,781	0,017	12,8333	3,69
Z2	28,715	0,23	2,81	0,744	0,019	12,4481	3,77
Z3	28,159	0,24	2,9	0,781	0,009	12,183	3,72
Z3	30,148	0,23	2,77	0,769	0,017	12,0563	3,60

Tab. č. 9a.: Tabulka vytvořená pro půdní živiny v půdě (N, C, H, S) a jejich poměry C/N a C/H. Zkratky půdních typů: F – fluvizem, B – kambizem, Z – černozem; *hodnoty pod mezí detekce stanovení

Půdní typ	kambizem	fluvizem	černozem
C/N poměr	10	26	12
C/H poměr	2	12	4
K (mg/kg)	14	39	34
P (mg/kg)	6	3	4
Ca (mg/kg)	154	2629	648
Mg (mg/kg)	16	37	22
Mn (mg/kg)	8	3	16
S (mg/kg)	6	15	8
Zn (mg/kg)	0,288	0,402	0,566
Fe (mg/kg)	26	28	6
Cu (mg/kg)	0,268	0,091	0,381
Cr (mg/kg)	0,024	0,009	0,009

Tab. č. 9b.: Stanovené živiny (K, P, Ca, Mg, Mn, S, Zn, Fe, Cu a Cr) pro všechny tři půdní typy.

5.3 Koncentrace estronu

Výsledky LC/MS analýzy byly zaznamenány v tabulce č. 10. Tyto naměřené hodnoty byly dále použity pro vytvoření grafů zobrazených na obrázcích č. 7 a 8. V tabulce č. 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty koncentrace estronu v půdách v jednotlivých časech odběru (pro pomoc při analýze vztahu půda/čas/estron).

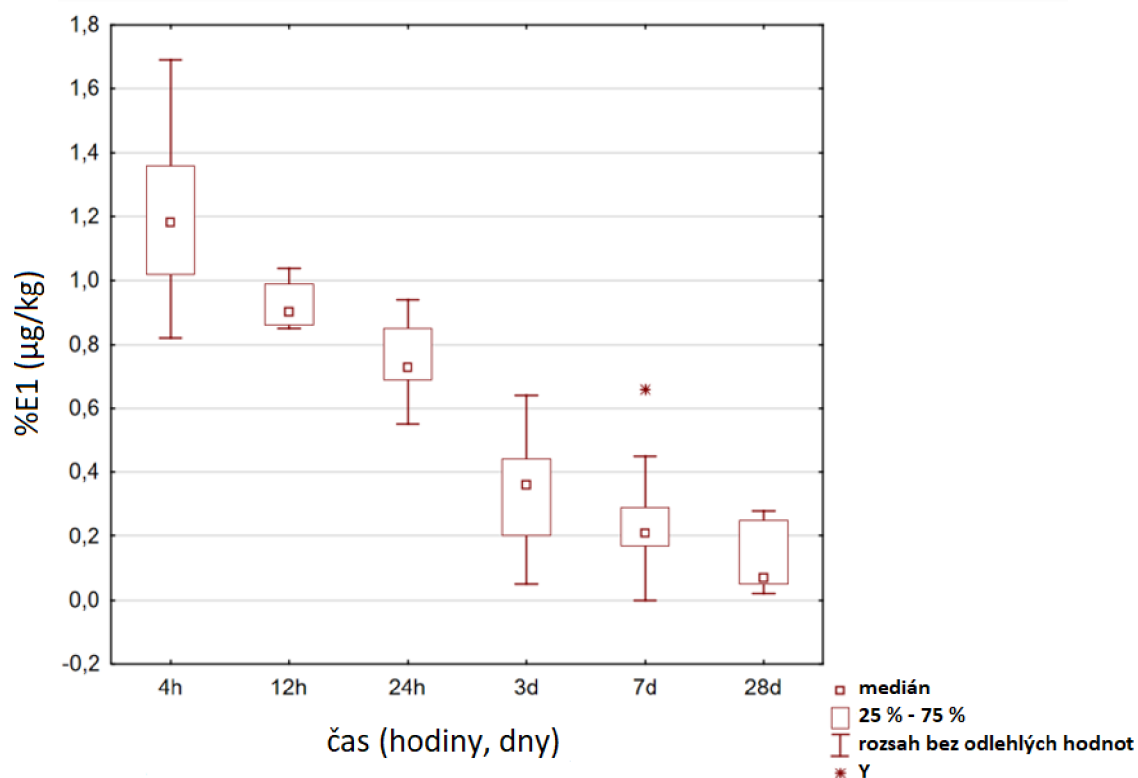
Koncentrace estronu (E1) v půdě µg/kg									
Půdní typ	4 h	12 h	24 h	3 dny	7 dní	28 dní	medián	min	max
kambizem	1,31	1,01	0,69	0,44	0,29	0,07	0,58	0,00	1,44
kambizem	1,02	1,04	0,69	0,36	0,00	0,08			
kambizem	1,44	0,99	0,85	0,48	0,26	0,02			
fluvizem	1,02	0,90	0,91	0,64	0,66	0,25	0,70	0,05	1,09
fluvizem	0,82	0,98	0,74	0,44	0,45	0,28			
fluvizem	1,09	0,90	0,94	0,05	0,18	0,25			
černozem	1,69	0,85	0,55	0,20	0,17	0,05	0,40	0,05	1,69
černozem	1,18	0,86	0,57	0,26	0,17	0,05			
černozem	1,36	0,86	0,73	0,17	0,21	0,05			
medián	1.18	0.90	0.73	0.36	0.21	0.07			
min	0.82(F)	0.85(Z)	0.55(Z)	0.05(F)	0.00(B)	0.02(B)			
max	1.69(Z)	1.04(B)	0.94(F)	0.64(F)	0.66(F)	0.28(Z)			

Tab. č. 10: Všechny výsledné hodnoty LC/MS analýzy. Označení písmeny Z, F a B v závorkách za hodnotami ve spodní části tabulky odpovídají jednotlivým půdním typům. F pro fluvizem, Z pro černozem a B pro kambizem. Hodnoty byly použity na vytvoření grafů č. 7 a 8 pomocí programu Statistica.

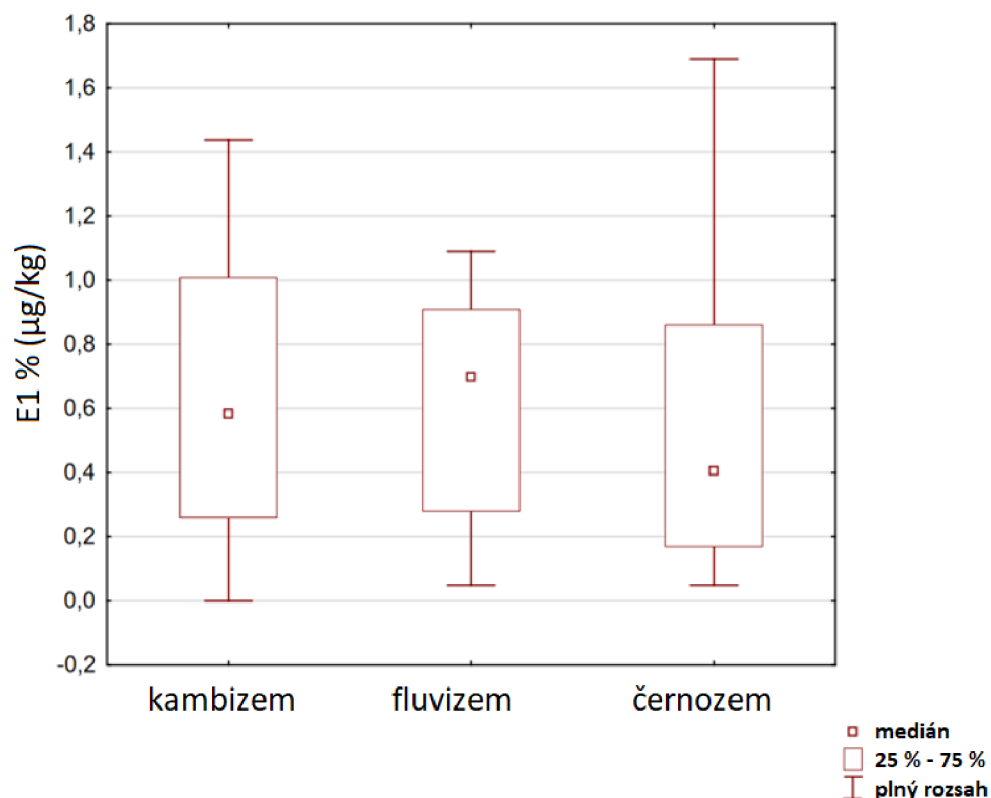
čas	kambizem	fluvizem	černozem
4 h	1,25	0,98	1,41
12 h	1,01	0,93	0,85
24 h	0,74	0,86	0,62
3 d	0,42	0,37	0,21
7 d	0,18	0,43	0,18
28 d	0,06	0,26	0,05

