

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Maja PLAHUTA

**STRUPENOST HORMONSKEGA MOTILCA BISFENOLA A PO  
FOTOLITSKI IN FOTOKATALITSKI OKSIDACIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**TOXICITY OF ENDOCRINE DISRUPTOR BISPHENOL A AFTER  
PHOTOLYTIC AND PHOTOCATALYTIC OXIDATION**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti. Vse analize so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v L05 Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Mihaela J. Tomana, za somentorico doc. dr. Tatjano Tišler ter za recenzentko prof. dr. Damjano Drobne.

Mentor: prof. dr. Mihael J. Toman

Somentorica: doc. dr. Tatjana Tišler

Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mihael J. TOMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Tatjana TIŠLER  
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za kemijo, biologijo in tehnologijo  
voda

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora: 9.1.2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Plahuta

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 504.5:615.9(043.2)=163.6  
KG Ekotoksikologija/estrogenska aktivnost/organska onesnažila/strupenost/hormonski motilci/bisfenol A/fotolitska oksidacija/fotokatalitska oksidacija/*Vibrio fischeri*/*Daphnia magna*/*Danio rerio*/test YES  
KK SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
AV PLAGUTA, Maja  
SA TOMAN, Mihael Jožef (mentor)/TIŠLER, Tatjana (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2012  
IN STRUPENOST HORMONSKEGA MOTILCA BISFENOLA A PO FOTOLITSKI IN FOTOKATALITSKI OKSIDACIJI  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 66 str., 8 pregl., 30 sl., 2 pril., 42 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen diplomskega dela je bil preveriti strupenost in estrogensko aktivnost organskega onesnažila bisfenola A (BPA) ter ugotoviti učinkovitost odstranjevanja BPA z naprednima oksidacijskima postopkoma, fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo. Odstranjevanje BPA iz izhodne raztopine s koncentracijo 20 mg/l je potekalo v dvo- oziroma trofaznem odprtem steklenem reaktorju, pri sobni temperaturi (20 °C), ob stalnem mešanju 600 rpm in stalnem prepihovanju z zrakom (pretok 300 ml/min). Med poskusi smo vzorce raztopine BPA osvetljevali s tremi različnimi žarnicami; halogensko žarnico in dvema UV žarnicama (17 W, 150 W). Pri fotokatalitski oksidaciji smo uporabljali dva katalizatorja in sicer TiO<sub>2</sub> P-25 (Degussa) ter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Strupenost BPA in vzorcev po odstranjevanju BPA smo testirali z akutnimi testi strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*), raki - vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) in zarodki rib cebric (*Danio rerio*). Estrogenost BPA in vzorcev po oksidaciji smo določali s preizkusom YES (Yeast Estrogen Screen assay), z gensko spremenjeno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati so pokazali, da je izhodna raztopina BPA strupena in estrogensko aktivna, z zmanjševanjem vsebnosti BPA pa sta se obe lastnosti zmanjšali. Strupenost in estrogenost vzorcev po fotolitski oksidaciji sta se zmanjšali sorazmerno s pretvorbo BPA, nista pa se zmanjšali pri vzorcih obdelanih s fotokatalitsko oksidacijo. Pri slednjih sta se v nekaterih primerih celo povečala, verjetno na račun stranskih produktov fotokatalitske oksidacije, ki so bolj strupeni in estrogensko aktivni kot sam BPA. Ugotovili smo, da so kemijske analize vzorcev po odstranjevanju BPA pokazale zmanjšanje BPA, vendar to ne zadostuje za dokaz, da snovi v vzorcih po čiščenju niso enako ali celo bolj strupene in estrogensko aktivne. Zato so za ugotavljanje učinkovitosti odstranjevanja BPA iz vode potrebni tudi biološki testi.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 504.5:615.9(043.2)=163.6  
CX Ecotoxicology/estrogenic activity/organic pollutants/toxicity/endocrine disruptors/bisphenol A/photolytic oxidation/photocatalytic oxidation/ *Vibrio fischeri*/*Daphnia magna*/*Danio rerio*/test YES  
CC SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
AU PLAHUTA, Maja  
AA TOMAN, Mihael Jožef (supervisor)/TIŠLER, Tatjana (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
PY 2012  
TI TOXICITY OF ENDOCRINE DISRUPTOR BISPHENOL A AFTER PHOTOLYTIC AND PHOTOCATALYTIC OXIDATION  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIII, 66 p., 8 tab., 30 fig., 2 ann., 42 ref.  
LA sl  
AL sl/an  
AB The purpose of this study was to examine the toxicity and estrogenic activity of an organic pollutant bisphenol A (BPA), and determine the efficiency of BPA removal by advanced oxidation processes of photolytic and photocatalytic oxidation. BPA removal from the initial solution with a concentration of 20 mg/l was conducted in two- or three phase open glass reactor at room temperature (20 °C), while stirring at 600 rpm and continuous purge with air (flow 300 ml/min). During the experiment, samples of BPA were illuminated with three different bulbs; halogen bulb and two UV lamps (17W, 150W). In the process of photocatalytic oxidation two catalysts were used; TiO<sub>2</sub> P-25 (Degussa) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Toxicity of BPA and treated samples were tested in acute toxicity tests with luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*), crustaceans water fleas (*Daphnia magna*) and fish embryos of zebrafish (*Danio rerio*). Estrogen activity of BPA and samples after oxidation were determined by Yeast Estrogen Screen (YES) assay with genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that the initial solution of BPA is toxic and estrogenic active, but after the reduction of BPA levels, during photolytic and photocatalytic oxidation, they both declined. Toxicity and estrogenicity of photolytically oxidized samples were reduced proportionally to the conversion of BPA, but did not decrease in samples treated by photocatalytic oxidation. In some photocatalytically treated samples the toxicity and estrogenicity even increased in comparison to the initial solution of BPA. The efficient removal of BPA from water by means of photolytic and photocatalytic oxidation was confirmed by chemical analysis, but this is no sufficient proof that toxicity and estrogenicity of tested compound were completely eliminated. For this reason, biological tests are required to verify the removal efficiency of investigated compound.



## KAZALO VSEBINE

str.

<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b> .....	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD)</b> .....	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine</b> .....	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Kazalo slik</b> .....	<b>IX</b>
<b>Kazalo prilog</b> .....	<b>XI</b>
<b>Okrajšave in simboli</b> .....	<b>XII</b>
<b>Slovarček</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Namen dela in hipoteze	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 Organska onesnažila	3
<b>2.1.1 Strupenost organskih onesnažil</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Estrogenost organskih onesnažil / hormonski motilci</b>	<b>3</b>
2.2 Bisfenol A (BPA)	5
<b>2.2.1 Strupenost BPA</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Estrogenost BPA</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3 Produkti razgradnje BPA</b>	<b>10</b>
2.3 Metode za določanje organskih onesnažil	10
<b>2.3.1 Kemijske metode za določanje prisotnosti organskih onesnažil</b>	<b>10</b>
<b>2.3.2 Metode za določanje prisotnosti strupenih snovi</b>	<b>11</b>
2.3.2.1 Test strupenosti z luminiscentnimi bakterijami ( <i>Vibrio fischeri</i> )	11
2.3.2.2 Test strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> )	13
2.3.2.3 Test strupenosti z ikrami rib cebric ( <i>Danio rerio</i> )	14
<b>2.3.3. Metode za določanje prisotnosti estrogensko aktivnih snovi</b>	<b>15</b>
2.3.2.4 Biološki test YES (Yeast Estrogen Screen)	17
2.4 Metode za odstranjevanje organskih onesnažil	17

<b>2.4.1</b>	<b>Napredni oksidacijski procesi (AOP)</b>	<b>17</b>
2.4.1.1	Fotolitska oksidacija	18
2.4.1.2	Fotokatalitska oksidacija	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>20</b>
3.1	Fotolitska oksidacija	20
3.2	Fotokatalitska oksidacija	20
3.3	Analiza s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)	20
3.4	Test strupenosti z luminiscentnimi bakterijami ( <i>Vibrio fischeri</i> )	21
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava BPA raztopine</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>21</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Izvedba testov</b>	<b>21</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Obdelava in vrednotenje rezultatov</b>	<b>22</b>
3.5	Test strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> )	23
<b>3.5.1</b>	<b>Priprava BPA raztopine</b>	<b>23</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>23</b>
3.5.2.1	Priprava ISO medija	23
3.5.2.2	Priprava M4 medija za gojenje vodnih bolh	23
3.5.2.3	Priprava razredčevalne vode (RV)	25
<b>3.5.3</b>	<b>Izvedba testov</b>	<b>26</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Obdelava in vrednotenje rezultatov</b>	<b>26</b>
3.6	Test strupenosti z zarodki cebric ( <i>Danio rerio</i> )	27
<b>3.6.1</b>	<b>Priprava BPA raztopine</b>	<b>27</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>27</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Izvedba testov</b>	<b>27</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Obdelava in vrednotenje rezultatov</b>	<b>29</b>
3.7	YES test	33
<b>3.7.1</b>	<b>Priprava BPA raztopine</b>	<b>33</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	<b>33</b>
3.7.2.1	Priprava minimalnega gojišča	33
3.7.2.2	Priprava rastnega gojišča	34
3.7.2.3	Priprava vzorcev za testiranje	35
<b>3.7.3</b>	<b>Izvedba testov</b>	<b>37</b>

<b>3.7.4</b>	<b>Obdelava in vrednotenje rezultatov</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>39</b>
4.1	Bisfenol A (BPA)	39
<b>4.1.1</b>	<b>Testi strupenosti</b>	<b>39</b>
4.1.1.1	Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami ( <i>Vibrio fischeri</i> )	39
4.1.1.2	Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> )	40
4.1.1.3	Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric ( <i>Danio rerio</i> )	40
<b>4.1.2</b>	<b>Primerjava občutljivosti testnih organizmov</b>	<b>44</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Test estrogenosti</b>	<b>45</b>
4.1.3.1	Test za določanje estrogenske aktivnosti (YES)	45
4.2	Vzorci po odstranjevanju BPA	46
<b>4.2.1</b>	<b>Vzorci po odstranjevanju BPA s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Testi strupenosti</b>	<b>48</b>
4.2.2.1	Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami ( <i>Vibrio fischeri</i> )	48
4.2.2.2	Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> )	50
4.2.2.3	Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric ( <i>Danio rerio</i> )	52
<b>4.2.3</b>	<b>Test estrogenosti</b>	<b>55</b>
4.2.3.1	Test za določanje estrogenske aktivnosti (YES)	55
<b>5</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>61</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Tabela 1: Rezultati strupenosti bisfenola A za dve vrsti alg (Staples, 1998).	7
Tabela 2: Rezultati testov strupenosti z vodnimi bolhami ( <i>Daphnia magna</i> ) (Staples, 1998).	8
Tabela 3: Testi strupenosti bisfenola A z ribami (Staples, 1998).	8
Tabela 4: Opazovani znaki razvoja zarodkov cebric po izpostavljenosti strupenim spojinam.	30
Tabela 5: Začetni volumni posameznih vzorcev dobljenih s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo naneseeni na kolone.	37
Tabela 6: Prikaz opaženih znakov na 10 zarodkih cebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 48 urni izpostavljenosti 20 mg/l BPA.	42
Tabela 7: Izračunane EC / IC / LC vrednosti za BPA za uporabljene testne organizme.	44
Tabela 8: Tipi reakcijskega medija, žarnic in katalizatorjev v poskusih fotolitske in fotokatalitske oksidacije ter učinkovitost pretvorbe BPA in ostanek BPA v posameznih vzorcih po končanem poskusu.	46

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Kemijska struktura bisfenola A.	5
Slika 2: Luminiscentna bakterija ( <i>Vibrio fischeri</i> ) ( <a href="http://www.pnas.org/content/102/8/2673/F2.large.jpg">http://www.pnas.org/content/102/8/2673/F2.large.jpg</a> ).	12
Slika 3: Vodna bolha ( <a href="http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Daphnia_magna-female_adult.jpg">http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Daphnia_magna-female_adult.jpg</a> ).	14
Slika 4: Cebrica ( <i>Danio rerio</i> ) ( <a href="http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Zebrafisch.jpg">http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Zebrafisch.jpg</a> ).	15
Slika 5: Stadiji razvoja zarodka cebric ( <i>Danio rerio</i> ) od 2 celičnega do 128 celičnega stadija.	28
Slika 6: 4 ure stara jajčeca rib cebric ( <i>Danio rerio</i> ).	28
Slika 7: Mikroplošča s 24 vdolbinami za akutni test strupenosti z zarodki cebric ( <a href="http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/img/prod/web_images/3047.jpg">http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/img/prod/web_images/3047.jpg</a> ).	29
Slika 8: 24 ur star normalno razvit zarodek cebrice ( <i>Danio rerio</i> ).	30
Slika 9: 48 ur star normalno razvit zarodek cebrice ( <i>Danio rerio</i> ).	31
Slika 10: Koaguliran zarodek cebrice.	31
Slika 11: Rep zarodka starega 48 ur ni ločen od rumenjaka.	32
Slika 12: Deformacija celega zarodka starega 48 ur.	32
Slika 13: 48 ur star zarodek brez pigmentacije telesa ter pigmentacije oči.	33
Slika 14: 48 ur zarodek z deformirano rumenjarkovo vrečo.	33
Slika 15: Primer vakuumskega razdelilnika pri ekstrakciji na trdni fazi (Empore, 1998).	36
Slika 16: Zaviranje luminiscence bakterij ( <i>Vibrio fischeri</i> ) v odvisnosti od koncentracije BPA.	39
Slika 17: Negibljive vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) v odvisnosti od koncentracije BPA.	40
Slika 18: Letalni učinki na zarodkih cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.	41
Slika 19: Subletalni učinki na zarodkih cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.	41

Slika 20: Normalno razviti zarodki cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.	43
Slika 21: Aktivnost $\beta$ -galaktozidaze po izpostavitvi različnim koncentracijam BPA v primerjavi z E2 (17 $\beta$ -estradiol), ki predstavlja pozitivno kontrolo, P (progesteron), ki predstavlja negativno kontrolo in B (blank), ki predstavlja ničelni vzorec.	45
Slika 22: Pretvorba BPA pod različnimi razmerami v odvisnosti od časa.	47
Slika 23: Zaviranje luminiscence bakterij ( <i>Vibrio fischeri</i> ) pri posameznih fotolitsko oziroma fotokatalitsko obdelanih vzorcih BPA.	48
Slika 24: Zaviranje luminiscence bakterij ( <i>Vibrio fischeri</i> ) v odvisnosti od ostanka BPA v posameznih vzorcih po fotolitski oziroma fotokatalitski oksidaciji.	49
Slika 25: Odstotek negibljivih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 h izpostavljenosti različnim vzorcem.	50
Slika 26: Od količine preostalega BPA v vzorcih po obdelavi odvisen odstotek negibljivih vodnih bolh.	51
Slika 27: Letalni učinki na zarodke cebric po 48 urni izpostavljenosti vzorcem po čiščenju s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.	52
Slika 28: Subletalni učinki na zarodke cebric po 48 urni izpostavljenosti vzorcem po čiščenju s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.	53
Slika 29: Intaktni zarodki rib cebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 48 urni izpostavitvi vzorcem obdelanih s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.	53
Slika 30: Relativna estrogenska aktivnost vzorcev po fotolitski/fotokatalitski obdelavi, izračunana glede na estrogensko aktivnost 20 mg/l BPA. BPA prikazuje estrogensko aktivnost 20 mg/l BPA, B pa predstavlja ničelni vzorec.	55

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati akutnih strupenostnih testov na BPA

Priloga B: Rezultati akutnih strupenostnih testov na vzorce po fotolitski in fotokatalitski oksidaciji

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOP	Advanced oxidation process (napredni oksidacijski postopki)
BPA	Bisfenol A
CPRG	Klorofenol rdeče $\beta$ -D-galaktopiranozid
E2	17 $\beta$ -estradiol
GC-MS	Gas chromatography – mass spectrometry (plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo)
hER	Humani estrogenski receptor
HPLC	High – Performance Liquid Chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
LC-MC	Liquid chromatography – mass spectrometry (tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo)
P	Progesteron
SPE	Ekstrakcija na trdni fazi
YES	Yeast estrogen screen (estrogenski test s kvasovkami)



## SLOVARČEK

**AKUTNI TEST STRUPENOSTI:** kratkotrajni test strupenosti, pri katerem spremljamo vplive kemikalij na testne organizme nekaj minut ali dni.

**EC** (effective concentration): koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči specifične odgovore pri določenem odstotku testnih organizmov (npr. 48 h EC<sub>50</sub> je koncentracija, ki v 48 urah povzroči merjen odziv pri 50 % izpostavljenih organizmov).

**IC** (inhibition concentration): koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči določen odstotek specifičnih odgovorov organizmov (npr. zaviranje encimske aktivnosti), glede na kontrolo (npr. 30 min IC<sub>50</sub> je koncentracija, ki povzroči 50 % zmanjšanje luminiscence luminiscentnih bakterij glede na kontrolo).

**LC** (lethal concentration): koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči smrtnost organizmov v izpostavljeni populaciji (npr. 48 h LC<sub>50</sub> je koncentracija, ki povzroči smrt 50 % izpostavljenih organizmov v 48 urah).

**KRONIČNI TEST STRUPENOSTI:** test strupenosti, v katerem so vključeni dolgotrajni dražljaji na organizem, ki lahko trajajo več tednov, odvisno od reproduktivnega cikla preiskovanega organizma.

**NOEC** (no observed effect concentration): najvišja koncentracija snovi, ki v določenem času ne povzroči statistično značilne spremembe merjenega odziva v organizmu v primerjavi s kontrolo.

## 1 UVOD

Rastoča populacija ljudi, urbanizacija in modernizacija vodijo v sproščanje strupenih organskih onesnažil v okolje, vključno z organskimi snovmi, ki povzročajo motnje v endokrinem sistemu živih bitij. Onesnaženje voda predstavlja velik problem svetovnih razsežnosti. Glavni vir onesnaženja predstavljajo sintetična organska onesnažila v komunalnih odplakah in industrijskih izpustih, različni pesticidi, ki se uporabljajo v kmetijstvu, izcedne vode, ki se iztekajo iz odlagališč itd.

Tradicionalno so bili problemi z odpadnimi vodami povezani predvsem z visoko vsebnostjo patogenih mikroorganizmov. Odpadne vode vsebujejo tudi širok spekter kemijskih onesnažil, ki jih je prav tako treba obravnavati zaradi njihovega škodljivega vpliva na zdravje ljudi in negativnih vplivov na okolje. Med različnimi skupinami kemijskih onesnažil, ki so pogosto prisotne v odpadnih vodah, so škodljivi učinki heterogene skupine hormonskih motilcev predvsem posledica njihove estrogenske aktivnosti.

Hormonski motilci so opredeljeni kot snovi, ki motijo endokrini sistem in fiziološke funkcije hormonov. Številni hormonski motilci, kot na primer industrijske kemikalije in kemikalije v vsakdanji rabi (npr. mehčala, zaviralci ognja in pesticidi), naravni ali sintetični hormoni ipd., dnevno odteka v površinske vode. Posledice prisotnosti teh snovi v vodnem okolju so še v veliki meri neznane, velik vpliv pa imajo na vodno favno saj povzročajo motnje v reprodukciji, feminizacijo rib in drugih vodnih organizmov v rekah, genetske mutacije in okvare v dednem materialu. Pojavljajo se tudi neželeni učinki v povezavi z zdravjem ljudi, to sta vse pogostejši pojav rakavih obolenj in zmanjšane reproduktivne sposobnosti moških (Miege, 2009 in Beck, 2006). Motilci endokrinega sistema predstavljajo nevarnost za okolje in zdravje ljudi, zato jih je treba določiti s kemijskimi ali biološkimi metodami in čim bolj učinkovito odstraniti iz okolja (Gómez, 2007).

Bisfenol A (BPA) je komercialno pomembna kemikalija, ki se primarno uporablja kot intermediat pri proizvodnji polikarbonatne plastike in epoksi smole, z ocenjeno svetovno proizvodnjo 3,7 milijonov ton na leto (Mihaich, 2009). Znano je, da se BPA sprošča v okolje z uporabo in izpusti iz proizvodnih in predelovalnih objektov in čistilnih naprav (Staples, 1998). Številne študije so proučevale odstranjevanje BPA iz vode z biološkimi

postopki, kemijskimi procesi in naprednimi oksidacijskimi postopki (AOP). Med slednje spadajo TiO<sub>2</sub> fotokataliza, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV kombinacija odstranjevanja BPA in Fentonova oksidacija (Rodrigues, 2010). Malo pa je raziskav, ki so proučevale in ugotovile strupenost in estrogensko aktivnost vzorcev po fotokatalitski oksidaciji (Chiang, 2004).

### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo preverjali strupenost in estrogensko aktivnost bisfenola A (BPA) ter ugotavljali, kako se strupenost in estrogenost po odstranitvi BPA z naprednima oksidacijskima postopkoma fotolitske ali fotokatalitske oksidacije, spremenita.

Odstranjevanje BPA iz vodne raztopine s fotolitsko oksidacijo smo izvedli v reaktorju z obsevanjem raztopine s svetlobo različnih valovnih dolžin (vidna svetloba, UV 254 nm, UV 365 nm). Proces fotokatalitske oksidacije je potekal po aktivaciji katalizatorja (TiO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) s svetlobo različnih valovnih dolžin.

Strupenost vzorcev smo ugotavljali s testi strupenosti z vodnimi organizmi iz različnih trofičnih nivojev. Izvedli smo test strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*), vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) ter zarodki rib cebric (*Danio rerio*). Estrogenost smo ugotavljali z biološkim testom YES, pri katerem smo uporabljali gensko spremenjeno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*.

Namen našega dela je bil z biološkimi testi ugotoviti strupenost in estrogensko aktivnost BPA ter vzorcev po odstranjevanju BPA s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo, ter med uporabljenimi metodami čiščenja BPA identificirati najbolj učinkovito metodo za odstranjevanje organskega onesnažila BPA iz vode.

V diplomski nalogi smo testirali naslednje hipoteze:

- BPA je strupen in estrogensko aktiven.
- Po odstranjevanju BPA se strupenost vzorcev zmanjša.
- Po odstranjevanju BPA se estrogenska aktivnost vzorcev zmanjša.
- Hitrejše in učinkovitejše odstranjevanje BPA bomo zaznali pri fotokatalitski oksidaciji.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 ORGANSKA ONESNAŽILA**

#### **2.1.1 Strupenost organskih onesnažil**

Različna organska onesnažila, kot na primer ftalati, policiklični aromatski ogljikovodiki, fenoli in onesnažila, ki vsebujejo dušik, se nahajajo v komunalnih odpadnih vodah.

