

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Anja PETERNEL

**OPTIMIZACIJA STRUPENOSTNIH TESTOV S SEDIMENTNIMI
ORGANIZMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

**OPTIMISATION OF TOXICITY TESTS WITH SEDIMENT
ORGANISMS**

MASTER'S THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana 2013

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija druge stopnje študija biologije. Opravljeno je bilo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 9. 3. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za **magistrski podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biologije**. Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Mihael J. Tomana, za somentorico doc. dr. Anito Jemec, za recenzentko pa prof. dr. Damjano Drobne.

Mentor: prof. dr. MIHAEL TOMAN

Somentorica: doc. dr. ANITA JEMEC

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

Član: Doc. dr. Anita JEMEC, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: Prof. dr. Damjana DROBNE, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 6. 8. 2013

Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja PETERNEL

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
UDK 595.373:574(043.3)=163.6
KG test strupenosti/sedimentni testni organizmi/*Asellus aquaticus*/bisfenol A
AV PETERNEL, Anja
SA TOMAN, Mihael J. (mentor)/JEMEC, Anita (somentorica)/DROBNE, Damjana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,
LI 2013
IN OPTIMIZACIJA STRUPENOSTNIH TESTOV S SEDIMENTNIMI ORGANIZMI
TD Magistrsko delo, (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XII, 68 str., 4 pregl., 23 sl., 3 pril., 93 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen magistrskega dela je bila optimizacija testa strupenosti s sedimentnim testnim organizmom izopodnim rakom vrste *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae. Slovensko ime: vodni osliček). Naloga je obsegala: vpeljavo vzdrževanja laboratorijske kulture testnih osebkov, optimizacijo testnega sistema za izvajanje testov strupenosti ter na koncu preizkus delovanja testa strupenosti z realnim onesnažilom, bisfenolom A (BPA). Testne osebke smo gojili v akvariju z vodo iz neonesnaženega vodotoka, hranili pa smo jih z listi črne jelše (*Alnus glutinosa*), ki so bili predhodno izpostavljeni rečni mikrobnii združbi. Ugotovili smo, da tip testnega medija ne vpliva bistveno na preživetje osebkov, zato smo vse teste strupenosti izvajali v testnih čašah s sintetično pripravljenim medijem. Bolj primeren način izpostavljanja je bil tak, kjer smo osebke izpostavili posamično, enega na testno posodo s sedimentom ali brez. Primerna menjava medija je bila dvakrat tedensko, menjava hrane pa enkrat tedensko. V testih strupenosti smo spremljali smrtnost, prehranjevanje in levitev testnih osebkov. BPA je povzročil smrtnost testnih osebkov. Vrednost LC₅₀ po 48 urah je bila 12 mg/l. Smrtnost se je večala s povečevanjem koncentracije kemikalije in s časom izpostavitve. Na levitve vodnih osličkov BPA v koncentracijah do 30 mg/l ni imel statistično značilnih učinkov (dvotedenska izpostavitve), medtem ko se je stopnja prehranjevanja zmanjšala. Dodan sediment ni vplival na učinke kemikalije na testne organizme, saj se je na sediment vezala zelo majhna količina BPA. Ugotovili smo, da so odrasli in juvenilni osebki enako občutljivi na BPA. Zaključujemo, da je predstavljeni test strupenosti s sedimentnim testnim organizmom rakom vrste *Asellus aquaticus* primeren za testiranje potencialnih učinkov onesnažil na okolje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
UDC 595.373:574(043.3)=163.6
CX toxicity test/sediment test organisms/*Asellus aquaticus*/bisphenol A
AU PETERNEL, Anja
AA TOMAN, Mihael J. (supervisor)/JEMEC, Anita (co-supervisor)/DROBNE, Damjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2013
TI OPTIMISATION OF TOXICITY TESTS WITH SEDIMENT ORGANISMS
DT M. Sc. Thesis, (Master Study Programmes)
NO XII, 68 p., 4 tab., 23 fig., 3 ann., 93 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The objective of the Master's thesis study was the optimisation of the toxicity test with sediment test organism isopod crustacean, *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae. Common name: waterlouse). The task included introduction of maintaining laboratory culture, optimisation of testing system for performing toxicity tests and furthermore, performance of toxicity tests with the existing pollutant bisphenol A (BPA). Test organisms were maintained in aquarium, filled with water from unpolluted stream and fed with black alder (*Alnus glutinosa*) leaves that was previously exposed to microbial community. Taking into mind that the type of a test medium has no significant influence on survival of test organisms, all toxicity tests were performed in test beakers by means of a synthetically prepared medium. The exposure of test organisms individually, one in each test beaker, was the most appropriate manner of exposure. The exposure was performed with sediment or without it. The medium was replaced twice a week and the food once a week. The mortality, the feeding rate and the moulting of test organisms was monitored. BPA caused death of test organisms. LC₅₀ after 48 h was 12 mg/l. The mortality increased with the increasing concentration of bisphenol A and with duration of exposure. BPA had no significant influence on test organisms moulting up to 30 mg/L of BPA while it reduced their feeding rate (time of exposure is 2 weeks). The addition of sediment had no impact on chemical effects on test organisms due to low binding BPA to sediment. BPA equally influenced adult and juvenile test organisms. From obtained results it can be concluded that introduced toxicity test with sediment test organism, isopod crustacean *Asellus aquaticus*, is suitable for testing potential effects of pollutants on the environment.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROBLEMATIKA ONESNAŽEVANJA POVRŠINSKIH VODA IN SEDIMENTOV	3
2.1.1 Onesnaževanje s hormonskimi motilci	4
2.2 EKOTOKSIKOLOŠKI TESTI	5
2.2.1 Prepoznavanje na onesnažilo najbolj občutljivega življenjskega stadija izbranega testnega osebka	6
2.2.2 Vezava onesnažil na sediment in njihov privzem v organizem	7
2.3 RAZLOGI ZA IZBIRO TESTNEGA ORGANIZMA VODNEGA OSLIČKA <i>ASELLUS AQUATICUS</i> (CRUSTACEA, ISOPODA) LINNAEUS 1758	8
2.4 OPIS VRSTE <i>ASELLUS AQUATICUS</i> (SLIKA 1).....	9
2.4.1 Uvrstitev v sistem	9
2.4.2 Habitat	9
2.4.3 Prehranjevanje	10
2.4.4 Interakcije z drugimi organizmi	10
2.4.5 Spolni dimorfizem	11
2.4.6 Razmnoževanje	12
2.5 UPORABLJENO ONESNAŽEVALO V MAGISTRSKI NALOGI: BISFENOL A	12
2.5.1 Splošno	12
2.5.2 BPA v vodnih okoljih	13
2.5.3 Učinki na organizme	13
2.5.4 Adsorbpcija BPA na sediment	14
2.6 RAZMERE GOJENJA TESTNIH ORGANIZMOV IN RAZMERE IZVEDBE TESTOV STRUPENOSTI Z VRSTO <i>ASELLUS AQUATICUS</i> , KI JIH NAVAJAJO RAZLIČNI AVTORJI	15
2.6.1 Priprava hrane za <i>A. aquaticus</i> po Bloor (2010)	15
2.6.2 Razlogi za izbiro listov črne jelše (<i>Alnus glutinosa</i>)	16
2.6.3 Pomen kolonizacije listne površine	16

3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 UVOD IN POTEK DELA.....	18
3.2 VZORČENJE	19
3.3 GOJENJE VRSTE <i>ASELLUS AQUATICUS</i>	21
3.4 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE LISTOV ČRNE JELŠE.....	22
3.5 ZAJEM VODE IZ REKE IŠKE	22
3.6 PRIPRAVA MEDIJA M4.....	22
3.7 PRIPRAVA OSEBKOV ZA TESTE	24
3.8 PRIPRAVA DISKOV LISTOV ČRNE JELŠE ZA TESTE	25
3.9 POTEK DELA	25
3.10 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI.....	25
3.10.1 Vzpostavitev testa strupenosti	25
3.10.2 Vpliv tipa medija na testne živali	28
3.10.3 Vpliv frekvence menjave hrane na testne živali	28
3.10.4 Vpliv števila osebkov v testni posodi na preživetje testnih živali	28
3.10.5 Vpliv sedimenta na testne živali	28
3.11 TESTI STRUPENOSTI	29
3.11.1 Priprava raztopine BPA.....	29
3.11.2 Priprava sedimenta	29
3.11.3 Preverjanje stabilnosti BPA v mediju in njegove koncentracije v sedimentu ..	31
3.11.4 Akutni testi strupenosti (96 ur)	32
3.11.4.1 Juvenilni osebki	32
3.12 RAČUNANJE LC-VREDNOSTI.....	33
3.13 KRONIČNI TESTI.....	33
3.14 KORELACIJA MASA – DOLŽINA TESTNIH ŽIVALI	34
4 REZULTATI.....	35
4.1 VZORČENJE	35
4.2 KEMIJSKE ANALIZE VODE IZ NAHAJALIŠČA	35
4.3 GOJENJE VRSTE <i>ASELLUS AQUATICUS</i>	36
4.4 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI	36
4.4.1 Smrtnost kontrole	36
4.4.1.1 Vpliv tipa medija in sedimenta.....	37
4.4.1.2 Vpliv frekvence menjave hrane.....	37
4.4.1.3 Vpliv števila osebkov v testni posodi.....	38
4.4.2 Prehranjevanje kontrole	39
4.5 TESTI STRUPENOSTI	40
4.5.1 Stabilnost bisfenola A v mediju M4	40
4.5.2 Koncentracija bisfenola A v sedimentu	40
4.5.3 Akutni testi strupenosti.....	41
4.5.4 Kronični test strupenosti.....	44
4.5.4.1 Smrtnost testnih osebkov.....	44

4.5.4.2 Prehranjevanje testnih osebkov	45
4.5.5 Vpliv bisfenola A na levitev po akutni in kronični izpostavitvi.....	46
5 RAZPRAVA	48
5.1 VZORČENJE	48
5.2 KEMIJSKE ANALIZE VODE IZ NAHAJALIŠČA	48
5.3 GOJENJE VRSTE <i>ASELLUS AQUATICUS</i>	48
5.4 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI	49
5.4.1 Smrtnost kontrole	49
5.4.2 Prehranjevanje kontrole	50
5.5 TESTI STRUPENOSTI	51
5.5.1 Akutni testi strupenosti.....	52
5.5.2 Kronični test strupenosti.....	53
5.5.3 Vpliv bisfenola A na levitev po akutni in kronični izpostavitvi.....	53
6 SKLEPI.....	56
7 POVZETEK	57
8 SUMMARY	59
9 VIRI	61

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Pregl. 1: Vsebnosti ionov v vodi iz nahajališča	34
Pregl. 2: Vrednosti ekoloških parametrov v vodi iz nahajališča	35
Pregl. 3: Vezava bisfenola A na sediment	40
Pregl. 4: Stopnja levitev pri kontroli in koncentraciji bisfenola A 5 mg/l. Ločeno so prikazani rezultati kroničnih in akutnih testov ter za odrasle in juvenilne osebkke. Prikazana so povprečja \pm standardna deviacija. Postavko «število levitev na dan» smo izračunali tako, da smo celotno število levov delili s številom dni izpostavljanja	46

KAZALO SLIK

	Str.
Sl. 1: <i>Asellus aquaticus</i> (vir: http://www.wildaboutbritain.co.uk)	9
Sl. 2: Telesni deli samca <i>A. aquaticus</i> . Na sliki sta vidna para pleopodov 1 in pleopodov 2 (vir: https://www.google.si)	11
Sl. 3: Strukturna formula BPA (vir: http://www.viewzone.com)	12
Sl. 4: Vzorčno mesto z okolico, fotografija je posneta 24. 2. 2012, ob drugem vzorčenju	18
Sl. 5: Satelitski posnetek okolice kraja vzorčenja. Mesto vzorčenja je obkroženo z rdečo barvo (vir: http://zemljevid.najdi.si/)	18
Sl. 6: Zemljevid okolice kraja vzorčenja. Mesto vzorčenja je obkroženo z rdečo barvo (vir: http://zemljevid.najdi.si/)	19
Sl. 7: Testni osebek v testni čaši z dodanim diskom lista črne jelše	25
Sl. 8: Vzpostavitev testnega sistema	25
Sl. 9: Testna posoda s sedimentom brez kaolina (levo) in s kaolinom (desno)	29
Sl. 10: Testni osebek v testni čaši z dodanim diskom lista črne jelše in s sedimentom	30
Sl. 11: Juvenilni testni osebki v mikrotitrski plošči	33
Sl. 12: Linearna korelacija med maso in dolžino 113 testnih osebkov	35
Sl. 13: Odstotek smrtnosti testnih organizmov glede na življenjski prostor. Primerjamo vpliv umetno pripravljenega medija M4, vodo iz reke Iške in vpliv umetno pripravljenega sedimenta. Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve	36
Sl. 14: Odstotek smrtnosti testnih organizmov glede na frekvenco menjave hrane. Primerjamo vpliv menjave hrane enkrat tedensko (1X) in menjave hrane dvakrat tedensko, kar smo izvedli v dveh ponovitvah (2X a, 2X b). Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve	37
Sl. 15: Odstotek smrtnosti organizmov glede na število osebkov na testno posodo. Primerjamo vpliv skupine ter individualnih osebkov v testni	38

posodi. Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve

- Sl. 16:** Stopnja prehranjevanja testnih živali v kontroli po dveh tednih izpostavitve. Primerjamo prehranjevanje kontrolne skupine v kroničnih testih strupenosti (K – strupenost) ter prehranjevanje v optimizacijskih testih, in sicer glede na tip življenjskega prostora (medij M4, medij voda iz reke Iške ter dodan sediment) ter glede na frekvenco menjave hrane (M4, 1X: enkrat tedensko; M4, 2X: dvakrat tedensko). Rezultati so podani v obliki »box-plotov«, kjer simboli pomenijo: minimalna in maksimalna vrednost: ⊥, in srednja vrednost: ■ 39
- Sl. 17:** Odstotek smrtnosti odraslih osebkov v akutnih testih strupenosti (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4) 41
- Sl. 18:** smrtnosti odraslih osebkov v akutnih testih strupenosti s sedimentom (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4 v vodni fazi nad sedimentom) 41
- Sl. 19:** Odstotek smrtnosti juvenilnih osebkov v akutnih testih strupenosti (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4) 42
- Sl. 20:** Odstotek smrtnosti juvenilnih osebkov v akutnih testih strupenosti s sedimentom (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4 v vodni fazi nad sedimentom) 42
- Sl. 21:** LC₅₀ po 48- in 96-urni izpostavitvi 43
- Sl. 22:** Odstotek smrtnosti osebkov v kroničnih testih po dveh tednih izpostavitve (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4). Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1. in 2. tednu izpostavitve 44
- Sl. 23:** Primerjava dnevne stopnje prehranjevanja po tednih. Prikazani sta kontrola in skupina, izpostavljena koncentraciji 5 mg/l BPA 45

KAZALO PRILOG

- Pril. A:** Razmere gojenja *A. aquaticus*, ki jih navajajo različni avtorji (viri so v oklepaju): (1): Bjelke, 2005; (2): Blockwell in sod., 1998; (3): Bloor in sod., 2005; (4): Bloor in sod., 2006; (5): Borgmann, 1996; (6): De Lange in sod., 2005; (7): Eimers in sod., 2002; (8): Hasu in sod., 2006; (9): Lukančič in sod., 2010; (10): Peeters in sod., 2002; (11): Prus, 1976; (12): Weltje in Oehlmann, 2006
- Pril. B:** Potek dela v laboratoriju
- Pril. C:** Stopnja prehranjevanja testnih živali v vseh poskusih, prikazana po tednih. Primerjamo prehranjevanje kontrolne skupine v kroničnih testih strupenosti (K-1, K-2, K-3: stopnja prehranjevanja v kontrolni skupini kroničnih testov strupenosti prvi, drugi in tretji teden izpostavitve) ter prehranjevanje v optimizacijskih testih, in sicer glede na tip življenjskega prostora (M4-1, M4-2, M4-3: stopnja prehranjevanja v mediju M4 prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; Iška-1, Iška-2, Iška-3: stopnja prehranjevanja v mediju vode iz reke Iške prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; sed-1, sed-2, sed-3: stopnja prehranjevanja v testih s sedimentom, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve) ter glede na frekvenco menjave hrane (1X-1, 1X-2, 1X-3: menjava hrane enkrat tedensko, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; 2X-1, 2X-2, 2X-3: menjava hrane dvakrat tedensko, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>A. aquaticus</i>	<i>Asellus aquaticus</i>
BPA	bisfenol A
BPK5	biokemijska potreba po kisiku po preteku nazivne dobe 5 dni
DSW	»Dutch standard water«
EC	koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči spremembo merjenega parametra pri določenemu odstotku testnih organizmov
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
HPLC	metoda tekočinske kromatografije visoke ločljivosti
KI	Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovenija
KPK	kemijska potreba po kisiku
LC	koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči smrt določenega odstotka testnih organizmov
TOC	totalni organski ogljik

1 UVOD

Kemijsko stanje velike večine (95 %) vodnih teles površinskih voda v Sloveniji je dobro, kar pomeni, da so z nevarnimi snovmi razmeroma malo obremenjena (Predstavitev Načrta ..., 2010). Kljub temu pa je bilo onesnaževanje površinskih voda prisotno tako v preteklosti kot danes. Viri onesnažil so različni, od industrijskih odpadkov, komunalnih odpadkov do snovi, uporabljenih v kmetijstvu. Obsegajo širok spekter kemikalij, patogenov in fizikalnih parametrov, kot je na primer temperatura. Učinki onesnažil na vodne ekosisteme so lahko kronični (daljši čas izpostavljenosti, nižje koncentracije onesnažila) ali akutni (krajši čas izpostavljenosti, višje koncentracije onesnažila). Lahko so posledica nesreč ali neprimerne rabe (Lukančič in sod., 2010). Pomembna posledica onesnaževanja je degradacija diverzitete in vrstnega bogastva bentoških skupnosti. Združbo, ki onesnaževanje preživi, sestavlja visoko število osebkov iz majhnega števila prilagojenih vrst (Bloor in sod., 2006).

Mnoga hidrofobna onesnažila, ki so slabo topna v vodi, se vežejo na zrnat material in se akumulirajo v sedimentu (Gaskell in sod., 2007). Takšno onesnaževanje predstavlja še posebej velik problem za organizme na območju rečnih nanosov (De Lange in sod., 2008). Sedimenti so pomemben ponor različnih onesnažil. Koncentracije teh so lahko v sedimentu precej večje kot v vodi nad njim. Onesnažila, vezana na sediment, predstavljajo neposredno tveganje za organizme, ki se prehranjujejo z detritom, saj ti rižejo po sedimentu in se hranijo neposredno z njega ter lahko na dolgi rok predstavljajo vir onesnaževanja za organizme višjih trofičnih nivojev (Eimers in sod., 2001).