Tab. č. 11.: průměrné hodnoty koncentrací estronu ve všech třech půdních typech v závislosti na čase.

Chování estronu v závislosti na čase je zobrazeno v grafu na obrázku č. 7. Zde je zobrazeno lineární snížení jeho koncentrace v půdě v závislosti na čase. V prvních 24 hodinách koncentrace estronu lineárně klesala a v 3. dni byl zaznamenán další prudký pokles koncentrace (z hodnoty mediánu 0,73 v měření po 24 hodinách na hodnotu mediánu 0,36 při měření po 3 dnech). Mezi 3. a 7. dnem koncentrace estronu stále klesala, ovšem pokles byl již mírnější, prudký pokles přišel v 28. dni měření na samotném konci experimentu (medián 0,07 $\mu\text{g}/\text{kg}$).



Obr. č. 7.: Graf zobrazující proměnu koncentrací estronu půdě v závislosti na čase. Vytvořeno v programu Statistica při použití dat uvedených v tabulce č. 10.



Obr. č. 8: Graf zobrazující proměnu koncentrací estronu v půdě v závislosti na půdním typu. Vytvořeno v programu Statistica při použití dat uvedených v tabulce č. 10.

Z výsledků měření vyplývá, že půdní typ kambizem a černozem se v průběhu pokusu chovaly podobně, zatímco fluvizem měla rozdílné hodnoty, přestože v prvních 3 dnech pokusu měly fluvizem a kambizem relativně blízké hodnoty, jak lze vidět v tab. č. 10. Kromě prvních 12 hodin pokusu vycházely u půdního typu fluvizem vždy nejvyšší průměrné hodnoty (viz tab. č. 10) s výjimkou 3. dne, kdy hodnoty fluvizemě vybočují s nejnižší hodnotou 0,05 viz tabulku. č. 10 (3. den/čas/hodnoty). Tento rozdíl hodnot se mezi půdními typy s přibývajícím časem zvětšoval: 3. den nebyly rozdíly hodnot půdních typů příliš rozdílné, zatímco 28. den byla u fluvizemě naměřena 4krát vyšší průměrná hodnota než u kambizemě a 5krát vyšší než u černozemě (viz tab. č. 10) Rozdíly hodnot byly naměřeny i mezi kambizemí a černozemí, i když ne tak vysoké jako v případě fluvizemě. Celkově vykazovala kambizem vyšší koncentrace estronu než černozem, s výjimkou prvních 4 h, kdy měla černozem nejvyšší hodnotu, ale rozdíl v hodnotách mezi oběma půdami se v čase snižoval a na konci pokusu byla naměřena prakticky totožná hodnota.

Na základě výsledků zaznamenaných v tabulce č. 10 a v souvisejícím grafu - obr. 8 je zřejmé, že u kambizemě a fluvizemě bylo pozorováno stabilní chování s konstantnějšími změnami koncentrací mezi jednotlivými po sobě jdoucími vzorky, než jak tomu bylo u černoze a také s rovnoměrněji rozloženými hodnotami (oba měly medián uprostřed pole).

U kambizemě však bylo pozorováno větší rozmezí hodnot než u fluvizemě, kde bylo rozmezí kompaktnější. To ukazuje, že estron byl na začátku pokusu adsorbován méně než u fluvizemě (ve 4 hodinách pokusu byly naměřeny hodnoty koncentrace 1,25 u kambizemě a 0,98 u fluvizemě). Jak bylo uvedeno, u fluvizemě byla naměřena nižší počáteční koncentrací (0,98), což předpokládá vyšší počáteční adsorpci estronu, avšak na konci pokusu byla u fluvizemě naměřena nejvyšší koncentrace (0,26), což naznačuje, že adsorpce nebo transformace se ke konci experimentu zpomalovala.

Černozem byla půdou s nejintenzivnější změnou, u které byla na začátku pokusu naměřena největší přítomnost estronu (po 4 h), po 28 dnech ho zůstalo nejméně v porovnání s ostatními půdními typy. V prvních 12 h měla velký propad, který pokračoval méně intenzivně až do 3. dne. Mezi 3. a 7. dnem byly naměřeny podobné hodnoty, a poté mezi 7. dnem a koncem pokusu hodnota koncentrace opět poklesla. Tyto větší výkyvy byly zaznamenány i v mediánu, čímž byl pozitivně zkreslen graf. To bylo způsobeno obecně vyššími hodnotami, které byly u černoze naměřeny (maximální naměřená koncentrace estronu v průběhu celého pokusu byla 1,69).

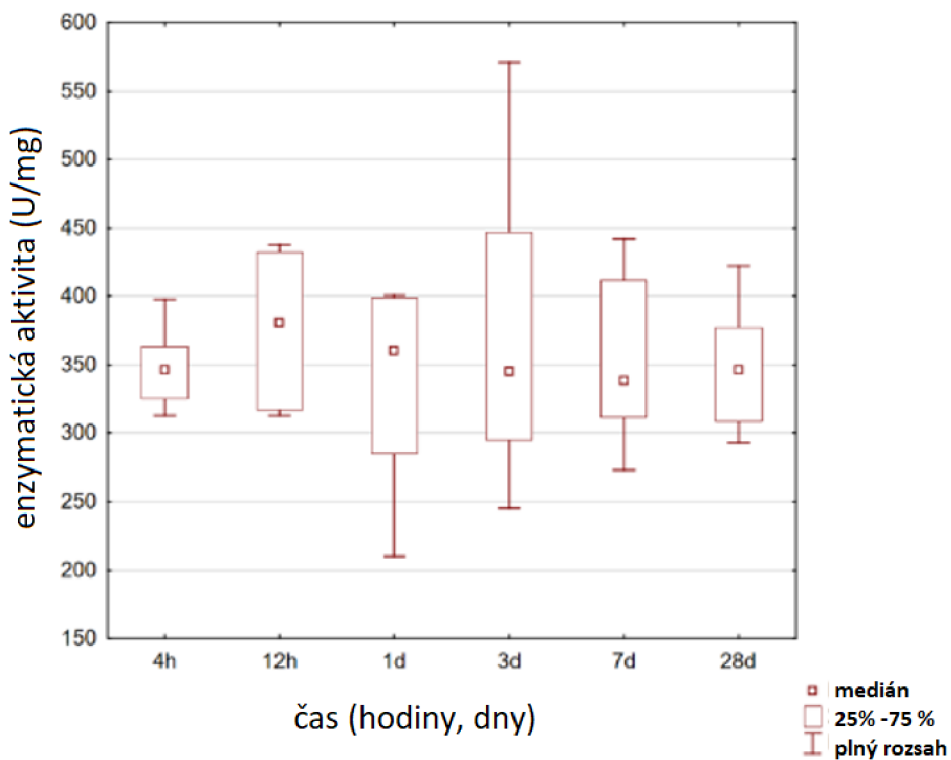
5.4 Enzymatická aktivita

Průměrné hodnoty lakázy a MnOxidázy jsou uvedeny v tabulce č. 12 a jejich statistiky v grafech na obr. č. 9 (enzymatická aktivita v čase) a obr. č. 10 (enzymatická aktivita v různých půdních typech).