Viri organskih onesnažil so različni. Mnoge strupene organske spojine izvirajo iz proizvodov, ki so v vsakdanji rabi, iz katerih se izločajo med uporabo ali na odlagališčih. K onesnaženju lahko prispevajo tudi padavinski odtoki s cest. Onesnažila v vodi imajo lahko strupene ali škodljive učinke na vodne organizme v onesnaženih vodah (Marttinen, 2003).

S povečanjem proizvodnje in intenzivne uporabe pesticidov v kmetijstvu, se je povečalo onesnaženje tal podzemnih in površinskih voda. Ostanki pesticidov dosežejo vodno okolje preko proizvodnih obratov z neposrednim površinskim odtekanjem, izpiranjem, itd. Strupene organske snovi v pesticidih predstavljajo resno tveganje za okolje in zdravje ljudi zaradi neposredne izpostavljenosti ali z ostanki v živilih in pitni vodi (Torres, 2009).

Viri onesnažil v površinskih vodah so na splošno razdeljeni v dve kategoriji. Ločimo točkovne vire onesnaževanja, kot na primer odpadne vode, odlagališča in izcedne vode. Drugo kategorijo onesnaževanja predstavljajo razpršeni viri onesnaževanja, katerih vnos strupenih snovi v vodo je posledica razpršenega vnosa po večjem prispevnem območju, kot na primer onesnaževanje s kmetijskih površin (Mohapatra, 2010).

#### **2.1.2 Estrogenost organskih onesnažil / hormonski motilci**

Številna organska onesnažila antropogenega izvora so za organizme strupena, povzročajo pa tudi motnje v delovanju endokrinega oz. hormonskega sistema živih bitij in so posledično zdravju škodljiva (Lintelmann, 2003).

Motilci endokrinega sistema (MES), oziroma hormonski motilci, so organizmu tuje snovi, ki posnemajo ali blokirajo delovanje endokrinega (hormonskega) sistema v živalih in ljudeh. Estrogenske odzive lahko povzročajo tudi različne naravne in umetne kemijske spojine (ksenoestrogeni, pseudoestrogeni) vključno s farmacevtskimi izdelki, pesticidi, industrijskimi kemikalijami in težkimi kovinami (Campbell, 2006).

Ameriška agencija za varovanje okolja – US Environmental Protection Agency (EPA) opredeljuje MES kot:

Eksogeno snov, ki ovira sintezo, izločanje, transport, vezavo, delovanje in odstranjevanje naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje ravnovesja v organizmu (homeostaze), razmnoževanje, razvoj ali/in obnašanje (US EPA, 1997).

Prisotnost estrogenskih substanc v površinskih vodah so opazili že od leta 1980 (Miege, 2008).

Hormonske motilce z estrogenskim delovanjem delimo na:

- Naravne steroidne hormone, kamor spadajo estrogeni, androgeni in progesteroni, katere proizvajajo ljudje in živali in jih z izločanjem vnašajo v okolje.
- Sintetične steroidne hormone. To je skupina farmacevtskih izdelkov, sestavljena predvsem iz peroralnih kontraceptivov (hormonov za preprečevanje ovulacije) ter steroidov za terapije v menopavzi. Sintetični nadomestki estrogena sta etinilestradiol in mestranol, progesterona pa norgestrel ali noretisteron.
- Fitoestrogene. To so naravni rastlinski proizvodi z estrogensko aktivnostjo, to so na primer skupina flavonoidov in lignani.
- Pesticide, ki so obsežna skupina biološko aktivnih snovi, npr. DDT, metoksiklor, ciklodieni, linuron, diuron, vinklozolin, atrazin ter pesticidi, ki imajo na organsko skupino vezano kovino živo srebro, svinec ali tributil kositer (TBT)
- Poliklorirane spojine, npr. policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), ki nastajajo pri nepopolnem izgorevanju, poliklorirani bifenili (PCB), ki jih uporabljamo v industriji kot plastifikatorje, maziva, hladilne tekočine, polibromirani difeniletri, ki se dodajajo v materiale za zaviranje gorenja.
- Organske kisikove spojine. Sem uvrščamo bisfenole, ftalate, ki se dodajajo plastiki, in dioksine, ki so prisotni v plastiki, smolah in belilih.
- Površinsko aktivne snovi. To so skupina kemikalij, ki se pretežno uporablja v proizvodnji detergentov npr. alkilfenolni etoksilati (APnEO), predvsem nonilfenolne in oktilfenolne spojine (Lintelmann, 2003).

Raziskave vplivov hormonskih motilcev na ljudi so pokazale, da ti motijo endokrini sistem, povzročajo nastanek rakavih tumorjev, prirojene okvare ter negativno vplivajo na

moške (npr. zmanjšanje števila spermijev) in ženske reproduktivne sisteme ter s tem povezane reproduktivne motnje pri ljudeh in živalih (Stahlschmidt-Allner, 1997).

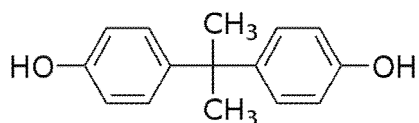
Ugotovljeni vplivi hormonskih motilcev na živali, ki so jim bile izpostavljene, so predvsem zmanjšanje plodnosti populacij zaradi zmanjšanja števila spermijev in nerazvitih testisov pri samcih sesalcev. Posledica izpostavljenosti hormonskim motilcem so tudi zmanjšanje velikosti penisa in spremenjena struktura testisov pri aligatorjih, pojav penisa pri samicah mehkužcev ter tudi produkcije proteina vitelogenina v samcih rib. Opažena je tudi feminizacija ribjih jat v onesnaženih rekah ter drugi škodljivi vplivi na živalih, ki povzročajo zmanjšanje številčnosti populacij (Miege, 2009 in Campbell, 2006).

Hormonski motilci vplivajo na delovanje endokrinega sistema:

- Z direktno interakcijo s hormonskimi receptorji in posnemanjem naravnih hormonov npr. estrogenov in androgenov (agonistično delovanje) in s tem aktiviranjem podobnih procesov v telesu ter povzročanjem prekomerne stimulacije oz. spodbujanja k njihovem delovanju (npr. dietilstilbestrol (DES) in ethinilestradiol).
- Z direktno interakcijo s hormonskimi receptorji in vezavo na receptorje, kar povzroča zaviranje delovanja naravnih hormonov (antagonistično delovanje). To so npr. herbicid linuron, vinklozolin in njuni metaboliti.
- Z indirektnimi vplivi na endokrini sistem s spremembo koncentracije hormonov, preko vplivov na sintezo, metabolizem, transport in izločanje hormonov (npr. TBT, PCB, dioksin).
- Z indirektnimi vplivi na endokrini sistem z vplivom na koncentracijo hormonskih receptorjev (Lintelmann, 2003).

## 2.2 BISFENOL A (BPA)

Bisfenol A, skrajšano BPA (2,2-bis (4-hidroksifenil) propan), je organska spojina z dvema fenolnima obročema, povezanimi z metilnim mostom in dvema metilnima funkcionalnima skupinama pripetima na most.



Slika 1: Kemijska struktura bisfenola A.

BPA je ena od pomembnejših kemijskih substanc na svetu. Pogosto se uporablja kot surovina za proizvodnjo fenolnih smol, poliakrilatov, poliestrov in predvsem za proizvodnjo epoksi smol, ki jih najdemo v premazih pločevink za hrano in različnih zaščitnih premazih. BPA se uporablja tudi za proizvodnjo polikarbonatne plastike, ki se uporablja v gospodinjskih aparatih, pri pakiranju hrane in plastičnih steklenicah (Staples s sod., 1998).

BPA se lahko izloča iz plastičnih proizvodov in embalaže za pijačo in hrano. Še posebej veliko poročil obstaja o kontaminaciji BPA-ja iz konzervirane hrane (Rastkari, 2011). Glavna dejavnika, ki vplivata na izločanje BPA iz površine embalaže sta čas segrevanja in temperatura v proizvodnem procesu (Rastkari, 2011). Po povečanju uporabe izdelkov, ki temeljijo na BPA, se je povečala tudi možnost onesnaženja okolja z njim. Letna proizvodnja BPA v svetu je v začetku leta 1990 presegla 1,1 milijarde evrov in znesek se povečuje (Lke s sod., 2002). Kemijska industrija je poročala, da je proizvodnja BPA v ZDA, leta 2006, obsegala 2.8 milijard evrov, napovedi za leto 2010 pa so obsegale 3,3 milijonov evrov. Svetovna proizvodnja BPA je leta 2008 obsegala 5,2 milijona ton. Večina BPA se uporablja v proizvodnji polikarbonatnih smol (75 %), sledijo epoksi smole (20 %), v druge namene, kot so zaviralci gorenja, nenasičene poliestrske, polisulfonske, polierimidne in poliarilatne smole, pa le 5 % (Chemical profile: Bisphenol A, 2008).

Na podlagi visokega obsega svetovne proizvodnje bisfenola A in dejstva, da se uporablja v številnih proizvodih, obstaja velika verjetnost, da BPA vnesemo v okolje v velikih količinah. Tako razpršeni viri (izdelki v uporabi, odlagališča), kot tudi točkovni viri BPA (razlitja, izpusti industrijske odpadne vode, proizvodni in predelovalni objekti, čistilne naprave) prispevajo k povečanju količine BPA v okolju (Lintelmann, 2003, Staples s sod., 1998).

### **2.2.1 Strupenost BPA**

V skladu z EPA standardom za postopke vrednotenja je bilo ugotovljeno, da je BPA zmerno do srednje strupen za ribe in vodne nevretenčarje (Lke s sod., 2002).

Strupenost BPA za vodne organizme so ugotavljali s pomočjo testov strupenosti z različnimi vrstami organizmov iz različnih trofičnih nivojev tako morskih organizmov kot tudi vodnih organizmov celinskih voda (Staples, 1998).

Rezultati testov strupenosti z dvema vrstama mikroorganizmov celinskih voda so: 18h EC<sub>50</sub> za vrsto *Pseudomonas putida* je približno 320.000 µg/l, za *Pseudomonas fluorescens* pa 54.500 µg/l (Staples s sod., 1998).

Teste strupenosti BPA z algami so opravili na zeleni algi celinskih voda *Pseudokirchneriella subcapitata* in morski algi *Skeletonema costatum*. Rezultati so v tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati strupenosti bisfenola A za dve vrsti alg (Staples, 1998).

Organizem	S/M	Tip testa	Opazovani znaki	Rezultat (µg/l)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	S	96 h EC <sub>50</sub>	Dolžina celic	2700
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	S	96 h EC <sub>50</sub>	Dolžina celic	3100
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	S	96 h NOEC	Dolžina celic in št.	1170
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	S	96 h EC <sub>50</sub>	Rast celic	2500
<i>Skeletonema costatum</i>	M	96 h EC <sub>50</sub>	Št. celic	1000
<i>Skeletonema costatum</i>	M	96 h EC <sub>50</sub>	Klorofil a	1800

Opomba: S/M se nanaša na alge celinskih voda (S) ali morske alge (M).

Rezultati akutnega in kroničnega testa strupenosti z algo *Pseudokirchneriella subcapitata* so pokazali 96 h EC<sub>50</sub> na osnovi štetja celic 2700 µg/l, 96 h EC<sub>50</sub> na osnovi velikosti celic pa 3100 µg/l. S 96 urnim kroničnim testom so ugotovili koncentracijo, pri kateri še ni bilo vidnih škodljivih učinkov na alge in to je 1170 µg/l (96h NOEC).

Testi strupenosti z morsko algo *Skeletonema costatum* so pokazali 96 h EC 50 pri 1000 µg/l na osnovi števila celic in 96 h EC<sub>50</sub> pri 1800 µg/l na osnovi količine klorofila a.



Testi strupenosti BPA z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*).

Tabela 2: Rezultati testov strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) (Staples, 1998).

Organizem	Tip testa	Opazovani znaki	Rezultat ( $\mu\text{g/l}$ )
<i>Daphnia magna</i>	48 h EC <sub>50</sub>	negibljevost	10000
<i>Daphnia magna</i>	48 h EC <sub>50</sub>	negibljevost	3900
<i>Daphnia magna</i>	48 h EC <sub>50</sub>	negibljevost	20000
<i>Daphnia magna</i>	21 d NOEC	Smrtnost in reprodukcija	> 3146

Zgornji podatki prikazujejo rezultate treh akutnih testov in testa kronične strupenosti BPA za vodne bolhe (*Daphnia magna*).

Rezultati akutnih testov strupenosti, ki temeljijo na negibljevosti organizmov po 48 urni izpostavljenosti bisfenolu A (48 h EC<sub>50</sub>), so v območju med 3,9 mg/l in 20 mg/l BPA. Kronični test strupenosti z vodnimi bolhami, pri katerem se ugotavlja najvišja koncentracija BPA pri katerem opazovana znaka strupenosti, smrtnost in zmanjšana reprodukcija, po 21 dnevni izpostavljenosti (21 d NOEC) še nista prisotna (Staples, 1998).

Testi strupenosti BPA z ribami celinskih voda in morskimi ribami.

Tabela 3: Testi strupenosti bisfenola A z ribami (Staples, 1998).

Organizem	S/M	Tip testa	Opazovani znaki	Rezultat ( $\mu\text{g/l}$ BPA)
<i>Pimephales promelas</i>	S	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	4700
<i>Pimephales promelas</i>	S	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	4600
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	S	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	3000-35000
<i>Onchorhynchus mykiss</i>	S	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	4000
<i>Notropis atherinoides</i>	S	72 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	4000-6000
<i>Oryzias latipes</i>	S	48 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	15.000
<i>Menidia menidia</i>	M	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	9400
<i>Cyprinodon variegatus</i>	M	96 h LC <sub>50</sub>	Umrljivost	7500

Opomba: S/M se nanaša na ribe celinskih voda (S) ali morske ribe (M).

Rezultati prikazujejo teste strupenosti BPA s štirimi vrstami rib celinskih voda in dvema vrstama morskih rib. Rezultat 96 h  $LC_{50}$  *Pimephales promelas* pod statičnimi razmerami znaša 4700  $\mu\text{g/l}$  BPA, v pretočnih razmerah pa 4600  $\mu\text{g/l}$  BPA. Raziskave strupenosti BPA na *Onchorhynchus mykiss* so pokazale, da je 96 h  $LC_{50}$  med 30 mg/l in 40 mg/l BPA, 72 h  $EC_{50}$  za *Notropis atherinoides* znaša 40 – 60 mg/l BPA in za *Oryzias latipes* je 48 h  $LC_{50}$  15 mg/l BPA.

V testih strupenosti z dvema vrstama morskih rib *Menidia menidia* in *Cyprinodon variegatus* so določili 96 h  $LC_{50}$  pri 9,4 mg/l BPA in 7,5 mg/l BPA (Staples, 1998).

V prikazanih rezultatih strupenosti BPA za vodne organizme različnih trofičnih nivojev je razvidno, da je BPA manj strupen za mikroorganizme kot za alge, nevretenčarje ali ribe. Strupenost BPA za nevretenčarje in ribe je primerljivo večja kot za mikroorganizme in manjša kot na alge.

### 2.2.2 Estrogenost BPA

BPA ni priznan kot mutagen, je pa estrogensko aktivna kemikalija, ki vpliva na naravne endokrine funkcije z vezavo na estrogenski receptor ter povzroča škodljive učinke na zdravje ljudi in živali že pri zelo nizkih koncentracijah (Lke s sod., 2002).

BPA je bil prvič dokazan kot estrogensko aktivna snov leta 1936 in sicer na podganah z odstranjenimi ovariji (Lintelmann, 2003). Leta 1993 so njegovo estrogenost dokazali z MCF-7, kulturo človeških rakastih celic, kjer je BPA stimuliral rast MCF-7 celic. Hormonski učinki so bili zaznavni že pri koncentraciji 2-5 ppb (2-5  $\mu\text{g/l}$ ), a je njegova estrogenska aktivnost od tisoč- do deset tisoč-krat manjša od estradiola (Krishnan s sod., 1993 in Lintelmann, 2003).

BPA lahko v organizmu izrine estradiol iz estrogenskega receptorja, inducira sintezo vitelogenina v jetrnih celicah ribjih samcev ter inducira transkripcijo rekombinantnih gensko spremenjenih kvasovk (Lintelmann, 2003). Lahko deluje tudi kot antigen, tako da blokira delovanje dihidrotestosterona v YES testu z receptorji za človeške androgene hormone (Sohoni and Sumpter, 1998).

BPA je prisoten v vodah z iztoki odpadnih voda iz tovarn, ki predelujejo BPA. Absorbira se tudi v zemljo, kjer lahko njegove koncentracije presegajo vsebnosti BPA v površinskih vodah.

BPA lahko v organizem vstopi preko absorpcije skozi kožo, kar lahko povzroča obsežne poškodbe ledvic, jeter, vranice, trebušne slinavke in pljuč. V stik z BPA lahko človek pride tudi s hrano in pijačo zaradi migracije BPA iz konzerv in pločevink premazanih z epoksi smolami ter iz posod iz polikarbonatne plastike (Mutou, 2006, Kang, 2006).

### **2.2.3 Produkti razgradnje BPA**

Različni biotski in abiotski procesi povzročajo razgradnjo in razpršenost BPA po izpustu v okolje. Razen mešanja v vodnem stolpcu, je BPA izpostavljen biorazgradnji, absorpciji na suspendirane snovi in sedimente ter fotorazgradnji (Staples, 1997).

BPA je biorazgradljiv, razgrajujejo ga mikroorganizmi v okolju, presnavljajo pa ga tudi določeni encimi rastlin in živali (Kang s sod., 2006). Testi razgradnje BPA s pomočjo bakterij, ki razgrajujejo BPA, so pokazali, da le-ta razpade na številne produkte. Glavna produkta sta hidroksiacetofenon in p-hidroksibenzaldehid, ta pa se naprej razgradita v p-hidroksibenzojsko kislino. Ostali produkti so še 2,3-bis-(4-hidroksifenil)-1,2-propandiol, bis-(4-hidroksifenil)-1-propan in p-hidroksifenacetil alkohol. Testi strupenosti teh produktov so pokazali zelo nizko strupenost in tudi estrogenska aktivnost se je po biorazgradnji BPA močno zmanjšala. Med testiranimi produkti biorazgradnje je šibko estrogensko aktivnost pokazal le p-hidroksiacetofenon (Ike s sod., 2002).

BPA je v okolju razgradljiv tudi preko direktne fotolize ali pa fotooksidacije. Absorbira spekter valovne dolžine od 200 do 300 nm, zato ga UV svetloba direktno aktivira ter pretvori v spojino kot je hidroksiliran BPA (3-OHBPA). Ta je zelo citotoksičen, njegova strupenost pa se še poveča po oksidaciji 3-OHBPA v orto-kinon (bisfenol-o-kinon), ki podobno kot večina drugih kemijskih mutagenov tvorijo adukte na DNK, posledica pa so lahko poškodbe dednega materiala in napake pri podvojevanju celic, kar lahko vodi v nastanek rakavih obolenj (Mutou, 2006).

## **2.3 METODE ZA DOLOČANJE ORGANSKIH ONESNAŽIL**

### **2.3.1 Kemijske metode za določanje prisotnosti organskih onesnažil**

Za učinkovito identificiranje prisotnosti organskih onesnažil ter morebitnih prisotnih hormonskih motilcev, se pogosto uporabljajo kemijske analizne metode.

Ločimo dva tipa kemijskih analiznih metod:

- GC-MS - plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo, je metoda, ki združuje plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo za identifikacijo in kvantifikacijo snovi v vzorcu. Uporabna je za identifikacijo snovi prisotnih v zelo nizkih koncentracijah. Ta metoda je za določanje nekaterih hormonskih motilcev, kot so pesticidi in herbicidi, premalo občutljiva in zato ni dovolj učinkovita.
- LC-MS - tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo, je analizna kemijska metoda, ki združuje fizične ločitvene zmožnosti tekočinske kromatografije (HPLC) z analizo zmogljivostjo masne spektrometrije. Ta tehnika je učinkovit postopek za analize okoljskih vzorcev saj ima višjo stopnjo občutljivosti (ng/l) in selektivnosti, kot katera koli druga metoda detekcije (Mohapatra, 2009). Uporablja se za identifikacijo in kvantifikacijo kemikalij v zmeseh (EPA, 1993).

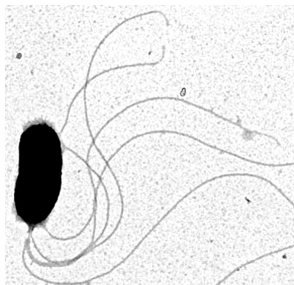
Konvencionalne metode, ki temeljijo samo na kemijskih analizah, so se izkazale za neučinkovite pri ocenah strupenosti odpadnih voda in ocenjevanju vplivov na vodne ekosisteme (Soupiras, 2008).

### 2.3.2 Metode za določanje prisotnosti strupenih snovi

Obstajajo različni testi strupenosti za ocenjevanje stopnje strupenosti spojin za vodne organizme. Ekotoksikološko testiranje določa neposredne ocene okoljskih učinkov odpadnih voda z izpostavljanjem organizmov izbrane testne vrste vodnim vzorcem in določanjem nekaterih znakov strupenosti, kot so smrtnost, sposobnost rasti, stopnja respiracije, itd. Testne skupine organizmov, ki se uporabljajo v ekotoksikoloških testih, so rastline, nevretenčarji, ribe in mikroorganizmi (Soupiras, 2008). V tej nalogi smo uporabili le tri najbolj uveljavljene teste strupenosti za organizme.

#### 2.3.2.1 Test strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*)

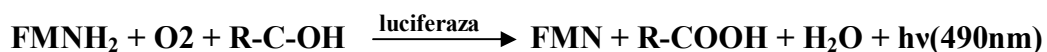
*Vibrio fischeri* (slika 2) so morske gram negativne paličaste bakterije z bički. Te bakterije živijo kot plankton (prosto plavajoče) ali pa v simbiozi z drugimi organizmi (npr. simbioza bakterij s sipi) v vseh morjih. Leta 1889 jih je odkril Beijernick in poimenoval *Aliivibrio fischeri*. Imajo posebno lastnost, da lahko sproščajo šibko svetlobo (luminiscenca), kot stranski produkt celičnega dihanja. Bakterija ni patogena in je enostavna za gojenje ter idealen organizem za uporabo v analiznih laboratorijih (Baumgartner in Dytkiewitz, 2010).