Pomemben cilj ekotoksikologije voda je določiti, katere koncentracije določene substance, imajo letalne in subletalne učinke na organizem, in ugotoviti »varno koncentracijo« substance, ki se še lahko pojavlja v vodotokih (Bloor in sod., 2005). Presoja in monitoring ekotoksikološkega tveganja onesnažil in standardi za kvaliteto vode temeljijo na rezultatih standardnih testov strupenosti, ki vključujejo omejeno število reprezentativnih vrst organizmov vključno z makroinvertebrati, navadno gojenih v laboratoriju (Beketov in Liess, 2008).

Vodni osliček *Asellus aquaticus*, je ena izmed reprezentativnih vrst v vodnih okoljih. Je široko razširjen, evriek bentoški nevretenčar (Bouskill in sod., 2006; Green in sod., 1986). Zaradi svoje razširjenosti in vključenosti v biološke procese ter zaradi ostalih pomembnih vlog, ki jih igra v bentoških skupnostih, je *A. aquaticus* primerna modelna vrsta v ekologiji voda (Hasu in sod., 2008). Izkazal se je tudi kot primeren sedimentni testni organizem, saj živi na sedimentu in v njem (Feltmate in sod., 1986) ter se prehranjuje z organskim detritom v sedimentu (Hasu in sod., 2008).

Kot onesnažilo, s katerim smo preizkusili delovanje našega testnega sistema, smo uporabili bisfenol A (BPA). BPA je pomembno onesnažilo s širokim spektrom vplivov na okolje, katerega uporaba, kot intermedijata v proizvodnji epoksi smole, polikarbonatne plastike, sredstev za gašenje in ostalih posebnih produktov, se je v zadnjih letih močno povečala (Zeng in sod., 2006). Ugotovljeno je bilo, da se BPA pojavlja v odpadnih vodah iz odlagališč smeti, v rekah, morjih in v prsti (Hasum in sod., 2006). Po ocenah Evropske komisije (European Union Risk Report, 2010) se letno v vode sprosti 21,260 kg BPA, kar vodi do upravičene skrbi o vplivih na vodno življenje.

Namen našega magistrskega dela je bila optimizacija testa strupenosti s sedimentnim testnim organizmom izopodnim rakom vrste *A. aquaticus*. Naloga je obsegala: vpeljavo vzdrževanja laboratorijske kulture testnih osebkov, optimizacijo testnega sistema za izvajanje testov strupenosti ter na koncu preizkus delovanja testa strupenosti z realnim onesnažilom, bisfenolom A.

Pri svojem delu smo pričakovali naslednje rezultate:

- a) Glede na literaturne podatke o gojenju vodnih osličkov ter glede na njihovo splošno razširjenost v naravi smo sklepali, da njihovo gojenje ni zahtevno.
- b) Pričakovali smo, da bo izvedba testov strupenosti uspešna in da bo podala smiselne rezultate.
- c) Pričakovali smo, da bodo izbrane koncentracije bisfenola A vplivale na preživetje, prehranjevanje ter levitev testnih osebkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROBLEMATIKA ONESNAŽEVANJA POVRŠINSKIH VODA IN SEDIMENTOV

Viri onesnaževanja voda in posledično tudi sedimentov so lahko direktni izpusti onesnažil v vodna telesa in tudi izcedne vode iz odlagališč. V preteklosti so bila mnoga odlagališča postavljena, ne da bi pri načrtovanju upoštevali njihov negativni učinek na okolje. Iz njih so iztekale odpadne vode, katerih količina se je v naslednjih nekaj desetletjih še povečala. Odpadna voda iz odlagališč lahko vsebuje visoke koncentracije toksičnih substanc, ki predstavljajo grožnjo okolju. V najslabšem primeru lahko odpadne vode pronicajo skozi substrat in ob suši povzročijo onesnaženje podtalne vode in vodotokov, v katere se iztekajo. Posledica učinkov strupenih izpustov in izcedne vode je lahko degradacija diverzitete in vrstnega bogastva bentoških skupnostih (Bloor in sod., 2006). Omejena združba favne, ki preživi, je sestavljena iz malega števila vrst z visokim številom osebkov (Bloor in sod., 2006). *Asellus aquaticus* je ena izmed takih vrst (Mulliss in sod., 1994).

Mnoga hidrofobna onesnažila, ki so slabo topna v vodi, se vežejo na zrnat material in se akumulirajo v sedimentu (Gaskell in sod., 2007). Takšno onesnaževanje predstavlja še posebej velik problem na območju rečnih nanosov, kot so poplavna območja jezer, območja delt in estuarijev (De Lange in sod., 2008). V praksi je težko ločiti, kdaj imajo na bentoške organizme vpliv onesnažila vezana na sediment in kdaj tista v zgoraj ležeči vodi ter v vmesni intesticijski vodi. Sedimenti lahko predstavljajo pomemben ponor onesnažil. Koncentracije v sedimentu so tako lahko precej večje kot v vodi nad njim. Onesnažila vezana na sediment predstavljajo neposredno tveganje za vodne in obvodne rastline ter za detritne in t. i. »deposit-feeding« organizme (ki rijejo po sedimentu in se hranijo direktno z njega), lahko pa predstavljajo vir onesnaževanja na dolgi rok za organizme višjih trofičnih nivojev (Eimers in sod., 2001). Tveganje zaradi vezanih onesnažil se poveča zaradi izpostavljenosti preko prehranjevanja. Velikost tveganja se razlikuje med vrstami, saj so na sediment vezana onesnažila za nekatere vrste bolj biološko dostopna kot za druge. Medvrstne razlike v bioakumulaciji onesnažil, vezanih na sediment, se lahko pojavijo zaradi razlik v izpostavljenosti kot posledica različnih habitatov, vedenj, privzema (npr. stopnja prehranjevanja, trajanje potovanja hrane po črevesju, učinkovitost desorpcije in absorpcije), metabolizma in ekskrecije. Razlike v izpostavljenosti se lahko pojavijo zaradi neenakomerne razporeditve onesnažila v sedimentu, s koncentracijami, ki se razlikujejo glede na velikost delcev v sedimentu in glede na tip sedimenta. Nekateri organizmi se selektivno hranijo na določenih tipih sedimenta in na določeni velikosti delcev, nekateri se aktivno izogibajo onesnaženemu sedimentu. Tako selektivno prehranjevanje kot aktivno izogibanje onesnaženim področjem imata pomemben vpliv na izpostavljenost onesnažilu

in bioakumulacijo. Učinkovitost absorpcije onesnažila variira od 0 % do 98 %. Razlike se pojavljajo glede na tip onesnažila, vrsto organizma in tehnike merjenja (Sprague, 1971).

2.1.1 Onesnaževanje s hormonskimi motilci

Med hormonske motilce je vključen širok spekter onesnažil. Taka onesnažila imajo lahko nepredviden vpliv na hormonsko aktivnost in lahko motijo hormonsko regulirane fiziološke procese (Hyne, 2011). Učinki motenj v hormonalni aktivnosti zaradi hormonskih motilcev se pojavljajo v različnih oblikah. Ovirajo lahko hormonalno signalizacijo, tako da se neposredno vežejo na nuklearni receptor za hormone (npr. receptor za ekdison, hormon, ki kontrolira levitve pri rakah) ter se obnašajo kot agonisti ali antagonisti (LeBlanc, 2007).

Precejšnje število nedavnih *in vivo* raziskav s kemikalijami, poznanimi kot hormonski motilci pri vretenčarjih (npr. ksenoestrogeni BPA, 4-*n*-nonilfenol in 17 α -etinilestradiol), je pokazalo, da imajo te kemikalije učinke tudi pri nevretenčarjih, vključno z mehkužci, žuželkami in raki (Vandenbergh in sod., 2003). Ena največjih težav pri večini raziskav z nevretenčarji je nedvoumno dokazati, da je sprememba res nastala zaradi motnje endokrinih mehanizmov in ne zaradi splošne strupenosti (Segner in sod., 2003). Tak dokaz pa je potreben, saj je osnova, s katero definiramo hormonski motilec (Weltje in Oehlmann, 2006).

Narejenih je bilo precej raziskav o vplivu onesnažil s hormonsko aktivnostjo na nekatere vrste rakov. Raziskave na vrsti amfipodnega raka *Monoporeia affinis*, ki se prehranjuje na sedimentu, so pokazale, da je bil spolni razvoj pri samcih ter razvoj olfaktorne senzile na antenah upočasnen ali prekinjen, ko so bile živali izpostavljene sedimentu iz jezera, v katerem so našli hormonske motilce iz bližnjega odlagališča smeti (Sundelin in sod., 2000). Eden izmed hormonskih motilcev, fungicid fenarimol, ki inhibira sintezo ekdisteroida pri členonožcih, je pri *M. affinis* znižal stopnjo parjenja in oploditve pri samcih (Jacobson in Sundelin, 2006). Sundelin in Eriksson (1998) poročata o visoki frekvenci deformiranih zarodkov pri *M. affinis*, ki so bili izpostavljeni visoki koncentraciji policikličnih aromatskih ogljikovodikov v talnem sedimentu. Pri populaciji vrste *Echinogammarus marinus* na onesnaženih območjih je bil močno povečan pojav interseksualnosti (kombinacija netipično ali delno razvitih spolnih znakov, značilnih za ženski in moški biološki spol) (Ford in sod., 2004). Reproduktivne samice vrste *Melita nitida*, ki so bile izpostavljene sedimentu, onesnaženemu s petrolejem s policikličnimi aromatskimi ogljikovodiki, so razvile neobičajne sete na oostegitu, njihova plodnost pa je bila opazno nižja (Borowsky in sod., 1997). Opažena je bila nenormalna struktura oocit v vitelogenezi pri *Gammarus pulex*, in sicer na območju, kjer so bile zaznane višje koncentracije 17 β -estradiola in estrona (Gross in sod., 2001). Kadmij je pri *Gammarus fossarum* inhibiral sekundarno vitelogenezo, nonilfenol pa je imel specifičen, od koncentracije odvisen učinek na embrionalni razvoj (Geffard in sod., 2010). Iz naštetih

učinkov je razvidno, da sta glavna fiziološka procesa pri rakih, na katere vplivajo okoljska onesnažila s hormonsko aktivnostjo, levitve in sekundarna vitelogeneza, kar lahko vpliva na spremenjeno reprodukcijo (Hyne, 2011).

2.2 EKOTOKSIKOLOŠKI TESTI

Osnovni cilj ekotoksikologije voda je ugotavljanje vplivov kemijskih snovi na organizme vodnih ekosistemov. Tako poskušamo ohraniti celost vodnih habitatov s preprečevanjem oz. minimaliziranjem učinkov epizodičnega in trajnega onesnaževanja. Pomembno je določiti, katere koncentracije določene substance imajo toksične ali subletalne učinke na organizem (ugotovimo »varno koncentracijo« substance), da lahko razvijemo standarde za zaščito vodnih ekosistemov. Presoja in monitoring ekotoksikološkega tveganja onesnažil ter standardi za kvaliteto vode temeljijo na rezultatih standardnih testov strupenosti, ki vključujejo omejeno število reprezentativnih vrst organizmov, vključno z makroinvertebrati, po navadi gojenih v laboratoriju (Bloor in sod. 2005). Različne vrste se močno razlikujejo glede na njihovo občutljivost na različna onesnažila (Beketov in Liess, 2008).

S testi strupenosti ugotavljamo učinke različnih koncentracij onesnažil (ali mešanico onesnažil) na testne organizme pod nadzorovanimi razmerami, ki jih lahko izmerimo in ponovimo (Rand in sod., 1995). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo na vpliv onesnaževanja na celotno vodno telo (Bloor in Banks, 2006). Škodljivi učinki raznih onesnaževal na makroinvertebrate celinskih voda so večinoma preučevani glede na njihovo smrtnost v testih strupenosti. Ne smemo pa zanemariti subletalnih učinkov onesnažil na organizme, saj so organizmi v naravnih sistemih zaradi spiranja površin (Bloor in Banks, 2006) in naravnega redčenja ter naravne razporeditve onesnažil pogosto izpostavljeni prav tem. Letalne koncentracije onesnažil se po navadi pojavljajo le na območjih, kjer pride do začetnega onesnaževanja zaradi izpustov in raznih nesreč (Rand in sod., 1995). Izpostavljenost subletalnim koncentracijam lahko pri testnih organizmih med drugim izzove spremembe v vedenju (Pascoe in sod., 1991), kar vključuje spremembo sposobnosti organizma, da se prilagodi in preživi v okolju, to pa pomeni, da se spremeni njegov pomen v okolju. Vedenje je sestavljeno iz različnih biokemijskih in fizioloških procesov, zato lahko vsaka sprememba pomeni občutljivo indikacijo subletalnega učinka onesnažila (Rand in sod., 1995). Za toksikološke namene so bila proučevana različna vedenja živali, kot so učinki na plavanje, odnos plen – plenilec, učinki na prehranjevanje ter zanimanje za hrano in partnerje (Blockwell in sod., 1998). Subletalni učinki pa so poleg vedenjskih lahko še biokemični, fiziološki (Pascoe in sod., 1991) ali na nivoju življenjskega cikla (Sprague, 1971).

V našem magistrskem delu smo uporabili dva osnovna tipa testov strupenosti:

- Akutni testi običajno trajajo krajši čas (48–96 ur). Ocene akutne toksičnosti, kot je na primer srednja letalna koncentracija (LC₅₀), izvirajo prav iz teh kratkotrajnih testov. Pri akutnih testih strupenosti dvigamo koncentracijo onesnažila do imobilizacije, smrti ali katerega drugega določenega odgovora testnega osebka (Buikema in sod., 1982). Akutni testi so primernejši za oceno občasnega ali presledkovnega vstopa polutantov v vodno telo, medtem ko imajo kronični testi pomen, ko je populacija izpostavljena onesnažilu dalj časa. Uporabimo jih lahko kot preliminarno orodje, s katerim določimo letalne koncentracije (LC₅₀), ter tako določimo še subletalne koncentracije, ki jih lahko uporabimo pri subletalnih kroničnih testih (Bloor in Banks, 2006).
- Kronični (subletalni) testi podajo ustrežnejše informacije za razvoj standardov o kvaliteti vode, kjer nekatere substance niso v letalnih koncentracijah, a lahko ovirajo normalno življenje organizmov v vodi. Kronični testi po navadi trajajo dalj časa (nekaj tednov). Kronična toksičnost pogosto nastane zaradi akumulacije toksikanta (Hellawell, 1986). Opredelitev toksikantov je zapletena, saj moramo poleg toksične aktivnosti upoštevati tudi njeno integracijo z raztopljenim kisikom, temperaturo in ostalimi okoljskimi parametri, vključno z možnostjo prisotnosti ostalih toksikantov (Sprague, 1971). Osnovni namen kroničnih testov je ugotoviti »okoljsko varne« koncentracije, pri katerih je zagotovljeno preživetje populacije na dolgi rok. To opredelimo z opazovanjem rasti, razvoja, plodnosti in vedenja ter fizioloških in biokemijskih funkcij (Bloor in sod., 2006). Dovoljevanje izpustov v subletalnih koncentracijah pa, žal, ne nudi zaščite živali pred tveganjem na daljši rok, saj se učinek subletalnih koncentracij pogosto poveča zaradi akumulacije onesnažil (Bloor in Banks, 2006). Poleg tega je kombinirani učinek dveh sočasno delujočih stresorjev lahko drugačen od njunih individualnih učinkov. Nekateri avtorji, kot je na primer Rasmussen (2000), so opazili, da kombiniran učinek dveh onesnažil lahko sešteje učinke individualnih onesnažil.

2.2.1 Prepoznavanje na onesnažilo najbolj občutljivega življenjskega stadija izbranega testnega osebka

Pri ekotoksikoloških testih je pomembno identificirati življenjske stadije, v katerih so testni osebki najbolj ranljivi (Green in sod., 1986). Različni avtorji ugotovijo različno občutljivost glede na starost testnih osebkov. Iz raziskav je znano, da so jajčeca rakov bolj odporna kot larve in da so mlajši ali manjši osebki rakov bolj občutljivi kot večji ali odrasli osebki, vendar sta Aleksejev in Antipin (1976) ugotovila, da so večji osebki vrste *Asellus militaris* bolj občutljivi kot manjši. Green in sod. (1986) pa ugotovijo, da so pri *A. aquaticus* najbolj občutljivi osebki, stari 30 dni. Manjši osebki imajo boljše razmerje med

površino in telesno težo, zato se različne snovi lahko hitreje akumulirajo in osebki prej poginejo. Jajčece *A. aquaticus* ima 4 membrane, ki se postopoma levijo. Osebki imajo tako do določene starosti več membran in so zato bolj odporni.

Lukančič S. in sod. (2010) za svoje poskuse izberejo le odrasle samce vrste *A. aquaticus*, saj imajo taki testi višjo ponovljivost in testne živali enostavnejše odgovore na izpostavitve kemikaliji kot testi s samicami ali juvenilnimi osebki. Samice imajo različne in bolj zapletene stadije življenjskega kroga. Težje je najti samice istega stadija brez jajčec ali vsaj z isto količino jajčec. Juvenilni osebki so pogosto bolj občutljivi na onesnažilo, vendar jih je težje najti v istem stadiju razvoja in med dvema levitvama. Samce lažje izberemo glede na isto velikost in obarvanost. Tako je celotna metoda bolj uravnotežena (Migliore in Giudici, 1990).

2.2.2 Vezava onesnažil na sediment in njihov privzem v organizem

Pomemben faktor pri določanju učinkovitosti, s katero žival absorbira onesnažilo, je učinkovitost desorpcije. Na sediment vezane kemikalije se morajo najprej desorbirati iz delcev, preden se lahko absorbirajo. Ta topnost se lahko pojavi že v vodnem mediju (izpostavitve vodi) ali v prebavnem traktu živali (izpostavitve preko prehranjevanja). Absorpcija onesnažil, vezanih na delce, je odvisna tudi od časa zadrževanja sedimenta v črevesu. Poleg prehranjevalnega vedenja in fiziologije črevesa ima pomembno vlogo pri bioakumulaciji organskih snovi tudi lipidna sestava organizma. Hidrofobna onesnažila se lahko akumulirajo v lipidih (Gaskell in sod., 2007). Za določitev biološkega pomena na substrat vezanih snovi je potrebno določiti, ali se vnos pojavi preko zaužitja delcev hrane, preko raztopine ali iz obojega. Onesnažila v raztopini so za organizme bolj pomembna kot tista, vezana na delce hrane. Obstajajo različni pristopi za ocenitev relativnega doprinosa raztopljenih in trdnih virov onesnažil (npr. kovin), ki se akumulirajo v vodnih živalih. Razdelitev onesnažil po tkivu živali lahko služi za določitev akumulacijskih poti. Visoka koncentracija snovi v škregah kaže na privzem preko vode, akumulacija v črevesu pa na zaužitje. Poznavanje poti privzema je pomembno za primerjavo med različnimi raziskavami in za predvidevanje rezultatov v naravnih sistemih (Eimers in sod., 2001).

Učinek na sediment vezanih onesnažil na vodne nevretenčarje se lahko razlikuje glede na razlike v biodostopnosti, kvaliteti ter strukturi hrane (Peeters in sod., 2000). Bioakumulacija je odvisna od vrste, določajo pa jo lastnosti organizma, kot so velikost, starost, spol, prehranjenost, vsebnost lipidov, metabolizem in prehranjevalno vedenje (Neff, 1979).