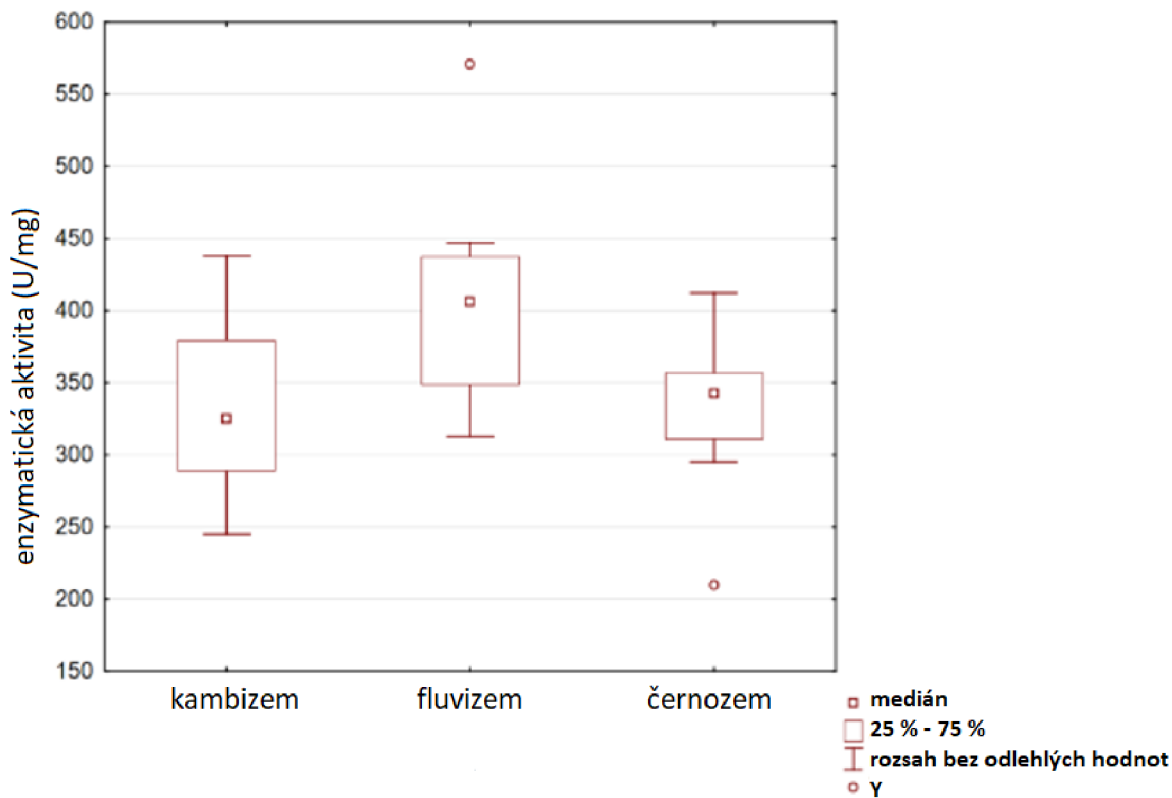
čas	Lakáza			Mn-oxidázy			medián pro čas
	kambizem	fluvizem	černozem	kambizem	fluvizem	černozem	
4 h	398	363	345	325	313	348	347
12 h	350	411	313	438	432	317	380
24 h	285	377	210	399	401	344	360
3 d	245	447	365	325	571	295	345
7 d	273	442	412	312	335	342	339
28 d	361	422	309	293	332	377	346
Medián enzymů v půdě	317	417	329	325	368	343	
Medián celkem	kambizem 325		fluvizem 406		černozem 343		

Tab. č. 12: Všechny naměřené hodnoty enzymatické aktivity po všechny tři půdní typy – kambizem, fluvizem a černozem. Ve spodní části tabulky jsou uvedeny mediány hodnot enzymatické aktivity pro různé půdní typy. V pravé části tabulky jsou uvedeny mediány hodnot enzymatické aktivity pro časová měření. Hodnoty v tabulce sloužily k vytvoření grafů zobrazených na obr. č. 9. a č. 10.

Hodnoty časových mediánů (z tabulky č. 12) ukazují, že enzymatická aktivita probíhala po celou dobu experimentu, přičemž nejvyšší mediány byly v měření po 12 hodinách a poté po 24 hodinách, nejnižší po 7 dnech a všechny ostatní měly prakticky stejné hodnoty. Bližší pohled na data poskytuje obr. č. 9, z něhož je patrné, že po 4 hodinách se vyskytovaly blízké hodnoty ve všech třech půdách. Do 12 h se aktivita obecně zvýšila (hodnoty přes 400 U/mg) a data byla variabilnější; po 12 h začal probíhat patrný pokles, stále ale s obecně dostatečně vysokými hodnotami, ale také s nejnižší naměřenou hodnotou (210 U/mg pro lakázu v černozemi); následovala nejvyšší hodnota v pokusu ve 3. dni (571 U/mg pro Mn-enzymy ve fluvizemi). V období od 12 hodin do 3 dní došlo k nejintenzivnějším změnám v celém pokusu, o čemž svědčí největší rozpětí hodnot (od nejnižších po nejvyšší v pokusu). Den 7 měl některé vysoké hodnoty (v řádu 400 U/mg), které pozitivně zkreslovaly graf, ačkoli jeho medián byl nejnižší. Klesající trend pokračoval i 28. den, kdy byly celkové hodnoty nižší než v předchozím období, ale byly kompaktněji rozložené a dostatečně vysoké, aby měly ve výsledku vyšší medián.



Obr. č. 9.: Grafické zobrazení enzymatické aktivity v půdním prostředí zobrazená v průběhu času. Vytvořeno v programu Statistica při použití dat uvedených v tabulce č. 12.

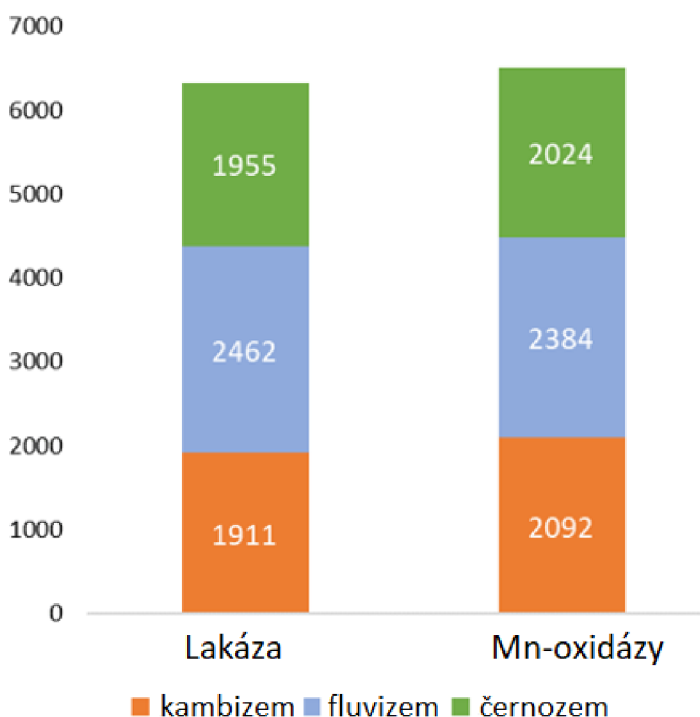


Obr. č. 10.: Grafické zobrazení enzymatické aktivity v půdním prostředí v závislosti na půdním typu. Vytvořeno v programu Statistica při použití dat uvedených v tabulce č. 12.