Slika 2: Luminiscentna bakterija (*Vibrio fischeri*) (<http://www.pnas.org/content/102/8/2673/F2.large.jpg>).

Kot vsi bioluminiscentni organizmi, luminiscentne bakterije za proizvodnjo svetlobe uporabljajo tako imenovan luciferin – luciferazni sistem. V tem procesu sodelujejo encimi luciferaze, ki transformirajo luciferin in kisik v svetlobo ter vodo.

Biokemijski mehanizem luminiscence *Vibrio fischeri*:



Struktura luciferina se pri različnih vrstah organizmov razlikuje. *Vibrio fischeri* pri reakciji uporablja riboflavin-5-fosfat, reduciran flavin mononukleotid (FMNH<sub>2</sub>), kot luciferin. Proizvedena svetloba je hladna svetloba z valovno dolžino 490 nm. Za ustvarjanje svetlobe je potrebna energija v obliki 2 NAD(P)H in ATP. Sistem luminiscence je neposredno povezan z dihalno verigo in ATP zalogami bakterije. Zato zaviranje celične aktivnosti (npr. zaradi prisotnih strupenih snovi) preko zmanjšanja nivoja celičnega dihanja, reducira bioluminiscenco bakterij.

Luminiscentni sistem ni esencialni, zato lahko bakterije to energijo v kritičnih situacijah shranijo. Posledično bakterije luminiscirajo samo, ko imajo dovolj hranil in kisika in ni prisotnih strupenih substanc. Stopnja zaviranja luminiscence je odvisna od stopnje strupenosti onesnažila na to bakterijo (Baumgartner in Dytkiewitz, 2010).

*Vibrio fischeri* se uporablja na področjih analize (odpadnih) voda za ekotoksikološke teste od leta 1979. Test poteka tako, da vzorec testirane vode zmešamo z bakterijami in merimo luminiscenco po določenem času inkubacije (30 min). Jakost luminiscence merimo v luminometru LUMIStox 300.

### 2.3.2.2 Test strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Ta test je namenjen testiranju vpliva kemikalij za planktonske organizme. Pomembnost testov s planktonskimi organizmi je ta, da ti organizmi predstavljajo hrano večjim vodnim organizmom, kot so ribe, in so zato pomembni člen prehranjevalnih verig (ISO 6341: 1996).

Vodne bolhe uvrščamo v red Cladocera, razred Branchiopoda. Poznamo približno 1000 vrst, kar je približno polovica vseh znanih vrst Branchiopodov. Nekatere vrste so zelo pogoste in razširjene po vsem svetu, med njimi so najbolj znane tiste iz rodu *Daphnia* (Forro, 2008).

Vodne bolhe *Daphnia magna* (slika 3) so sestavni del zooplanktona celinskih voda. So avtohtona vrsta severne in zahodne Severne Amerike. Vrsta je razširjena tudi v Evraziji in nekaterih regijah Afrike. So filtratorji, prehranjujejo se predvsem z različnimi vrstami enoceličnih alg in organskimi delci, s protisti, bakterijami in raztopljenim organskim materialom. (Brennan, 2006).

Vodne bolhe dosegajo velikosti 1 – 5 mm. Njihov trup pokriva dvoloputast karapaks iz katerega moli le glava in je na zadnji strani navadno podaljšan v trn. Na sredi glave je eno samo sestavljeno oko, ki je nastalo z zlivanjem para očes pri prednikih vodnih bolh. Število okončin na oprsju (torakopodov) je zmanjšano na pet parov. Te okončine ne sodelujejo pri premikanju. V ta namen vodne bolhe uporabljajo velike, razvejane druge tipalnice. Telo je brezbarvno in prosojno, pigmentirano je le oko.

Večji del leta se razmnožujejo nespolno, partenogenetsko in v populacijah prevladujejo samice. Samice nosijo v valilniku (marsupij) na hrbtu, med košem in trupom, neoplojena diploidna jajčeca, iz katerih se že v valilniku izvalijo mlade vodne bolhe. Tak način razmnoževanja jim omogoča izredno hitro povečanje številčnosti v ugodnih razmerah, ko je hrane dovolj.

Ob spremembi abiotskih in biotskih razmer (npr. sprememba temperature, pomanjkanje hrane, velika gostota populacije, kopičenje izločkov, prisotnost strupenih snovi), pride do prekinitve partenogenetskega razmnoževanja. Samice izležejo haploidna jajčeca iz katerih se razvijejo samci. Samci oplodijo haploidna jajčeca, ki jih izvalijo samice in tako nastanejo na neugodne razmere odporna, tako imenovana »zimski« jajca (efipij), obdana z nepropustnim, temnim ovojem. Iz teh jajc se ob ugodnih razmerah razvijejo samice, ki se

nadalje razmnožujejo partenogenetsko. Večina vrst živi v celinskih vodnih ekosistemih, posamezne vrste pa tudi v morjih (Forro, 2008). *Daphnia magna* so ene izmed najpogosteje uporabljenih organizmov v testih akutne in kronične strupenosti, predvsem zato, ker imajo kratek življenjski cikel (7 do 8 tednov pri 20 °C), dosežejo spolno zrelost med 6 – 8 dnevi po izvalitvi, so nezahtevne za gojenje in so dovolj občutljive na različne strupene kemikalije (Brennan, 2006).



Slika 3: Vodna bolha ([http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Daphnia magna-female\\_adult.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Daphnia_magna-female_adult.jpg)).

Pri rakih je veliko fizioloških procesov reguliranih z neurohormoni, vključno z metabolizmom maščob, ravnovesjem ionov, levitvijo, regeneracijo, razvojem spolnih žlez, reproduktivno fiziologijo, prebavo in delovanjem srca. Večina znanih nevretenčarskih hormonov so peptidni neurohormoni. Ključni hormoni žuželk in rakov so peptidni hormoni (npr. hormon levitve ekdison, juvenilni hormoni), ki pa so bolj dovzetni za receptorsko povezane motnje (Brennan, 2006).

Pomemben fiziološki proces predstavlja levitev, ki vodnim bolham omogoča rast. Ksenobiotiki, ki motijo delovanje procesov endokrinega sistema vretenčarjev, motijo tudi hormonsko povezane levitvene procese členonožcev, z delovanjem kot antagonisti endogenih hormonov (ekdisteroide) in posledično blokirajo ekdisteroide receptorje, zaradi česar levitev ne more potekati (Brennan, 2006).

### 2.3.2.3 Test strupenosti z ikrami rib cebric (*Danio rerio*)

Cebrice so ene izmed najbolj pomembnih modelnih rib v raziskavah na področju razvojne biologije vretenčarjev. Uporabljajo se v številnih raziskavah na področju molekularne

genetike, biologije vretenčarjev, razvojne biologije, neurobiologije in transgenskih raziskav (Nagel, 2002).

Cebrice (*Danio rerio*) je prvi opisal Hamilton Buchanan leta 1922. Prvotno so se imenovale *Brachydanio rerio*. Spadajo v družino krapovcev, *Cyprinidae*, razred *Osteichties* (teleostei).

So majhne ribe, ki živijo v pritokih reke Ganges v jugovzhodni Aziji. Odrasle ribe merijo 3-5 cm, gojimo jih lahko tako v mehki kot tudi trdi vodi, na temperaturi 26 °C. Zrelost dosežejo v treh mesecih in ležejo veliko število (50 do 200) prosojnih, neadhezivnih jajc na dan, velikih približno 1 mm. Cebrice so r-strategi, kar pomeni, da imajo hiter prirastek populacije, visoko stopnjo plodnosti, nizko raven starševske skrbi za potomce in visoko umrljivost v juvenilnem obdobju (Nagel, 2002).



Slika 4: Cebrica (*Danio rerio*) (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Zebrafisch.jpg>).

Jajca so telolecitalna in delitve so meroblastične in diskoidalne. Kmalu po oploditvi se citoplazma jajca akumulira na animalnem polu, kjer obdaja jedro zigote. Brazdanje poteka le na tem delu jajca, na tako imenovanem blastodisku.

### 2.3.3. Metode za določanje prisotnosti estrogensko aktivnih snovi

Kemijske analize za določanje estrogenih hormonov v vodah uporabljamo za določanje spojin (območje v ng/l) in natančno identifikacijo molekule, medtem ko estrogenske učinke, ki jih te spojine (npr. bisfenol A, polibromirani difenil etri, ftalati, organokloridi, alkilfenoli ali dioksini) povzročajo, merimo oz. določamo z biološkimi metodami.

Za realnejšo oceno učinkovitosti odstranjevanja hormonskih motilcev iz odpadnih voda je potrebno uporabiti, poleg kemijskih analiznih metod, tudi biološke preizkuse saj slednji



zagotavljajo celovito oceno vseh potencialno škodljivih, poznanih in nepoznanih sestavin v odpadni vodi (Miege, 2009).

Biološki *in vitro* testi so v primerjavi s kemijskimi analizami razmeroma poceni, hitri, ponovljivi in ne zahtevajo velike količine vzorčnega materiala, vendar pa je dobljen rezultat lahko drugačen od dejanskega učinka na organizem zaradi encimskih biotransformacij v organizmih. Biološki preizkusi za ugotavljanje prisotnosti hormonskih motilcev z estrogenskim delovanjem v vodah vključujejo različne nivoje biološke organizacije: molekularni nivo, biokemijski nivo, celični nivo, organizme, populacije in ekosistem. Metode temeljijo na vezavi hormonskih motilcev na receptorje, povzročajo ciljno pomnoževanje in diferenciacijo celic ali spremenijo sintezo proteinov. Uporabljajo se jetrne celice rib ali gojene celične linije, modificirane kvasovke itd. Pogosto uporabljen je E-screen test, ki temelji na pomnoževanju rakavih celic MCF-7 (celične linije celic raka na prsih) v prisotnosti estrogensko aktivnih snovi (Murk, 2002). Pogosto se uporablja tudi YES test (yeast estrogen screen) z gensko spremenjeno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jo razvili pod vodstvom prof. Sumpterja (Glaxo - Oddelek za genetiko). Kvasovke imajo v svoj genom vgrajen gen za človeški receptor za estrogen (hER) in zapis za gen *lac Z*, ki kodira zapis za encim  $\beta$ -galaktozidazo. V prisotnosti spojin z estrogensko aktivnostjo, se le te vežejo na hER in sprožijo serijo reakcij, ki v končni fazi vplivajo na barvo dodanega substrata, ki jo izmerimo spektrofotometrično (Routledge in Sumpter, 1996).

Zraven *in vitro* testov obstaja še mnogo *in vivo* bioloških testov. Ti omogočajo določanje estrogenskega potenciala zmesi v okolju, brez poznavanja vseh obstoječih snovi v okoljskih vzorcih.

Številne *in vivo* biološke analize se uporabljajo za oceno estrogenske aktivnosti čistih spojin ali vzorcev iz okolja. Najpogosteje uporabljen *in vivo* biomarker v vodnem okolju je vitelogeninski test (VTG). VTG je prekursorski protein jajčnega rumenjaka, ki se sintetizira v jetrih ribjih samic ter se transportira v ovarije (Van den Belt, 2004). Pri sameih je običajno prisoten v zelo nizkih koncentracijah a se ob prisotnosti hormonskih motilcev (MES), lahko izraža VG gen, ki povzroča povečano proizvodnjo vitelogenina v ribjih sameih. Ta znak se lahko uporablja kot biomarker izpostavljenosti ksenoestrogenom.

Drugi uporabljeni *in vivo* biomarkerji so še struktura spolnih žlez, reproduktivno delovanje in uspešnost razmnoževanja (Van den Belt, 2004).

Biološki monitoring estrogensko aktivnih snovi na organizmih *in vivo* omogoča oceno dejanskega vpliva estrogenske snovi na ciljno vrsto. *In vivo* testi so učinkoviti pokazatelji kumulativnega estrogenskega odziva na izpostavljeno mešanico MES v danem okolju. Glavna pomanjkljivost tega pristopa je pomanjkanje specifičnosti odziva organizma na različne MES (Campabell, 2006).

#### 2.3.2.4 Biološki test YES (Yeast Estrogen Screen)

V testu YES uporabljamo gensko spremenjeno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (prof. Sumpter, GLAXO, VB). Te imajo v svoj genom vstavljen gen za humani receptor za estrogen (hER). Poleg tega imajo vstavljen tudi ekspresijski plazmid, ki nosi zapis za reporterski gen lac-Z, ki kodira zapis za encim  $\beta$ -galaktozidazo. Encim omogoča merjenje aktivnosti receptorja. Kadar je v vzorcu prisoten estrogen oz. ksenoestrogen se bo le-ta vezal na hER. Dimerni kompleks se je nato sposoben vezati na del zaporedja DNK, ki se odziva na estrogen, t. i. ERE (estrogen responsive element). To zaporedje se nahaja pod močnim promotorjem v ekspresijskem plazmidu – to je isti promotor, pod kontrolo katerega je gen za lac-Z. Tako pride ob vezavi dimera hER-E na zaporedje ERE do izražanja  $\beta$ -galaktozidaze, ki se izloča v medij, v katerem so kvasovke. Encim razgradi substrat CPRG (klorofenol rdeče galaktopiranozid), kar zaznamo kot spremembo barve, in sicer iz rumene v rdeče-vijolično obarvan produkt CPR (klorofenol rdeče), katerega absorbanco izmerimo pri 575 nm (Routledge in Sumpter, 1996).

### 2.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE ORGANSKIH ONESNAŽIL

#### 2.4.1 Napredni oksidacijski procesi (AOP)

Odstranjevanje organskih onesnažil in hormonskih motilcev je možno z uporabo bioloških procesov, kemijske oksidacije ali naprednih oksidacijskih procesov (Advanced oxidation processes, AOP) (Rodriguez, 2010). Veliko strupenih in estrogensko aktivnih snovi je v vodi prisotnih v nizkih koncentracijah. Poleg tega so ksenoestrogeni in estrogeni slabo biološko razgradljivi. To povzroča, da je njihovo odstranjevanje s konvencionalnimi biološkimi, fizikalnimi in kemijskimi metodami težavno in drago. Bolj učinkoviti procesi čiščenja MES, brez uporabe bioloških procesov, so AOP metode. AOP lahko okvirno opredelimo kot metode oksidacije v vodni fazi, ki na osnovi visoko reaktivnih

intermediatov, kot so hidroksilni radikali, razgradijo ciljna onesnažila (Klavarioti, 2009). Uporaba naprednih oksidacijskih procesov pri odstranjevanju hormonskih motilcev (npr. BPA), kot so oksidacija z ozonom, UV fotoliza, fotokataliza z UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fotokataliza z UV/TiO<sub>2</sub> in Fentonova oksidacija, temeljijo na produkciji in delovanju hidroksilnih radikalov, ki so močni oksidanti. Vendar se med temi postopki lahko tvorijo sekundarni produkti razgradnje, ki so lahko bolj strupeni kot prvotne spojine (Neamtu, 2006, Torres, 2008).

#### 2.4.1.1 Fotolitska oksidacija

Fotolitska oksidacija je eden izmed naprednih oksidacijskih procesov, kjer s pomočjo UV ali vidne svetlobe nastanejo hidroksilni radikali, ki oksidirajo organsko snov. Ko organsko onesnažilo, kot je BPA, absorbira svetlobo, potečejo fotokemijske reakcije. Če je energija absorbirane UV svetlobe večja od moči kemijske vezi med atomi, lahko ta vez razpade. Najpomembnejši mehanizmi za razpad polimerov sta fotoliza in fotooksidacija. Če absorpcija svetlobe vodi direktno v kemijsko reakcijo, ki povzroča razgradnjo, to imenujemo fotoliza.

Fotooksidacija je rezultat izpostavljenosti in absorpcije svetlobe (UV), ki vodi do nastanka radikalov, ki strupene snovi oksidirajo (Diepens, 2009).

#### 2.4.1.2 Fotokatalitska oksidacija

Eden izmed naprednih oksidacijskih procesov za razgradnjo organskih onesnažil je fotokatalitska oksidacija z uporabo UV svetlobe ter dodanim katalizatorjem, ki pospeši oksidacijo ali celo privede do popolne mineralizacije onesnažila. Pogosto uporabljen katalizator v fotokatalitski oksidaciji je titanov dioksid (TiO<sub>2</sub>). Heterogena polprevodniška fotokataliza z uporabo fotokatalizatorja TiO<sub>2</sub> je nova tehnologija s ključnimi prednostmi saj katalizator deluje v razmerah, kot se pojavljajo v naravi, je poceni, na tržišču dostopen v različnih kristalnih oblikah in lastnostih delcev, je nestrupen in fotokemijsko stabilen (Klavarioti, 2009).

V procesu odstranjevanja organskih onesnažil s fotokatalitsko oksidacijo se kot katalizator uporablja tudi vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Razgradnja organskih spojin z UV svetlobo in prisotnim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je hitrejša zaradi nastanka hidroksilnih radikalov (OH<sup>•</sup>), ki nastanejo med fotokemijskimi reakcijami (Neamtu, 2006). Ti hidroksilni radikali (OH<sup>•</sup>, E<sub>0</sub> = 2,8 V), ki

nastanejo med fotolizo vodikovega peroksida obsevanega z UV svetlobo, so eni izmed najmočnejših oksidantov in lahko oksidirajo širok spekter organskih onesnažil hitro in neselektivno (Xu B. s sod., 2008).

Med procesom fotolitske oksidacije s TiO<sub>2</sub> in UV sistemom radikali nastajajo pod vplivom sevanja UV svetlobe po naslednjem mehanizmu:



O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikali se lahko povežejo med sabo in povzročijo nastanek vodikovega peroksida kot še dodatnega oksidanta, ki deluje kot akceptor elektronov in tvori hidroksilne radikale:



Tako so lahko organske snovi v vodi oksidirane s hidroksilnimi radikali:



kjer sta RX<sub>ad</sub> in RX neka absorbirana ali neabsorbirana organska snov v vodi (Rodriguez, 2010).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 FOTOLITSKA OKSIDACIJA

Poskuse fotolitske oksidacije smo izvedli v steklenem laboratorijskem šaržnem bioreaktorju z goščo z izhodno raztopino BPA, s koncentracijo 20 mg/l. 250 ml izhodne raztopine smo zlili v reaktor. Poskus smo izvajali pri sobni temperaturi (20 °C) pri atmosferskem tlaku, ob stalnem mešanju 600 rpm in stalnem prepihanju z zrakom (pretok 300 ml/min). Med poskusi smo vzorce raztopine BPA osvetljevali s halogensko žarnico ali UV žarnicama (17W ali 150W).

#### 3.2 FOTOKATALITSKA OKSIDACIJA

Postopek poskusa s fotokatalitsko oksidacijo je potekal podobno kot zgoraj opisan postopek poskusa s fotolitsko oksidacijo. Postopka se razlikujeta v tem, da smo pri fotokatalitski oksidaciji uporabljali dva katalizatorja in sicer TiO<sub>2</sub> P-25 (Degussa) ali H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki sta pospešila hitrost razgradnje bisfenola A v raztopini. Katalizator smo v reaktor dodali pred začetkom poskusa, aktivirala pa sta ga O<sub>2</sub> in svetloba uporabljenih žarnic.

#### 3.3 ANALIZA S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

Razgradnjo BPA smo spremljali tako, da smo iz reaktorja odvzeli vzorce v časovnih presledkih 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 in 360 minut ter jih analizirali s HPLC metodo. Za analizo smo uporabili aparat Agilent 1100 (Agilent Technologies, ZDA) z binarno črpalko in UV detektorjem ob konstantni temperaturi 30 °C. 20 µl vzorca smo nanesli na kolono Phenomenex Luna 5u C18(2) 100A (250 × 4,6 mm I.D., 5 µm) (Phenomenex, ZDA). Mobilna faza s konstantnim pretokom 1 ml/min je bila sestavljena iz metanola (MeOH) in ultra čiste vode (mQ) v razmerju MeOH : mQ = 75:25. UV detekcija je potekala pri valovni dolžini 210 nm (Mao s sod., 2004).

### 3.4 TEST STRUPENOSTI Z LUMINISCENTNIMI BAKTERIJAMI (*Vibrio fischeri*)

#### 3.4.1 Priprava BPA raztopine

Izhodno raztopino BPA za fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo, s koncentracijo 20 mg/l, smo pripravili tako, da smo najprej zatehtali 20 mg BPA, ga prenesli v 1 ml epico in raztopili v etanolu. Nato smo v 250 ml bučko odpipetirali 0,25 ml pripravljene raztopine in jo redčili z ultra čisto, oziroma vodovodno vodo. Za testiranje zaviranja luminiscence različnih koncentracij BPA smo uporabili izhodno raztopino BPA, katero smo med poskusom redčili, kot je opisano v izvedbi testov (poglavje 3.4.3).

#### 3.4.2 Priprava vzorcev

V testu smo uporabljali zmrznjene luminiscentne bakterije proizvajalca Dr. Lange. Testni komplet Dr. Lange: Luminescent bacteria test LCK 482 vsebuje epruvete z liofiliziranimi luminiscentnimi bakterijami vrste *Vibrio fischeri* sev NRRL-B-11177, reaktivacijsko raztopino (glukoza, natrijev klorid, pH 7,0), standardno raztopino (7,5 % natrijev klorid) in reakcijske epruvete (15 ml). Potrebovali smo še 2% raztopino NaCl, steklene kivete, pipete (0,2 - 1,0 ml), (1,0 - 5,0 ml) in nastavke za pipete. V vzorcih smo pred izvedbo strupenostnega testa na luminiscentne bakterije izmerili koncentracijo raztopljenega kisika ter pH. Vsebnost kisika v vseh testiranih vzorcih smo izmerili z oksimetrom. Merilno sondo oksimetra z membransko elektrodo, selektivno za kisik, smo umerili ter jo dali v vzorec in mešali dokler se številka ni ustalila, po merjenju smo sondo sprali z destilirano vodo. PH smo izmerili s pH metrom, kateremu smo pred merjenjem preverili in uravnali točnost delovanja. Previsok ali prenizek pH smo nevtralizirali na 7,0 +/- 0,2, z dodajanjem baze NaOH oziroma kisline HCl. Vsi testirani vzorci so morali imeti ustrezno slanost (2 % NaCl) saj nižje koncentracije NaCl v vzorcu povzročijo osmotsko povezano svetlobno inhibicijo. Zato smo pred poskusom v 20 ml vsakega vzorca dodali 0,4 g soli NaCl in dobili 2% raztopino NaCl.