2.3 RAZLOGI ZA IZBIRO TESTNEGA ORGANIZMA VODNEGA OSLIČKA *ASELLUS AQUATICUS* (CRUSTACEA, ISOPODA) LINNAEUS 1758

Vrsta *A. aquaticus* (Crustacea, Isopoda) Linnaeus 1758 je široko razširjena, evrieka skupina (Bouskill in sod., 2006), ki predstavlja pomemben sestavni del celinskih voda (Green in sod., 1986). Je pomemben sestavni del regulacije in ohranjanja prehranjevalnih mrež (Bouskill in sod., 2006), bodisi kot porabnik (herbivor, detritivor) (Giudici, 1988) ali kot plen številnim vrstam rib in predatorskim makroinvertebratom (Green in sod., 1986). Zaradi svoje razširjenosti, visoke plodnosti (Migliore in Giudici, 1990) in vključenosti v biološke procese ter zaradi ostalih pomembnih vlog, ki jih igra v bentoških skupnostih, je *A. aquaticus* primerna modelna vrsta pri ekologiji voda (Hasu in sod., 2008), ključen organizem v mnogih biotičnih indeksih (Green in sod., 1986) in dober kazalnik zunanjih vplivov na vodotok (Eimers in sod., 2001). Njegova razširjenost je večja v reguliranih kot v naravnih vodotokih (Peeters in sod., 2002). *A. aquaticus* je občutljiv na antropogene toksične snovi (Migliore in Giudici, 1990), ki jih lahko najdemo v njegovih tkivih še dolgo po izpostavitvi (Plenet, 1995).

A. aquaticus je vezan na sediment, po katerem rije, in se prehranjuje z detritom, zato je izpostavljen onesnažilom, vezanim na sediment, in kot tak primeren za njihovo preučevanje (Eimers in sod., 2001). Ker je *A. aquaticus* tako ozko vezan na sediment, je kot tak občutljiv na njegove vplive. Sediment igra pomembno vlogo pri razporeditvi osebkov *A. aquaticus* v njihovem habitatu (Peeters in sod., 2002). Vpliva neposredno na organizem kot medij za njihovo bivanje ter posredno, saj se v substratu vse zunanje razmere, ki jim je izpostavljen organizem, nekoliko spremenijo (Minshall, 1984). *A. aquaticus* se lažje zoperstavi hitrejšemu vodnemu toku, če se ima možnost skriti v intersticielne prostorčke v sedimentu. Učinki hitrosti vodnega toka se torej razlikujejo glede na tip substrata, ki je prisoten v vodotoku (Peeters in sod., 2002). Skrivanje *A. aquaticus* v intersticielnih prostorčkih zmanjšuje občutljivost organizmov na predatorje, kot so npr. ribe (Feltmate in sod., 1986). Dokazano pa je, da *A. aquaticus* zasede intersticielni prostor tudi, kadar v bližini ni predatorjev ali močnega toka. Uporaba intersticielnih prostorov torej ni samo fleksibilen odgovor na stres, temveč tudi enostavna negativna fototaksija (Ward, 1992).

Populacijo organizmov je enostavno vzdrževati v laboratorijski kulturi (Beketov in Liess M, 2008), tudi po več mesecev (Hasu in sod., 2008). Ni nam potrebno dodajati različnih prehranskih dodatkov, saj ti bistveno ne vplivajo na osebke, kvečjemu slabšajo stanje glede na kontrolo (Hasu in sod., 2008). Pri rakih v testnih sistemih lahko spremljamo enostavno merljive parametre, to so na primer levitve in regeneracija (Watts in sod., 1992).

Osebki vrste *A. aquaticus* so bili že v precejšnjih raziskavah uporabljeni kot testni organizmi. Uporabili so jih na primer Blockwell in sod. (1998), Bloor in sod. (2005, 2006)

ter Eimers in sod. (2002). Na njih so potekali tudi mnogi podobni testi. Prus (1976) je v svojih raziskavah preučeval porabo energije pri *A. aquaticus*, Bjelke (2005) je preučeval vplive nižjih koncentracij kisika, Peeters in sod. (2002) so preučevali vplive različnih stresorjev na *A. aquaticus*, Hasu in sod. (2006) pa so preučevali odpornost na parazite pri *A. aquaticus*.

2.4 OPIS VRSTE ASELLUS AQUATICUS (SLIKA 1)



Slika 1: *Asellus aquaticus* (vir: <http://www.wildaboutbritain.co.uk>)

2.4.1 Uvrstitev v sistem

Uvrstitev *A. aquaticus* v sistem povzemamo po Grunerju (1956).

razred RAKI Crustacea

podrazred VIŠJI RAKI Malacostraca Latreille 1806

nadred VALILNIČARJI Peracarida Calman 1904

red ENAKONOŽCI Isopoda Latreille 1817

podred Aselotte Latreille 1806

družina VODNI OSLIČKI Asellidae Sars 1897

rod *Asellus* E. L. Geoffroy 1762

2.4.2 Habitat

A. aquaticus je splošno razširjen epibentoški (evritopa, evritermna in ekspanzivna vrsta) izopodni rak celinskih voda (Jugovic, 2005). Najdemo ga v vseh tipih površinskih voda,

večinoma pa v stoječih ali počasi tekočih vodnih telesih. Najdemo ga celo v rahlo brakičnih vodah, s slanostjo do 15 % (Prevorčnik in sod., 2009), pa tudi v vseh tipih podzemnih celinskih voda (Jugovic, 2005). Po navadi ga najdemo v obogatenih vodah (Green in sod., 1986), prenese pa lahko tudi zelo visoko organsko obremenjenost, kjer je indikator in uspešen član α -mezotrofne skupnosti (Prevorčnik in sod., 2009). Vodni oslički ne znajo plavati, ampak živijo v sedimentu (Fitter in Manuel, 1986). Pogosto se zadržujejo v plitkih predelih med rastlinjem ali med ostanki rastlinja, med kamni ali v votlih delih rastlin. Najdemo jih lahko tudi v globokih, celo reliktnih jezerih, kjer so razmere zelo stabilne. Vrsta je negativno fototaktična in pozitivno tigmotaktična (Jugovic, 2005). Bjelke (2005) je v svojem članku preverjal učinkovitost različnih vrst v različnih koncentracijah kisika. Dokazal je, da *A. aquaticus* morda ni med najučinkovitejšimi drobilci v normoksiji (normalna koncentracija kisika, 9 mg/l), vendar se zato še vedno lahko prehranjuje v hipoksiji (koncentracija kisika pod 2 mg/l), le v nekoliko manjši stopnji.

2.4.3 Prehranjevanje

A. aquaticus je detritivorni drobilec, prehranjuje se selektivno. Prehranjuje se z bakterijami in z glivami poraslim, grobo zrnatim organskim materialom. Izkorišča lahko tudi zelena rastlinska tkiva in alge (Hasu in sod., 2008). Stopnja prehranjevanja vodnega oslička je do 6 μ g suhe mase hrane/mg suhe teže/h (Gaskell in sod., 2007). V hepatopankreasu ima endosimbiontske bakterije, ki prispevajo h gostiteljevi prebavi, tako da proizvajajo prebavne encime (Hasu in sod., 2008). Pri vrsti *A. aquaticus* se pojavlja tudi tendenca h kanibalizmu (Rauch in Morrison, 1999).

2.4.4 Interakcije z drugimi organizmi

Vsak osebek *A. aquaticus* predstavlja obliko epizojskega življenja, saj nekatere vrste organizmov izkoriščajo *A. aquaticus* kot substratni organizem. Mednje spadajo predvsem protozoi in kotačniki. Največ epibiontov se pojavlja na obustnih okončinah, na prvih nekaj ventralnih segmentih in na škrgah. Epibionti imajo različne prilagoditve za življenje na živem substratu. Ločimo fakultativne vrste (*Acineta tuberosa*), ki lahko poseljujejo tudi druge organizme, rastlinski ali abiotski substrat, ter vrste, pri katerih je ves življenjski cikel odvisen od *A. aquaticus* (*Gymnodinoides aselli*) (Cook in sod., 2002).

A. aquaticus je pogost vmesni gostitelj parazitskih ježerilcev, kot sta *Acantocephalus lucii* in *Acantocephalus anguillae* (Hasu in sod., 2008). Glavni gostitelj akantocefalov je navadni ostriž (*Perca fluviatilis*). Paraziti se pariyo v njegovem črevesju, vodni oslički pa se z njimi okužijo preko ostriževih iztrebkov, kjer se nahajajo jajčeca *A. lucii* in *A. anguillae*. Paraziti se v telesni votlini vodnega oslička razvijajo več mesecev do infektivnega stadija (Benesh in sod., 2009). Življenjski cikel je zaključen, ko paraziti požrejo gostitelja (Benesh in Valtonen, 2007). Raziskave odpornosti izpodnih rakov na parazitske ježerilce so pokazale, da pri gostiteljih obstajajo tako celični kot humoralni

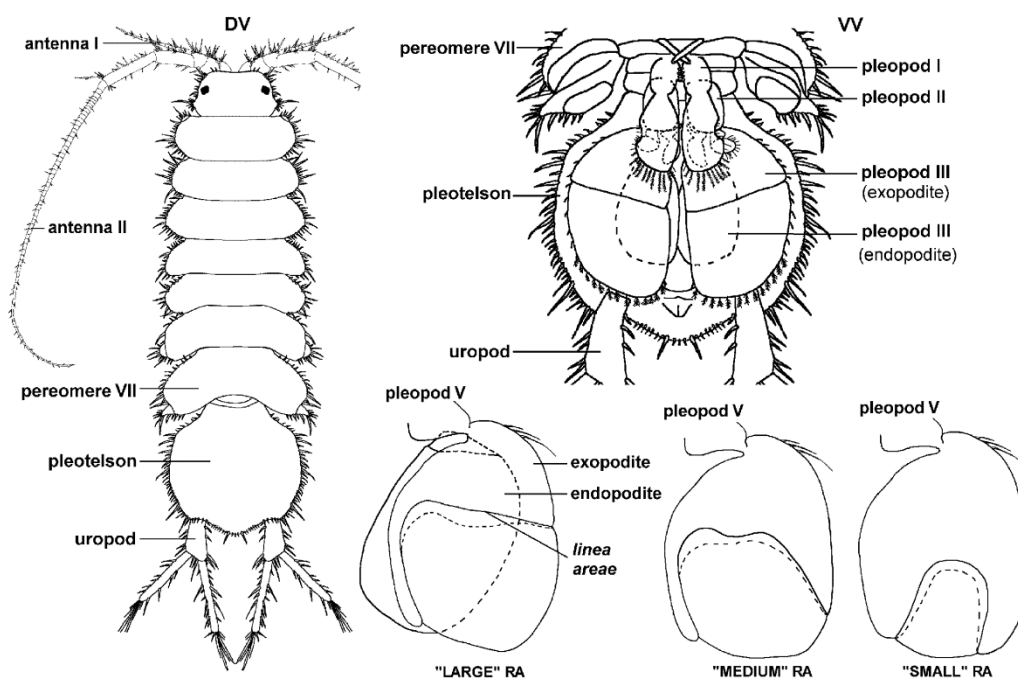
odgovori, ki preprečujejo parazitski larvi, da bi se prebila skozi črevesno steno gostitelja v hemocel. Kadar larvi vseeno uspe priti v hemocel in se tam razvije v infektivni stadij, postane, če je gostitelj samica, ta neplodna, poveča pa se tudi tveganje, da gostitelj postane plen ribam zaradi spremenjene pigmentacije (Hasu in sod., 2006).

A. aquaticus je relativno mirne narave. Lahko ga najdemo v koeksistenci z različnimi vrstami postranic (npr. *Gammarus pulex*). *Gammarus* je dosti bolj agresivna in tekmovalna skupina osebkov, zato lahko njihova prisotnost zniža preživetje in fiziološki status *A. aquaticus* (Blockwell in sod., 1998). Bengtsson (1982) predvideva, da obstaja celo odnos predator – plen med obema vrstama. Lahko pride do direktnega napada bolj agresivne skupine postranic ali do kemotaksij podrejenega *A. aquaticus*.

Vodni osliček je pomemben plen mnogih ptic, rib in predatorskih makroinvertebratov (Hasu in sod., 2008).

2.4.5 Spolni dimorfizem

Pri *A. aquaticus* je opazen spolni dimorfizem. Samci so večji od samic in imajo daljše antene glede na dolžino telesa (Bertin in Cezilly, 2003). Samca in samico lahko ločimo tudi po pleopodih. Samica ima samo drugi par pleopodov, medtem ko imajo samci prvi in drugi par pleopodov, prvi delno prekriva drugega (Slika 2). Samci imajo četrti par nog ukrivljen, da z njimi lahko zgrabijo samico med kopulacijo. Samice imajo vse noge enake. Spola lahko ločimo tudi glede na obliko telesa, vendar ta metoda ni statistično dokazana. Samice naj bi bile nekoliko širše v zgornjem delu telesa, medtem ko so samci enako široki po vsej dolžini telesa. Informacije o določanju spola sem dobila pri asist. dr. Simoni Prevorčnik (Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Univerza v Ljubljani).



Slika 2: Telesni deli samca *A. aquaticus*. Na sliki sta vidna para pleopodov 1 in pleopodov 2 (vir: <https://www.google.si>)

2.4.6 Razmnoževanje

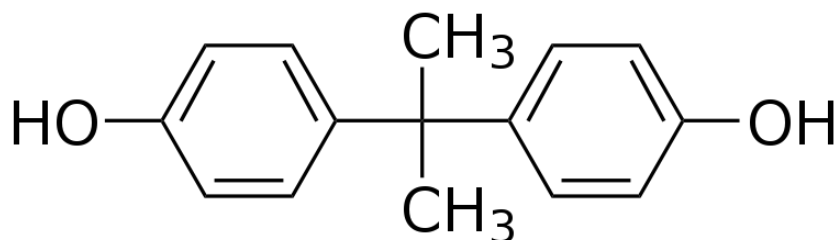
A. aquaticus je vrsta, pri kateri je značilno prekopulatorno vedenje, s katerim samec zaščiti samico pred drugimi potencialnimi partnerji. Pri samcih je uspeh pri parjenju pozitivno povezan z dolžino telesa, predvidevajo pa, da je uspeh prav tako odvisen od dolžine anten (Bertin in Cezilly, 2003). Samice *A. aquaticus* nosijo oplojena jajčeca v valilni vreči (marsupij), kjer se potomci razvijajo približno 2 tedna (pri temperaturi 20 °C), nato zapustijo marsupij in postanejo prosto živeči juvenilni osebkji (Hasu in sod., 2006). Samica lahko sprostí okoli 100, večje pa do 150 juvenilnih osebkov, ki v 30 dneh dosežejo velikost > 1.0 mm. Pri samicah lahko pride tudi do kanibalističnega vedenja do potomstva (Green in sod., 1986).

2.5 UPORABLJENO ONESNAŽEVALO V MAGISTRSKI NALOGI: BISFENOL A

2.5.1 Splošno

Bisfenol A (BPA; 2,2-(4,4-dihidroksifenil)propan) (Slika 3) je sintetiziran s kombinacijo acetona in fenola. BPA je pomembna organska spojina, ki predstavlja intermediat v proizvodnji epoksi smole, polikarbonatne plastike, sredstev za gašenje in ostalih posebnih produktov. Epoksi smole uporabljamo kot kontaktno površino s hrano pri prekrivanju pločevink, pri avtomobilskih delih, kot lepilo ter za prekrivanje PVC-sten v vodovodnih ceveh. S polikarbonatno plastiko obdamo električne dele v samogibnih predelih,

uporabljam jo v neprebojnem steklu, gospodinjskih aparatih, embalaži za hrano, plastenkah (Howard, 1989). Nekatere polimere, ki vsebujejo BPA, uporabljajo celo v zobozdravstvu (Sun in sod., 2005).



Slika 3: Strukturna formula BPA (vir: <http://www.viewzone.com>)

V zadnjih letih se je letna poraba BPA močno povečala (Zeng in sod., 2006). Ugotovljeno je bilo, da se BPA pojavlja v odpadnih vodah iz odlagališč smeti, v rekah, morjih in v prsti (Hasu in sod., 2006). Do onesnaževanja okolja z BPA pride ne samo pri slučajnih razlitjih ali izpustih (Brotons in sod., 1995), temveč tudi pri uporabi BPA v procesu proizvodnje drugih spojin ali produktov (pri pranju ostankov in kot odpadna voda), lahko pa tudi zaradi nepazljivosti v obliki prašnih emisij med predelavo, uporabo in transportom. Ker je BPA uporabljan tako v gospodinjstvu kot v industriji, je lahko prisoten v kanalizaciji ter v odpadni vodi (Sun in sod., 2005). Letno se v vode sprosti 21,260 kg emisij BPA, kar vodi do upravičenih skrbi o vplivih na vodno življenje (European Union Risk ..., 2010).

2.5.2 BPA v vodnih okoljih

Najvišje koncentracije BPA so izmerili na območjih, ki so v bližini raznih industrijskih postrojenj, katerih glavne dejavnosti so proizvodnja plastike. Viri onesnaženja okolja z BPA so: odpadna voda, kanalizacija, izcedna voda, surova odpadna voda, podzemna voda, voda v kanalih, lagunah, estuarjih in rečna voda (Plantan, 2012)

Koncentracije BPA v vodnih območjih po celem svetu nihajo od nekaj nanogramov BPA na liter v morjih in čistejših vodah, do kar 0,15 mg/l BPA v odpadnih industrijskih vodah, v izcednih vodah iz predelovalnice (reciklirnice) umetnih rastlin pa kar 0,37 mg/l BPA. Koncentracije BPA v evropskih državah so razmeroma nizke v primerjavi z ostalim svetom. Vendar so prav v Evropi zasledili prisotnost BPA v podzemni vodi, medtem ko je v Aziji in ZDA še niso (Huang in sod., 2011).

2.5.3 Učinki na organizme

BPA naj bi imel estrogensko aktivnost (je hormonski motilec) (Krishnan in sod., 1993) in akutno strupenost pri podganah in miših, ki so jih hranili z višjimi dozami BPA, ter še posebno močne učinke na njihovih zarodkih (Morrissey in sod., 1987). BPA lahko inducira

antioksidativno obrambo in oksidativni stres pri vodnih organizmih (Jemec in sod., 2012). Pri žuželkah BPA moti dva osnovna fiziološka procesa odvisna od ekdisteroidov, levitve in embrionalni razvoj. Ekdisteroidi predstavljajo skupino steroidnih hormonov, značilnih za členonožce (žuželke, rake). Predstavljajo pomemben del regulacije razvoja, rasti in razmnoževanja in imajo podobno funkcijo kot androgeni, estrogeni in tiroidni hormoni pri vretenčarjih. Sodelujejo pri regulaciji embrionalnega razvoja pri rakih (Mu in LeBlanc, 2002), regulirajo proces levitve (Horn in sod., 1996), sodelujejo pa tudi pri regulaciji vitelogeneze in spermatogeneze, kar jim daje funkcijo reproduktivnega hormona (Happ, 1992). BPA izzove antioksidativno aktivnost, kar se pokaže v podaljšani fazi med dvema levitvama in v motnjah v embrionalnem razvoju. Antioksidativno aktivnost BPA izzove tako, da funkcionira kot juvenilni hormon (metil farnesoat), medtem ko lahko izzove tudi aktivnost juvenilnega hormona pri rakih (Mu in sod., 2005).