Rozdíly hodnot v čase byly způsobeny důsledkem rozdílů jak v chování jednotlivých půd, tak i v chování jednotlivých enzymů v daných půdách. Obrázek č. 9 shrnuje celkové hodnoty jednotlivých enzymů v jednotlivých půdách a obrázku č. 10 byl vytvořen pro zvýraznění rozdílů v půdách.

Černozem měla nejkompaktnější hodnoty, většinou v rozmezí 300 U/mg, ale také nejnižší naměřenou hodnotu (210 U/mg pro lakázu, v grafu na obrázku č. 10 je tato hodnota zobrazená jako odlehlá). U kambizemě byly výsledné hodnoty rozprostřené od 200 do 400 U/mg s větší variabilitou hodnot. Fluvizem měla nejvyšší celkové hodnoty, většinou okolo 400 U/mg a jednu vysokou hodnotu (571 u/mg) pro Mn-enzymy (je zobrazená jako odlehlá hodnota v grafu na obr č. 10).

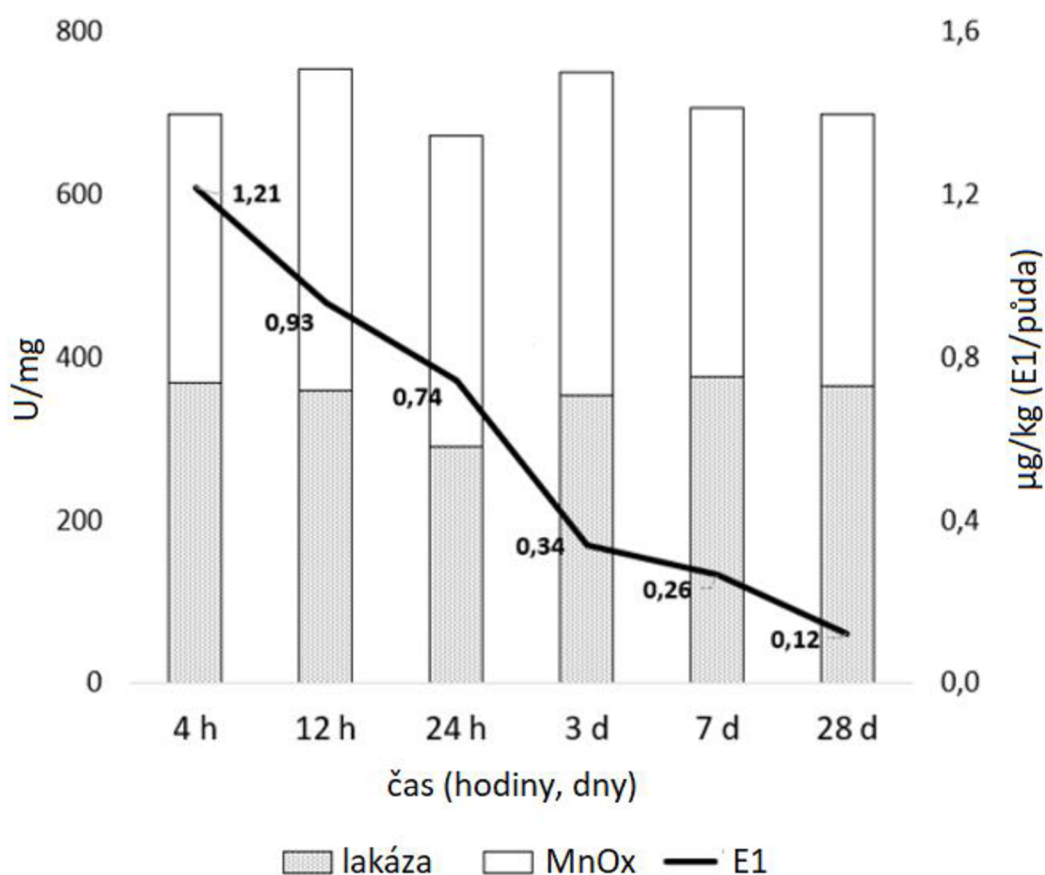
Z obr. č. 11 je patrné, že Mn-enzymy měly vyšší aktivitu než lakáza a byly více zastoupeny v kambizemi a černozemi. Fluvizemě měly naopak nižší aktivitu MnOxidasy než lakázy, ale celkově nejvyšší (4846 jednotek). Kambizem a černozem měly velmi blízké hodnoty (4003 a 3979 jednotek).



Obr. č. 11.: enzymatická aktivita lakázy a Mn-Oxidáz zobrazená pro tři půdní typy. Jednotky udávají výši enzymatické aktivity (nejvyšší enzymatickou aktivitu vykazoval půdní typ fluvizem s celkovým počtem 4846 jednotek).

5.5 Korelace enzymatické aktivity a přítomnosti estronu

Procentuální zastoupení estronu v půdě (E1%) se od začátku do konce experimentu snižovalo. Z počátečních 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (50 μg estronu/1 kg půdy) zůstalo již po 4 hodinách v průměru 1,21. Ve 12 h byla koncentrace 0,93 a enzymatická aktivita vyšší. Po 24 h však, ačkoli koncentrace E1 stále klesala, klesala i enzymatická aktivita, ale opět se zvýšila po 3 dnech, kdy byla nejvyšší, což souviselo s nejprudším poklesem přítomnosti E1 v půdě. Do 28 dnů pak dosáhla průměrné hodnoty 0,12 (ale mediánu 0,05). Pokud jde o enzymy, zdá se, že došlo k rovnoměrnému rozdělení. Lakáza byla více přítomna ve 4 h, pak ji další tři dny předstihla MnOxidáza, zatímco na konci pokusu byla opět výraznější lakáza.



Obr. č. 12.: Grafické zobrazení korelace enzymatické aktivity a přítomnosti estronu v čase. Lze pozorovat kontinuální snižování estronu v průběhu času, zatímco rozdělení enzymatické aktivity je rovnoměrné. Vytvořeno v programu Statistica.

5.6 Porovnání výsledných hodnot všech tří půdních typů

Obr. 13, tabulka č. 13 (níže) a tabulka č. 12 (výše) pomáhají shrnout a vysvětlit výsledné hodnoty obsahu estronu v půdě a enzymatické aktivity ve všech třech sledovaných půdních typech. Všechny tři vykazují obecně vyšší pokles hodnot estronu do 3. dne pokusu, poté mírnější pokles až do konce pokusu. Kambizem byla určena jako nejstálejší v těchto změnách. Podrobné porovnání chování sledovaných půd při trvání pokusu je popsáno v následujících odstavcích.

U kambizemě byla sledována velmi konstantní změna koncentrace estronu a 28. den dosáhla velmi nízkých hodnot (0,06). Po 4 hodinách bylo naměřeno 1,25 estronu a také nejvyšší enzymatická aktivita (398 pro lakázu a 438 pro MnOxidázu). To naznačuje, že v této půdě došlo nejen k rychlé počáteční adsorpci (jak se očekávalo), ale také byla přítomna snadno dostupná mikrobiální společenstva (využitá pro rozklad) se snadným přístupem k imobilizovanému estronu (vysvětluje se to její písčitéjší strukturou ve srovnání s ostatními půdami, která umožnila přístup organismů k estronu). Enzymatická aktivita po následující dny kontinuálně klesala, stejně jako koncentrace estronu, což naznačuje, že s postupujícím časem mikroorganismy pokračovaly v degradaci dostupného estronu, ale ten se také dále adsorboval. Na konci pokusu se enzymatická aktivita začala opět zvyšovat, přičemž hodnota lakázy 28. den byla 361 oproti hodnotě 273, která byla naměřena 7. den. To naznačuje, že se estron mohl začít částečně desorbovat, a tedy být opět k dispozici pro biodegradaci.