#### 3.4.3 Izvedba testov

Test strupenosti smo izvedli v skladu z ISO standardom (ISO 11348-2, 1998) za določanje zaviranja luminiscence bakterij. Za izvedbo poskusa smo potrebovali po 20 ml vzorca z

2% raztopino NaCl in nevtralnem pH. V kiveto smo nalili po 12 ml reaktivacijske raztopine in pustili termostatirati na 15 °C v LUMIStherm-u. Luminiscentne bakterije smo najprej reaktivirali z dodano reaktivacijsko raztopino in termostatirali v LUMIStherm-u. Na to smo razredčili bakterije v skladu z navodili in jih prenesli v steklene kivete. S pipeto smo dodali 4,5 ml reaktivacijske raztopine v kiveto s suspendiranimi luminiscentnimi bakterijami in dobro premešali. Po 0,2 ml suspenzije smo prenesli v steklene kivete v LUMIStherm-u, na pozicije od B1 do C2. Ostalo suspenzijo (11,2 ml) smo prelili v preostalo reaktivacijsko raztopino, zmešali in po 0,5 ml prenesli v steklene kivete v LUMIStherm, na pozicije od B3 do C10. Termostatirali smo 15 min. V vrsto A smo pripravili serijo vzorcev tako, da smo dali 1,5 ml 2% NaCl v kivete od A1 do A9, v A9 smo dali 1,0 ml, v A10 pa nič. Pripravljen vzorec za redčenje (20 mg/l BPA) smo dali v A8 in A10 1,5 ml, v A9 pa 2,0 ml. Nato smo prenesli po 1,5 ml raztopine iz A8 v A6, zmešali in prenesli 1,5 ml iz A6 v A4, zopet premešali in dali 1,5 ml iz A4 v A2. Po enakem postopku smo prenesli tudi 1,5 ml iz A9, preko A7, A5 v A3. A1 predstavlja kontrolo z 3 ml 2% NaCl (razredčevalna raztopina) s katero smo primerjali dobljene rezultate o zaviranju luminiscence posameznih vzorcev. Po končani inkubaciji smo posamezne kivete od B1 do C10 vstavili v aparaturu (Lumistox 300, dr. Lange) in izmerili luminiscenco. Nato smo v iste kivete dodali vzorce pripravljene v vrsti A in sicer od B1 do C2 smo dodali po 0,8 ml, v vse ostale pa 0,5 ml vzorca. Tako pripravljene kivete smo inkubirali 30 minut ter ponovno izmerili luminiscenco vseh vzorcev. Po končanih meritvah nam je program izpisal luminiscence prvih in drugih meritev (pred in po dodani strupeni snovi).

#### **3.4.4 Obdelava in vrednotenje rezultatov**

Učinek snovi na luminiscentne bakterije smo izmerili glede na kontrolo, ki ni vsebovala testirane snovi in jo primerjali s testnimi mešanici, v katere smo dodali vzorce. Za kontrolo in vse vzorce smo izračunali odstotek zaviranja. Izračunali smo vrednosti za 30 min IC<sub>20</sub>, 30 min IC<sub>50</sub> ter 30 min IC<sub>80</sub> s pomočjo programa Dr. Lange LUMISsoft 4. Ta program nam je izračunal tudi 95 % interval zaupanja za 30 min IC<sub>50</sub>.

Koncentracije BPA, ki povzročajo manj kot 20% zaviranje luminiscence, se tretirajo kot nestrupene saj prag strupenosti predstavlja 20% zaviranje luminiscence.

### 3.5 TEST STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)

#### 3.5.1 Priprava BPA raztopine

Priprava BPA raztopine je potekala, kot opisano pri testu strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*). Razlikuje se le priprava redčitev BPA za testiranje strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*). Za test smo pripravili 4 različne koncentracije raztopine BPA in sicer 5, 10, 15 in 20 mg/l BPA. Te redčitve smo pripravili iz osnovne raztopine 20 mg/ml BPA, pri čemer smo kot topilo za redčenje uporabili ultra čisto ali vodovodno vodo.

#### 3.5.2 Priprava vzorcev

##### 3.5.2.1 Priprava ISO medija

Za testiranje strupenosti vzorcev smo ultra čisti vodi dodali soli (ISO 6341: 1996).

V 200 ml vzorca dodamo naslednje soli:

- Raztopina 1.1.  $\text{CaCl}_2$  raztopina ; 0,8 ml  
73,52 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Raztopina 1.2.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  raztopina ; 0,2 ml  
123,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Raztopina 1.3. raztopina kalijevega klorida ; 0,2 ml  
5,8 g/l KCl
- Raztopina 1.4.  $\text{NaHCO}_3$  raztopina ; 0,2 ml  
64,8 g/l  $\text{NaHCO}_3$

##### 3.5.2.2 Priprava M4 medija za gojenje vodnih bolh

Medij za gojenje vodnih bolh in za kronične teste (M4) (OECD, 1998) smo pripravili tako, da smo v 10 l stekleno posodo odpipetirali raztopine po sledečem zaporedju:

- 40 ml raztopine 1.1.
- 10 ml raztopine 1.2.



- 10 ml raztopine 1.3.
- 10 ml raztopine 1.4.
- 1 ml raztopine 2.1.
- 5 ml raztopine 2.2.
- 2 ml raztopine 2.3.
- 50 ml raztopine 2.4.
- 5 ml raztopine 2.5.
- 1 ml raztopine 2.6.

Raztopine navedenih števil od 1.1. do 1.4. so opisane pod pripravo ISO medija (poglavje 3.5.2.1.). Raztopine od 2.1. do 2.6. za gojenje in reprodukcijo vodnih bolh pa smo pripravili na sledeč način:

- Raztopina 2.1. Kationska raztopina

V 1 liter destilirane vode smo dali:

- 3,60 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 3,06 g LiCl
- 0,71 g RbCl
- 1,52 g  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,16 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,13 g  $\text{ZnCl}_2$
- 0,10 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

- Raztopina 2.2. Anionska raztopina

V 1 liter destilirane vode smo dali:

- 0,54 g  $\text{NaNO}_3$
- 5,72 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0,032 g NaBr
- 0,13 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,006 g KJ
- 0,004 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$
- 0,001 g  $\text{NH}_4\text{VO}_3$

- Raztopina 2.3. Silikatna raztopina  
475 mg/l  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$
- Raztopina 2.4. EDTA raztopina  
V 1 liter destilirane vode smo dali:
  - 0,5 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$
  - 0,19 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- Raztopina 2.5. Fosfatna raztopina  
V 1 liter destilirane vode smo dali:
  - 0,28 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0,37 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- Raztopina 2.6. Vitaminska raztopina  
V 1 liter destilirane vode smo dali:
  - 0,7 g tiamin hidroklorida ( $\text{B}_1$ )
  - 0,01 g cianokobalamina ( $\text{B}_{12}$ )
  - 0,007 g biotina ( $\text{B}_7$ )

### 3.5.2.3 Priprava razredčevalne vode (RV)

Razredčevalna voda (RV) je raztopina, ki se uporablja za pripravo vzorcev z različnimi koncentracijami BPA za akutne strupenostne teste z vodnimi bolhami in cebricami.

Pripravili smo jo tako, da smo v 10 l bučko odpipetirali raztopine po sledečem receptu:

- 40 ml raztopine 1.1.
- 10 ml raztopine 1.2.
- 10 ml raztopine 1.3.
- 10 ml raztopine 1.4.

Raztopine navedenih števil so opisane pod pripravo ISO medija (poglavje 3.5.2.1.).

Za testiranje strupenosti različnih koncentracij BPA na vodne bolhe smo pripravili redčenja BPA od 0 mg/l (kontrola) do 20 mg/l. Redčitve smo pripravili v 100 ml bučkah

ter vsebino prelili v 3 steklene petrijevke, v vsako po 30 ml vzorca. Prvo petrijevko, v katero smo prenesli po 20 vodnih bolh, smo uporabili za prenos vodnih bolh v drugi dve petrijevki (v vsako smo iz prve petrijevke prenesli po 10 vodnih bolh). Na ta način smo zmanjšali količino z vodnimi bolhami prenesene vode, ki bi razredčila vzorec.

### 3.5.3 Izvedba testov

Akutni test strupenosti smo izvedli v skladu z ISO standardom (ISO 6341: 1996) za določanje zaviranja gibanja vodnih bolh (*Daphnia magna*). Za test strupenosti smo uporabili vodne bolhe stare največ 24 ur. Najprej smo izvedli preliminarni test, s katerim smo določili območja koncentracij, katere smo nato testirali v končnem ali definitivnem testu strupenosti. Preliminarni test smo izvedli z naslednjimi koncentracijami BPA: 20, 40, 60, 80 in 100 mg/l. Rezultati testa so nam pokazali najnižjo koncentracijo, ki je povzročila 100 % negibljivost vodnih bolh in najvišjo koncentracijo, ki ni povzročila nobenih učinkov na izpostavljenih vodnih bolhah.

Končni (definitivni) test strupenosti BPA na vodne bolhe, smo izvedli z v preliminarnem testu določenimi koncentracijami BPA (5, 10, 15, 20 mg/l). Strupenostne teste z vzorci po odstranjevanju BPA s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo pa smo izvedli brez preliminarne testa saj smo določali strupenost le v nerazredčenih vzorcih. Teste smo opravili v dveh ponovitvah po 10 vodnih bolh / petrijevko s 30 ml vzorca. Poskusne posode z vodnimi bolhami smo za 24 ur inkubirali na  $20 \pm 1$  °C z 16 : 8 urno fotoperiodo. Živali med akutnim testom strupenosti nismo hranili.

### 3.5.4 Obdelava in vrednotenje rezultatov

Po koncu testa (24 h) smo prešteli število normalno gibljivih vodnih bolh v vsaki petrijevki. Normalno gibljive bolhe smo določili tako, da smo petrijevko rahlo zatresli in tiste, ki niso bile sposobne plavati 15 sekund po tresljaju, določili za negibljive, čeprav so morda lahko še vedno premikale tipalnice. Izračunali smo odstotke negibnih vodnih bolh za vsako koncentracijo in izračunali 24 h EC<sub>10</sub>, 24 h EC<sub>50</sub>, 24 h EC<sub>90</sub> ter 95% interval zaupanja za 24 h EC<sub>50</sub> s pomočjo računalniškega programa z uporabo probit analize.

### 3.6 TEST STRUPENOSTI Z ZARODKI CEBRIC (*Danio rerio*)

#### 3.6.1 Priprava BPA raztopine

Priprava BPA raztopine je potekala, kot opisano pri testu strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*). Priprava redčitev pa je potekala, kot opisano pri testu strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*).

#### 3.6.2 Priprava vzorcev

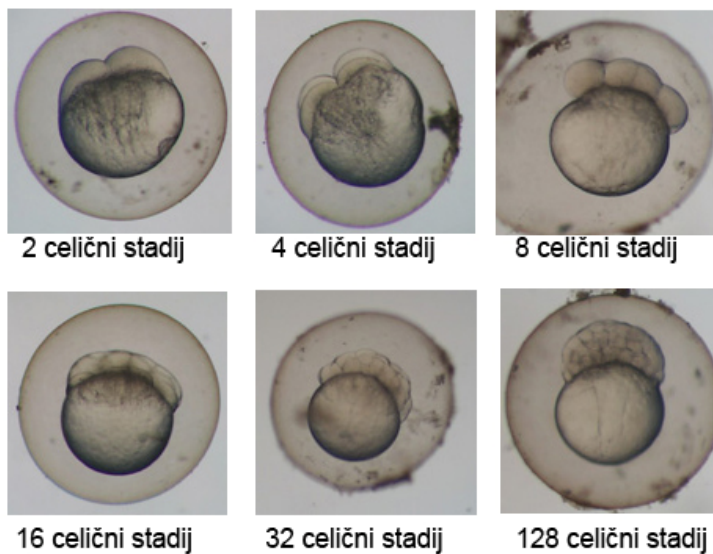
Za izvajanje testa z zarodki cebric smo potrebovali razredčevalno vodo, zato smo vsem izhodnim raztopinam, ki so bile pripravljene v ultra čisti vodi (mQ), dodali vse potrebne soli za ISO medij (ISO 6341: 1996). Kontrola testa z zarodki cebric je predstavljala RV (razredčevalna voda) (ISO 6341: 1996). Pozitivno kontrolo testa strupenosti z zarodki cebric pa je predstavljala referenčna raztopina 3,4-dikloroanilin, s koncentracijo 3,7 mg/l. Obe kontroli smo izvedli na 10 ikrah.

Pred samim testom smo vsem vzorcem izmerili koncentracijo raztopljenega kisika z oksimetrom ter pH s pH metrom. Slednjega smo uravnali na  $7,0 \pm 0,2$  z dodajanjem čim manjše količine kisline HCl (vodikov klorid) ali baze NaOH (natrijev hidroksid).

Za testiranje strupenosti različnih koncentracij BPA smo pripravili vzorce z različnimi koncentracijami BPA (5, 10, 15 in 20 mg/l).

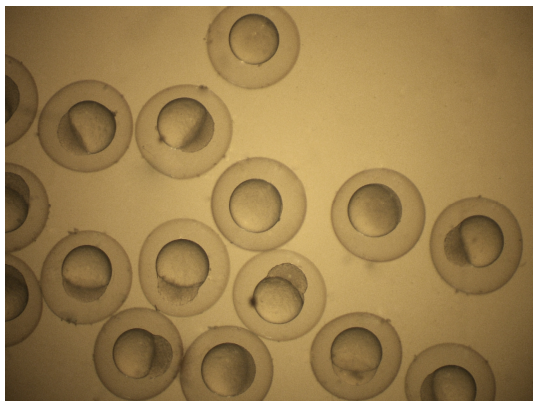
#### 3.6.3 Izvedba testov

Za test smo uporabili oplojena jajčeca cebric, od 4-celičnega do 128-celičnega stadija zarodka, stara največ 4 ure.



Slika 5: Stadiji razvoja zarodka cebric (*Danio rerio*) od 2 celičnega do 128 celičnega stadija.

V petrijevki, kamor smo dali vse ikre, smo pod lupo ločili oplojena jajčeca od neoplojenih ter jajčeca z anomalijami v embrionalnem razvoju (asimetrične celične delitve, vezikli) ali s poškodovano membrano. Za test smo uporabili le na videz normalno razvita jajčeca.



Slika 6: 4 ure stara jajčeca rib cebric (*Danio rerio*).

Poskus smo začeli tako, da smo po 10 oplojenih jajčec cebric prenesli v 50 ml steklene čaše napolnjene z 20 ml razredčevalne vode s pomočjo pipete. Ob prenosu smo zajeli čim manj vode, v kateri so bile ikre. Nato smo z mililitrsko pipeto zajeli po eno jajčece z 1 ml vzorca iz čaše ter prenesli v vdolbino mikroplošče s 24 jamicami (slika 7), tako da je vsaka vdolbina vsebovala po 1 jajčece z 1 ml vzorca. Za vsako koncentracijo BPA in vsak s

fotolitsko oz. fotokatalitsko oksidacijo obdelan vzorec smo testirali 10 jajčec. Napolnjene plošče smo pokrili s pokrovom ter jih inkubirali v prostoru z dnevno/nočnim ciklom na temperaturi  $26 \pm 1$  °C. Vsa jajčeca smo inkubirali v vzorcih na mikroplošči 48 ur na približno 26 °C.



Slika 7: Mikroplošča s 24 vdolbinami za akutni test strupenosti z zarodki cebric ([http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/dl/img/prod/web\\_images/3047.jpg](http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/img/prod/web_images/3047.jpg)).

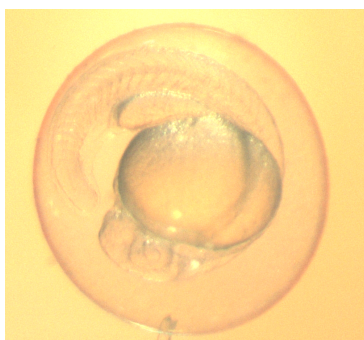
#### 3.6.4 Obdelava in vrednotenje rezultatov

Po 24 in 48 urah inkubacije smo pod lupo določevali razvojne znake (Tabela 4). Opazovali in določali smo ustaljene znake, kateri so bili za detekcijo strupenosti uporabljeni že v predhodnih raziskavah. Smo pa k opazovanim znakom dodali 2, po našem mnenju, relevantna znaka. K subletalnim znakom smo dodali deformacijo rumenjakeve vreče saj je bil ta znak pogosto prisoten pri zarodkih izpostavljenih višjim koncentracijam BPA, vendar zarodki s tem znakom niso nujno kazali letalnih znakov, kot je odsotnost srčnega utripa, nerazviti somiti, zaraščenost repa z rumenjakovo vrečo. K letalnim znakom smo dodali deformacije celotnega zarodka saj so naši rezultati pokazali, da se zarodki s hujšimi deformacijami celotnega telesa niso izvalili in niso preživel. Med te deformacije vključujemo nenormalno razvito glavo in nenormalno razvito telo zarodka. Tako smo zarodkom določali 5 letalnih ter 7 subletalnih znakov strupenih spojin na zarodke cebric ter odstotek pojavljanja posameznega učinka na zarodkih cebric. Izračunali smo 48 h EC/LC<sub>10</sub>, 48 h EC/LC<sub>50</sub>, 48 h EC/LC<sub>90</sub> ter 95% interval zaupanja za 48 h EC/LC<sub>50</sub> s pomočjo računalniškega programa z uporabo probit analize.

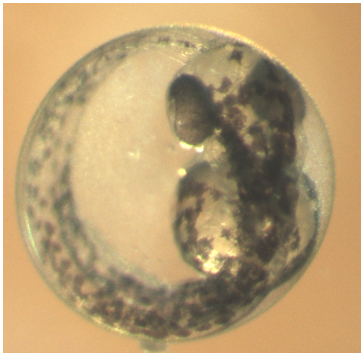
Tabela 4: Opazovani znaki razvoja zarodkov cebric po izpostavljenosti strupenim spojinam.

Letalne spremembe:	Koaguliran zarodek
	Rep ni ločen od rumenjaka
	Ni razvitih somitov
	Ni srčnega utripa
	Deformacija celega zarodka
Sub-letalne spremembe:	Ni razvitih oči
	Zarodek se ne giblje
	Ni pigmenta v očeh
	Ni krvnega obtoka
	Ni pigmentacije telesa
	Ni otolitov v ušesu
	Deformacija rumenjakeve vreče
Ostale spremembe:	Prisotnost endemov
	Ni oplojena
	Poškodovana hrbtenica

Vse znake strupenosti na zarodke cebric smo primerjali z zarodki cebric iz kontrole, takšnimi, ki niso kazali letalnih, subletalnih, ali drugih znakov napak v razvoju zarodka (Slika 8, 9)



Slika 8: 24 ur star normalno razvit zarodek cebrice (*Danio rerio*).



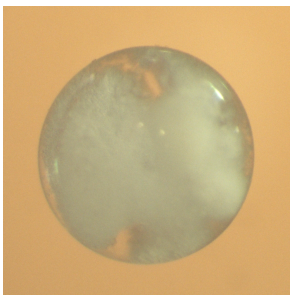
Slika 9: 48 ur star normalno razvit zarodek cebrice (*Danio rerio*).

Po 48 urah smo zarodkom cebric lahko določili naslednje toksikološke znake:

- Letalni znaki:

Letalni znaki so znaki, ki indicirajo letalnost. Raziskave so pokazale, da se zarodki ne izvalijo, če je kateri od teh znakov prisoten. Ti znaki so:

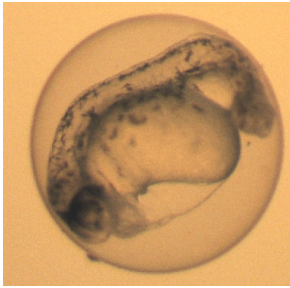
1. Koaguliran zarodek se opazi že brez povečave. Jajčeca so neprosojna in skozi mikroskop lahko izgledajo temnejša od ostalih.



Slika 10: Koaguliran zarodek cebrice.

2. Pomemben znak je ločenost repa od rumenjakeve vreče. Normalno razvit zarodek ima dobro viden rep ločen od rumenjaka.





Slika 11: Rep zarodka starega 48 ur ni ločen od rumenjaka.

3. Zarodek v razvoju ne tvori somitov.
4. Če med pregledom zarodka srčni utrip ni zaznaven, je zarodek mrtev.
5. Deformacije celega zarodka, kot so nenormalno razvita hrbtne struna in nenormalno razvita glava so znaki, ob katerih se zarodek ne izvali.



Slika 12: Deformacija celega zarodka starega 48 ur.

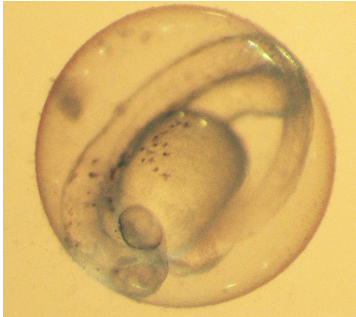
Pogosto je pri posameznem zarodku prisotnih več letalnih znakov hkrati. Tako deformacijo celega telesa pogosto spremlja slaba razvitost in zraslost repa z rumenjarkovo vrečo in odsotnost srčnega utripa.

- Subletalni znaki:

Subletalni znaki so znaki, ki se pojavljajo na zarodku tekom embriogeneze, vendar ne povzročajo smrti, niso letalni. Ti znaki so:

1. Ni razvitih oči,
2. zarodek se ne giblje,
3. ni pigmenta v očeh (Slika 13),
4. ni krvnega obtoka,

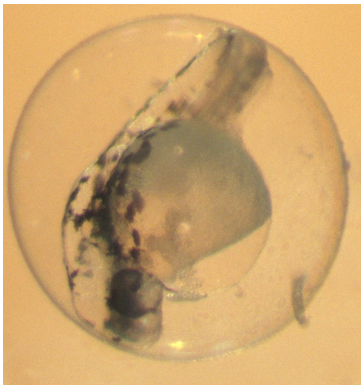
5. ni pigmentacije telesa (Slika 13),



Slika 13: 48 ur star zarodek brez pigmentacije telesa ter pigmentacije oči.

6. ni otolitov v ušesu,

7. deformacija rumenjarkove vreče (Slika 14).



Slika 14: 48 ur zarodek z deformirano rumenjarkovo vrečo.