2.5.4 Adsorbpcija BPA na sediment

Adsorbpcija in desorbpcija organskih polutantov na oz. iz sedimentov sta centralna procesa, ki vplivata na obnašanje onesnažila, na njegov transport in ekotoksikološko tveganje. Razumevanje tega procesa prispeva k presoji tveganja in določitvi usode v vodnih okoljih (Zeng in sod., 2006).

Zeng in sod. (2006) so ugotovili, da se proces adsorbpcije BPA na sediment začne s hitrim začetnim adsorbpcijskim korakom, ki traja približno 4 ure. V prvih 20 minutah je adsorbpcija najhitrejša, saj količina adsorbiranega BPA doseže tudi preko 88 %. To pomeni, da v tem procesu hitra adsorbpcija igra pomembnejšo vlogo kot počasna. Stadiju adsorbpcije sledi stadij desorbpcije, ko se adsorbirana količina postopoma zmanjšuje. Ravnotežje med adsorbpcijo in desorbpcijo (stopnja adsorbpcije je enaka stopnji desorbpcije) je doseženo po osmih urah. Primeren čas za pripravo sedimenta z BPA v testih strupenosti je torej 8 ur.

Količina na sediment adsorbiranega BPA je na splošno nizka (Sun in sod., 2005). Adsorbpcija BPA je odvisna od sestave sedimenta ter od nekaterih fizikalnih in kemijskih komponent. Pomembno vlogo pri adsorbpciji imajo temperatura (adsorbpcija BPA je eksotermen proces), gostota sedimenta, koncentracija železa ter pH-vrednost (v kislem okolju se količina adsorbiranega BPA na sediment zmanjšuje z višanjem pH, medtem ko v alkalnem okolju adsorbpcija variira) (Zeng in sod., 2006). BPA ima večjo adsorbpcijo po odstranitvi karbonatov iz sedimenta. Količina adsorbpcije BPA je povezana tako s totalnim organskim ogljikom (TOC) kot z raztopljenim organskim ogljikom v sedimentu. Ugotovili so, da tudi različni ioni (kot sta npr. Ca^{2+} in K^+) vplivajo na adsorbpcijo BPA, in sicer zaradi njihove različne valence. Adsorbpcija BPA se zmanjšuje s povečevanjem razmerja voda – sediment (Sun in sod., 2005).

2.6 RAZMERE GOJENJA TESTNIH ORGANIZMOV IN RAZMERE IZVEDBE TESTOV STRUPENOSTI Z VRSTO *ASELLUS AQUATICUS*, KI JIH NAVAJAJO RAZLIČNI AVTORJI

Ko ustvarjamo program za laboratorijsko gojenje za ekotoksikološke študije, moramo paziti, da živali vzdržujemo v standardiziranih in ponovljivih razmerah. Živali ne smejo doživeti stresa, da lahko manipuliramo z njihovim toksikološkim odgovorom. Pri vzdrževanju laboratorijske kulture je zelo pomembna tudi pravilna prehrana, saj z njo vzdržujemo zdravo populacijo brez stresa. Pomembno je, da živali vzdržujemo v čim bolj naravnem okolju. Z zagotovitvijo prave prehrane posnemamo njihove naravne vire in zagotovimo primerne nutriente za rast in reprodukcijo. Naše gojene živali bodo le tako lahko reprezentativen primer populacij v naravi in uporabne za ekotoksikološke raziskave (Bloor, 2011). Gojenje in poskusi, ki jih izvajamo, morajo biti ponovljivi. Hitro namreč lahko pride do razlik med rezultati posameznih poskusov, ki so med drugim lahko posledica kvalitete vode, postopkov v poskusu ali genetske variacije med posameznimi populacijami. S standardizacijami v izvedbi poskusov, kot je na primer standardni umetni medij, lahko zmanjšamo vsaj nekaj izmed teh neskladnosti (Borgmann, 1996).

V Prilogi 1 so zbrani podatki iz literature o gojenju vodnih osličkov in o izvajanju testov strupenosti. Nekateri parametri, kot je na primer temperatura, zelo variirajo pri različnih avtorjih. V takih primerih smo se odločili za nam najbolj ustrezno oz. najlažje izvedljivo možnost glede na razmere v laboratoriju, kjer so bili testi izvajani. Pri drugih parametrih, kot je na primer izbira hrane za testne osebe, pa so si avtorji precej enotni. V večini primerov so bili kot hrana izbrani z mikroorganizmi obraščeni listi črne jelše (*Alnus glutinosa*). Priprava listov, ki ustrezajo prehranjevanju *A. aquaticus*, zahteva postopek vzpostavitve obrasti. Bloor in sod. (2010) so opisali standardizirano pripravo hrane za *A. aquaticus*, ki smo jo upoštevali tudi v naših testih.

2.6.1 Priprava hrane za *A. aquaticus* po Bloor (2010)

Liste naberemo jeseni med odpadanjem, odrežemo z drevesa in posušimo na zraku. Vsi listi morajo biti nabrani z istega drevesa, isti dan. Dodamo 10 l rečne vode in pest organskega detrita. Oboje mora biti iz neonesnaženega vira. V laboratoriju zlijemo vse skupaj v 15-litrsko posodo, ki je ne zapremo. Dodamo pest že prej nabranih jelšinih listov in detrita, ki služijo kot vir bakterij in gliv, ter premešamo. Liste tako vzdržujemo vsaj 10 dni, nakar jih vzamemo iz posode, jim odstranimo odvečno tekočino, da preprečimo organsko obogatitev, in jih damo v akvarij. Liste, odstranjene iz posode, nadomestimo z novimi suhimi listi. Vzdrževane liste nato prosto raztresemo po akvariju ter jih menjamo v rednih intervalih. Listov mora biti toliko, da pokrijejo dno akvarija in segajo do višine približno 50 mm. Če mlade osebe ločimo od odraslih, moramo tudi te preskrbeti z vzdrževanimi listi, ki jih potrebujejo za skrivališče in prehrano. Prehranjujejo se tudi z

iztrebki odraslih osebkov, ki jih je potrebno dodajati v gojišče, dokler se niso sposobni hraniti samo še z vzdrževanimi listi (približno po 25 dnevih).

2.6.2 Razlogi za izbiro listov črne jelše (*Alnus glutinosa*)

V večini člankov so kulturo *A. aquaticus* hranili z listi črne jelše (*Alnus glutinosa*). Te pogosto najdemo v bližini nahajališč vodnega oslička. Prehranjevalna aktivnost *A. aquaticus* je bila preizkušena z različnimi vrstami hrane, od otroške do ribje (Blockwell in sod., 1996) in pasje (Willoughby in Sutcliffe, 1976). Ko gojimo osebkove za namen ekotoksikoloških raziskav, je potrebno ustvariti reprezentativne razmere, torej uporabiti njihovo naravno hrano. Odgovor živali je namreč odvisen od njene nedavne zgodovine, ki poleg bolezni in življenjskega stadija vključuje tudi prehrano (Bloor in sod., 2005; Bloor, 2010). V nasprotnem primeru nam testi lahko pokažejo napačne rezultate. Menimo, da predelana hrana, kot je na primer pasja, ni najbolj primerna za teste strupenosti.

2.6.3 Pomen kolonizacije listne površine

Vloga alohtonega organskega materiala (npr. listja in lesa) v potokih in rekah je precej dobro raziskana (Anderson in Sedell, 1979). Sveže odpadli listi in ostali rastlinski detrit, ki ga zanese v vodo, zelo hitro kolonizirajo mikroorganizmi (proces, ki ga vključimo pri vzdrževanju listov za prehrano vodnih osličkov) (Gollady in sod., 1983). S pomočjo različnih poskusov je bilo ugotovljeno, da imajo drobilci, ki se prehranjujejo na detritu, raje in tudi bolje preživijo na substratu, ki je bil prej koloniziran, npr. z glivami (Bueler, 1984). Predvidevajo, da mikrobna kolonizacija izboljša kvaliteto detrita za prehranjevanje, saj imajo glive sposobnost uničenja rastlinskih alelokemikalij (Rosenthal in sod., 1979), sintetizirajo mikronutriente, proizvajajo mikotoksine (Graca in sod., 1994), poleg tega pa imajo detritivori sposobnost izkoristiti nekatere encime gliv (Iversen, 1974). Dokazali so, da *A. aquaticus* razlikuje med z glivami poraslimi in neporaslimi listnimi površinami ter celo med različnimi glivnimi micelijami. Prehranjuje se s strganjem listne površine in pri tem selektivno požira glivne micelije (Graca in sod., 1994). Odpadle liste kolonizirajo bakterije, glive in alge. Večina rakov ima kemosenzorične senzile, zato lahko razlikujejo med kemičnimi signali vseh treh mikroorganizmov. De Lange (2004) je ugotovila, da so glive in bakterije pomembnejši del obrasti kot alge. *Gammarus pulex* (ki ima podobne prehranjevalne preference kot *A. aquaticus*) raje izbere liste, poraščene z glivami ter bakterijami, saj so te bolj specifične za razkrajajoče liste, medtem ko alge večkrat rastejo na mineralnem substratu, torej jih *G. pulex* ne povezuje z virom hrane (De Lange in sod., 2005).

Hranilna kvaliteta detrita je definirana glede na kemijske (npr. dušik in lignin), fizikalne (npr. odpornost) in biološke (npr. biomasa mikrobov) parametre. Visoka kvaliteta hrane pomeni nizko razmerje C : N, nizko vsebnost lignina, nizko odpornost in visoko biomaso mikrobov (Iversen, 1974). Ravno zaradi tega predstavlja črna jelša visoko kvalitetno hrano.

Ko so ponudili *Gammarus pulex* (vrsta, ki ima podobne prehranjevalne preference kot *A. aquaticus*) na izbiro liste različnih vrst, kot so črna jelša (*Alnus glutinosa*), bukev (*Fagus sylvatica*), hrast (*Quercus robur*), brest (*Ulmus glabra*), jesen (*Fraxinus excelsior*) in vrba (*Salix caprea*), je ta zaužil precej več listov črne jelše kot ostalih vrst (Nilsson, 1974).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 UVOD IN POTEK DELA

Prvi del magistrskega dela je obsegal pregled že obstoječe literature o gojenju vodnih osličkov (*Asellus aquaticus*) in sorodnih vrst, testih strupenosti z *A. aquaticus* kot testnim organizmom in/ali bisfenolom A (BPA) kot testno kemikalijo. Poskušali smo najti tudi informacije o pripravi sedimenta za vodne organizme in o obnašanju BPA v stiku s sedimentom. Testne razmere, kot jih navajajo različni avtorji, so povzete v Prilogi A (glej poglavje 2.6). Iz zbranih podatkov smo sestavili svoj sistem za gojenje in sistem za izvajanje testov strupenosti.

V drugem delu smo začeli s praktičnim delom, ki je vključevalo terensko in laboratorijsko delo. Na terenu smo vzorčili vodne osličke in zbrali vzorce vode iz nahajališča za kemijske analize. V laboratoriju smo nato zbrali osebke iz vzorca in jih preložili v akvarij, kjer smo jih pustili, da se aklimatizirajo. Pri tem smo skušali čim bolj optimizirati razmere za gojenje.

Naslednja stopnja je obsegala postavitve sistema za izvajanje testov strupenosti, kjer smo ugotavljali tip testnih posod, volumen medija v testnih posodah, menjave medija ter izbrali testne parametre. Sledila je optimizacija kontrolne skupine, ki je vključevala izbor medija, izbiro frekvence menjave hrane in števila testnih osebkov v testnih posodah.

Ko so bile izbrane optimalne razmere za izvajanje testov strupenosti, smo njihovo delovanje preizkusili z dodatkom različnih koncentracij BPA. Izvedli smo več paralelnih akutnih in kroničnih testov. Pri akutnih testih smo spremljali takojšnje učinke dodane kemikalije. Testi so trajali štiri dni. Akutne teste smo izvedli s sedimentom ali brez, poleg odraslih testnih osebkov pa smo uporabili tudi juvenilne. S kroničnimi testi, ki so trajali od dva do tri tedne, smo preverjali učinke kemikalije na daljši rok. Kronične teste smo opravljali le z odraslimi osebki, brez sedimenta.

Parametri, ki smo jih spremljali med kontrolnimi testi in testi strupenosti, so bili smrtnost (koliko osebkov pogine v določenem času pod določenimi razmerami), stopnja hranjenja (kolikšna je, v miligramih, suha masa organske snovi, ki jo skonzumira osebek na miligram suhe telesne mase na dan) in stopnja levitve (kolikokrat se v povprečju osebek levi na dan izpostavitve).

3.2 VZORČENJE

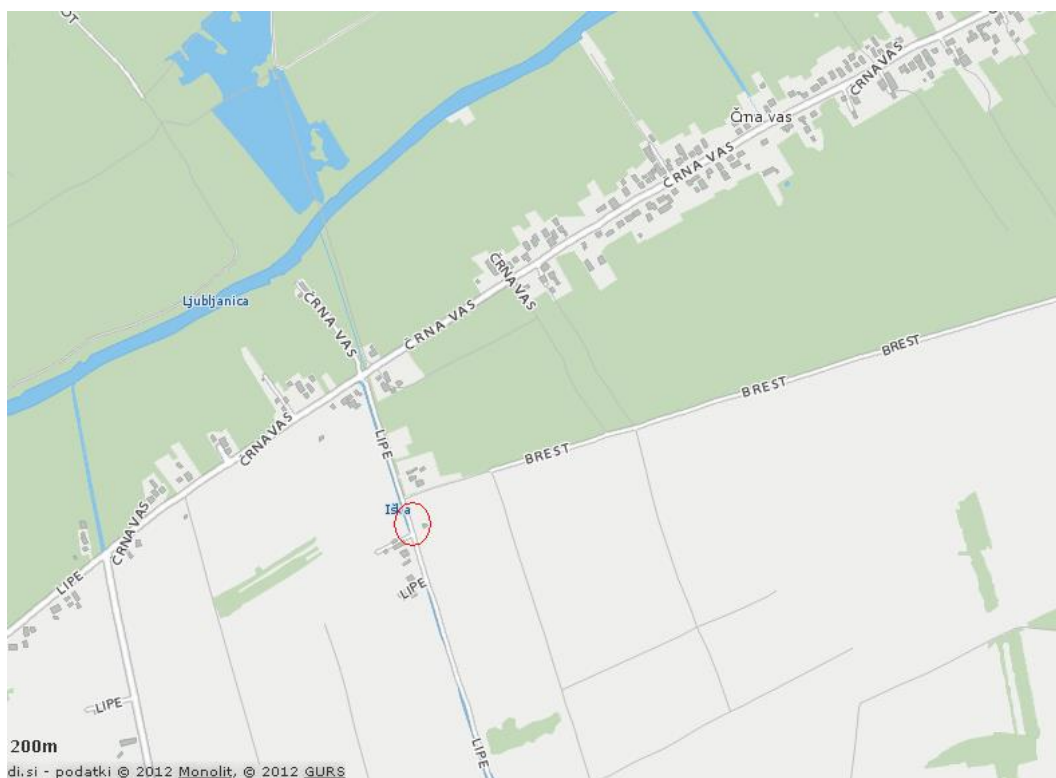
Osebkje vodnega oslička (*A. aquaticus*) smo nabrali v njegovem naravnem okolju, v manjšem, počasi tekočem potoku v Črni vasi. (Slike 4–6).



Slika 4: Vzorčno mesto z okolico, fotografija je posneta 24. 2. 2012, ob drugem vzorčenju



Slika 5: Satelitski posnetek okolice kraja vzorčenja. Mesto vzorčenja je obkroženo z rdečo barvo (vir: <http://zemljevid.najdi.si/>)



Slika 6: Zemljevid okolice kraja vzorčenja. Mesto vzorčenja je obkroženo z rdečo barvo (vir: <http://zemljevid.najdi.si/>)

Vzorčili smo jeseni, 16. 11. 2011, zgodaj spomladi, 24. 2. 2012, ter pozno spomladi, 23. 4. 2012. Dobili smo tri različne populacije, ki so se med seboj razlikovale predvsem v številu osebkov na vzorec, ki se je manjšalo od prvega do zadnjega vzorčenja. Vzorčili smo tudi na začetku junija, 11. 6. 2012, vendar je bilo v vzorcu le 5 osebkov, ki jih nismo uporabili v testih.

Vzorčili smo po metodi vzorčenja z brcanjem (angl.: *kick-sampling*); ročno mrežo smo postavili pravokotno na substrat z odprtino proti toku in jo čvrsto pritiskali ob dno vodotoka. Eno nogo smo postavili tik pred vhodno odprtino in nato z njo močno razbrcali substrat 0,25 m nazaj proti toku. Počakali smo nekaj časa, da je vodni tok odnesel dvignjene usedline in živali v mrežo. V vzorec smo zajeli tudi precej vodnega rastlinja, saj se ga vodni oslički radi oprimejo.

Ob vsakem vzorčenju smo nabrali tri podvzorce. Da bi odstranili čim več blata in si olajšali kasnejše zbiranje osebkov iz vzorca, smo vsak podvzorec še v mreži sprali z vodo iz vodotoka. Podvzorce smo shranili v hladilni torbi, v katero smo dodali nekaj vode iz vodotoka.

Vzorec smo pripeljali v laboratorij. Tam smo iz vzorca pobrali dele vodnega rastlinja, ga dali v banjico z vodo ter iz njega pobrali posamezne vodne osličke, ki smo jih shranili v čaši z vodovodno vodo.

Večino vzorca je predstavljalo blato, zato smo ga nekaj dali v manjše plastično sito, ga nekaj minut spirali z nežnim curkom vodovodne vode ter tako poskušali odstraniti kar največ blata, hkrati pa ohraniti osebke v vzorcu žive in nepoškodovane. Iz očiščenega vzorca smo zbrali osebke vodnega oslička ter jih dali v čašo z vodovodno vodo. Postopek smo ponavljali, dokler nismo pregledali celotnega vzorca. Iz vzorca smo zbirali odrasle osebke (dolžina od začetka glave do konca pleotelzona je večja od 4 mm), juvenilne pa smo pustili v vzorcu.

Na kraju vzorčenja smo vzeli tudi vzorec vode iz vodotoka in ga shranili v hladilniku za kasnejše analize.