Fluvizem začínala s nejnižší dostupností estronu (po 4 hodinách hodnota 0,98), ale také s nejnižší enzymatickou aktivitou, což znamená, že tato půda měla rychlejší a lepší sorpci než ostatní půdy, ale žádné mikroorganismy se nepřipravily na rozklad sorbovaného estronu. Vyšší sorpci lze vysvětlit nejvyšší koncentrací uhlíku, kterou tato půda měla ve srovnání s ostatními dvěma, což mělo za následek vyšší hydrofobnost půdy. Dalším výsledkem toho, že tato půda měla nejvyšší koncentrace živin (C:N a C:N:P), bylo, že se její mikrobiální společenstvo rychle přizpůsobilo přítomnosti estronu a do 3. dne vykazovalo nejvyšší mikrobiální (447 pro lakázu a 571 pro MnOxidázu). Tento nárůst koreloval s nejrychlejším poklesem koncentrace mezi 24 hodinami a 3. dnem, což ukazuje, že původně sorbovaný estron byl nyní degradován novými společenstvy. Na konci pokusu měla fluvizem nejvyšší zbytkovou koncentraci (0,26), což lze vysvětlit její jílovitou strukturou: v porovnání s ostatními byla u fluvizemě určena textura s nejmenším objemem mikropórů, podle čehož bylo určeno, že pomalá sorpční fáze byla nejdelší, a to umožnilo mikrobiálním společenstvům obnovit svou aktivitu více, než tomu bylo u kambizemě: fluvizem dosahovala hodnot 422 pro lakázu a 332 pro MnOxidázu ve srovnání s kambizemí s 361 pro lakázu a 293 pro MnOxidázu ve 28. dni.

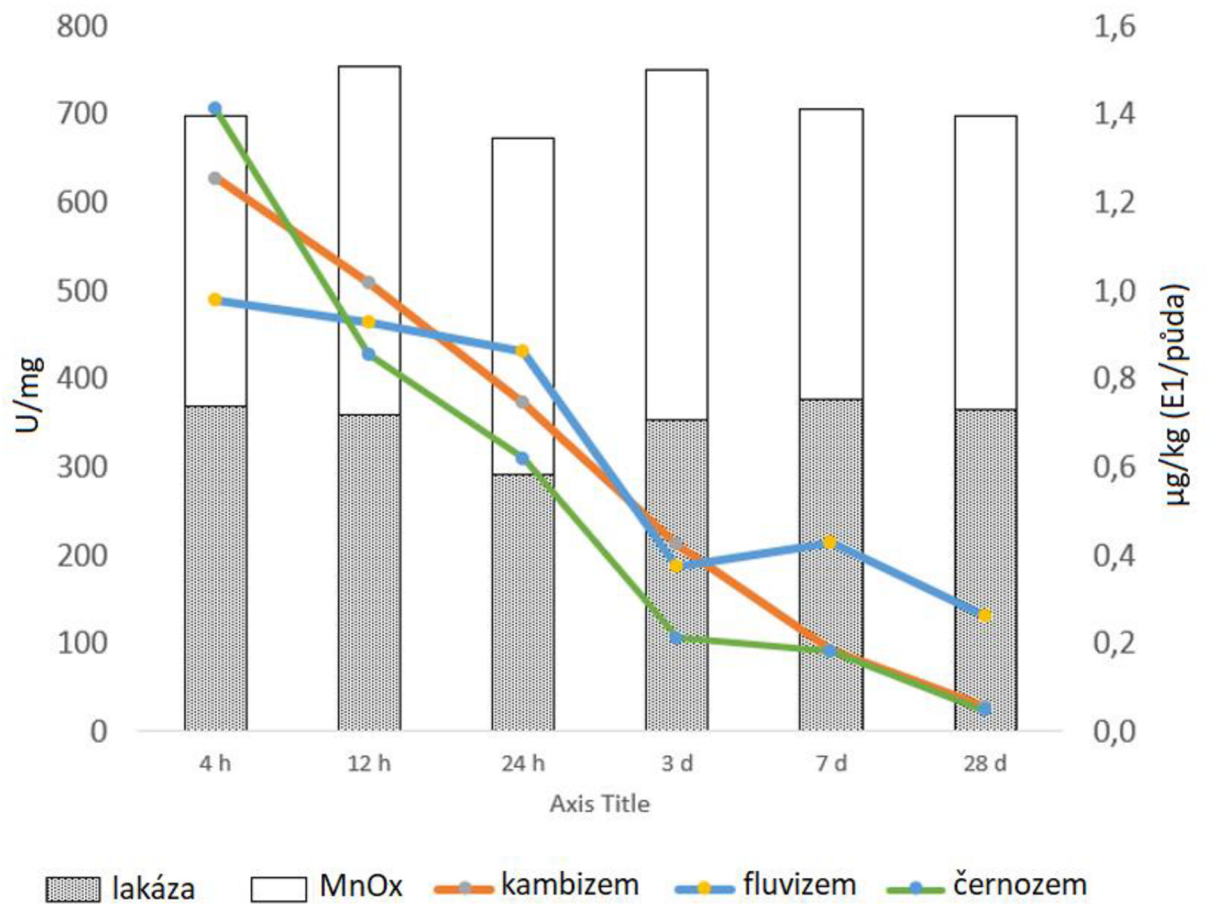
Černozem, ačkoli má většinu půdních vlastností společných s kambizemí, se chovala odlišně. Jílovitá struktura zajišťovala zpočátku rychlou sorpci (přes velké póry) a byla zde dobrá mikrobiální aktivita (344 lakáza a 348 MnOxidázy po 4 h) podpořená dobrým zastoupením živin (C:N:P 12:4, K, Mg, Ca atd.). Na rozdíl od ostatních půd se však u černozemě změny mezi po sobě jdoucími odběry pravidelně měnily, po vzestupech

následovaly poklesy, což mohlo být způsobeno spíše enzymatickou aktivitou než půdními vlastnostmi. Procentuálně (výpočty na základě výsledků pro černoze v tab. č. 10), začínají změny vysoko, s poklesem 40 % mezi 4h a 12h, pouze 27 % mezi 12h a 24h, 66 % do 3 dnů. Procentuálně nejnižší pokles (14 %) mezi 3 a 7 dny a největší (72 %) mezi 7. a 28. dnem. V korelaci s enzymatickou aktivitou bylo zjištěno, že při počátečním poklesu koncentrace estronu (4 h až 12 h) docházelo také k pomalému poklesu enzymatické aktivity, což naznačuje, že estron byl sice degradován, ale hlavně sorbován do půdy. Mezi 12 a 24 hodinami se aktivita zvýšila (u MnOxidáz) a koncentrace klesala méně, což by mohlo znamenat, že estron byl převážně degradován. Pokles estronu o 66 % mezi 24 h a 3. dnem odpovídá nejnižší aktivitě v černozi, proto se jako nejpravděpodobnější jeví vysoká sorpce místo enzymatické aktivity. Od 3. do 7. dne se estron stával opět více dostupným mikroorganismům, protože se začínala zvyšovat jejich aktivita. Největší pokles koncentrace estronu mezi 7. a 28. dnem spolu s nejvyšší enzymatickou aktivitou naznačuje, že estron byl nyní z větší části degradován. Tato dostupnost by mohla být způsobena větší desorpcí estronu ke konci pokusu, ale také specifitějším mikrobiálním společenstvím přizpůsobeným estronu, které se nyní konečně vytvořilo a mělo k estronu přístup (struktura černoze byla jílovitá, tedy velké póry, které umožňovaly přístup mikroorganismů k zachycenému estronu).

Kambizem							
	4h	12h	24h	3d	7d	28d	medián
E1	1.25					0.06	0.61
lakáza	398			245			318
MnOxidázy		438				293	349
Fluvizem							
	4h	12h	24h	3d	7d	28d	medián
E1	0.98					0.26	0.64
lakáza	363			447			417
MnOxidázy	313			571			368
Černoze							
	4h	12h	24h	3d	7d	28d	medián
E1	1.41					0.05	0.41
lakáza			210		412		329
MnOxidázy				295		377	343

Tab. č. 13.: Minimální, maximální a mediánové hodnoty koncentrací E1 a enzymatické aktivity ve třech typech půdních typů – srovnání pro zobrazení korelace mezi dostupností E1 a aktivitou enzymů.