### 3.7 YES TEST

#### 3.7.1 Priprava BPA raztopine

Priprava BPA raztopine je potekala, kot opisano pri testu strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*). Za testiranje estrogenosti različnih koncentracije BPA smo uporabili le izhodno raztopino BPA, katero smo med poskusom redčili.

#### 3.7.2 Priprava vzorcev

##### 3.7.2.1 Priprava minimalnega gojišča

Najprej smo nalili ultračisto vodo (mQ) do polovice 1000 ml bučke in dodali:

- 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 1,98 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,
- 4,2 g KOH,
- 0,41 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ,
- 50 mg leucina,
- 50 mg histidina,
- 50 mg adenina,
- 20 mg arginina- HCl,
- 20 mg metionina,
- 30 mg tirozina,
- 30 mg izoleucina,
- 30 mg lizin- HCl,
- 25 mg fenilalanina,
- 100 mg glutaminske kisline,
- 150 mg valina,
- 375 mg serina,
- 1 ml  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  raztopine (40 mg raztopimo v 50 ml mQ).

Pripravljeno gojišče smo 2 uri mešali na mešalu (600 rpm,  $T < 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Minimalno gojišče smo nato prelili po 45 ml v 200 ml erlenmajerice ter jih avtoklavirali ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 minut). 200 ml erlenmajerice z minimalnim gojiščem smo do uporabe hranili na sobni temperaturi.

### 3.7.2.2 Priprava rastnega gojišča

Rastni medij smo pripravili sterilno po spodnjem receptu tako, da smo dodali ustrezne snovi v minimalni medij sterilno, ob ognju:

- 5 ml raztopine glukoze.

Sterilizirali smo raztopino glukoze (20 g glukoze/100 ml destilirane vode) z avtoklaviranjem 20 minut pri  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  in 1,1 bar ter jo shranili na sobni temperaturi.

- 1,25 ml raztopine aspartatne kisline.

Raztopino aspartata (200 mg aspartatne kisline/50ml destilirane vode) smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter shranili na sobni temperaturi.

- 0,5 ml raztopine vitaminov:
  - 8 mg tiamina
  - 8 mg piridoksina
  - 8 mg pantotenske kisline
  - 40 mg inositola

Vse kemikalije smo raztopili v 180 ml ultračiste vode ter dodali 20 ml biotinske raztopine (2 mg/100 mL ultračiste vode). Nato smo vitaminsko raztopino sterilizirali s filtriranjem čez 0,2 µm filter. Hranili smo jo v hladilniku (4 °C).

- 0,4 ml raztopine treonina.

Raztopino treonina (24 mg/ml) smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter shranili pri temperaturi 4 °C.

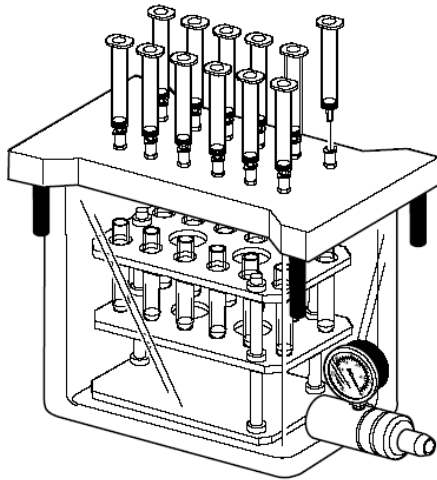
- 125 µl bakrovega (II) sulfata.

249,7 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  smo raztopili v 50 ml ultračiste vode. Sterilizirali smo ga s filtriranjem čez filter s porami 0,2 µm in shranili pri sobni temperaturi.

### 3.7.2.3 Priprava vzorcev za testiranje

Ker so bile spojine z estrogensko aktivnostjo v vodnih vzorcih prisotne v zelo nizkih koncentracijah, smo pred samim poskusom ugotavljanja prisotnosti le-teh s testom YES, izvedli še postopek koncentriranja oz. ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

Pri postopku SPE smo uporabili kolone proizvajalca Waters® Oasis® s polnilom Oasis® HLB 60µm. Specifična površina polnila je v območju 727–889 m<sup>2</sup>/g, povprečni premer por znaša od 73 do 89 Å. Vsebujejo polnilo, ki ima po sestavi ustrezno ravnotežje hidrofilno/lipofilno, kar omogoča visok izkoristek za kisle, bazične in nevtralne snovi (OASIS® HLB Extraction Cartridges, 2000).



Slika 15: Primer vakuumskega razdelilnika pri ekstrakciji na trdni fazi (Empore, 1998).

Kondicioniranje kolon je potekalo s 4 ml 100% metanola. Ostanek topil smo spirali s 4 ml ultračiste vode in nato nanegli vzorec (količine prikazane v tabeli 5). Za tem je sledilo spiranje nečistoč s 4 ml 5% metanola. Kolone smo sušili s prepihovanjem z dušikom. Posušene kolone smo lahko shranili v zamrzovalnik ali pa je po končanem sušenju sledila elucija vzorcev s 4 ml metanola. V epruveh dobili vzorce smo koncentrirali s sušenjem z dušikom do končnega volumna 1 ml. Končne koncentrirane vzorce smo v vialah shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 5: Začetni volumni posameznih vzorcev dobljenih s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo naneseni na kolone.

Oznake vzorcev po fotolitski / fotokatalitski oksidaciji	Volumen vzorca, nanešen na SPE (ml)
1	29
2	27
3	29
4	22
5	33
6	40
7	32
8	30
9	30

### 3.7.3 Izvedba testov

Test estrogenosti različnih koncentracij BPA smo opravili tako, da smo v prvo vrstico stolpca mikrotiterske plošče nanesli po 100  $\mu$ l začetnega vzorca in sicer v koncentraciji 20 mg/l BPA ter oba standarda: estradiol (27,7  $\mu$ g/l) in progesteron (36,4  $\mu$ g/l). Standard E2 (estradiol) je predstavljal pozitivno kontrolo, standard P (progesteron), ki je sicer steroidni hormon, vendar nima estrogenskega učinka, pa negativno. Redčitve BPA smo pripravili tako, da smo dali v vsako naslednjo luknjico istega stolpca 50  $\mu$ l vzorca iz prejšnje luknjice ter dodali 50  $\mu$ l etanola, torej je bil redčitveni faktor 2. Tako pripravljene vzorce na prvi mikrotiterski plošči, smo prenesli na drugo mikrotitersko ploščo tako, da smo v iste luknjice prenesli 10  $\mu$ l vzorca iz prve plošče. Plošče smo nato pustili v laminariju odprte, da je izhlapel ves etanol, saj bi ta motil test. Za testiranje estrogenske aktivnosti vzorcev pridobljenih po čiščenju s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo, smo vzorce najprej koncentrirali po SPE postopku opisanem zgoraj, nato pa smo jih direktno nanesli v vsako luknjico stolpca mikrotiterske plošče. Nanešen volumen smo preračunali glede na količino začetnega vzorca (Tabela 5) ter mikrotiterske plošče sušili v sterilnem laminariju, da ni prišlo do okužb. V posušene plošče smo nato dodali po 200  $\mu$ l kvasovk, pripravljenih v rastnem mediju z dodanim substratom CPRG. Vse delo je potekalo sterilno

ob ognju v laminariju. Poleg zgoraj omenjenih kontrol smo imeli tudi kontrolo, s katero smo se prepričali, da je rastno gojišče primerno za rast kvasovk in da v njem niso prisotne snovi, ki bi dale lažno pozitiven rezultat (Bb; kvasovke + rastni medij). Za ničelne vzorce oz. B (slepa kontrola) smo uporabili rastno gojišče s kvasovkami in CPRG-jem. Mikrotitersko ploščo smo nato za 48 do 72 ur inkubirali pri 34 °C.

#### 3.7.4 Obdelava in vrednotenje rezultatov

Po dvodnevni inkubaciji vzorcev s kvasovkami pri 34 °C smo izmerili absorbance pri 575 nm in pri 620 nm. Pri 575 nm smo merili absorbanco barve razgradnega produkta CPRG, pri 620 nm pa smo merili absorbanco rasti kvasovk.

Aktivnost encima  $\beta$ -galaktozidaze, ki je razgradil CPRG, smo izračunali po naslednji formuli:

$$T_a = A_{575} - (A_{620} - B_{povp}) \quad \dots (9)$$

Kjer je :

- $T_a$  = aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze
- $A_{575}$  = absorbanca, izmerjena pri 575 nm
- $A_{620}$  = absorbanca, izmerjena pri 620 nm
- $B_{povp}$  = absorbanca povprečja ničelnega vzorca (izmerjena pri 620 nm)

Estrogensko aktivnost naših vzorcev smo izračunali po naslednji enačbi:

$$EA = \frac{T_a - X}{\Delta} \times 100 \quad \dots (10)$$

Kjer je:

- EA = estrogenska aktivnost vzorca (%)
- $T_a$  = vrednost aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze, izračunana po enačbi (1)
- X = začetna točka intervala estrogenosti (kar predstavlja ničelni vzorec B)
- $\Delta$  = interval estrogenosti z začetno točko X v ničelnem vzorcu B in konec v izhodnem vzorcu 20 mg/l BPA.

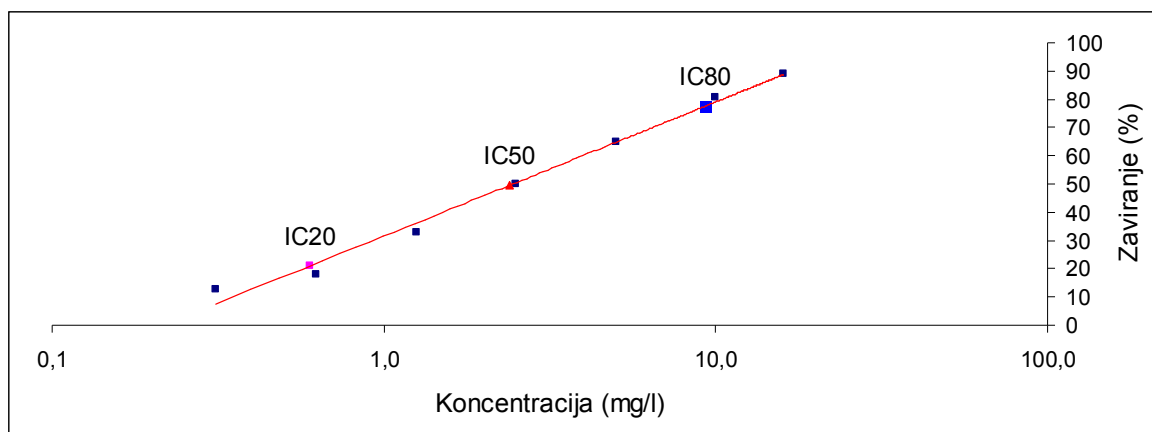
## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 BISFENOL A (BPA)

#### 4.1.1 Testi strupenosti

##### 4.1.1.1 Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*)

Odvisnost zaviranja luminiscence luminiscentnih bakterij (*Vibrio fischeri*) od različnih koncentracij BPA je prikazana na sliki 16.



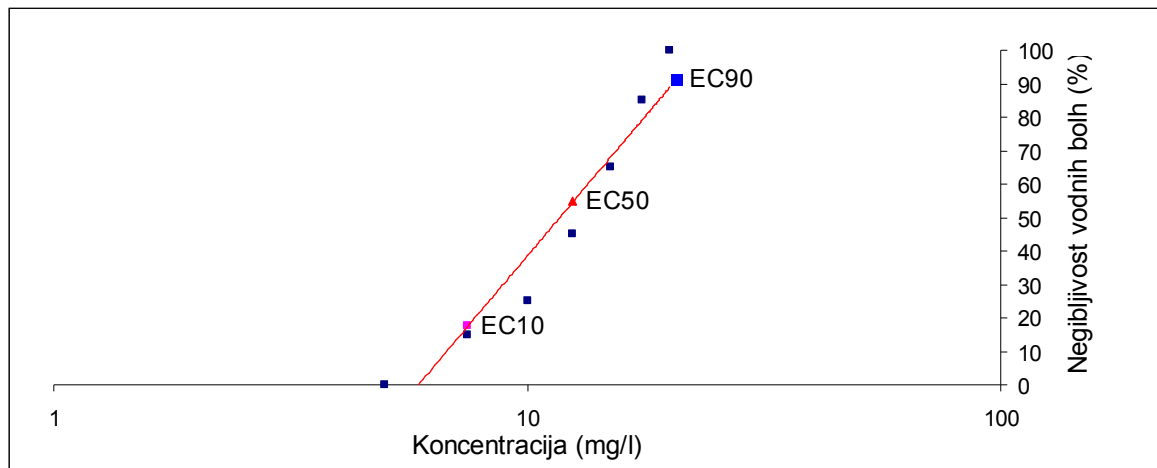
Slika 16: Zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) v odvisnosti od koncentracije BPA.

Rezultati testa akutne strupenosti BPA na luminiscentne bakterije (*Vibrio fischeri*) prikazujejo, da se z višanjem koncentracije BPA v suspenziji sorazmerno povečuje zaviranje luminiscence bakterij. Test strupenosti na luminiscentne bakterije je pokazal 89 % zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) pri najvišji testirani koncentraciji BPA. Ta je bila zaradi narave testa 16 mg/l saj smo izhodno raztopino z 20 mg/l BPA, z dodatkom suspenzije luminiscentnih bakterij, razredčili. Najnižji testirani koncentraciji BPA (0,3 mg/l in 0,6 mg/l) povzročata zaviranje luminiscence, ki je manjše od 20 %, zato se ne tretirata kot strupeni. Najnižja testirana koncentracija, ki se upošteva za strupeno, je 1,3 mg/l BPA, s 33% zaviranjem luminiscence (Slika 16). Test akutne strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri* se je v predhodnih raziskavah izkazal kot zelo primeren presejalni test za hitro oceno strupenosti vod. Vrednost 30 min IC<sub>50</sub> znaša 2,4 mg/l BPA.



#### 4.1.1.2 Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Strupenost različnih koncentracij BPA za vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 24 urah izpostavljenosti je prikazana na sliki 17.



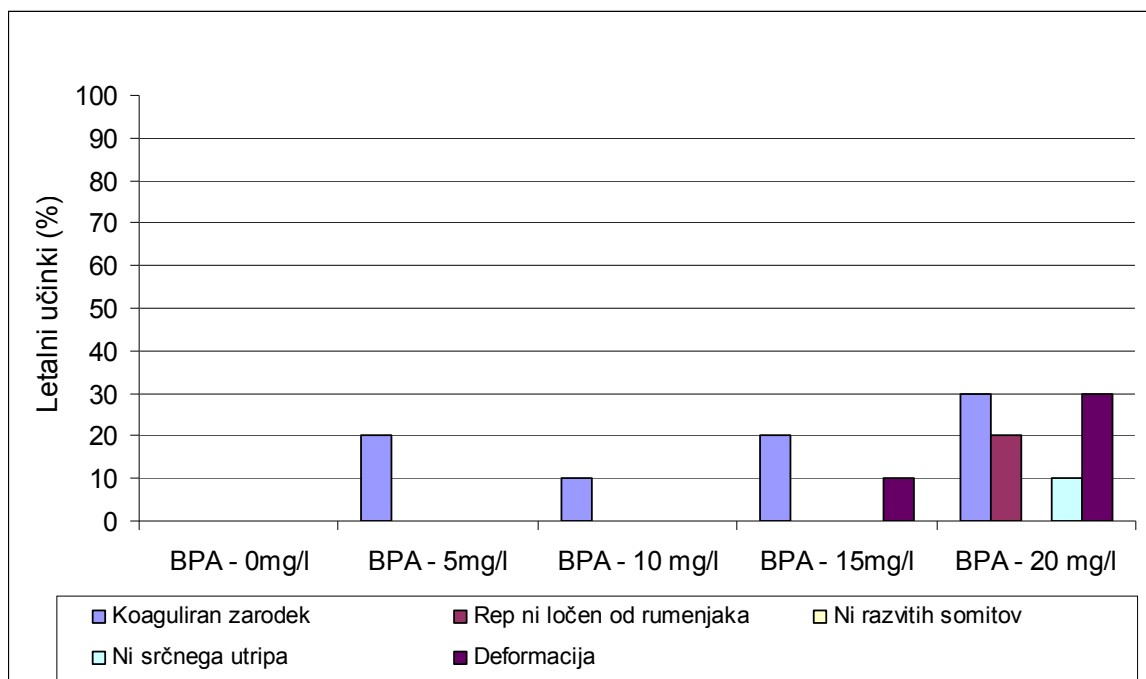
Slika 17: Negibljive vodne bolhe (*Daphnia magna*) v odvisnosti od koncentracije BPA.

Test strupenosti BPA z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) je pokazal, da se s povečevanjem koncentracije BPA povečuje strupenost le tega za vodne bolhe. Za testni organizem nestrupeno koncentracijo smo določili pri 5 mg/l BPA saj so bile po 24 urah inkubacije normalno gibljive vse izpostavljene vodne bolhe. Odziv vodnih bolh se z višanjem koncentracije BPA sorazmerno povečuje in doseže 100 % smrtnost oziroma negibnost testnih organizmov po 24 urni izpostavljenosti izhodni raztopini BPA (20 mg/l). Najnižja testirana koncentracija BPA, ki je še pokazala strupenost je bila 7,5 mg/l BPA. Izračunana vrednost 24 h  $EC_{50}$  za vodne bolhe (*Daphnia magna*) znaša 12,5 mg/l BPA. Rezultati akutnega testa strupenosti že objavljenih raziskav so pokazali različne 24 urne vrednosti  $EC_{50}$  in sicer 8,57 mg/l (Brennen, 2006) in 24 mg/l (Ike s sod., 2002). Objavljeni rezultati 48 urne vrednosti  $EC_{50}$  pa so 7,75 mg/l (Brennen, 2006), 10 mg/l (Alexander s sod. 1988, Ike s sod., 2002) in 16 mg/l (Mu s sod., 2005).

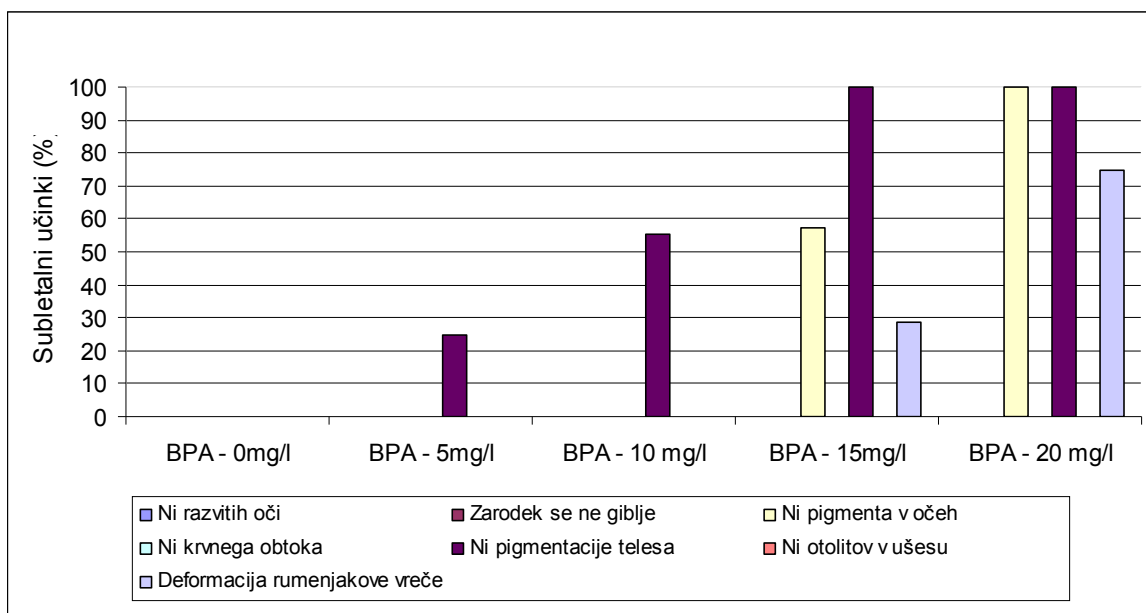
#### 4.1.1.3 Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric (*Danio rerio*)

Strupenost BPA za zarodke smo ugotavljali z določanjem števila letalnih in subletalnih učinkov na zarodke cebric. Učinki 48 urne izpostavljenosti zarodkov cebric (*Danio rerio*) različnim koncentracijam BPA (od 0 mg/l do 20 mg/l) so prikazani na slikah 18 in 19. Tabela 6 prikazuje opažene učinke na 10 zarodkih, ki so bili 48 ur izpostavljeni 20 mg/l

BPA. Odstotek intaktnih (normalno razvitih) zarodkov cebric, oziroma zarodkov, ki ne kažejo nobenega letalnega, subletalnega ali kakšnega drugega znaka, je prikazan na sliki 20.



Slika 18: Letalni učinki na zarodkih cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.

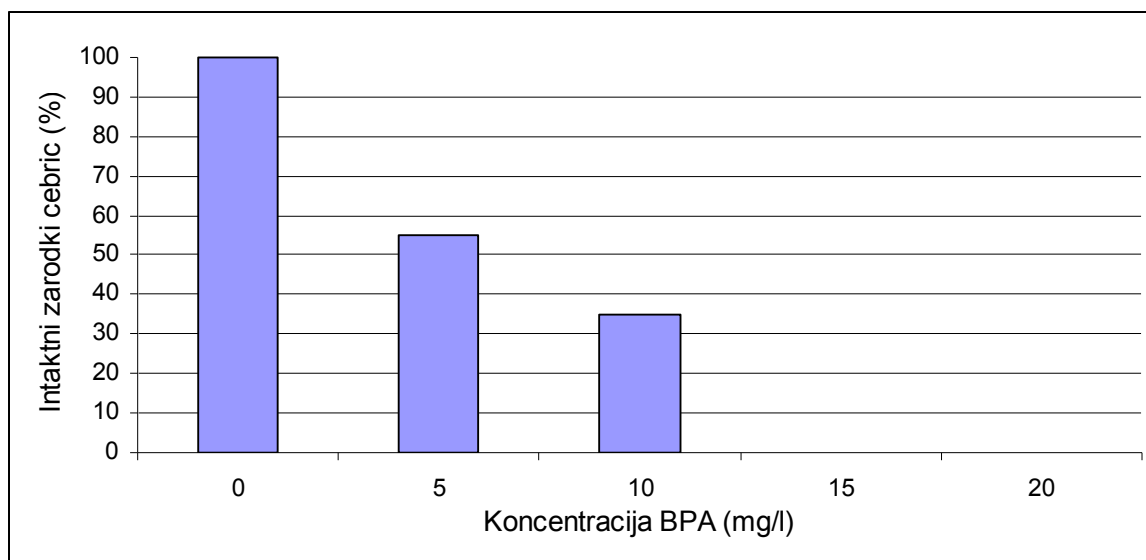


Slika 19: Subletalni učinki na zarodkih cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.