3.3 GOJENJE VRSTE *ASELLUS AQUATICUS*

Osebke smo iz čaše prelili v 5-litrski steklen akvarij. Nov medij je bilo potrebno dodajati postopoma, da se razmere za vodne osličke niso prehitro spremenile. Zato smo akvarij do treh četrtin napolnili z vodo iz vodotoka, zadnjo četrtino pa z vodo iz reke Iške. Dodali smo še namočene liste črne jelše (*Alnus glutinosa*), s katerimi se vodni oslički prehranjujejo, ter nekaj vodnega rastlinja iz vzorca. Listov črne jelše smo dodali toliko, da so popolnoma prekrili dno akvarija, ob pritisku k dnu akvarija pa so segali približno 50 mm visoko. V akvarij smo speljali tudi cevko s kisikom iz vodne črpalke in tako rahlo prezračevali kulturo *A. aquaticus*. Prezračevanje je bilo občasno tudi izključeno, saj vodni oslički preživijo tudi pri nižjih koncentracijah kisika. Če je nastala obrast na stenah akvarija, je nismo odstranjevali. Vodne osličke smo gojili pri svetlobnem režimu 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Temperatura prostora je bila konstantna ($T = 21 \pm 1$ °C).

Preden smo osebke iz akvarija uporabili v nadaljnjih poskusih, smo jih vsaj dva tedna pustili v akvariju za gojenje, da so se adaptirali na razmere v laboratoriju. Prva dva tedna smo s pomočjo oksimetra dnevno spremljali koncentracijo kisika v akvariju. Vrednost je bila približno 8 mg/l, občasno tudi manj. Manjša nihanja očitno niso vplivala na osebke v akvariju, kar je dokaz, da konstantna vrednost koncentracije kisika v mediju ni bistvena za preživetje vodnih osličkov. Po potrebi smo dodajali vodo iz reke Iške ter nove liste črne jelše.

3.4 NABIRANJE IN SHRANJEVANJE LISTOV ČRNE JELŠE

Listi črne jelše so bili nabrani spomladi 2012 v okolici biološkega središča v Ljubljani (Večna pot 111). Nabrani so bili le odpadli listi, ki so bili na robu vodotoka, torej so bili mokri ter zato obraščeni z glivami in bakterijami. Za teste in gojenje je obrast na listih zelo pomembna, zato smo skupaj z listi shranili tudi vodo iz najdišča. Del listov smo posušili na papirnatih brisačah in jih nato shranili v kartonasti škatli, nekaj pa smo jih namočili v vodo iz najdišča, da se je na njih ohranila obrast. Vse posušene liste, ki smo jih imeli namen uporabiti v testih, smo dva tedna pred uporabo namočili v isto vodo, kjer so že bili namočeni listi. Tako smo vzpostavili mikrobo zdužbo tudi na novih listih. Vodo z listi smo hranili v delno pokriti hladilni skrinji na temperaturi 21 ± 1 °C, brez prezračevanja. Po potrebi smo dodajali vodo iz reke Iške. Liste smo občasno premešali, da ni prišlo do anaerobne razgradnje.

3.5 ZAJEM VODE IZ REKE IŠKE

Dne 24. 2. 2012 smo na območju Iškega vintgarja, v bližini planinske koče, zajeli 20 l vode iz reke Iške. Vodo smo shranili v plastičnem sodu, ki smo ga hranili na 4 °C.

Vodo iz reke Iške smo izbrali, ker so jo v laboratoriju na Kemijskem inštitutu (KI) že prej uporabljali kot referenčno vodo pri testih strupenosti z ribami ter tudi pri drugih testih. Lastnosti vode iz reke Iške: pH: 8,4, trdota: 140 mg CaO/l, alkaliteta: 131 mg CaO/l (Tišler in sod. 2004).

3.6 PRIPRAVA MEDIJA M4

Kot medij smo v večini poskusov uporabili medij M4, ki se v laboratoriju KI uporablja za gojenje vodnih bolh ter v kroničnih testih strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna*. Založne raztopine so navedene spodaj. Založne raztopine smo hranili v hladilniku na 4 °C, po potrebi smo pripravili 10 l raztopine M4, ki smo jo hranili na 21 ± 1 °C.

Založne raztopine:

1.1. raztopina CaCl₂

73,52 g/l CaCl₂ · 2H₂O

1.2. raztopina MgSO₄ · 7H₂O

123,3 g/l MgSO₄ · 7H₂O

1.3. raztopina KCl

5,8 g/l KCl

1.4. raztopina NaHCO₃

64,8 g/l NaHCO₃

2.1. raztopina kationov

7210 mg MnCl₂ · 4H₂O

6120 mg LiCl

1420 mg RbCl

3040 mg SrCl₂ · 6H₂O

335 mg CuCl₂ · 2H₂O

260 mg ZnCl₂

200 mg CoCl₂ · 6H₂O

skupaj v 2 l H₂O

2.2. raztopina anionov

548 mg NaNO₃

5719 mg H₃BO₃

32 mg NaBr

126 mg Na₂MoO₄ · 2H₂O

6,5 mg KJ

4,38 mg Na₂SeO₃

1,15 mg NH₄VO₃

skupaj v 1 l H₂O

2.3. silikatne raztopine

21,475 mg/l Na₂SiO₃

2.4. raztopina Fe/EDTA

500 mg Na₂EDTA · 2H₂O

199,1 mg FeSO₄ · 7H₂O

Obe raztopini pripravimo ločeno v 500 ml, ju združimo in takoj avtoklaviramo.

2.5. raztopina sulfata

286 mg KH₂PO₄

368 mg K₂HPO₄

skupaj v 1 l H₂O (bidest.)

2.6. raztopina vitaminov

750 mg tiamin hidroklorida

10 mg cianobalamina (B₁₂)

7,5 mg biotina

skupaj v 1 l H₂O (globoko zamrznemo razdeljeno po 1 ml)

Priprava 10 l medija M4:

- 40 ml raztopine 1.1. (CaCl_2)
- 10 ml raztopine 1.2. (MgSO_4)
- 10 ml raztopine 1.3. (KCl)
- 10 ml raztopine 1.4. (NaHCO_3)
- 1 ml raztopine 2.1. (raztopina kationov)
- 5 ml raztopine 2.2. (raztopina anionov)
- 2 ml raztopine 2.3. (silicate solution)
- 50 ml raztopine 2.4. (raztopina Fe/EDTA)
- 5 ml raztopine 2.5. (raztopina fosfata)
- 1 ml raztopine 2.6. (raztopina vitaminov/globoko zamrznjena) – vedno dodamo direktno pred uporabo
- 9866 ml destilirane H_2O

3.7 PRIPRAVA OSEBKOV ZA TESTE

Osebke smo dali pod lupo in jih posneli z digitalno kamero Nikon DS-Fi1S, nato smo s pomočjo programa NIS-Elements Documentation 2.2 imaging software izmerili njihovo dolžino. Na fotografiji smo lahko natančno določili dolžino osebka, ki je bila merjena od začetnega dela glave do konca pleotelzona. Pri merjenju nismo upoštevali anten in uropodov. Izbirali smo osebke, večje od 4 mm, saj naj bi bili vodni oslički pri tej velikosti že odrasli. Glede tega, kdaj so organizmi odrasli, v literaturi ni enotnega podatka. Avtorji vzamejo zelo različne dolžine, večinoma pa 4–5 mm (De Lange in sod., 2005; Peeters in sod., 2000; Peeters in sod., 2002; Weltje in Oehlmann, 2006). Tudi mi smo zaradi primerljivosti poskusov izbirali približno enako velike osebke (4–7 mm).

Testnim osebkom smo pred uporabo v testih določili spol. Samca in samico ločimo po pleopodih. Samica ima samo drugi par pleopodov, medtem ko imajo samci prvi in drugi par pleopodov, pri čemer prvi delno prekriva drugega. Samci imajo četrti par nog ukrivljen, da z njimi lahko zgrabijo samico med kopulacijo. Samice imajo vse noge enake. Spola lahko ločimo tudi glede na obliko telesa, vendar ta metoda ni statistično dokazana. Samice naj bi bile nekoliko širše v zgornjem delu telesa, medtem ko so samci enako široki po vsej dolžini telesa. Informacije o določanju spola sem dobila pri asist. dr. Simoni Prevorčnik (Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Univerza v Ljubljani). Pri juvenilnih osebkih težje ločimo samca in samico, zato tu spola nismo določali. Weltje in sod. (2006) v takem primeru predlagajo, da povečamo število izpostavljenih juvenilnih osebkov in zberemo podatke o spolu šele po koncu testa, saj so takrat osebki starejši in spol lažje določimo.

3.8 PRIPRAVA DISKOV LISTOV ČRNE JELŠE ZA TESTE

Liste črne jelše smo nežno obrisali s papirnato brisačko. S pomočjo plutovrta s premerom 15 mm smo izrezali potrebno število diskov listov črne jelše za teste. Tako smo dobili diske enake oblike in enake površine, da so bili testi čim bolj primerljivi med seboj. Pazili smo, da na diskih ni bilo debelejših listnih žil, saj jih vodni oslički ne pojedjo.

3.9 POTEK DELA

Delo smo razdelili v 3 glavne delovne sklope. To so: optimizacija testa strupenosti, akutni testi z BPA in kronični testi z BPA. Potek dela je prikazan v Prilogi B.

3.10 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI

3.10.1 Vzpostavitev testa strupenosti

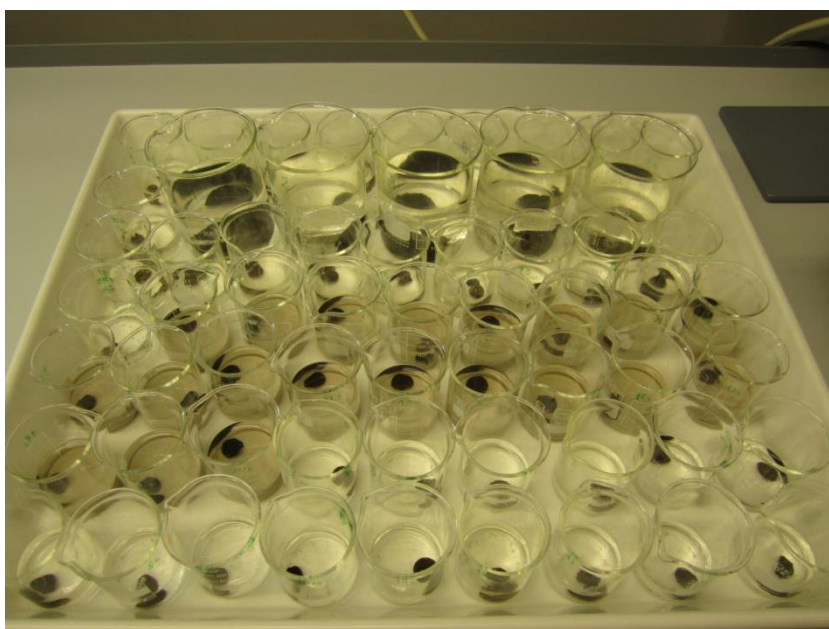
Pri optimizaciji testa strupenosti smo ugotavljali, kako različni dejavniki brez prisotnosti kemikalije vplivajo na kontrolo. Preizkusili smo, kako se testni osebki odzivajo na različne medije, na dodan sediment ter kakšen vpliv ima na njih različna frekvenca hranjenja. Naš cilj je bil najti najustreznejši testni sistem, kjer bi bilo preživetje kontrolnih osebkov največje.

Teste z individualnimi osebki smo izvajali v 50-mililitrskih testnih čašah, v katere smo dali 30 ml medija ter v vsako po en osebek vodnega oslička. Če smo spremljali tudi prehranjevanje, smo dodali še disk lista črne jelše (Slika 7). Svetlobne in temperaturne razmere so bile enake kot pri gojenju *A. aquaticus* (16 ur svetlobe in 8 ur teme, $T = 21 \pm 1$ °C). Testnih čaš nismo prezračevali. Za opazovanje odziva testnih živali na posamezne razmere smo po navadi vzeli 10 osebkov na paralelko, ki smo jo ponovili dvakrat ali trikrat (Slika 8). Čaše so bile delno pokrite s PVC-prevleko, da medij ni izhlapeval, še vedno pa je bil omogočen dostop zraka. Leve osebke smo sproti odstranjevali enako, kot so to v svojih testih strupenosti naredili Weltje in sod. (2006), saj se oslički z njimi prehranjujejo. Medij v poskusih smo menjali dvakrat tedensko. Menjava medija dvakrat tedensko je bila potrebna zaradi kasnejših testov strupenosti, kjer je tako pogosta menjava nujna zaradi preprečevanja spreminjanja koncentracije dodane testne kemikalije, ki lahko med testom razpade.



Slika 7: Testni osebek v testni čaši z dodanim diskom lista črne jelše

Dnevno smo spremljali dogajanje v čašah, in sicer smrtnost, prehranjevanje in levitev ter izleganje mladih osebkov, če je samica nosila jajčeca. Beležili smo tudi ostale posebnosti v poskusu, ki bi morda lahko pomagale pri interpretaciji rezultatov, kot sta količina iztrebkov in zmanjšana gibljivost testnih živali.



Slika 8: Vzpostavitev testnega sistema

Parametri, ki smo jih spremljali v testih:

- **Smrtnost:** Smrtnost smo določili kot odstotek mrtvih osebkov v določenem času. Smrt osebkov smo prepoznali po odsotnosti gibanja. Osebek, pri katerem nismo zaznali nobenih premikov okončin, smo nekajkrat dregnili s pipeto. Če ni bilo nobenega odziva, smo ga šteli za mrtvega. Če je od smrti preteklo več ur, se je osebek zvil, zaslužil in rahlo spremenil barvo. V takem stanju mrtvih živali ni bilo težko prepoznati. Pogosto se je ob smrti osebkov pojavila tudi sluz na vrhu medija.
- **Prehranjevanje:** Prehranjevanje smo določili kot požrto suho maso v miligramih na miligram suhe mase testnega osebkov na dan. Požrto suho maso diskov smo dobili tako, da smo določili suho maso diskov pred in po prehranjevanju. Suho maso živali smo določili s pomočjo korelacije med dolžino živali in maso živali (glej poglavje 3.14).

Diske smo pred uporabo v poskusu in po njej rahlo obrisali s papirnato brisačko, jih za 24 ur sušili na zraku na sobni temperaturi ter jih po sušenju stehali. Tako smo dobili podatek o količini organskega materiala, ki so ga vodni oslički skonzumirali v času poskusa.

Tak način sušenja diskov se nam je zdel najprimernejši, saj se je na diskih ohranila mikrobna združba, kar je pomembno predvsem pred uporabo diskov, hkrati pa je bila napaka precej manjša, kot če bi tehtali mokre diske. V primeru, da bi liste sušili v sušilniku, bi sicer dobili natančnejše podatke, a bi uničili mikrobno združbo, kar bi vplivalo na prehranjevanje testnih osebkov.

Naredili smo tudi kontrolo, kjer smo diske listov črne jelše pustili v mediju brez dodanega vodnega oslička. Na ta način smo preverili, ali tudi brez dodanih testnih živali pride do mikrobne razgradnje lista. Ugotovili smo, da se suha masa diskov pred in po vzpostavitvi v mediju ne razlikuje, torej do razgradnje, vsaj v času med menjavami diskov, ne pride.

- **Levitev:** Leve je bilo dokaj enostavno ločiti od medija in živali. Bili so prozorno bele barve, po navadi v dveh delih. Pogosto se je zgodilo, da je osebek najprej odvrzel le polovico leva, drugo polovico pa šele naslednji dan. Na to smo morali biti pozorni in upoštevati le eno levitev.
- **Iztrebljanje:** Občasno (predvsem na začetku eksperimentalnega dela diplome) smo spremljali tudi iztrebke, katerih količina (določena samo s prostim očesom) se je ujemala s stopnjo prehranjevanja. Iztrebke prepoznamo kot majhne (milimeter ali manj dolge) valjaste skupke rjave barve. Spremljanje iztrebkov smo opazovali le

kot hiter kazalnik tega, ali poskus napreduje in se živali hranijo. Če so bili namreč listi premalo časa namočeni in izpostavljeni mikrobnim združbi, jih živali niso želele zaužiti.

3.10.2 Vpliv tipa medija na testne živali

V večini pregledanih člankov so za gojenje vodnih osličkov uporabili le medij brez sedimenta (npr.: Bjelke, 2005; Blockwell, 1998; Bloor in sod., 2005; Bloor in sod., 2006; Prus, 1976), zato smo najprej preverili, kako se testni osebki odzivajo na različne vodne medije. Primerjali smo vodo iz reke Iške ter sintetični medij M4. Pripravili smo 20 čaš. V prvih deset smo nalili v vsako po 30 ml medija M4, v drugih deset pa po 30 ml vode iz reke Iške. Pred testom smo vodo temperirali na sobno temperaturo. Nenadna sprememba temperature ob prenosu iz akvarija bi namreč lahko povzročila šok pri testnih organizmih, posledica šoka pa je lahko spremenjen odziv na testne razmere. Diske smo menjali enkrat na teden. Poskus je trajal tri tedne.

3.10.3 Vpliv frekvence menjave hrane na testne živali

Pri vseh nadaljnjih poskusih smo uporabljali medij M4, ki se je izkazal za primernejšega (preživetje kontrol je bilo večje). Postopek priprave poskusa je bil enak, le da smo pri polovici testnih živali diske menjali enkrat na teden, pri polovici živali pa dvakrat na teden. Na ta način smo ugotavljali, kateri način hranjenja testnim osebkom bolj ustreza. Poskus je trajal tri tedne.

3.10.4 Vpliv števila osebkov v testni posodi na preživetje testnih živali

V 5 večjih čaš smo nalili 300 ml medija M4 in v vsako dodali 10 vodnih osličkov ter večji disk s premerom 5 cm, ki smo ga prav tako izrezali s plutovrtom. Enak volumen medija in premer diskov so uporabili Weltje in sod. (2006) v skupinskih testih strupenosti z 10 osebki *A. aquaticus*, kjer se je ta način izkazal za ustreznega. Ugotavljali smo, kako večje število osebkov v istem poskusu vpliva na preživetje testnih živali. Diske v tem poskusu in vseh naslednjih smo menjali enkrat na teden, saj se je ta način hranjenja izkazal za ustreznjšega (večje preživetje kontrol). Poskus je trajal tri tedne.

3.10.5 Vpliv sedimenta na testne živali

Ponovili smo poskus z medijem M4 in z menjavo diskov enkrat tedensko, le da smo tokrat v čaše dodali sediment. Preverjali smo, kako sediment vpliva na testne osebke. Dvakrat tedensko smo skupaj z medijem zamenjali tudi sediment. Poskus je trajal tri tedne. Pri testih s sedimentom nismo mogli spremljati levitev, saj levi niso bili vidni. Predvidevamo, da zaradi tega, ker jih je prekril pesek. Tudi če bi bili levi na površini, bi jih težko ločili od

peska. Odločili smo se za uporabo umetno pripravljene sedimenta, tako v kontrolnih testih kot v testih strupenosti (glej poglavje 3.11.2).