Pro přehlednost bylo podle výsledných hodnot v tabulce č. 13 vytvořeno grafické znázornění zobrazené na obrázku č. 13.



Obr. č. 13.: – enzymatická aktivita a přítomnost koncentrací estronu v půdních typech (jejich porovnání). Vytvořeno podle dat zobrazených v tab. č. 13 v programu Statistica.

6 Diskuze

Odstraňování steroidních hormonů jako půdních kontaminantů většinou probíhá s využitím sorpce a desorpce (Caron et al. 2010), následně biodegradací a dokonce fototransformací (Loffredo, 2006). Sorpční izoterma je obecně v prvních 24 hodinách lineární, poté se stává nelineární, kdy se může střídát sorpce a desorpce (Kim et al., 2016), a po 3 dnech dosahuje zdánlivé sorpční rovnováhy, a končí stárnutím kontaminantu v půdě v dlouhodobém horizontu, kdy je sorpce téměř nevratná. Proces je ovlivňován vlastnostmi půdy, parametry prostředí a molekulární strukturou sloučeniny (Flogeac et al., 2005). Relevantní vlastnosti půdy jsou: pH, výměnná kationová kapacita, textura půdy, objem mikropórů a povrch půdy a její hydrofobicita (Drahorad et al., 2020), půdní organický uhlík (Yu et al., 2004) a organická hmota (Durán-Álvarez et al. 2004). V diplomové práci bylo potvrzeno, že tyto půdní vlastnosti zároveň s hodnotou koncentrace estronu použitého v inkubačním pokusu opravdu ovlivňují degradaci léto látky pomocí mikroorganismů.

Molekulární struktura a její funkční skupiny určují vazby, které sloučenina vytváří s půdními částicemi. V případě estronu jsou funkčními skupinami hydroxyl (-OH) a keton (=O), které tvoří vodíkové a π - π vazby (Takigami et al. 2011). U steroidních hormonů existují dva typy sorpce: rychlá a pomalá. Ty jsou určeny mechanismem sorpce: hydrofobní interakcí (rychlá sorpce) a vyplněním mikropórů (pomalá sorpce). Rychlá sorpce probíhá ve fázi lineární izotermy a je dána hydrofobností půdy. Jelikož je estron hydrofobní molekula (všechny steroidní hormony jsou hydrofobní) a půda obecně také, tak po příchodu estronu do půdy dochází k rychlé interakci s jejími částicemi. To je důvodem, proč je sorpce rychlá. Hydrofobicita půdy pozitivně koreluje zaprvé s množstvím organického půdního uhlíku (Caron et al. 2010) a organického materiálu (Drahorad et al. 2020); a zadruhé s povrchem půdy, kde se nachází alkylový a aromatický uhlík. Větší množství alkylového C (oproti aromatickému C) zvyšuje hydrofobicitu (Wang et al. 2011). Pomalá sorpce přichází po rychlé v nelineární fázi, kdy sorpce probíhá prostřednictvím zaplnění mikropórů (s menším objemem), ale může docházet i k desorpci. V této fázi dochází k redukci mobilního estronu a k jeho akumulaci v půdě.

Dostupnost estronu v půdě je důležitá pro aktivitu mikrobiomu, proto je sorpce jedním z hlavních faktorů, které ji ovlivňují. Obecně se má za to, že nízká dostupnost snižuje mikrobiální aktivitu (Lee et al. 2009). Tato nízká dostupnost však může být způsobena zaprvé nedostupností estronu, vysokou v nelineární fázi, kdy mikroorganismy nemohou proniknout do malých mikropórů, kde je estron imobilizován, nebo zadruhé pokročilou degradací estronu, jak se experiment blíží k pozdějším fázím (protože estron je v prostředí degradován velmi rychle, v řádu hodin až několika dní). Mikrobiální aktivita však nezávisí pouze na dostupnosti estronu, ale také na adaptabilitě mikrobiálního společenstva, proto se může stát, že v některých prostředích jsou společenstva připravená již od počátku, zatímco jiná potřebují určitý čas, aby se jejich mikroorganismy adaptovaly na nový zdroj potravy. Dále mikroorganismy potřebují pro svůj životní cyklus také půdní živiny, proto je pro dobrou mikrobiální aktivitu pozitivní dobré množství půdních živin (Pratush et al. 2020). Z tohoto důvodu bylo v diplomové práci vyvozeno, že rozdíly v enzymatickém chování byly

způsobeny různými mikrobiálními společenstvy a jejich adaptačními mechanismy, jelikož jediným zdrojem uhlíku pro mikroorganismy byl estron.

7 Závěr

V této diplomové práci byly uskutečněny inkubační pokusy, které byly prováděny na třech půdních typech. V modelovém inkubačním pokusu byla popsána sorpce a degradace estronu v půdě v závislosti na koncentraci hormonálních látek, půdních vlastnostech a aktivitě půdních mikroorganismů, což bylo zároveň cílem práce. Tyto testy mobility a odstranění estronu ukázaly, že typ půdní matrice hraje svou roli v tom, jakým způsobem mobilita a degradace estronu probíhá. Cíl práce byl tedy splněný a zároveň byla potvrzena hypotéza, která předpokládala, že půdní mikroorganismy degradují rezidua hormonálních látek v půdě v závislosti na jejich koncentraci a půdních vlastnostech. Je tedy užitečné vědět, s jakými půdními typy v podobných pokusech pracujeme, jelikož v nich, i přes podobné vlastnosti, jsou rozdíly.

Všechny tři půdy vykazovaly dobrou enzymatickou aktivitu a rozkládaly estron, i když žádná z nich ho během 28 dnů nerozložila úplně. Koncentrace estronu klesala v prvních 24 hodinách obecně lineárně a poté měla mezi 24 hodinami a 3. dnem pokles, který koreloval s nejintenzivnější enzymatickou aktivitou: od nejnižších maximálních hodnot (lakáza, 210 v černozemi ve 24 hodinách) po nejvyšší maximální hodnoty (MnOxidázy, 570 ve fluvizemi ve 3. dni). Po 3. dni byly změny estronu nepravidelné, končily celkovým průměrem 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ půdy a enzymatickou aktivitou blízkou hodnotám ze začátku pokusu (4 h). Fluvizem zůstala s nejvyšší koncentrací estronu, 0,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, přestože měla nejvyšší enzymatickou aktivitu. Toto chování naznačuje, že v mobilitě estronu hrála významnější roli půdní textura než enzymatická aktivita: fluvizem měla jílovitou strukturu, která zajišťovala vyšší a rychlejší sorpci (hydrofobnější než ostatní dvě půdy), ale její menší objem mikropórů ve srovnání s jílovitou a písčitou půdou černozemí, resp. kambizemí, neumožňoval mikroorganismům přístup k imobilizovanému estronu. Kambizem a černozem se chovaly podobně (vzhledem ke srovnatelným půdním vlastnostem) a měly dobrou míru odstranění estronu, zůstalo jen 0,06, resp. 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Jejich enzymatická aktivita se nicméně lišila, přičemž kambizem byla nejaktivnější v prvních hodinách (4 h), zatímco u černozemě byl její vrchol mezi 7. a 28. dnem. Závěrem lze říci, že všechny tři půdy by byly dobré při bioremediaci estronu, zejména pokud by jejich textura směřovala k hrubšímu materiálu. Pokud by fluvizem měla písčitéjší strukturu, byla by v odstraňování estronu nejlepší. Jako takové byly v tomto výzkumu účinnější kambizem a černozem.