Tabela 6: Prikaz opaženih znakov na 10 zarodkih cebric (*Danio rerio*) po 48 urni izpostavljenosti 20 mg/l BPA.

Zarodek:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Letalne spremembe:</b>										
Koaguliran zarodek	X		X					X		
Rep ni ločen od rumenjaka							X			X
Ni razvitih somitov										
Ni srčnega utripa		X								
Deformacija celega organizma							X			X
<b>Sub-letalne spremembe:</b>										
Ni razvitih oči										
Zarodek se ne giblje										
Ni pigmenta v očeh				X	X	X			X	
Ni krvnega obtoka										
Ni pigmentacije telesa				X	X	X			X	
Ni otolitov v ušesu										
Deformacija rumenjakeve vreče				X	X					
<b>Ostale spremembe:</b>										
Prisotnost endemov										
Ni oplojena										
Poškodovana hrbtenica										

X - Znak je pri tem zarodku prisoten.



Slika 20: Normalno razviti zarodki cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA.

Dobro razviti in lažje določljivi znaki so se pri zarodkih cebric razvili po 48 urah izpostavljenosti testnim koncentracijam BPA. Dobljeni rezultati prikazujejo večanje števila letalnih in subletalnih znakov na zarodkih rib cebric (*Danio rerio*) sorazmerno z višanjem koncentracije BPA. Rezultati so pokazali različno občutljivost spremljanih parametrov. Največji učinek je imel BPA na koagulacijo zarodkov (letalni znak) in odsotnost pigmentacije telesa (subletalni znak). Subletalni znak, odsotnost pigmentacije telesa se pojavi pri 25 % zarodkov že pri 5 mg/l BPA. 56 % zarodkov cebric je brez pigmenta na telesu po inkubaciji v 10 mg/l BPA, 100 % pa po 48 urni inkubaciji v 15 in 20 mg/l BPA. Drugi subletalni učinki zarodkov, ki smo jih zaznali po 48 urni izpostavljenosti zarodkov cebric vzorcu s koncentracijo 15 mg/l BPA, so odsotnost pigmenta v očeh (57 %) in deformacija rumenjakeve vreče (29 %). Ob izpostavljenosti cebric 20 mg/l BPA smo opazili, da 100 % zarodkov ni imelo pigmenta v očeh, enak odstotek (100 %) ni imelo pigmenta na telesu, 75 % zarodkov pa je imelo deformirano rumenjakevo vrečo. Kot dodaten znak smo pri teh zarodkih opazili še poškodbo hrbtenice (nenormalno razvita hrbtna struna) in sicer pri 13 % zarodkov rib cebric. Ugotovili smo, da so subletalni odzivi zarodkov bolj občutljivi od letalnih saj smo letalne znake opazili šele pri višjih koncentracijah BPA (15 mg/l in 20 mg/l BPA). Ti znaki so koagulacija ikre cebric, ki se pojavi pri 15 mg/l BPA (pri 20 % zarodkov) in 20 mg/l BPA (pri 30 % zarodkov).

Nenormalno razvite zarodke (smrtne deformacije zarodkov) smo pri 15 mg/l BPA opazili pri 10 % zarodkov, pri 20 mg/l BPA smo ta znak opazili pri 30 % zarodkov. Pri najvišji koncentraciji BPA smo zaznali še dva dodatna letalna znaka in sicer zraslost repa z rumenjarkovo vrečo (20 %) ter odsotnost srčnega utripa (10 %). 48 h EC<sub>50</sub> smo določili pri 7,5 mg/l BPA, 48 h LC<sub>50</sub> za cebrice smo izračunali pri 18,2 mg/l BPA.

#### 4.1.2 Primerjava občutljivosti testnih organizmov

Primerjava EC, IC in LC vrednosti za strupenost BPA na testne organizme ter 95% interval zaupanja za EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> je prikazana v tabeli 7.

Tabela 7: Izračunane EC / IC / LC vrednosti za BPA za uporabljene testne organizme.

	<i>Vibrio fischeri</i> (IC vrednosti)	<i>Daphnia magna</i> (EC vrednosti)	<i>Danio rerio</i>	
			(EC vrednosti)	(LC vrednosti)
Čas izpostavitve	30 min	24 h	48 h	
EC <sub>10</sub> (IC <sub>20</sub> ) (LC <sub>10</sub> )	0,6	7,5	4,2	10,2
EC <sub>50</sub> (IC <sub>50</sub> ) (LC <sub>50</sub> )	2,4	12,5	7,5	18,2
95 % interval zaupanja	2,4 do 2,5	11,3 do 14,1	/ *	16,9 do 20,2
EC <sub>90</sub> (IC <sub>80</sub> ) (LC <sub>90</sub> )	9,3	20,7	13,5	32,3

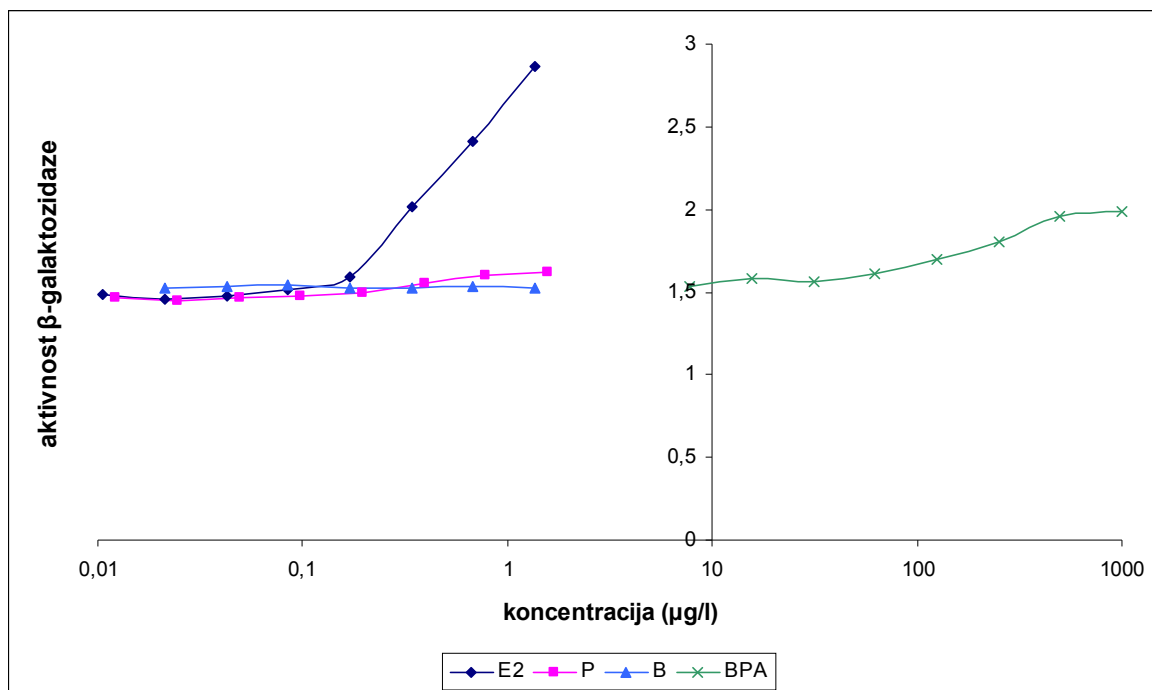
\* 95% interval zaupanja nismo mogli izračunati zaradi pomanjkanja podatkov

Če primerjamo EC<sub>50</sub> in IC<sub>50</sub> vrednosti, se je za najbolj občutljivega izkazal testni sistem akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*), kjer je 30 min IC<sub>50</sub> za BPA 2,4 mg/l. Za manj občutljivega se je izkazal test strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) saj je 24 h EC<sub>50</sub> za BPA 12,5 mg/l. EC vrednosti testa z zarodki cebric so pokazale večjo občutljivost od testa z vodnimi bolhami. Najmanjšo občutljivost pa so pokazale LC vrednosti testa z zarodki cebric saj je 48 h LC<sub>50</sub> za BPA 18,2 mg/l.

### 4.1.3 Test estrogenosti

#### 4.1.3.1 Test za določanje estrogenske aktivnosti (YES)

Slika 21 prikazuje primerjavo estrogenske aktivnosti BPA s standardi E2 ( $17\beta$ -estradiol), P (progesteron) ter ničelnim vzorcem.



Slika 21: Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze po izpostavitvi različnim koncentracijam BPA v primerjavi z E2 ( $17\beta$ -estradiol), ki predstavlja pozitivno kontrolo, P (progesteron), ki predstavlja negativno kontrolo in B (blank), ki predstavlja ničelni vzorec.

Kot prikazuje slika 21, estrogenska aktivnost pada z zmanjševanjem koncentracij BPA. Pri najvišji koncentraciji 20 mg/l BPA, smo izmerili najvišjo aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze (1,98). Najnižja testirana koncentracija je bila 0,3 mg/l BPA, ki ni pokazala estrogenske aktivnosti, saj je bila aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze enaka kot pri ničelnem vzorcu (1,53).

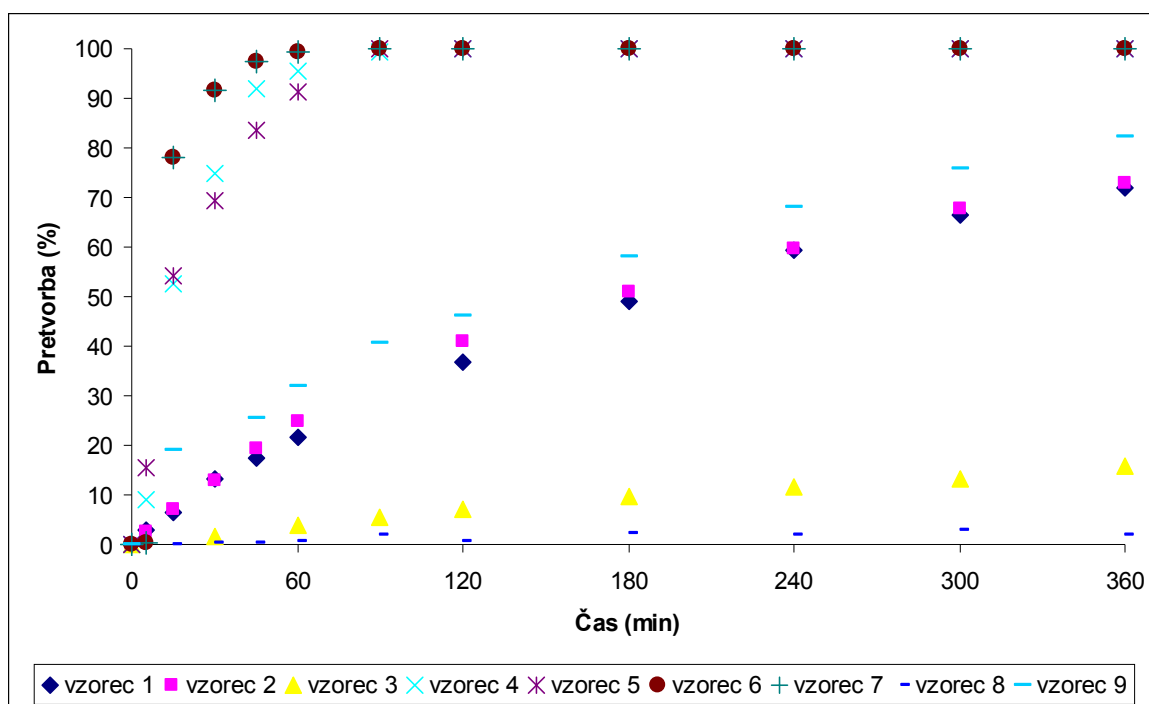
## 4.2 VZORCI PO ODSTRANJEVANJU BPA

### 4.2.1 Vzorci po odstranjevanju BPA s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo

Uporabljeni reakcijski mediji, opis razmer v poskusih, uporaba katalizatorjev, učinkovitost pretvorbe BPA ter preostanek BPA v vzorcih po tretiranju so prikazani v tabeli 8. Učinkovitost pretvorbe BPA v odvisnosti od časa je prikazana na sliki 22.

Tabela 8: Tipi reakcijskega medija, žarnic in katalizatorjev v poskusih fotolitske in fotokatalitske oksidacije ter učinkovitost pretvorbe BPA in ostanek BPA v posameznih vzorcih po končanem poskusu.

vzorec	voda	žarnica	katalizator	pretvorba (%)	ostanek BPA (mg/l)
1	ultra čista	UV 254 nm, 17 W	brez	83,9	3,22
2	vodovodna	UV 254 nm, 17 W	brez	73,0	5,4
3	ultra čista	UV 365 nm, 150 W	brez	15,9	16,82
4	ultra čista	UV 365 nm, 150 W	TiO <sub>2</sub> P-25	100,0	0
5	vodovodna	UV 365 nm, 150 W	TiO <sub>2</sub> P-25	100,0	0
6	ultra čista	UV 254 nm, 17 W	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100,0	0
7	ultra čista	UV 365 nm, 150 W	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100,0	0
8	ultra čista	halogenka	brez	3,0	19,4
9	ultra čista	halogenka	TiO <sub>2</sub> P-25	82,2	3,56



Slika 22: Pretvorba BPA pod različnimi razmerami v odvisnosti od časa.

Najnižjo vrednost pretvorbe BPA in tudi najpočasnejšo pretvorbo smo zaznali v vzorcih 3 in 8, kjer smo vzorca osvetljevali s halogensko žarnico oz. z 150 W UV žarnico. Konverzija vzorca 8 je bila 3,0%, v vzorcu pa je ostalo še približno 19 mg/l BPA, kar je največ od vseh vzorcev po fotolitski ali fotokatalitski oksidaciji. Pretvorba BPA v vzorcu 3 je bila 15,9%, v vzorcu je ostalo še približno 17 mg/l BPA. Visok odstotek pretvorbe BPA smo izmerili v vzorcih 1 in 2, kjer smo uporabljali 17 W UV žarnico (254 nm) ter v vzorcu 9, kjer smo osvetljevali s halogensko svetilko in uporabili katalizator  $\text{TiO}_2$  P-25. Konverzija je obsegala od 73,0 do 83,9 %. Popolno pretvorbo BPA pa smo izmerili v vzorcih 4, 5, 6 in 7. Visoko učinkovitost je tako pokazala fotokatalitska oksidacija s katalizatorjem  $\text{TiO}_2$  P-25 in 150 W UV žarnico (vzorec 4 in 5) ter z uporabo  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 17 W (vzorec 6) kot tudi 150 W UV žarnice (vzorec 7). Popolno pretvorbo smo zaznali tako pri uporabi ultra čiste kot tudi vodovodne vode.

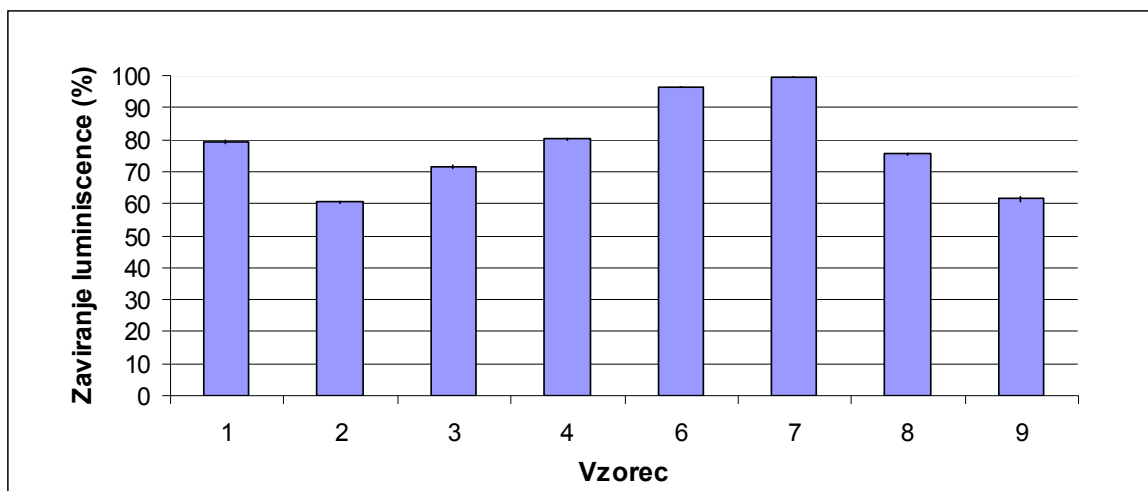
Pri pretvorbi BPA s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo nismo zaznali večjih razlik med uporabo ultra čiste vode ter vodovodne vode. Katalizator je bistveno vplival na hitrost razgradnje BPA saj se je razgradnja BPA začela takoj, 100% pretvorbo pa smo izmerili že po 90 minutah (Slika 22).



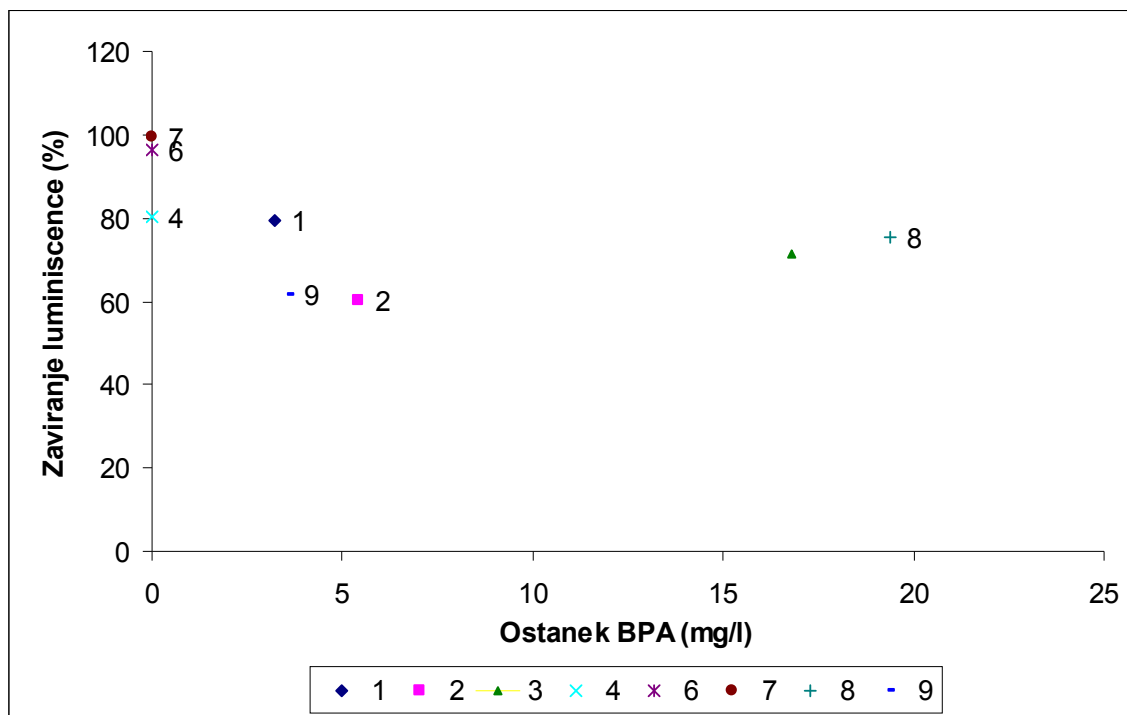
## 4.2.2 Testi strupenosti

### 4.2.2.1 Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*)

Zaviranje luminiscence po izpostavljenosti luminiscentnih bakterij različnim vzorcem po fotolitski oziroma fotokatalitski oksidaciji je prikazana na sliki 23. Vrednost zaviranja luminiscence v odvisnosti od preostanka BPA v posameznem vzorcu pa je prikazana na sliki 24.



Slika 23: Zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) pri posameznih fotolitsko oziroma fotokatalitsko obdelanih vzorcih BPA.



Slika 24: Zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) v odvisnosti od ostanka BPA v posameznih vzorcih po fotolitski oziroma fotokatalitski oksidaciji.

Koncentracija vseh vzorcev je zaradi narave testa bila 50 vol.%. Najvišjo vrednost zaviranja luminiscence bakterij in tako tudi največjo strupenost smo izmerili ob izpostavitvi bakterij vzorcem 6 (96,3% zaviranje) in 7 (99,4% zaviranje). Strupenost teh dveh vzorcev je celo višja kot je izmerjena strupenost izhodne raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/l BPA. Ta vzorca predstavljata paradoks saj sta najbolj strupena, kljub temu, da smo pri teh vzorcih izmerili popolno, 100 % razgradnjo BPA oziroma v teh vzorcih BPA ni bil prisoten. Očitno visoko strupenost na luminiscentne bakterije (*Vibrio fischeri*) v teh dveh vzorcih povzroča katalizator  $H_2O_2$ , ki smo ga uporabili v prebitku in smo ga zaznali v vzorcih tudi po končani reakciji. Dokaj visoko vrednost zaviranja luminiscence smo izmerili pri vzorcih 1, 3, 4 in 8 (vrednost zaviranja obsega od 71,4 do 80,2 %). V vzorcih 3 in 8 je visoko zaviranje luminiscence posledica ostanka BPA, ki povzroča strupenost saj je v vzorcu 3 ostalo še 16,8 mg/l, v vzorcu 8 pa kar 19,4 mg/l BPA. Za vzorca 1 in 4 tega ne moremo trditi saj je razgradnja v teh dveh vzorcih dosegla 84 oz. 100 %. Najnižjo stopnjo zaviranja luminiscence v primerjavi z ostalimi vzorci smo zaznali

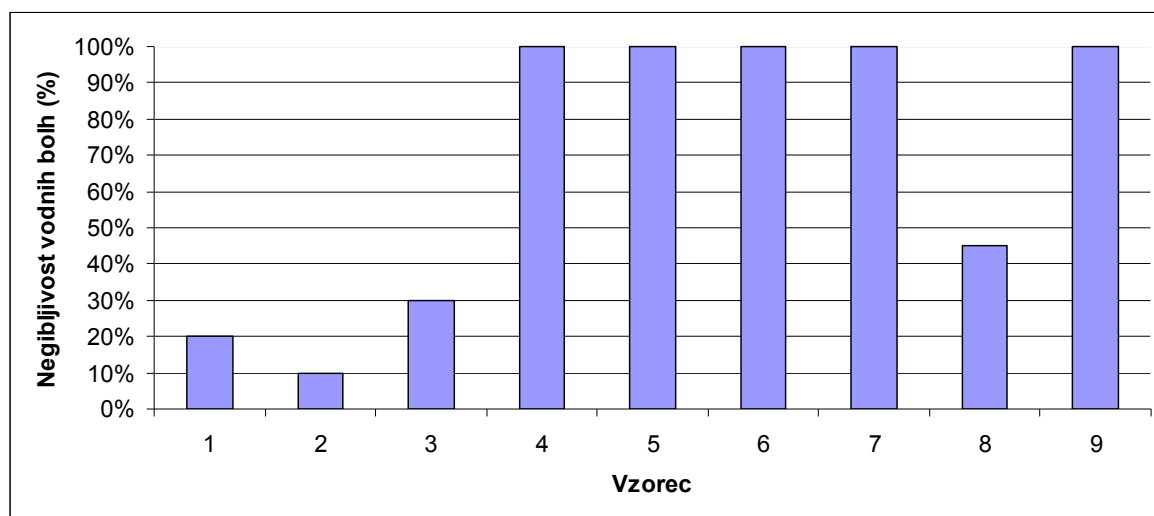
pri vzorcih 2 (60,4% zaviranje) in 9 (61,6% zaviranje). Ostanek BPA v teh dveh vzorcih je bil 5,4 mg/l (vzorec 2) in 3,56 mg/l (vzorec 9).