3.11 TESTI STRUPENOSTI

3.11.1 Priprava raztopine BPA

Pripravili smo 500 ml izhodne raztopine BPA s koncentracijo 100 mg/l v mediju M4. V 500-mililitrsko bučko smo dodali 50 mg BPA ter nalili medij M4 do oznake. Raztapljanje BPA je dolgotrajen postopek. Izmenjujeta se mešanje na magnetnem mešalniku na temperaturi 30 °C in mešanje v ultrazvočni kopeli v zaporedju: 60 min. magnetno mešalo, 15 min. ultrazvočna kopel, 90 min. magnetno mešalo, 15 min. ultrazvočna kopel, 90 min. magnetno mešalo, 15 min. ultrazvočna kopel, 90 min. magnetno mešalo. Raztopino BPA smo po navadi pripravili nekaj dni pred uporabo in jo nato shranili v hladilniku. Iz izhodne raztopine BPA s koncentracijo 100 mg/l smo z redčenjem z medijem M4 pripravili nižje koncentracije (2,5 mg/l–30 mg/l, odvisno od poskusa).

3.11.2 Priprava sedimenta

Sediment smo prvič pripravili po navodilih (OECD 218, 2004; Marinković in Kraak, 2010), kjer je opisan postopek priprave sedimenta za teste z vrsto *Chironomus riparius*. V članku so uporabili pesek, kaolin ter delno razgrajen organski material, in sicer v razmerju: 75–76 % suhe mase kvarčnega peska (velikost delcev je bila v več kot 50 % med 50 in 200 µm), 20 % suhe mase kaolina ter 4–5 % suhe mase šote ali α-celuloze v prahu.

Sami smo uporabili le pesek in kaolin, saj smo v testne čaše že dodali diske listov črne jelše, torej ni potrebe po dodatnem organskem materialu. Izkazalo se je, da ta način priprave sedimenta za vodne osličke ni primeren. V članku so testne posode prezračevali, v našem primeru pa to ni bilo izvedljivo. Pesek in kaolin se v mediju zato nista mešala, nastali sta dve fazi – spodaj pesek in zgoraj kaolin (Slika 9). Ko smo čez noč pustili osebek v testni čaši, se je ta potopil v kaolin in poginil.



Slika 9: Testna posoda s sedimentom brez kaolina (levo) in s kaolinom (desno)

Odločili smo se, da bomo sedimente pripravljali brez kaolina, torej samo s peskom. Kot pesek smo uporabili otroško mivko iz Termita. Zanj smo se odločili, ker je neoporečna, ne vsebuje organskih snovi, enaka velikost delcev (0–1 mm) pa je že bila uporabljena pri podobnih poskusih (Peeters in sod., 2000).

Lastnosti mivke:

Povzeto po Termit d.d. (2010):

- srednja velikost zrn: 0,20 mm
- granulacija: 0–1 mm
- nasipna teža: cca. 1,5 t/m³
- gostota pri 20 °C: 2,4 g/cm³
- topnost v vodi: netopno
- pH-vrednost pri 100 g/l H₂O in 20 °C: cca 7

Toksikološki in ekotoksikološki podatki:

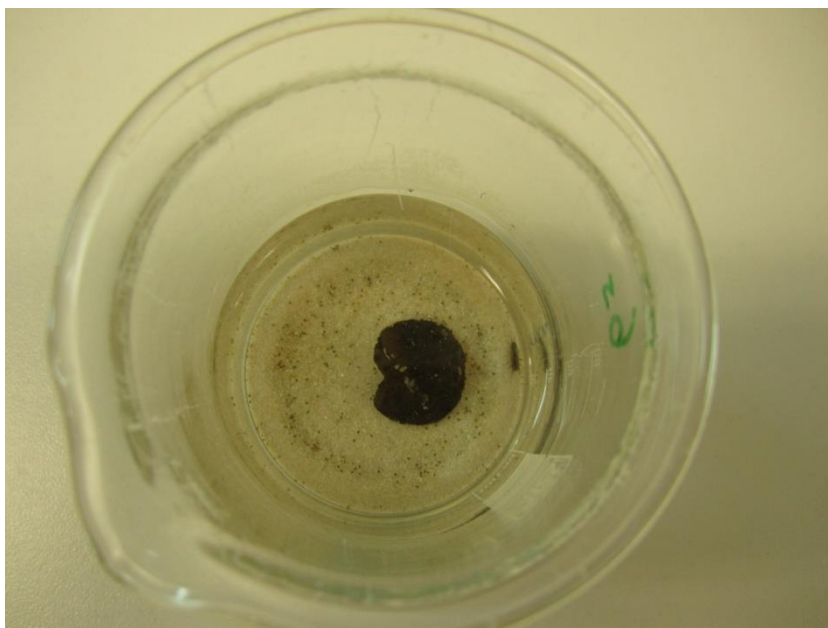
Povzeto po tehničnem varnostnem listu, Termit d.d. (2009):

- zaužitje: LD₅₀, podgane oralno: 5000 mg/kg
- stik s kožo ali očmi: ni dražilno
- ne povzroča preobčutljivosti
- ni biološko razgradljivo
- snov ni strupena za vodne organizme

Razmerje med sedimentom in medijem naj bi bilo približno 1 : 4 (OECD 218, 2004; Eimers in sod., 2002). V štiri plastenke smo tako natehtali po 225 mg peska ter 900 ml

raztopine BPA. Vse štiri plastenke z različnimi koncentracijami kemikalije smo nato vstavili na vrtilno kolo, namenjeno pripravi sedimenta, ter jih tam pustili 8 ur, kolikor je potrebno za vzpostavitev ravnovesja med adsorbcijo in desorbcijo BPA (Zeng in sod., 2006). Po končanem mešanju smo plastenke čez noč pustili v laboratoriju na sobni temperaturi, da se je sediment posedel na dno in medij ni bil več moten. Ker na mešalniku lahko naenkrat pripravljamo le štiri različne koncentracije BPA, smo kontrolo, torej sediment z medijem brez kemikalije, premešali kar ročno. V ločenem poskusu smo enkrat pripravili tudi kontrolo s sedimentom na vrtilnem kolesu in preživetje je bilo enako kot pri kontroli, ki ni bila pripravljena na vrtilnem kolesu.

Naslednji dan, ko se je sediment popolnoma posedel na dno, smo s pipeto previdno odpipetirali raztopino iz plastenke v litrsko čašo ter pri tem pazili, da v pipeto ni zašel še sediment. S sedimentom smo napolnili testne čaše, tako da smo dobili želeno razmerje med peskom in medijem (1 : 4). Tako kot pri testih brez sedimenta smo za vsako koncentracijo pripravili 10 čaš. V čaše smo nato odpipetirali še potrebno količino ustrezne raztopine, ki smo jo prej ločili od sedimenta. Pipetirali smo previdno, ob robu čaše, da ni prišlo do dvigovanja sedimenta (Slika 10).



Slika 10: Testni osebki v testni čaši z dodanim diskom lista črne jelše in s sedimentom

Po enakem postopku smo pripravili tudi mikrotitrne plošče za teste z juvenilnimi osebki. V vsako odprtino smo natehtali 0,5 g sedimenta ter dodali 2 ml medija.

3.11.3 Preverjanje stabilnosti BPA v mediju in njegove koncentracije v sedimentu

Zanimalo nas je, ali je BPA stabilen v mediju M4 ter koliko se njegova koncentracija spremeni v času izpostavitve (96 ur) pri testnih razmerah (16 ur svetlobe in 8 ur teme, $T =$

21±1 °C). Vzorčili smo raztopine pred izpostavitvijo in po izteku poskusa (96 ur). Koncentracijo BPA smo pomerili z aparatom (Spectra system™, Thermo Scientific) HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) (Jemec in sod., 2012). Ugotovili smo, da se koncentracija BPA v mediju med izpostavitvijo ne spreminja.

Zanimalo nas je, kakšen delež BPA se veže na sediment. Pomerili smo koncentracijo BPA v vodni fazi pripravljenega sedimenta po mešanju na vrtilnem kolesu in v samem mediju M4, ki smo ga dodali pesku pred mešanjem na vrtilnem kolesu.

3.11.4 Akutni testi strupenosti (96 ur)

V poskusne čaše smo dodali le medij z določeno koncentracijo BPA in glede na tip poskusa tudi sediment, medtem ko diskov črne jelše nismo dodajali. Medija zaradi kratkega časa izpostavitve med poskusom nismo menjali, saj se je izkazalo, da BPA v tem času ostane stabilen (koncentracija se ne spreminja).

Za vsako koncentracijo BPA smo pripravili deset 50-mililitrskih čaš z 20 ml medija z vsako od koncentracij kemikalije. V vsako čašo smo dali po en osebek. Vsak poskus smo izvedli v dveh ali treh paralelkah. Paralelke enakih tipov poskusa smo za prikaz združili. To lahko storimo, ker so kontrolne skupine pri istem tipu poskusa enake, smrtnost ne preseže 10 %.

Test smo izvedli pri različnih koncentracijah BPA. Najprej smo izvedli preliminarni test, pri katerem smo uporabili le pet osebkov na koncentracijo. Tako smo ugotovili, kateri razpon koncentracij BPA moramo uporabiti v nadaljnjih testih. Koncentracije BPA v naših strupenostnih testih so precej višje, kot jih najdemo v naravi. Za izbrane koncentracije smo se odločili predvsem za preverjanje delovanja testa strupenosti.

Pri akutnih testih smo spremljali stopnjo smrtnosti in levitve. Pri akutnih testih, kjer smo dodali sediment, levitev nismo spremljali.

3.11.4.1 Juvenilni osebki

Akutne teste smo izvedli tudi z juvenilnimi osebki. Juvenilni osebki, ki smo jih uporabili v testih, so bili rojeni v akvariju. Izbirali smo osebkke, velikosti 2 mm ali manj, pri določanju velikosti pa smo si pomagali s stekelcem z vrisano milimetrsko mrežo. Poskusi so potekali v 24-mestnih mikrotitrskih ploščah, kjer smo v vsako odprtino dali po en osebek, 2 ml medija in glede na tip poskusa tudi sediment (Slika 11). Mikrotitrsko ploščo z 2 ml medija so v testih strupenosti z juvenilnimi *A. aquaticus* uporabljali tudi Weltje in sod. (2006). Enako kot pri testih z odraslimi osebki smo uporabili po 10 osebkov za vsako koncentracijo BPA. Mikrotitrsko ploščo smo delno pokrili s pokrovom. Leve juvenilnih osebkov smo sprti odstranjeval iz odprtin. Vsako odprtino smo dnevno pregledali pod lupo in tako spremljali smrtnost.



Slika 11: Juvenilni testni osebki v mikrotitrski plošči

3.12 RAČUNANJE LC-VREDNOSTI

LC-vrednost (angl.: *lethal concentration*) je koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči smrt določenega odstotka testnih organizmov (npr. 48 h LC₅₀ je koncentracija, ki povzroči smrt 50 % organizmov v 48 urah). LC-vrednosti smo računali s pomočjo programa Epa Probit Analysis (Version 1.5).

3.13 KRONIČNI TESTI

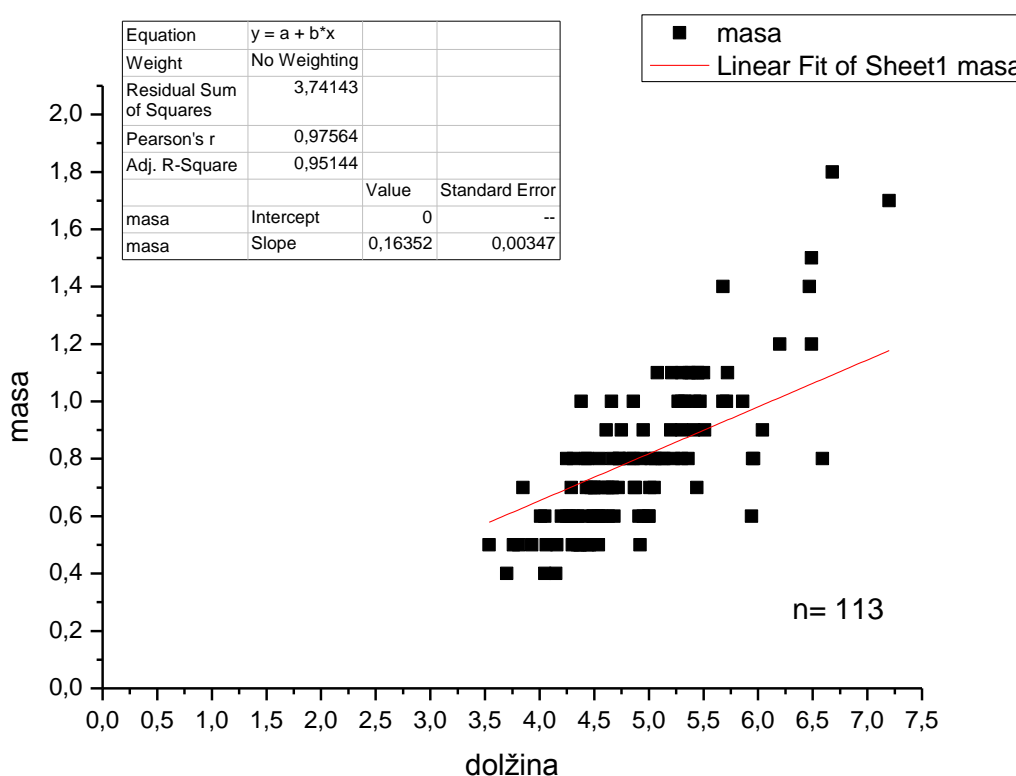
Kronični testi strupenosti so trajali dva ali tri tedne. Postopek je bil enak kot pri akutnih testih, le da smo v testne čaše dodali še diske listov črne jelše. Hrano smo menjali enkrat, medij pa dvakrat na teden. Spremljali smo smrtnost in stopnjo prehranjevanja glede na koncentracijo BPA. Kroničnih testov s sedimentom nismo izvajali.

3.14 KORELACIJA MASA – DOLŽINA TESTNIH ŽIVALI

V literaturi (npr. Bundschuh in sod., 2011) smo zasledili, da avtorji stopnjo prehranjevanja podajajo v mg skonzumirane suhe mase na mg suhe mase živali na dan. Ker smo v prvih testih merili le dolžino živali, nas je zanimala korelacija med dolžino in suho maso, s pomočjo česar smo lahko določili suho maso živali.

Iz končanih akutnih testov smo vzeli 113 preživelih osebkov z znano telesno dolžino, jih dali v označene epice in jih nato v sušilniku sušili 24 ur na 105 °C. Po sušenju smo epice z osebki preložili v eksikator in tako preprečili vezavo vlage na osebek. Počakali smo, da se osebki ohladijo in jih nato hitro stehali.

Določili smo linearno korelacijo med maso osebkov in dolžino osebkov (Slika 12). Dobili smo faktor 0,16352, s katerim smo pomnožili izmerjene mase osebkov (masa osebkov = 0.1635 X dolžina osebkov). Tako smo dobili predvidene suhe mase organizmov posamezne dolžine.



Slika 12: Linearna korelacija med maso in dolžino 113 testnih osebkov

4 REZULTATI

4.1 VZORČENJE

V prvem vzorcu, nabranem zgodaj spomladi (24. 2. 2012), smo našli več kot 100 odraslih osebkov. Od takrat smo vzorčili še dvakrat v razmiku približno enega meseca in enkrat na začetku junija. Opazili smo trend zmanjševanja števila osebkov *Asellus aquaticus* na posamezen vzorec, medtem ko se je dolžina telesa osebkov z vsakim vzorčenjem povečevala.

Poleg vrste *A. aquaticus* smo v vzorcu našli tudi precej drugih taksonov. Najštevilčnejši so bili predstavniki skupin vrtničarjev (cl. Turbellaria), postranic (g. *Gammarus*), mladoletnic (o. Trichoptera), polžev (cl. Gastropoda), pijavk (scl. Hirudinea), ceponožnih rakov (scl. Copepoda), vodnih pršic (cl. Arachnida), hroščev (o. Coleoptera). Spremljali smo tudi frekvenco pojavljanja postranic (*Gammarus fossarum*). Za razliko od vodnih osličkov je bilo z vsakim vzorčenjem v vzorcu več postranic, osebki pa so bili prav tako vedno večji. V vodotoku se je s časom od pomladi do poletja močno povečevala količina vodnega rastlinja.

4.2 KEMIJSKE ANALIZE VODE IZ NAHAJALIŠČA

Vsebnosti ionov in ekološke vrednosti vode iz vodotoka, kjer smo nabrali testne osebke, so prikazane v Preglednici 1 in Preglednici 2.

Preglednica 1: Vsebnosti ionov v vodi iz nahajališča

14. 3. 2012	ion	vsebnost v vzorcu (mg/l)
anioni	fluorid	0,835
	klorid	2,53
	nitrit	< 0,5
	bromid	< 0,5
	nitrat	2,79
	sulfat	5,30
	fosfat	< 0,5
kationi	natrij	1,68
	amonij	< 0,5
	kalij	3,09
	magnezij	55,2
	kalcij	23,8

Preglednica 2: Vrednosti ekoloških parametrov v vodi iz nahajališča

ekološki parametri	vrednost v vzorcu (mg/l)
TOC (celokupni organski ogljik)	4,630
KPK (kemijska potreba po kisiku)	13,1
BPK5 (biokemijska potreba po kisiku po preteku nazivne dobe 5 dni)	5

4.3 GOJENJE VRSTE *ASELLUS AQUATICUS*

Testne osebkke smo gojili v prezračevanem steklenem akvariju, z dodanimi listi črne jelše, kot priporočajo mnogi raziskovalci (Bjelke, 2005; Bloor in sod., 2005; Bloor in sod., 2006; Prus, 1976). Nekajkrat smo v akvarij dodali tudi liste topola in hrasta, pripravljene po enakem postopku, kot so bili listi jelše. Osebkke v akvariju se z njimi niso prehranjevali, medtem ko smo liste črne jelše zaradi hitre porabe morali dodajati zelo pogosto (3–4 srednje veliki listi na dva tedna). Vodni oslički so se prehranjevali tudi z levi in mrtvimi osebkke, saj teh ob pregledu akvarija nismo opazili. Med testi strupenosti smo ugotovili, da se vodni oslički levijo zelo pogosto (tudi do enkrat na teden), torej bi v primeru, da se osebkke z levi ne bi prehranjevali, teh moralo biti v akvariju precej. Koncentracija kisika je med gojenjem rahlo variirala, brez vidnih vplivov na populacijo vodnih osličkov. Osebkke v akvariju so se med seboj parili, prišlo je tudi do izleganja mladih vodnih osličkov, ki jih sicer nismo pobirali iz vzorcev. Temperatura v laboratoriju, kjer se je nahajal akvarij z *A. aquaticus*, je bila ves čas konstantna.