8 Literatura

- Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR, Fraser LR. 2003. 17 β -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Human Reproduction*, **18(1)**: 100-107.
- Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Gray LE. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β -trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, **22(6)**: 1350-1360.
- Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. 1998. Endocrine-modulating substances in the environment: estrogenic effects of pharmaceutical products. *International Journal of Toxicology*, **17(2)**: 139-158.
- Arukwe A, Grotmol T, Haugen TB, Knudsen FR, Goksøyr A. 1999. Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Science of the total environment*, **236(1-3)**: 153-161.
- Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsén H, Mayer I, Dimberg K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology*, **53(2)**: 139-152.
- Björlenius B, Wahlberg C. 2006. Drugs and the flow of the substances they contain. Pages 21-38 in *Environment and Pharmaceuticals*. Apoteket AB, Stockholm.
- Burnison, BK, Hartmann, A., Lister, A., Servos, M. R., Ternes, T., & Van Der Kraak, G. (2003). A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, **22(10)**, 2243-2250.
- Caron E, Farenhorst A, Zvomuya F, Gaultier J, Rank N, Goddard T, Sheedy C, 2010. Sorption of four estrogens by surface soils from 41 cultivated fields in Alberta, Canada. *Geoderma*, **155(1-2)**: 19-30.
- Castensson S, Gunnarsson B. 2006. Drugs and the flow of the substances they contain. Pages 7-18 in *Environment and Pharmaceuticals*. Apoteket AB, Stockholm.
- Colucci MS, Bork H, Topp E. 2001. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality*, **30(6)**: 2070-2076.
- Čonková E, Laciakova A, Kováč G, Seidel H. 2003. Fusarial toxins and their role in animal diseases. *The veterinary journal*, **165(3)**: 214-220.
- Das, BS, Lee LS, Rao PSC, Hultgren RP. 2004. Sorption and degradation of steroid hormones in soils during transport: Column studies and model evaluation. *Environmental science & technology*, **38(5)**: 1460-1470.

Drahorad SL, Jehn FU, Ellerbrock RH, Siemens J, Felix-Henningsen P. 2020. Soil organic matter content and its aliphatic character define the hydrophobicity of biocrusts in different successional stages. *Ecohydrology*, **13(6)**: 2232.

Durán-Álvarez JC, Prado B, Ferroud A, Juayerk N, Jiménez-Cisneros B. 2014. Sorption, desorption and displacement of ibuprofen, estrone, and 17 β estradiol in wastewater irrigated and rainfed agricultural soils. *Science of the Total Environment*, **473**: 189-198.

Elser JJ, Hamilton A. 2007. Stoichiometry and the new biology: the future is now. *PLoS biology*, **5(7)**, e181.

Finlay-Moore, O., Hartel, P. G., & Cabrera, M. L. (2000). *17 β -estradiol and testosterone in soil and runoff from grasslands amended with broiler litter* (Vol. 29, No. 5, pp. 1604-1611). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.

Flogeac, K., Guillon, E. and Aplincourt, M., 2005. Adsorption of several metal ions onto a model soil sample: Equilibrium and EPR studies. *Journal of colloid and interface science*, **286(2)**, pp.596-601.

Gorshkov, S., Gorshkova, G., Knibb, W., & Gordin, H. (1999). Sex ratios and growth performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared in mariculture in Eilat (Red Sea). *Israeli Journal of Aquaculture*, **51(3)**, 91-105.

Hanselman, T. A., Graetz, D. A., & Wilkie, A. C. (2003). Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environmental science & technology*, **37(24)**, 5471-5478.

Grebe, S. K., & Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here?. *The Clinical biochemist reviews*, **32(1)**, 5.

Haws, N. W. (2003). *Integrated flow and transport processes in subsurface-drained agricultural fields* (Doctoral dissertation, Purdue University).

Haws, N. W., Das, B. S., & Rao, P. S. C. (2004). Dual-domain solute transfer and transport processes: evaluation in batch and transport experiments. *Journal of contaminant hydrology*, **75(3-4)**, 257-280.

Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Meeker, L. R., & Doerge, D. R. (2005). Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, **825(2)**, 134-143.

Jacobsen, A. M., Lorenzen, A., Chapman, R., & Topp, E. (2005). Persistence of testosterone and 17 β -estradiol in soils receiving swine manure or municipal biosolids. *Journal of environmental quality*, **34(3)**, 861-871.

Kim, E., Jung, C., Han, J., Her, N., Park, C. M., Jang, M., ... & Yoon, Y. (2016). Sorptive removal of selected emerging contaminants using biochar in aqueous solution. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **36**, 364-371.

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 US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, *36*(6), 1202-1211.

Lange, I. G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., & Meyer, H. H. (2002). Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica chimica acta*, *473*(1-2), 27-37.

Lee LS, Strock TJ, Sarmah, A. K., & Rao, P. S. C. (2003). Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment. *Environmental Science & Technology*, *37*(18), 4098-4105.

Lee LS, Carmosini N, Sassman SA, Dion HM, Sepúlveda MS. 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality. *Advances of Agronomy* **93**:1-68

Lee, S., Pardue, J.H., Moe, W.M. and Kim, D.J., 2009. Effect of sorption and desorption-resistance on biodegradation of chlorobenzene in two wetland soils. *Journal of Hazardous Materials*, **161**(1): 492-498.

Loffredo E. and Senesi, N., **2006**. Fate of anthropogenic organic pollutants in soils with emphasis on adsorption/desorption processes of endocrine disruptor compounds. *Pure and applied chemistry*, **78**(5): 947-961.

Lorenzen, A., Hendel, J. G., Conn, K. L., Bittman, S., Kwabiah, A. B., Lazarovitz, G., ... & Topp, E. (2004). Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. *Environmental Toxicology: An International Journal*, **19**(3): 216-225.

McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine reviews*, **22**(3): 319-341.

Nagel, S. C., Vom Saal, F. S., & Welshons, W. V. (1998). The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **217**(3): 300-309.

Nichols, D. J., Daniel, T. C., Moore Jr, P. A., Edwards, D. R., & Pote, D. H. (1997). *Runoff of estrogen hormone 17β-estradiol from poultry litter applied to pasture*, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. **26**: 1002-1006.

Oberdorster E, Cheek A. 2001. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, **20**(1): 23-36.

Orlando, E. F., Kolok, A. S., Binzcik, G. A., Gates, J. L., Horton, M. K., Lambright, C. S., ... & Guillette Jr, L. J. (2004). Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an

aquatic sentinel species, the fathead minnow. *Environmental health perspectives*, **112(3)**: 353-358.

Örn, S., Yamani, S., & Norrgren, L. (2006). Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 α -ethinylestradiol and 17 β -trenbolone. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **51(2)**: 237-243.

Panter GH, Thompson RS, Sumpter JP. 2000. Intermittent exposure of fish to estradiol. *Environmental science & technology*, **34(13)**: 2756-2760.

Pratish, A., Ye, X., Yang, Q., Kan, J., Peng, T., Wang, H., ... & Hu, Z. (2020). Biotransformation strategies for steroid estrogen and androgen pollution. *Applied microbiology and biotechnology*, **104**: 2385-2409.

Raman, D. R., Williams, E. L., Layton, A. C., Burns, R. T., Easter, J. P., Daugherty, A. S., ... & Sayler, G. S. (2004). Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environmental Science & Technology*, **38(13)**: 3567-3573.

Rurainski, R. D., Theiss, H. J., & Zimmermann, W. (1977). Occurrence of natural and synthetic estrogens in drinking water. *Gas-Wasserfach. Wasser-Abwasser*, **118**: 288-291.

Shore, L. S., Correll, D., & Chakroborty, P. K. (1995). Fertilization of fields with chicken manure is a source of estrogens in small streams. *Animal waste and the land-water interface*, 155-162.

Shore, L. S., & Shemesh, M. (2003). Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry*, **75(11-12)**: 1859-1871.

Shore, L. S., Reichmann, O., Shemesh, M., Wenzel, A., & Litaor, M. I. (2004). Washout of accumulated testosterone in a watershed. *Science of the Total Environment*, **332(1-3)**: 193-202.

Schiffer, B., Daxenberger, A., Meyer, K., & Meyer, H. H. (2001). The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environmental health perspectives*, **109(11)**: 1145-1151.