Zanimiv rezultat predstavljata vzorca 1 in 2 saj kljub podobnim reakcijskim pogojem med fotolitsko oksidacijo (razlikujeta se le v uporabljeni vodi) in podobni pretvorbi BPA, povzroča vzorec 1 79% zaviranje luminiscence, vzorec 2 pa 60% zaviranje luminiscence. Paradoks tega je, da je ostanek BPA v vzorcu 1 manjši (3,2 mg/l), kot v vzorcu 2 (5,4 mg/l). Iz rezultatov lahko torej sklepamo, da pri fotolitski oksidaciji v vodovodni vodi verjetno nastanejo strupeni produkti, ki vplivajo na zaviranje luminiscence bakterij.

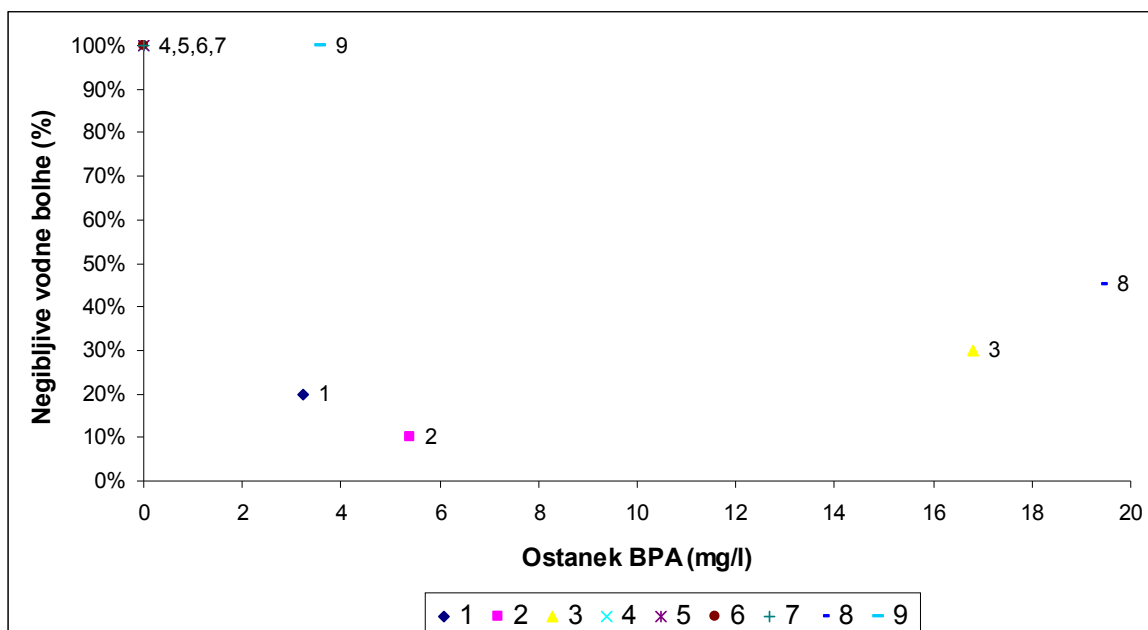
Testa strupenosti na luminiscentne bakterije nismo opravili na vzorcu 5, zaradi premajhnega volumna vzorca, ki smo ga imeli na voljo.

#### 4.2.2.2 Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

Odstotek negibljivih vodnih bolh ob izpostavljenosti posameznim vzorcem po 24 urah sta prikazana na sliki 25. Odvisnost gibljivosti vodnih bolh od ostanka BPA v posameznem vzorcu pa je prikazana na sliki 26.



Slika 25: Odstotek negibljivih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 24 h izpostavljenosti različnim vzorcem.



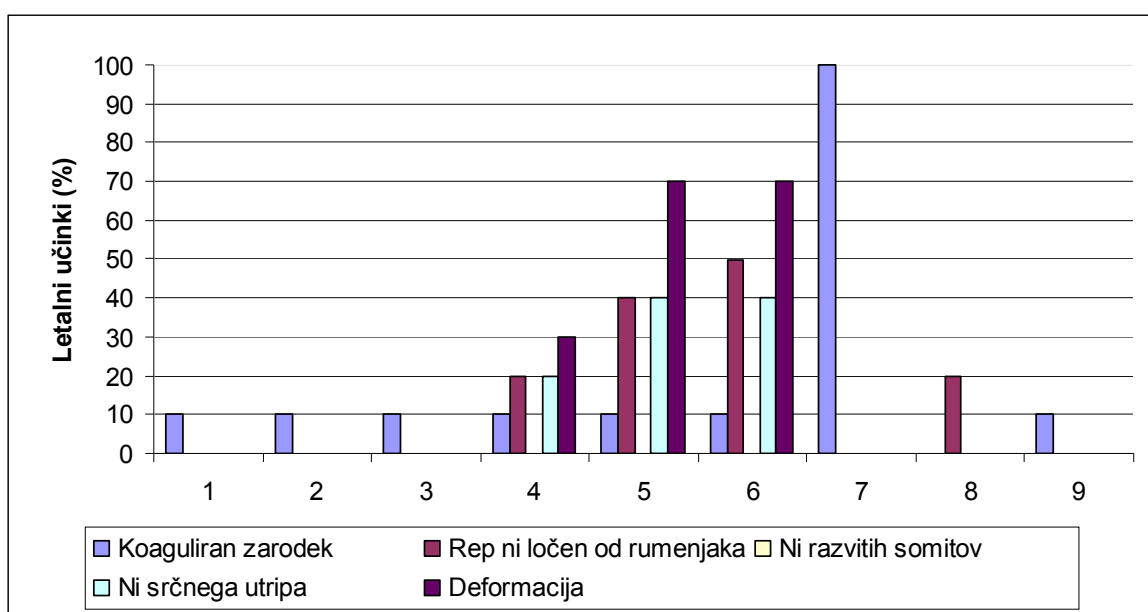
Slika 26: Od količine preostalega BPA v vzorcih po obdelavi odvisen odstotek negibljivih vodnih bolh.

Za vodne bolhe najbolj strupeni so se izkazali vzorci 4, 5, 6, 7 in 9 pri katerih smo zaznali 100% negibljivost testnih živali. V vzorcih 4, 5, 6 in 7 smo s pomočjo meritev s HPLC ugotovili, da BPA, po obdelavi v vzorcih, ni bil več prisoten, razen v vzorcu 9, kjer smo zaznali ostanke BPA, vendar v dokaj nizki koncentraciji in sicer 3,56 mg/l. Kljub popolni pretvorbi BPA in posledično izjemno nizki vsebnosti BPA, je bilo v omenjenih vzorcih 100 % izpostavljenih vodnih bolh negibljivih (Slika 25). Vse vzorce, v katerih smo zaznali 100% neaktivnost vodnih bolh, smo obdelali s fotokatalitsko oksidacijo ob uporabi katalizatorja bodisi  $\text{TiO}_2$  P-25 bodisi  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vsi preostali vzorci, obdelani s procesom fotolitske oksidacije, brez uporabe katalizatorja, so pokazali manjši učinek na vodne bolhe, kljub ostanku BPA. Največ normalno gibljivih vodnih bolh (le 10 % negibljivih bolh) smo zaznali v vzorcu 2 (Slika 25). Omenjen vzorec je vseboval vodovodno vodo iz pipe. Vzorec smo obdelali s fotolitsko oksidacijo, kjer katalizator ni bil prisoten, in ga osvetljevali s 17 W UV žarnico. Ostanek BPA v tem vzorcu je bil 5,4 mg/l. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da ostanek BPA v vzorcih nima tako velikega vpliva na gibljivost vodnih bolh (Slika 26). Večji vpliv ima način odstranjevanja BPA iz vode saj so vzorci obdelani s fotokatalitsko oksidacijo bolj strupeni. Vzrok večje strupenosti je verjetno nastanek strupenih intermediatov med potekom reakcije fotokatalitske oksidacije s prisotnim katalizatorjem  $\text{TiO}_2$  P-25. Strupenost v vzorcih z dodanim  $\text{H}_2\text{O}_2$  je verjetno

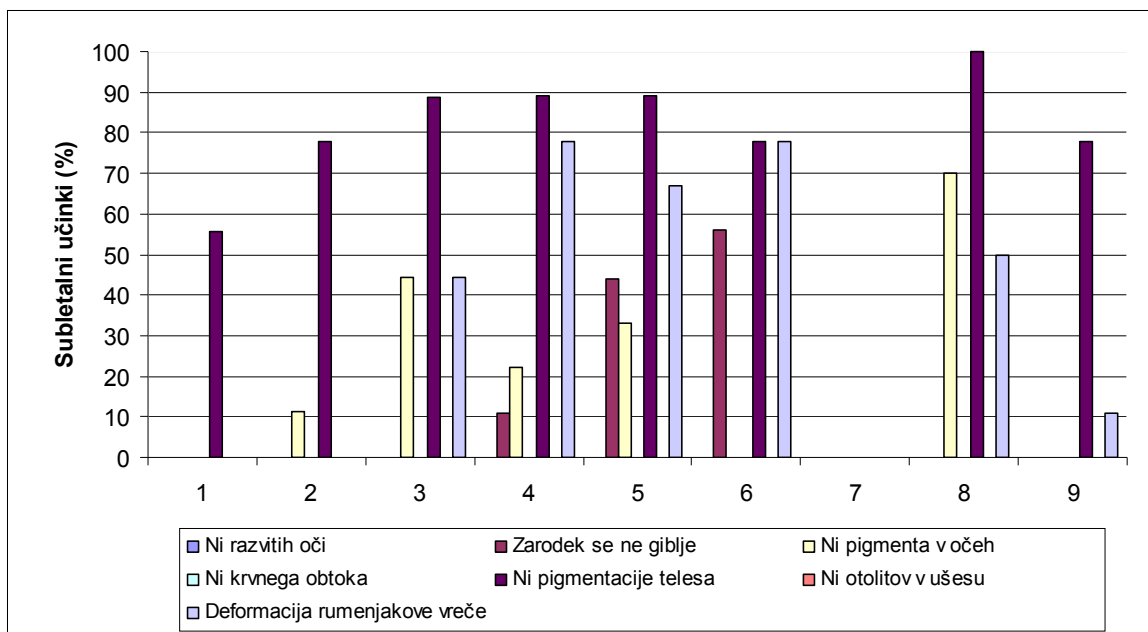
posledica tega, da smo katalizator uporabili v prebitku in smo ga zaznali v vzorcih tudi po končani reakciji.

#### 4.2.2.3 Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric (*Danio rerio*)

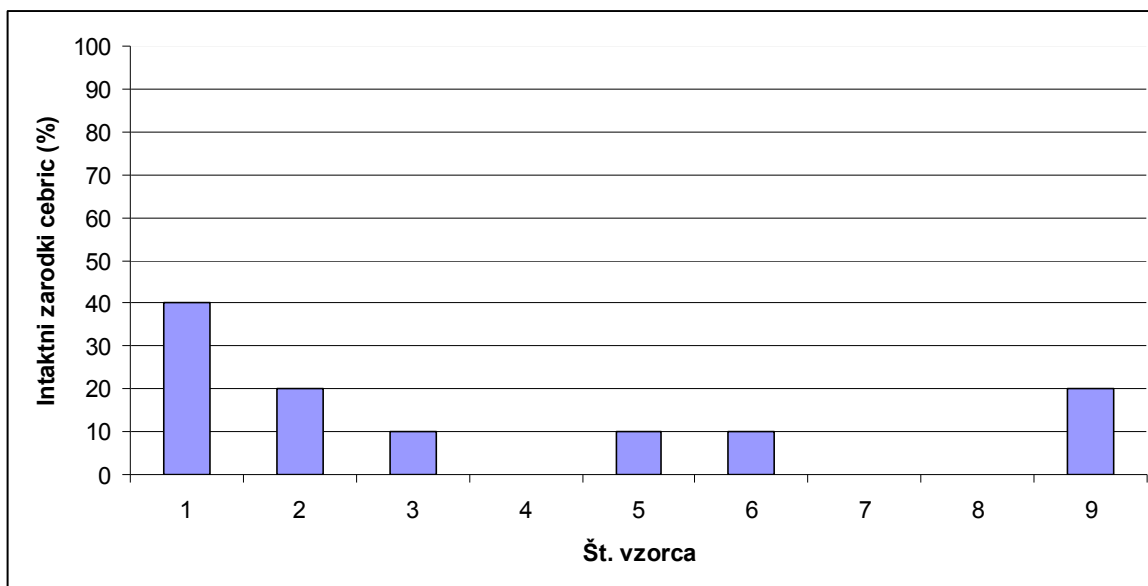
Zarodkom cebric smo po 48 urah inkubacije v posameznih vzorcih po obdelavi določili razvojne znake. Odstotek pojavljanja letalnih znakov po 48 h izpostavljenosti različnim vzorcem je prikazan na sliki 27, odstotek pojavljanja subletalnih znakov pa na sliki 28. Na sliki 29 je prikazan odstotek zarodkov cebric, ki po 48 urni izpostavitvi vzorcem niso kazali nobenih znakov strupenosti.



Slika 27: Letalni učinki na zarodke cebric po 48 urni izpostavljenosti vzorcem po čiščenju s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.



Slika 28: Subletalni učinki na zarodke cebric po 48 urni izpostavljenosti vzorcem po čiščenju s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.



Slika 29: Intaktni zarodki rib cebric (*Danio rerio*) po 48 urni izpostavitvi vzorcem obdelanih s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.

Dobljeni rezultati prikazujejo zmanjšanje letalnih znakov po odstranjevanju BPA v vzorcih 1, 2, 3 in 9. Pri vseh navedenih vzorcih smo kot edini smrtni znak zaznali koagulacijo 10 %

zarodkov, kar je verjetno posledica ostanka BPA. To potrjuje število subletalnih znakov iker cebric izpostavljenih tem vzorcem saj z naraščanjem ostanka BPA v vzorcih od 1 (3,2 mg/l BPA) do 3 (16,8 mg/l BPA) narašča tudi število subletalnih znakov. Na osnovi odstotka zarodkov cebric, ki niso kazali nobenega znaka (Slika 29), lahko sklepamo, da je bil na zarodke cebric najmanj strupen vzorec 1, s 40 % intaktnih zarodkov. Višjo stopnjo subletalne strupenosti vzorca 2 od vzorca 1 lahko razložimo z večjim ostankom BPA v vzorcu 2 (5,2 mg/l). Kljub nižji vsebnosti BPA v vzorcu 9 (3,5 mg/l) pa je strupenost primerljiva z vzorcem 2. Večja strupenost je verjetno posledica prisotnosti strupenih produktov fotolitske oksidacije.

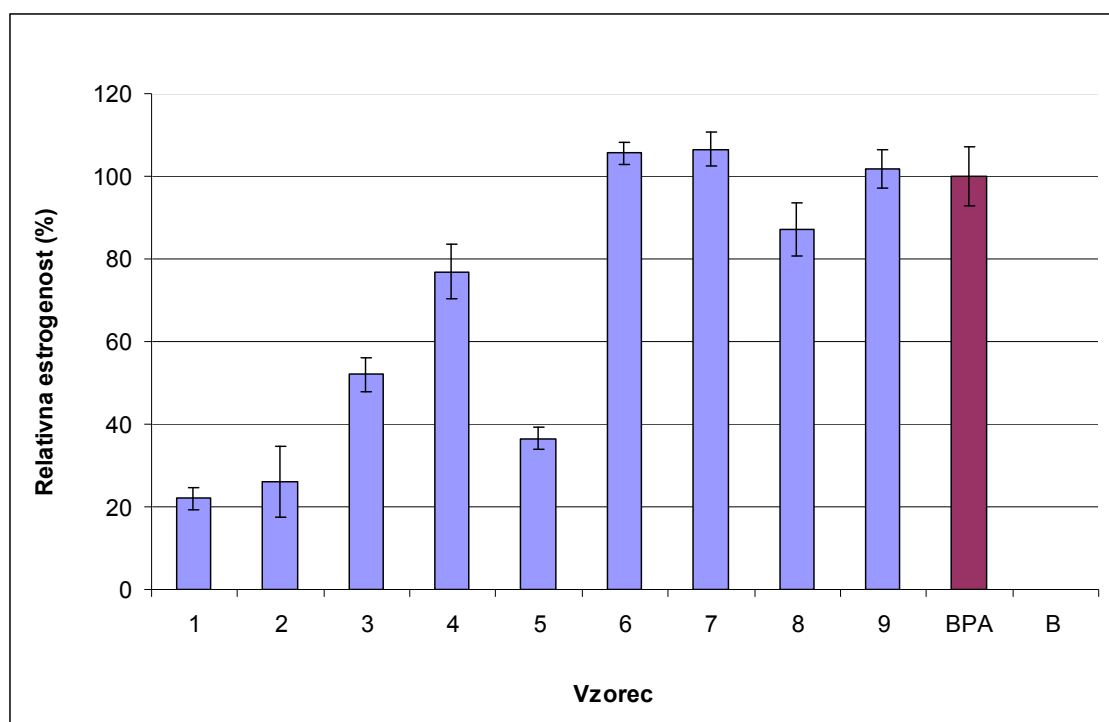
Strupenost ostalih vzorcev se od vzorca 4 proti 7 povečuje. To prikazuje povečevanje števila letalnih znakov iker cebric ter povečevanje odstotka posameznega znaka, kljub temu da v teh vzorcih ni ostanka BPA. Za najbolj strupen vzorec se je izkazal vzorec 7 saj je 100 % iker cebric koaguliralo, kar je najverjetneje posledica prisotnosti  $H_2O_2$ . Podatki o strupenosti  $H_2O_2$  na ribe kažejo, da je  $H_2O_2$  šibko strupen na ribe z 96 h  $LC_{50}$  med 10-37 mg/l (Arkema Inc., 2009).

Sklepamo lahko, da imajo vpliv na povečano strupenost vzorcev obdelanih s fotokatalitsko oksidacijo strupeni intermediati, ki nastanejo med potekom reakcije fotokatalitske oksidacije s prisotnim katalizatorjem  $TiO_2$  P-25 ali  $H_2O_2$ . Največkrat opažen subletalni znak zarodkov cebric je odsotnost pigmentacije telesa, katerega smo opazili pri vseh testiranih vzorcih, razen vzorcu 7, kjer so vse izpostavljene ikre koagulirale, posledično določanje drugih znakov strupenosti ni bilo mogoče. Najnižji odstotek depigmentiranih iker (50 %) smo zaznali v vzorcu 1. V preostalih vzorcih, kjer se je ta znak pojavljal, je bil odstotek depigmentiranih iker 70 % oziroma višji. 100 % zarodkov brez pigmentacije telesa smo opazili v vzorcu 8, kar je pričakovano saj je omenjen vzorec imel največji ostanek BPA, 19,4 mg/l.

### 4.2.3 Test estrogenosti

#### 4.2.3.1 Test za določanje estrogenske aktivnosti (YES)

Estrogenska aktivnost vzorcev po odstranjevanju BPA s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo je prikazana na sliki 30, kot relativna estrogenost vzorcev izračunana glede na estrogensko aktivnost 20 mg/l BPA.