4.4 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI

4.4.1 Smrtnost kontrole

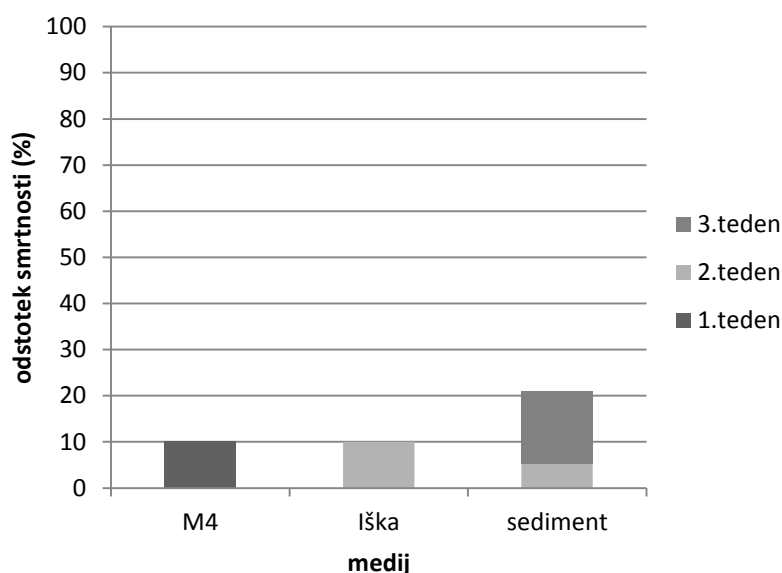
Smrtnost kontrole, torej testnih osebkkov v testnih čašah brez dodane kemikalije, smo ugotavljali s spremljanjem števila mrtvih osebkkov v testnih čašah. Mrtve osebkke najlažje prepoznamo po odsotnosti gibanja (Lukančič in sod., 2010). Primerjali smo smrtnost testnih osebkkov v različnih tipih medija, ob dodanem sedimentu in v skupinskih testih.

4.4.1.1 Vpliv tipa medija in sedimenta

Pri polovici testnih osebkov smo uporabili sintetični medij M4, pri drugi polovici pa vodo iz reke Iške. Nismo opazili bistvene razlike v smrtnosti. V obeh primerih je poginilo največ 10 % osebkov. V mediju M4 je do smrti prišlo prvi teden, v vodi iz reke Iške pa drugi teden. 10% smrtnost je v skladu z zahtevami, ki jih mednarodni standardi priporočajo kot maksimalno dovoljeno smrtnost v kontroli (ISO 6341, 1996; ISO 10706, 2000).

V drugem delu poskusa smo mediju M4 dodali še umetno pripravljene sediment. Smrtnost je bila v prvih dveh tednih pod desetimi odstotki, v tretjem tednu pa se je povečala na 20 %.

Vpliv različnih tipov medija in sedimenta na smrtnost vodnih osličkov je prikazan na Sliki 13.

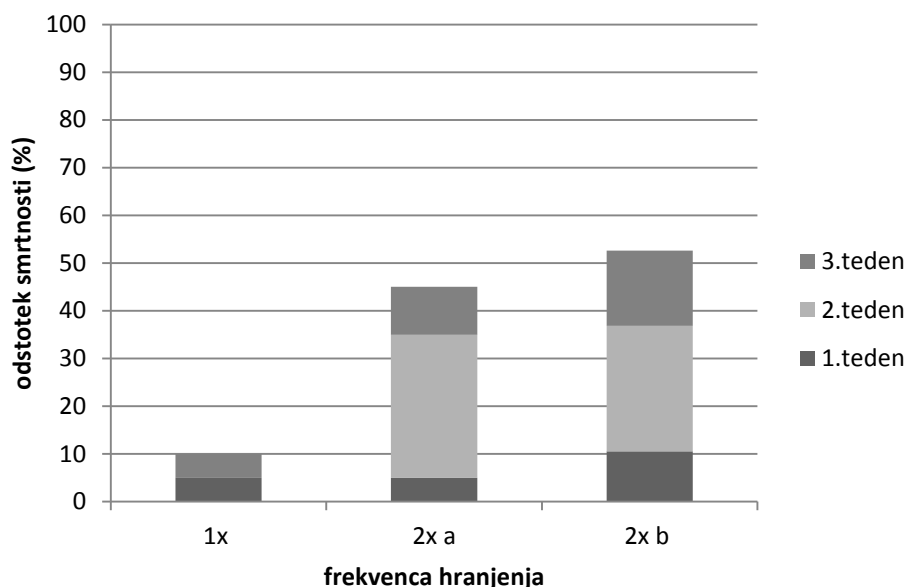


Slika 13: Odstotek smrtnosti testnih organizmov glede na življenjski prostor. Primerjamo vpliv umetno pripravljene medija M4, vodo iz reke Iške in vpliv umetno pripravljene sedimenta. Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve

4.4.1.2 Vpliv frekvence menjave hrane

V tretjem delu poskusa smo preverili, kako se testni osebki odzivajo na različne frekvence menjave hrane. Polovici testnih osebkov smo hrano menjali enkrat tedensko, enako kot v prejšnjih testih, medtem ko smo drugi polovici hrano menjali dvakrat tedensko. Kot medij smo uporabili medij M4, sedimenta nismo dodajali. Prišlo je do močno povečane smrtnosti pri osebkih s pogostejšo menjavo hrane. Test s pogostejšo menjavo hrane smo ponovili in dobili podobne rezultate. Odstotek smrtnosti pri osebkih z menjavo hrane enkrat na teden

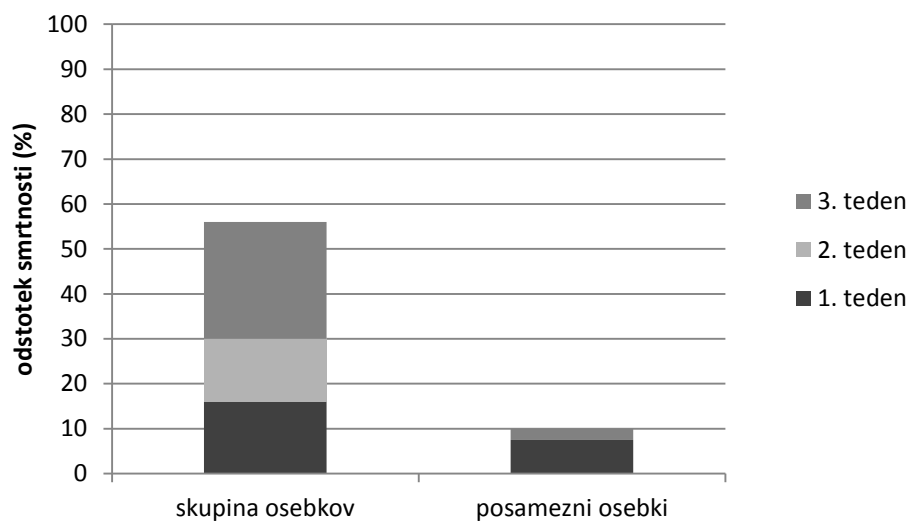
je do 10 %, pri osebkih z menjavo hrane dvakrat tedensko pa 35 % po dveh tednih in približno 50 % po treh tednih (Slika 14).



Slika 14: Odstotek smrtnosti testnih organizmov glede na frekvenco menjave hrane. Primerjamo vpliv menjave hrane enkrat tedensko (1 X) in menjavo hrane dvakrat tedensko, kar smo izvedli v dveh ponovitvah (2 X a, 2 X b). Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve

4.4.1.3 Vpliv števila osebkov v testni posodi

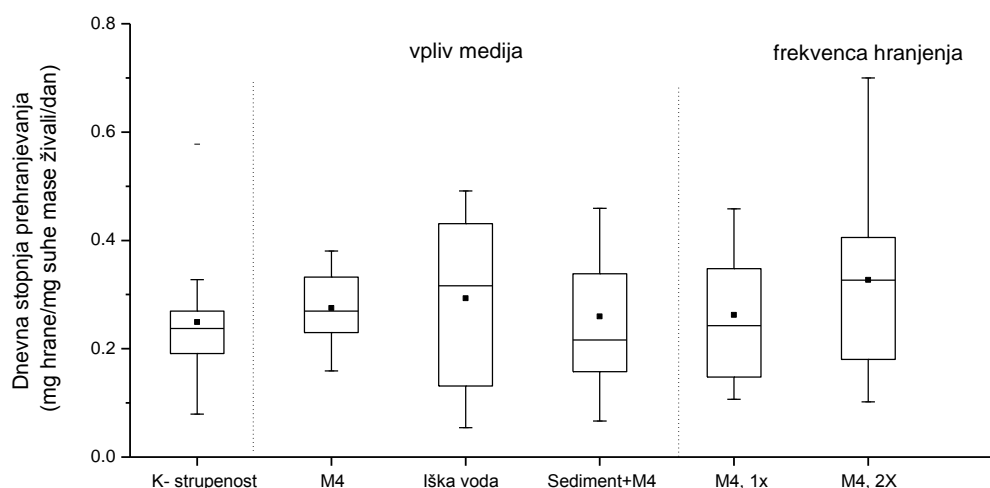
Opazovali smo, kako vpliva večje število osebkov v testni posodi na njihovo preživetje. Poskus smo izvedli v večjih testnih posodah, v katere smo dali 10 osebkov ter disk jelše z večjim premerom kot v individualnih testih. Tudi volumen medija je bil ustrezno večji kot v poskusih, kjer so bili osebki izpostavljeni posamično. Kot medij smo v poskusu uporabili medij M4, in sicer brez dodanega sedimenta, hrano pa smo menjali enkrat tedensko. Po dveh tednih je bila smrtnost v poskusu 30%, po treh tednih pa več kot 50% (Slika 15). Opazili smo, da se osebki v testnih čašah prehranjujejo z levi drug drugega in da pojedjo tudi mrtve osebke. Pogosto se je namreč zgodilo, da se je število osebkov v testnih čašah zmanjšalo, nikjer pa nismo opazili poginulih osebkov. Našli pa smo ostanke okončin in opazili, da je voda postala motna, na vrhu medija pa se je pojavila sluz – oboje smo opazili, ko je poginil kakšen osebek v individualnih testih.



Slika 15: Odstotek smrtnosti organizmov glede na število osebkov na testno posodo. Primerjamo vpliv skupine in individualnih osebkov v testni posodi. Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1., 2. in 3. tednu izpostavitve

4.4.2 Prehranjevanje kontrole

Spremljali smo tudi stopnjo prehranjevanja, ki smo jo podali v mg skonzumirane suhe mase lista na mg suhe mase živali na dan. Upoštevali smo le prva dva tedna izpostavitve. Izkazalo se je, da tip življenjskega prostora in frekvenca hranjenja ne vplivata na stopnjo prehranjevanja. Rezultate smo primerjali tudi s stopnjo prehranjevanja kontrolne skupine iz kroničnih testov strupenosti, kjer ponovno ni bistvenih razlik (Slika 16). V poskusu z večjim številom osebkov v testni čaši prehranjevanja nismo spremljali, saj so osebki zelo hitro poginili, prehranjevali pa so se tudi z levi in s poginulimi osebki.



Slika 16: Stopnja prehranjevanja testnih živali v kontroli po dveh tednih izpostavitve. Primerjamo prehranjevanje kontrolne skupine v kroničnih testih strupenosti (K – strupenost) ter prehranjevanje v optimizacijskih testih, in sicer glede na tip življenjskega prostora (medij M4, medij voda iz reke Iške in dodan sediment) ter glede na frekvenco menjave hrane (M4, 1 X: enkrat tedensko; M4, 2 X: dvakrat tedensko). Rezultati so podani v obliki »box-plotov«, kjer simboli pomenijo: minimalna in maksimalna vrednost: ⊥, in srednja vrednost: ■

Primerjali smo tudi stopnjo prehranjevanja po tednih v kontrolnih skupinah vseh poskusov (Priloga C). Opazili smo, da se pri živalih, ki so v laboratoriju več kot 2 meseca, prehranjevanje med tritedenskim poskusom poveča (poveča se v tretjem tednu). Pri živalih, ki so bile v laboratoriju le en mesec, tega pojave nismo opazili.

4.5 TESTI STRUPENOSTI

4.5.1 Stabilnost bisfenola A v mediju M4

Preverili smo stabilnost BPA v mediju M4. S HPLC-aparatom smo izmerili koncentracijo BPA v mediju pred izpostavitvijo v poskusu in po njej. Po 4 dneh izpostavljenosti enakim razmeram, kot so bili v testih strupenosti, se koncentracija BPA v M4 ni spremenila za več kot 5 %. Zato vse rezultate testov strupenosti podajamo kot nominalne koncentracije (0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 in 30 mg/l).

4.5.2 Koncentracija bisfenola A v sedimentu

S HPLC-aparatom smo izmerili koncentracijo bisfenola A v mediju M4 pred dodatkom k sedimentu in po pripravi sedimenta. Na ta način smo želeli ugotoviti, koliko bisfenola A se veže na sediment in koliko ga ostane v mediju M4. V povprečju se koncentracija kemikalije spremeni za 5,11 %, povprečna vezava na sediment pa je 0,0023 mg BPA/g suhe mase sedimenta (Preglednica 3). Zato smo pri rezultatih testov strupenosti s sedimenti vse koncentracije BPA podali kot koncentracije BPA v mediju M4.

Preglednica 3: Vezava bisfenola A na sediment

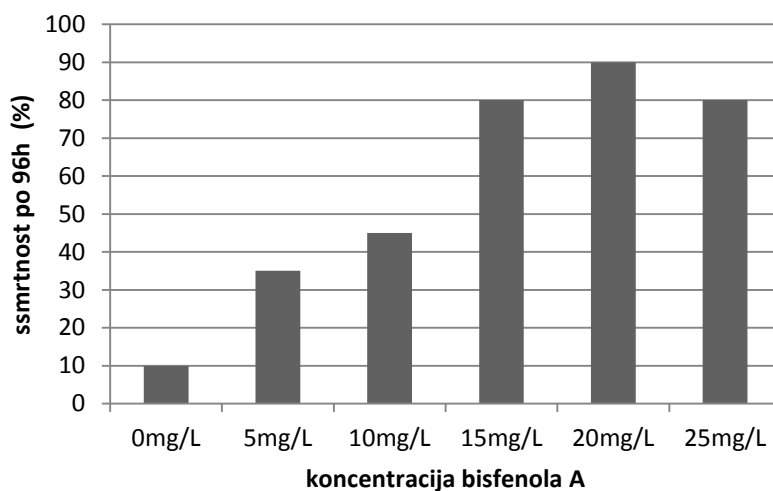
nominalna koncentracija BPA v M4 (mg/l)	izmerjena koncentracija BPA v M4 (mg/l)		delež vezanega BPA na sediment (%)	konc. vezanega BPA (mg BPA/g suhe mase sedimenta)
	pred stabilizacijo	po stabilizaciji		
2,5	2,6838	2,6383	1,69	0,0002
5	5,4690	5,0903	6,92	0,0017
10	11,0580	10,3350	6,54	0,0033
15	16,1570	15,3007	5,30	0,0039

4.5.3 Akutni testi strupenosti

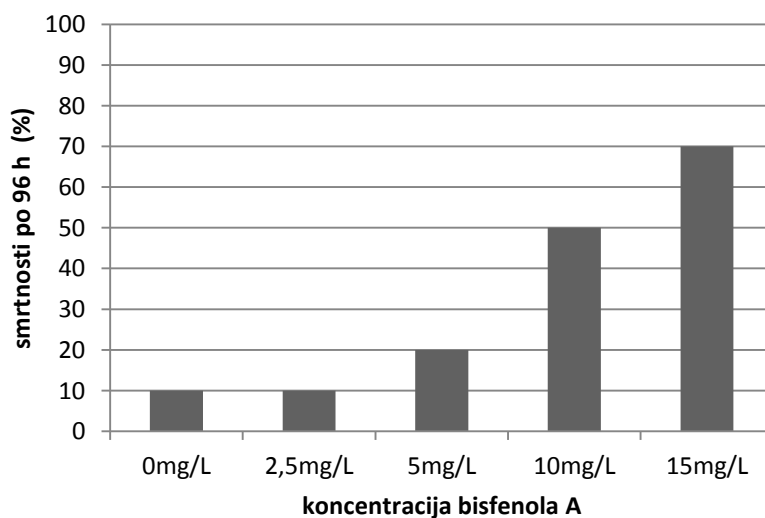
Akutne teste smo izvajali s sedimentom ali brez ter z odraslimi ali juvenilnimi osebki. Uporabili smo naraščajoče koncentracije BPA, za kontrolo pa smo uporabili le medij M4. Zanimalo nas je, pri kateri koncentraciji BPA se pojavijo prvi učinki kemikalije, pri kateri pogine polovica osebkov (LC_{50}) in pri kateri koncentraciji že poginejo vsi osebki.

V preliminarnih testih smo poiskali rang koncentracij, v katerem je smiselno izvajati nadaljnje definitivne teste strupenosti. Preliminarni test smo izvedli s petimi odraslimi osebki na koncentracijo. Koncentracije bisfenola A so bile 5, 10, 15 in 20 mg/l ter kontrola (0 mg/l). Pri 20 mg/l niso poginili vsi organizmi, zato smo v nekaterih naslednjih testih strupenosti uporabili še koncentracije bisfenola A 25 ali celo 30 mg/l, pri nekaterih pa še koncentracijo 2,5 mg/l, da smo preverili smrtnost pri nižji koncentraciji.

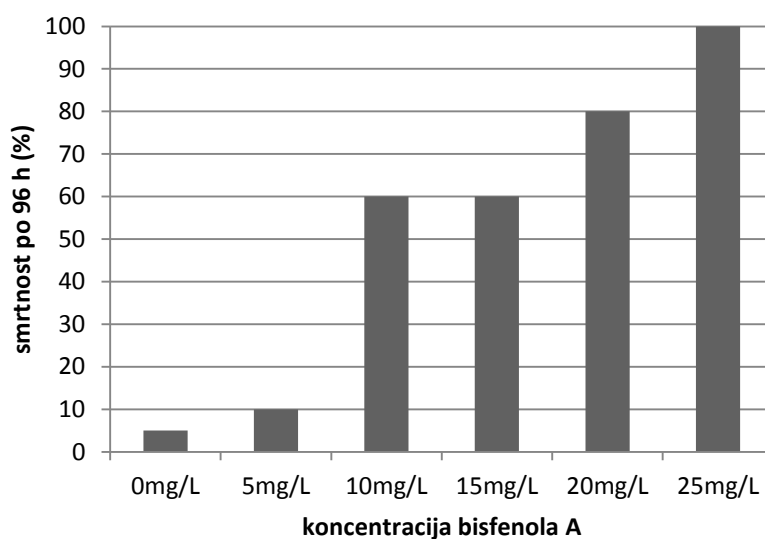
Rezultati definitivnih testov strupenosti so prikazani na Slikah 17–20. Smrtnost narašča z naraščanjem koncentracije BPA.