Schowanek, D., & Webb, S. (2002). Exposure simulation for pharmaceuticals in European surface waters with GREAT-ER. *Toxicology Letters*, **131(1-2)**: 39-50.

Song, M. K., & Choi, S. H. (2001). Growth promoters and their effects on beef production-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **14(1)**: 123-135.

Tyler, C., Jobling, S., & Sumpter, J. P. (1998). Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical reviews in toxicology*, **28(4)**: 319-361.

Takigami, H., Taniguchi, N., & Shimizu, Y. (2011). Sorption and desorption of 17 β -estradiol to natural sediment. *Water Science and Technology*, **64(7)**: 1473-1478.

- Tapiero, H., Ba, G. N., & Tew, K. D. (2002). Estrogens and environmental estrogens. *Biomedicine & pharmacotherapy*, **56(1)**: 36-44.
- Van der Merwe, P. J., Pieterse JW (1994). Stability of zeranol, nandrolone and trenbolone in bovine urine. *Analyst*, **119(12)**: 2651-2653
- Svenson, A., Allard, A. S., & Ek, M. (2003). Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Research*, **37(18)**: 4433-4443.
- Wang, X., Guo, X., Yang, Y., Tao, S., & Xing, B. (2011). Sorption mechanisms of phenanthrene, lindane, and atrazine with various humic acid fractions from a single soil sample. *Environmental science & technology*, **45(6)**: 2124-2130.
- Yu, Z., Xiao, B., Huang, W. and Peng, P.A., 2004. Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, **23(3)**: 531-539.
- Yuri, T., Nikaido, Y., Shimano, N., Uehara, N., Shikata, N., & Tsubura, A. (2004). Effects of prepubertal zeranol exposure on estrogen target organs and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *in vivo*, **18(6)**: 755-762.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

EDC – endokrinní disruptory

SBGH – globulin vázající hormony v séru

MGA – melengestrol acetát

TBA – trenbolonacetát

ČOV – čistírna odpadních vod

OC – organický uhlík

HPLC – vysokoučinná kapalinová chromatografie

LC/MS – Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

EC – elektrická konduktivita

E1 – estron

10 Samostatné přílohy



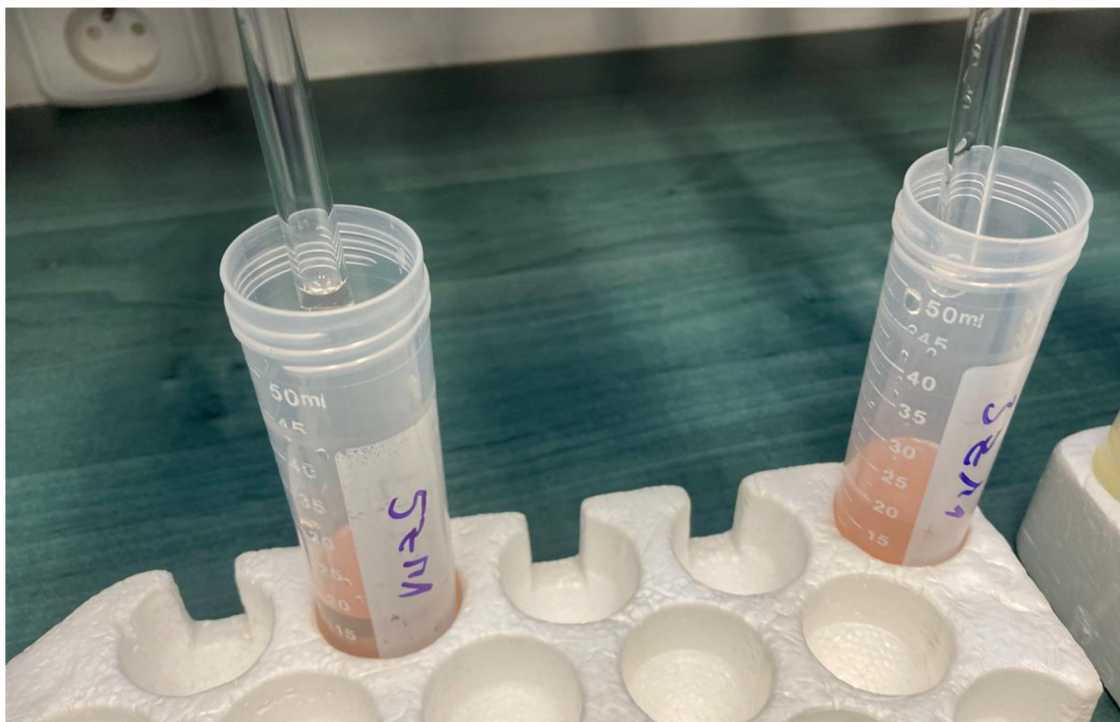
Obr. č. 1: Třepačka využívaná k promíslení půdních vzorků



Obr. č. 2: Filtrování vzorků a jejich shromažďování do zkumavek



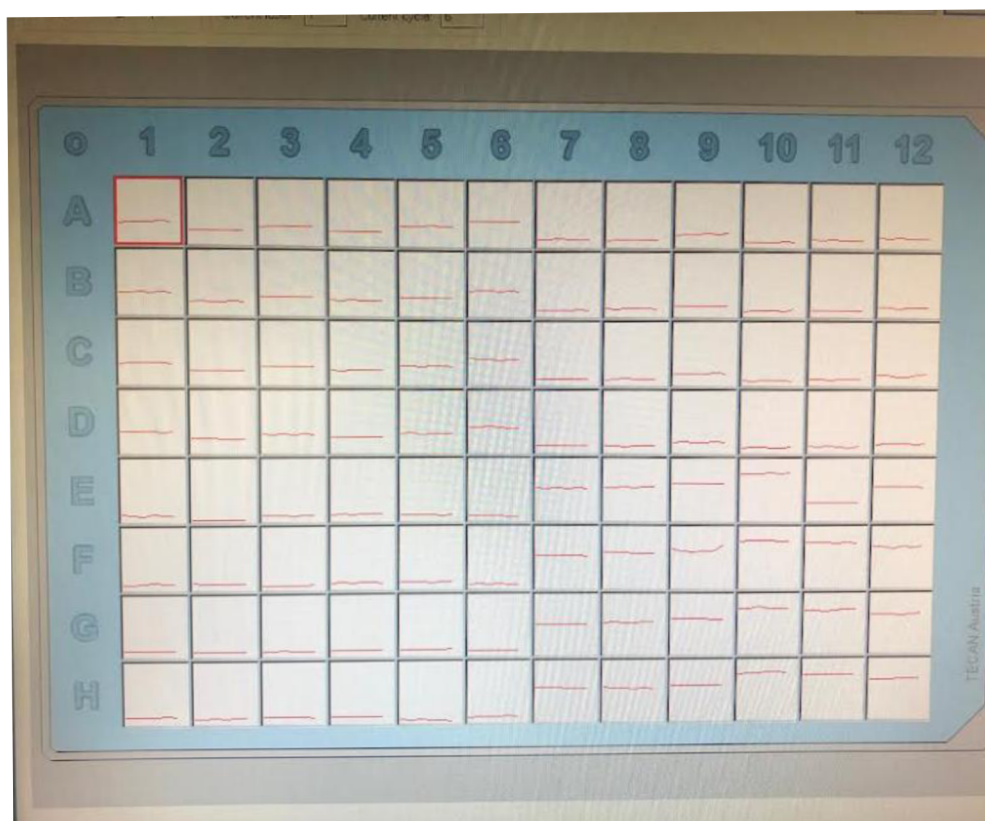
Obr. č. 3.: Bližší pohled na filtrační proces



Obr. č. 4.: Přefiltrovaný vzorek připravený k pipetování



Obr. č. 5.: shromážděné vzorky připravené k pipetování



Obr. č. 8: Výsledné grafické znázornění z přístroje Tecan, dále zpracované a vložené do samostatných tabulek.