Slika 30: Relativna estrogenska aktivnost vzorcev po fotolitski/fotokatalitski obdelavi, izračunana glede na estrogensko aktivnost 20 mg/l BPA. BPA prikazuje estrogensko aktivnost 20 mg/l BPA, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Rezultati YES testa vzorcev po odstranjevanju BPA s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo so pokazali zmanjšanje estrogenske aktivnosti vzorcev 1, 2 in 5 glede na izhodno raztopino, ki je vsebovala 20 mg/l BPA. Najmanjšo estrogensko aktivnost smo izmerili pri vzorcu 1 (22 %). Ostanek BPA v tem vzorcu je bil 3,22 mg/l. Ta vzorec smo čistili s fotolitsko oksidacijo brez uporabe katalizatorja, osvetljevali smo z 17 W UV žarnico, za reakcijski medij smo uporabili ultračisto vodo (mQ). Vzorec 2 lahko primerjamo z vzorcem 1 (26% estrogenost glede na izhodni vzorec BPA). Od vzorca 1 se



razlikuje le po tem, da smo uporabili vodovodno vodo. Ostanek BPA v tem vzorcu je 5,4 mg/l. Nizko estrogensko aktivnost smo izmerili tudi vzorcu 5 (36% estrogenost). Ta vzorec smo obdelali s fotokatalitsko oksidacijo, z uporabo katalizatorja TiO<sub>2</sub> P-25. Vzorec smo osvetljevali s 150 W UV žarnico in uporabili vodovodno vodo. Podobne reakcijske pogoje smo uporabili tudi pri tretiranju vzorca 4, le da smo za reakcijski medij uporabili ultračisto vodo (mQ). Kljub podobnim reakcijskim pogojem pa je estrogenska aktivnost vzorca 4 mnogo višja od vzorca 5 saj obsega 77% estrogenost. Ker v nobenem od teh dveh vzorcev ni ostanka BPA, je estrogenska aktivnost vzorcev verjetno posledica estrogenosti stranskih produktov fotokatalitske oksidacije. V vzorcu 3 smo izmerili 52% estrogenost. Vzorec 8 ima le rahlo znižano estrogensko aktivnost (87% estrogenost) glede na izvorni vzorec. Visoka estrogenska aktivnost vzorca 8 je posledica zelo slabe razgradnje BPA med postopkom fotolitske oksidacije s halogensko svetilko saj je bila konverzija le 3% in je v končnem vzorcu ostalo še 19,4 mg/l BPA. Vzorca 6 in 7 smo tretirali s fotokatalitsko oksidacijo, z dodanim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Uporabili smo ultračisto vodo (mQ) in vzorca osvetljevali s 17 W oziroma 150 W UV žarnicama. Pretvorba BPA je bila pri teh testnih pogojih zelo hitra, zato v vzorcih ni bilo prisotnega BPA. Ta se je popolnoma razgradil. Estrogenost je v tem primeru posledica prisotnega H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ali estrogenskih stranskih oz. končnih produktov fotokatalitske oksidacije. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na samo rast kvasovk ni imel nobenega vpliva saj je bila rast kvasovk dobra. Možno je, da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sam reagira s CPRG ali pa je pri fotokatalitski oksidaciji s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastal kak stranski produkt, ki ga nismo zaznali in je estrogensko aktivnem že pri nizkih koncentracijah. Vzorec 9 smo tretirali s fotokatalitsko oksidacijo s katalizatorjem TiO<sub>2</sub> P-25, osvetljevali pa smo s halogensko žarnico. Konverzija BPA je bila 82% in ostanek BPA v tem vzorcu le 3,56 mg/l. BPA je pri tej koncentraciji še estrogensko aktiven, vendar manj kot pri koncentraciji 20 mg/l, zato je posledica tako visoke estrogenske aktivnosti najverjetneje tudi tvorba stranskih oz. končnih produktov fotokatalitske oksidacije, ki so prav tako estrogensko aktivni.

## 5 SKLEPI

- Za določanje prisotnosti organskega onesnažila BPA v vodi smo uporabljali kemijsko analizo. Strupenost in estrogensko aktivnost izhodne raztopine BPA ter vzorcev obdelanih s fotolitsko / fotokatalitsko oksidacijo smo ugotavljali s serijo bioloških akutnih testov strupenosti z organizmi iz različnih trofičnih nivojev ter s testom YES.
- Pri bioloških testih strupenosti z organizmi različnih trofičnih nivojev smo ugotovili, da so uporabljene testi različno občutljivi na BPA. Med akutnimi testi strupenosti bisfenola A je največjo občutljivost pokazal test strupenosti z luminescentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*). 30 min  $IC_{50}$  znaša 2,5 mg/l BPA. Drugi po občutljivosti je test strupenosti z zarodki rib cebric (*Danio rerio*) 48 h  $EC_{50}$  je 10 mg/l BPA (48 h  $LC_{50}$  pa 17 mg/l). Za najmanj občutljivega se je izkazal test strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*), izračunan 24 h  $EC_{50}$  za vodne bolhe (*Daphnia magna*) znaša 12 mg/l BPA.
- Izhodna raztopina BPA je bila estrogensko aktivna v biološkem testu YES. Z zmanjševanjem vsebnosti BPA se tudi estrogenost zmanjšuje.
- Pretvorba BPA je odvisna od reakcijskih pogojev in katalizatorja. Za najbolj učinkovito pretvorbo BPA se je izkazala fotokatalitska oksidacija tako s  $TiO_2$  P-25 kot tudi s  $H_2O_2$  s 100% pretvorbo BPA. Za najhitrejšo metodo čiščenja BPA pa se je izkazala fotokatalitska oksidacija z  $H_2O_2$  saj se že po kratkem času BPA popolnoma pretvori.
- Testi strupenosti vzorcev po fotolitski oz. fotokatalitski oksidaciji so pokazali, da so vzorci čiščeni s fotokatalitsko oksidacijo še vedno strupeni, kljub temu da v teh vzorcih s kemijsko analizo v vzorcih nismo več zaznali BPA. Hkrati pa so ti vzorci še vedno estrogensko aktivni. Vzrok večje strupenosti in estrogenske aktivnosti, kljub popolni pretvorbi BPA, je verjetno nastanek strupenih in/ali estrogensko aktivnih intermediatov med potekom reakcije fotokatalitske oksidacije s prisotnim katalizatorjem  $TiO_2$  P-25. Strupenost vzorcev obdelanih z  $H_2O_2$  pa je verjetno posledica tega, da smo katalizator  $H_2O_2$  uporabili v prebitku in smo ga zaznali v vzorcih tudi po končani reakciji.

- Estrogenska aktivnost vzorcev dobljenih po odstranjevanju BPA s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo se vedno ne zmanjšuje, kljub zmanjšanju vsebnosti BPA, ampak se v primeru vzorcev čiščenih s fotokatalitsko oksidacijo in dodanimi katalizatorji, estrogenost celo poveča.
- Kljub zelo učinkoviti metodi odstranjevanja organskega onesnažila bisfenola A iz vode so rezultati pokazali, da to še ne pomeni tudi zmanjšanje strupenosti in estrogenosti vodnih vzorcev. Kljub popolni pretvorbi BPA so vode po čiščenju še vedno, ali pa celo bolj strupene in estrogensko aktivne, kot pred čiščenjem. Vzrok za to je nastanek sekundarnih intermediatov pri procesu fotolitske, predvsem pa fotokatalitske oksidacije, ki so lahko bolj strupeni in estrogensko aktivni od prvotnega organskega onesnažila, ki smo ga hoteli iz vode odstraniti. Zato je potrebno poleg kemijskih določitev vsebnosti BPA v vodi izvesti tudi biološke teste za ugotavljanje strupenosti in estrogenosti vodnih vzorcev.

Na podlagi naštetih sklepov lahko:

- Potrdimo hipotezo, da je BPA strupen za testirane vodne organizme in estrogensko aktiven.
- Hipotezo, da se po odstranjevanju BPA iz vode strupenost vzorcev zmanjša, ne moremo popolnoma potrditi saj se je strupenost vzorcev čiščenih s fotolitsko oksidacijo res zmanjšala, strupenost vzorcev čiščenih s fotokatalitsko oksidacijo pa se je v nekaterih primerih celo povečala.
- Hipotezo, da se po odstranjevanju BPA estrogenska aktivnost vzorcev zmanjša, lahko delno potrdimo saj se je estrogenost vzorcev čiščenih s fotolitsko oksidacijo res zmanjšala, estrogenost vzorcev čiščenih s fotokatalitsko oksidacijo pa se je pri nekaterih vzorcih, predvidoma na račun dodanega  $H_2O_2$ , celo povečala.

- Potrdimo lahko hipotezo, da je hitrejše in učinkovitejše odstranjevanje BPA potekalo pri fotokatalitski oksidaciji saj smo v vzorcih, čiščenih s fotokatalitsko oksidacijo, takoj zaznali razgradnjo BPA, popolno pretvorbo BPA pa smo izmerili že po 90 minutah.

## 6 POVZETEK

Namen diplomskega dela je bil preveriti strupenost in estrogensko aktivnost organskega onesnažila bisfenola A (BPA) ter ugotoviti učinkovitost odstranjevanja BPA z naprednima oksidacijskima postopkoma, fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo. Odstranjevanje BPA iz izhodne raztopine s koncentracijo 20 mg/l je potekalo v dvo- oziroma trofaznem odprtem steklenem reaktorju, pri sobni temperaturi (20 °C), ob stalnem mešanju 600 rpm in stalnem prepihanju z zrakom (pretok 300 ml/min). Med poskusi smo vzorce raztopine BPA osvetljevali s tremi različnimi žarnicami; halogensko žarnico in dvema UV žarnicama (17 W, 150 W). Pri fotokatalitski oksidaciji smo uporabljali dva katalizatorja in sicer TiO<sub>2</sub> P-25 (Degussa) ter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Strupenost BPA in vzorcev po odstranjevanju BPA smo testirali z akutnimi testi strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*), raki - vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) in zarodki rib cebric (*Danio rerio*). Estrogenost BPA in vzorcev po oksidaciji smo določali s preizkusom YES (Yeast Estrogen Screen assay), z gensko spremenjeno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati so pokazali, da je izhodna raztopina BPA strupena in estrogensko aktivna, z zmanjševanjem vsebnosti BPA pa sta se obe lastnosti zmanjšali. Strupenost in estrogenost vzorcev po fotolitski oksidaciji sta se zmanjšali sorazmerno s pretvorbo BPA, nista pa se zmanjšali pri vzorcih obdelanih s fotokatalitsko oksidacijo. Pri slednjih sta se v nekaterih primerih celo povečala, verjetno na račun stranskih produktov fotokatalitske oksidacije, ki so bolj strupeni in estrogensko aktivni kot sam BPA. Ugotovili smo, da so kemijske analize vzorcev po odstranjevanju BPA pokazale zmanjšanje BPA, vendar to ne zadostuje za dokaz, da snovi v vzorcih po čiščenju niso enako ali celo bolj strupene in estrogensko aktivne. Zato so za ugotavljanje učinkovitosti odstranjevanja BPA iz vode potrebni tudi biološki testi.

## 7 VIRI

- Arkema Inc. 2009. Hydrogen Peroxide 10-19 % (All Grades). Material Safety Data Sheet, Version 1.2, Philadelphia, Pennsylvania.
- Baumgartner V., Dytkewitz E. 2010. HPTLC-Bioluminescence-Coupling using *Vibrio fischeri*. Conference Club de CCM.
- Beck I. C., Bruhn R., Gandrass J. 2006. Analysis of estrogenic activity in costal surface waters of the Baltic Sea using the Yeast estrogen screen. *Chemosphere* 63, 1870 - 1878.
- Brennan S.J., C.A., Roche J.J., Fogarty A.M. 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 49–55.
- Campbell C.G., Borglin S.E., Green B., Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T. 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere* 65, 1265–1280.
- Chemical Profile: Bisphenol A. 14 January 2008. ICIS Chemical Business. Reed Business Information Limited. Dosegljivo na URL: <http://www.icis.com/Articles/2008/01/14/9092025/chemical-profile-bisphenol-a.html> [Uporabljeno 02-04-2011]
- Chiang K., Lim T. M., Tsen L., Lee C. C. 2004. Photocatalytic degradation and mineralization of bisphenol A by TiO<sub>2</sub> and platinumized TiO<sub>2</sub>. *Applied Catalysis A: General* 261, 225 – 237.
- Chronically Toxic Samples. EPA/600/R-92/080. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Duluth, MN.

- Diepens M., Gijsman P. 2009. Influence of irradiation intensity on the photodegradation of bisphenol A polycarbonate, *Polymer Degradation and Stability*, 94, 34-38
- Diepens M., Gijsman P., Lemstra P.J. 2009. Photodegradation and stability of bisphenol a polycarbonate in eathering conditions. Eindhoven: Technische Universiteit. (doktorsko delo)
- EPA: U.S. Environmental Protection Agency. 1993a. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluation: Phase II Toxicity Identification Procedures for Acutely and Chronically Toxic Samples. EPA/600/R-92/080. U.S. Environmental Protecricion Agency, Office of Research and Development, Duluth, MN.
- Gómez M., Garralón G., Plaza F., Vilchez R., Hontoria E., Gómez M.A. 2007. Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies. *Desalination* 212, 79–91.
- Gillen K.T., Cloug R.L. 1989. Timetemperaturedose rate superposition: a methodology for extrapolating accelerated radiation aging data to low dose rate conditions, *Polymer Degradation and Stability*, 24, 137-168.
- Ike M., Chen M.Y., Jin C.S., Fujita M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol A. *Environmental toxicology*, Vol. 17, Issue 5, pages 457 – 461.
- International Organization for Standardization 1996. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). International Standard ISO 6341, Geneve.
- International Organization for Standardization 2007. Water quality – Determination of of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Standard ISO 15088, Geneve.

- International Organization for Standardization 1998. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria. International Standard ISO 11348-2, Geneve.
- Kang J., Katayama Y., Kondo F. 2006. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 217, 81–90.
- Klavarioti M., Mantzavinos D., Kassinos D. 2009. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International* 35, 402–417.
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A. 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75, 5, 631-681.
- Mao L., Sun C., Zhang H., Li Y., Wus D. 2004. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. *Analytica Chimica Acta*, 522, 241 - 246.
- Martinen S. K., Kettunen R. H., Rintala J. A. 2003. Occurance and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *The science of the total Environment* 301, 1 – 12.
- Miege C., Karolak S., Gabet V., Jugan M.-L., Oziol L., Chevreuil M., Levi Y., Coquery M. 2009. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, No. 2.
- Mihaich E. M., Friderich U., Caspers N., Hall A. T., Klecka G. M., Dimond S. S., Staples C. A., Ortego L. S., Hentges S. G. 2009. Acute and chronic toxicity testing of



bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1392 – 1399.

Mohapatra D. P., Brar S. K., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. 2010. Physico – chemical pretreatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere* 78, 923 – 941.

Murk A.C., Legler J., Van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkeliink A., Van Der Burg B., Rijs G.B.J., Vethaak D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with their in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 1, pp. 16–23.

Mutou Y., Ibuki Y., Terao Y., Kojima S., Goto R. 2006. Chemical change of chlorinated bisphenol A by ultraviolet irradiation and cytotoxicity of their products on Jurkat cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21, 283-289.

Nagel, R. 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19, 38-48.

Neamtu M., Frimmel F. H. 2006. Degradation of endocrine disrupting bisphenol A by 254nm irradiation in different water matrices and effect on yeast cells. *Water research* 40, 3745-3750.

OASIS® HLB Extraction Cartridges. 2000. Instruction Sheet for the Large Volume Cartridges. Milford, USA, Waters Corporation: 2 str.

OECD 211. 1998. Guidelines for testing of chemicals: *Daphnia magna* reproduction test. Dosegljivo na URL: <http://www.oecd.org/dataoecd/17/63/1948277.pdf> [Uporabljeno 14-04-2011]

- Rastkari N., Yunesian M., Ahmadkhaniha R. 2011. Levels of bisphenol A and bisphenol F in canned foods in Iranian markets. *Iran J. Environ. Health Sci. Eng.*, Vol 8, No. 1, pp. 95 – 100.
- Pickett J.E., Martin J.W., Ryntz R.A., Dickie R.A. 2005. Highly predictive accelerated weathering of engineering thermoplastics. Service life prediction: challenging the status quo, *Federation of societies for coatings technology*, 93106.
- Rodriguez E. M., Fernandez G., Klamerth N., Maldonado M. I., Alvarez P. M., Malato S. 2010. Efficiency of different solar advanced oxidation processes on the oxidation of bisphenol A in water. *Applied Catalysis B: Environmental* 95, 228–237.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 3, 241-248.
- Stahlschmidt-Allner P., Allner B., Römbke J., Knacker T. 1997. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment. *ESPR-Environ. Sci. & Pollut. Res.* 4 (3), 155 – 162.
- Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., O'Block S.T., Harris L.R. 1998. A review of the environmental fate, effects and exposure of Bisphenol A. *Chemosphere*, Vol. 36, NO. 10, pp. 2149-2173.
- Torres R.A., Sarantakos G., Combet E., Retrier C., Pulgarin C. 2008. Sequential helio-photo-Fenton and sonication processes for the treatment of bisphenol A. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 199, 197–203.
- U.S. EPA, 1997. Special Report on Endocrine Disruption. Fact Sheet. Washington, EPA D.C.: 4. str.

- Van den Belt K., Berckmans P., Vangenechten C., Verheyen R., Witters H. 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17-estradiol, estrone, 17-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 66, 183-195.
- Xu B., Gao N., Cheng H., Xia S., Rui M., Zhao D. 2008. Oxidative degradation of dimethyl phthalate (DMP) by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. *Journal of Hazardous Materials*, 162 (2009) 954–959.
- Zhang Y., Zhou J.L., Ning B. 2007. Photodegradation of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in water. *Water Research*, 41, 19 – 26.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Mihaelu J. Tomanu, somentorici doc. dr. Tatjani Tišler, prof. dr. Albinu Pintarju in Mirjani Bistan za vodenje, pomoč in svetovanje pri opravljanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za vso podporo v času študija.

## PRILOGE

Priloga A: Rezultati akutnih strupenostih testov na BPA.

Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*)

V tabeli je prikazana odvisnosti zaviranja luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) od različnih koncentracij BPA.

Tabela 1: Zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) v odvisnosti od koncentracije BPA

Koncentracija BPA (mg/l)	Zaviranje luminiscence (%)
0,3	12,6
0,6	18,2
1,3	33,0
2,5	49,8
5,0	65,1
10,0	80,8
16,0	89,0

Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

V tabeli je prikazana strupenost različnih koncentracij BPA na vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 24 urah izpostavljenosti.

Tabela 2: Število in odstotek negibljivih vodnih bolh (*Daphnia magna*) v odvisnosti od koncentracije BPA.

Koncentracija BPA (mg/l)	Št. negibljivih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	Negibljive vodne bolhe (%)
0	0 / 20	0
5	0 / 20	0
7,5	3 / 20	15
10	5 / 20	25
12,5	9 / 20	45
15	13 / 20	65
17,5	17 / 20	85
20	20 / 20	100

Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric (*Danio rerio*)

V tabeli so prikazani učinki 48 urne izpostavljenosti zarodkov cebric (*Danio rerio*), različnim koncentracijam BPA (od 0 mg/l do 20 mg/l).

Tabela 3: Odstotki letalnih, subletalnih in ostalih učinkov na zarodke cebric po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA .

<b>Koncentracija BPA:</b>	0 mg/l	5 mg/l	10 mg/l	15 mg/l	20 mg/l
<b>Letalne spremembe:</b>	0%	20%	10%	30%	60%
Koaguliran zarodek	0%	20%	10%	20%	30%
Rep ni ločen od rumenjaka	0%	0%	0%	0%	20%
Ni razvitih somitov	0%	0%	0%	0%	0%
Ni srčnega utripa	0%	0%	0%	0%	10%
Deformacija celega organizma	0%	0%	0%	10%	30%
<b>Sub-letalne spremembe:</b>	0%	25%	55,5%	100%	100%
Ni razvitih oči	0%	0%	0%	0%	0%
Zarodek se ne giblje	0%	0%	0%	0%	0%
Ni pigmenta v očeh	0%	0%	0%	57,1%	100%
Ni krvnega obtoka	0%	0%	0%	0%	0%
Ni pigmentacije telesa	0%	25%	55,5%	100%	100%
Ni otolitov v ušesu	0%	0%	0%	0%	0%
Deformacija rumenjakeve vreče	0%	0%	0%	28,6%	75%
<b>Ostale spremembe:</b>	0%	0%	0%	0%	10%
Prisotnost endemov	0%	0%	0%	0%	0%
Ni oplojena	0%	0%	0%	0%	0%
Poškodovana hrbtenica	0%	0%	0%	0%	10%

0% Znak pri pregledu rezultatov ni opažen.

% Vsota vseh znakov določenega tipa skupaj.

Priloga B: Rezultati akutnih strupenostnih testov na vzorce po fotolitski in fotokatalitski oksidaciji.

Test akutne strupenosti z luminiscentnimi bakterijami (*Vibrio fischeri*)

V tabeli je prikazano povprečno zaviranje luminiscence po izpostavljenosti luminiscentnih bakterij različnim vzorcem po fotolitski oziroma fotokatalitski oksidaciji.

Tabela 4: Zaviranje luminiscence bakterij (*Vibrio fischeri*) pri posameznih fotolitsko oziroma fotokatalitsko obdelanih vzorcih BPA.

<b>Vzorec</b>	<b>Vrednost zaviranja luminiscence (%)</b>
1	79,25
2	60,38
3	71,42
4	80,16
6	96,29
7	99,39
8	75,45
9	61,56

Test akutne strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*)

V tabeli sta prikazana število in odstotek negibljivih vodnih bolh po 24 urni izpostavljenosti posameznim vzorcem obdelanih z fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo.

Tabela 5: Število in odstotek negibljivih vodnih bolh (*Daphnia magna*) v posameznem vzorcu.

<b>Vzorec</b>	<b>Št. negibljivih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh</b>	<b>Negibljuje vodne bolhe (%)</b>
1	4 / 20	20
2	2 / 20	10
3	6 / 20	30
4	20 / 20	100
5	20 / 20	100
6	20 / 20	100
7	20 / 20	100
8	9 / 20	45
9	20 / 20	100



Test akutne strupenosti z zarodki rib cebric (*Danio rerio*)

V tabeli je prikazan odstotek pojavljanja različnih razvojnih znakov po 48 urah inkubacije v posameznih vzorcih po fotolitski in fotokatalitski oksidaciji.

Tabela 6: Odstotki letalnih, subletalnih in ostalih učinkov na zarodke cebric, ob 48 urni izpostavljenosti devetim vzorcem po čiščenju s fotolitsko ali fotokatalitsko oksidacijo.

<b>VZOREC:</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Letalne spremembe:</b>	10%	10%	10%	40%	80%	80%	100%	20%	10%
Koaguliran zarodek	10%	10%	10%	10%	10%	10%	100%	0%	10%
Rep ni ločen od rumenjaka	0%	0%	0%	20%	40%	50%	0%	20%	0%
Ni razvitih somitov	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ni srčnega utripa	0%	0%	0%	20%	40%	40%	0%	0%	0%
Deformacija celega organizma	0%	0%	0%	30%	70%	70%	0%	0%	0%
<b>Sub-letalne spremembe:</b>	50%	70%	80%	90%	80%	80%	0%	100%	70%
Ni razvitih oči	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Zarodek se ne giblje	0%	0%	0%	10%	40%	50%	0%	0%	0%
Ni pigmenta v očeh	0%	10%	40%	20%	30%	0%	0%	70%	0%
Ni krvnega obtoka	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ni pigmentacije telesa	50%	70%	80%	80%	80%	70%	0%	100%	70%
Ni otolitov v ušesu	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Deformacija rumenjakeve vreče	0%	0%	40%	70%	60%	70%	0%	50%	10%
<b>Ostale spremembe:</b>	0%	0%	0%	10%	10%	0%	0%	0%	0%
Prisotnost endemov	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Ni oplojena	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Poškodovana hrbtenica	0%	0%	0%	10%	10%	0%	0%	0%	0%

0% Znak pri pregledu rezultatov ni opažen.

% Vsota vseh znakov določenega tipa skupaj.