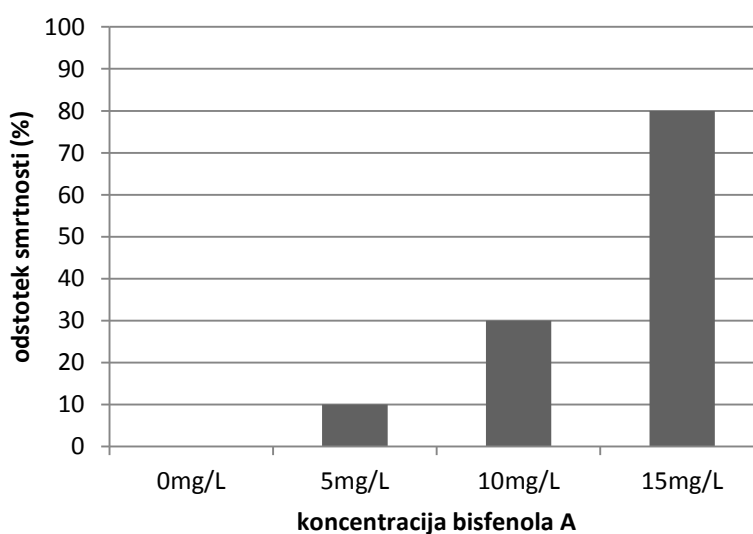
Slika 17: Odstotek smrtnosti odraslih osebkov v akutnih testih strupenosti (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4)



Slika 18: Odstotek smrtnosti odraslih osebkov v akutnih testih strupenosti s sedimentom (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4 v vodni fazi nad sedimentom)

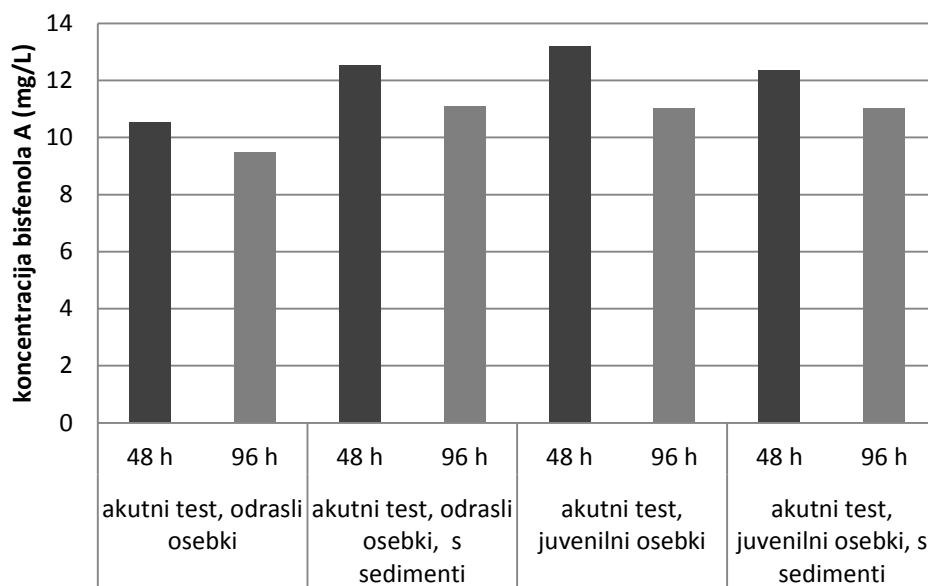


Slika 19: Odstotek smrtnosti juvenilnih osebkov v akutnih testih strupenosti (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4)



Slika 20: Odstotek smrtnosti juvenilnih osebkov v akutnih testih strupenosti s sedimentom (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4 v vodni fazi nad sedimentom)

Iz podatkov na Slikah 17-20 smo izračunali LC-vrednosti (Slika 21), kar nam omogoča primerjavo rezultatov med posameznimi tipi akutnih testov z literaturnimi podatki. Povprečna LC₅₀-vrednost po 48 urah za odrasle in juvenilne osebe je 12,3 mg/l, po 96 urah pa 10,6 mg/l.



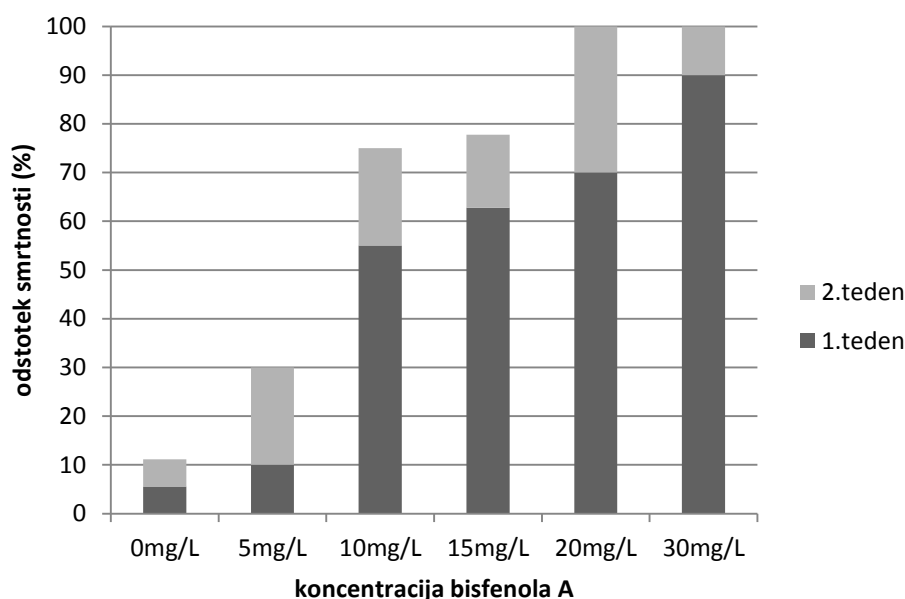
Slika 21: LC₅₀ po 48- in 96-urni izpostavitvi

4.5.4 Kronični test strupenosti

Izvedli smo tritedenski kronični test v dveh paralelkah. Ker smo opazili, da se smrtnost kontrolne skupine v tretjem tednu poveča, smo za nadaljnje prikaze rezultatov upoštevali le dva tedna izpostavitve, ko je smrtnost v kontroli 10% ali manj. Tak odstotek je namreč še dopusten v kontrolni skupini. Podobno kot pri akutnih testih smo v testih uporabili naraščajoče koncentracije bisfenola A, in sicer od 2,5 mg/l do 30 mg/l ter kontrolo (0 mg/l). Uporabili smo le odrasle testne osebke in samo medij M4 brez sedimenta.

4.5.4.1 Smrtnost testnih osebkov

Odstotek smrtnosti narašča s časom izpostavitve in z naraščanjem koncentracije bisfenola A. Pri koncentracijah nad 10 mg/l večina osebkov pogine že prvi teden, po navadi kar v prvih dneh izpostavitve. Osebki, ki preživijo, navadno vztrajajo do konca testa, kasneje jih pogine le malo, osebek ali dva, redkeje več na paralelko. Pri koncentracijah nad 20 mg/l je smrtnost 100% (Slika 22). Razlike v smrtnosti glede na spol testnega organizma se niso pojavile.

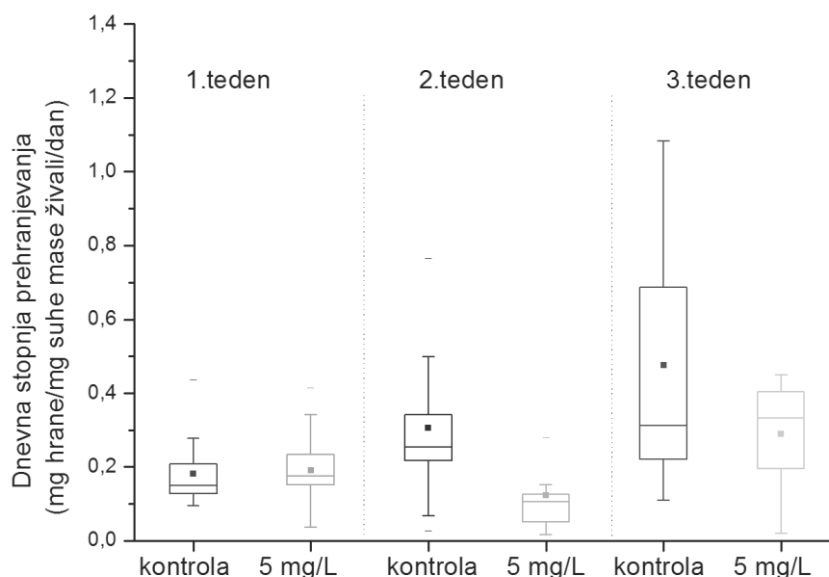


Slika 22: Odstotek smrtnosti osebkov v kroničnih testih po dveh tednih izpostavitve (na X-osi je koncentracija bisfenola A v M4). Z različnimi barvami je ločena smrtnost po 1. in 2. tednu izpostavitve

4.5.4.2 Prehranjevanje testnih osebkov

Smrtnost pri kontrolnih skupinah v kroničnih testih je bila ves čas pod 10 %, zato se nam je zdelo smiselno, da spremljamo tudi stopnjo prehranjevanja, saj s tem preverimo fitness populacije.

Opazovali smo le prehranjevanje pri kontrolnih skupinah in pri najnižji koncentraciji bisfenola A, torej 5 mg/l. Pri višjih koncentracijah je veliko živali poginilo, zato nismo imeli dovolj podatkov, da bi preverili stopnjo prehranjevanja. Primerjali smo prehranjevanje pri kontrolnih skupinah in pri skupinah v raztopini 5 mg/l bisfenola A v posameznem tednu (Slika 23). V prvem tednu izpostavitve ni prišlo do zmanjšane prehranjevanja pri 5 mg/l bisfenola A, nato pa se je prehranjevanje glede na kontrolno skupino zmanjšalo. Razlike v prehranjevanju glede na spol testnega organizma se niso pojavile.



Slika 23: Primerjava dnevne stopnje prehranjevanja po tednih. Prikazani sta kontrola in skupina, izpostavljena koncentraciji 5 mg/l BPA

4.5.5 Vpliv bisfenola A na levitev po akutni in kronični izpostavitvi

Levitve smo spremljali pri vseh izvedenih testih, razen pri testih s sedimentom, kjer leve težje opazimo, in pri testih z desetimi osebki v isti testni čaši, ker so se ti prehranjevali z levi drug drugega in zato levov v čašah nismo našli. Dodatna težava pri skupinskih testih je, da levov, ki jih najdemo v testni posodi, ne moremo določiti posameznim osebkom in bi jih zato morali preračunati na enega, kar daje statistično manj močne rezultate (Weltje in sod., 2006). Prikazani so rezultati levitev pri testih strupenosti (akutnih in kroničnih), in sicer pri kontrolni skupini brez dodanega BPA ter pri skupini s koncentracijo BPA 5 mg/l. Stopnjo levitev smo prikazali s številom levitev na osebek na dan, enako, kot so to storili Weltje in sod. (2006). Na ta način smo lahko primerjali levitve v različnih strupenostnih ali kontrolnih testih, ne glede na trajanje izpostavitve. Pri prikazih levitev so Weltje in sod. (2006) upoštevali le levitve preživelih osebkov, enako, kot smo to storili v naših testih.

Iz naših rezultatov je razvidno, da BPA ne vpliva bistveno na levitve pri *A. aquaticus* (Preglednica 4). Ugotovili smo, da je stopnja levitve v primeru akutnih testov nekoliko višja kot pri kroničnih. Preverili smo, kaj se dogaja z osebki v 14-dnevnih testih (kontrolnih in kroničnih), in ugotovili, da je tudi pri teh povečana stopnja levitev v prvih štirih dneh. Razlike v smrtnosti glede na spol testnega organizma se niso pojavile.

Preglednica 4: Stopnja levitev pri kontroli in koncentraciji bisfenola A 5 mg/l. Ločeno so prikazani rezultati kroničnih in akutnih testov ter za odrasle in juvenilne osebkke. Prikazana so povprečja \pm standardna deviacija. Postavko «število levitev na dan» smo izračunali tako, da smo celotno število levov delili s številom dni izpostavljanja

		kronični testi	akutni testi	
			odrasli	juvenilni
število levitev na dan	kontrola	0,0635 (± 0.0483)	0,0694 (± 0.1152)	0,1058 (± 0.1260)
	5 mg/l	0,0510 (± 0.0437)	0,0769 (± 0.1201)	0,0865 (± 0.1213)

5 RAZPRAVA

5.1 VZORČENJE

Pričakovali smo, da v vzorcu, nabranem zgodaj spomladi, ne bomo našli nobenega primerka ali zelo malo primerkov *Asellus aquaticus*, saj so bile temperature v tem času še zelo nizke. *A. aquaticus* se v hladnejšem delu leta zarije globoko v sediment, kjer ostane, dokler se temperature ne dvignejo. V zadnjem tednu pred nabiranjem je sicer prišlo do otoplitve (najvišja dnevna temperatura se je dvignila s 7 °C na 17 °C), vendar naj ena sama krajša otoplitev še ne bi povzročila premika *A. aquaticus* iz sedimenta na njegovo površino (vir: prof. dr. Toman, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Univerza v Ljubljani). Po vzorčenju smo v nasprotju s pričakovanji v vzorcu našli več kot 100 odraslih osebkov.

Vodnega oslička pogosto najdemo v koeksistenci z različnimi vrstami postranic, vendar pa so postranice dosti bolj agresivna in tekmovalna skupina osebkov, zato lahko njihova prisotnost zniža preživetje in fiziološki status vrste *A. aquaticus* (Blockwell in sod., 1998). Predvidevamo, da porast števila osebkov vrste *Gammarus fossarum*, ki smo jo opazili z vsakim naslednjim vzorčenjem tudi v našem primeru negativno vpliva na preživetje vrste *A. aquaticus*, katere število osebkov se je zmanjševalo s časom vzorčenja.

5.2 KEMIJSKE ANALIZE VODE IZ NAHAJALIŠČA

Glede na Pravilnik o odpadnih vodah (Ur. l. RS. 45/2007) so vrednosti ekoloških parametrov s kraja vzorčenja precej nižje od dopustnih za iztok odpadne vode v vodotoke. Bloor (2006) poudari, da je v testih strupenosti pomembno, da uporabimo testne osebkke iz neonesnaženega vira. Če bi namreč uporabili osebkke, ki so bili v svojem življenju že izpostavljeni kateremu izmed onesnažil, bi to lahko vplivalo na rezultate testov strupenosti, ki že tako variirajo med populacijami ali celo znotraj populacije. Živali iz onesnaženega vira so lahko manj občutljive kot tiste iz čistih območij.

5.3 GOJENJE VRSTE *ASELLUS AQUATICUS*

Testne osebkke smo gojili v podobnih razmerah, kot jih priporočajo mnogi raziskovalci in sicer v steklenem akvariju z rahlim prezračevanjem. Kot hrano smo uporabili z mikrobnou združbo obrasle liste črne jelše (*Alnus Glutinosa*), enako kot so to storili raziskovalci iz pregledanih člankov (Bjelke, 2005; Bloor in sod., 2005; Bloor in sod., 2006; Prus, 1976). Tudi sami smo ugotovili, da je črna jelša najprimernejša hrana za vodne osličke, saj smo nekajkrat v akvarij dodali tudi liste topola in hrasta, pripravljene po enakem postopku, kot so bili pripravljene listi jelše. Osebkke v akvariju se z njimi niso prehranjevali. Izkazalo se je,

da je gojenje vodnih osličkov nezahtevno. Niso bili občutljivi niti na rahlo variiranje koncentracije kisika med gojenjem. Primernost razmer v akvariju se je pokazala tudi s tem, da so se osebki med seboj parili, in s tem, da je prišlo do izleganja mladih vodnih osličkov. Temperatura v laboratoriju, kjer se je nahajal akvarij z *A. aquaticus*, je bila ves čas konstantna. Konstantna temperatura je v testih, kjer spremljamo tudi levitve testnih osebkov, zelo pomembna, saj temperatura vpliva na levitveno vedenje izpostavljenih živali. Weltje in sod. (2006) so dokazali, da je frekvenca levitev pri 20 °C višja kot pri 15 °C.

5.4 OPTIMIZACIJA TESTA STRUPENOSTI

Naši rezultati so pokazali, da osebkom *A. aquaticus*, ki smo jih uporabili v testih strupenosti bolj ugaja nižja frekvenca menjave hrane ter posamična izpostavitve, torej en testni osebek na testno posodo. Pomemben parameter, ki ga moramo upoštevati za primerljivost rezultatov je čas prilagajanja testnih osebkov na laboratorijske razmere, ki mora biti enak za vse organizme, uporabljene v testih.

5.4.1 Smrtnost kontrole

Najpomembnejši kazalnik vpliva različnih testnih razmer na testne osebkke je preživetje organizmov v skupini, kjer ni dodanega onesnaževala, tj. v kontrolni skupini. Mrtve osebkke najlažje prepoznamo po odsotnosti gibanja (Lukančič in sod., 2010). Če povzamemo, smo ugotovili, da preizkušena medija in sediment bistveno ne vplivata na preživetje, zelo pomembna pa sta frekvenca hranjenja osebkov in število osebkov v testnih čašah. Preživetje testnih organizmov se je znižalo ob večji frekvenci hranjenja in ob večjem številu osebkov v testnih čašah.

Primerjali smo preživetje testnih osebkov v sintetičnem mediju M4 in v vodi iz reke Iške. Testni osebki niso pokazali preference do nobenega izmed medijev, saj je bila v smrtnost v obeh primerih enaka. Odločili smo se, da bomo pri nadaljnjih poskusih uporabljali medij M4. Ta je bolj definiran, torej ima znano sestavo, ki se ne spreminja, kar se načeloma lahko zgodi pri vodi iz reke Iške. Poleg tega isti medij v našem laboratoriju uporabljajo za teste na vodnih bolhah, kar omogoča primerljivost rezultatov.

V tretjem delu poskusa smo preverili, kako se testni osebki odzivajo na različne frekvence menjave hrane. Polovici osebkov smo hrano menjali enkrat tedensko, medtem ko smo drugi polovici hrano menjali dvakrat tedensko. Prišlo je do močno povečane smrtnosti pri osebkih s pogostejšo menjavo hrane. Rezultati kažejo, da vodnim osličkom ne ustreza pogosta menjava hrane. Predvidevamo, da jih moti stalno premikanje in da potrebujejo nekaj časa, da se privadijo na nov vir organskih snovi. Predvidevamo lahko tudi, da se v enem tednu, ko so listi v poskusu, poveča obrast mikrobne združbe na listu. S pogosto

menjavo prekinemo proces nastajanja obrasti. Mikrobnna združba ima pri prehranjevanju *A. aquaticus* veliko vlogo, saj ta lahko celo razlikuje med različnimi glivnimi miceliji in se selektivno prehranjuje (Graca in sod., 1994).

Opazovali smo tudi, kako vpliva večje število osebkov v testni posodi na njihovo preživetje. Test smo izvedli z desetimi osebki na testno posodo in ga primerjali s testi z individualnimi osebki. Ugotovili smo, da večje število osebkov negativno vpliva na preživetje, saj je bila smrtnost osebkov precej večja kot v individualnih testih. Opazili smo, da se osebki v testnih čašah prehranjujejo z levi drug drugega in da pojedjo tudi mrtve osebke. Predvidevamo, da testnim osebkom ne ustreza bivanje v isti testni čaši. To se sicer ne ujema s preživetjem osebkov v akvarijih, kjer nismo opazili, da bi se število osebkov kljub veliki gostoti zmanjševalo. Nasprotno, osebki so se v akvariju celo razmnoževali, tako da jih je bilo v njem vedno več. Sklepamo, da je to posledica organskega materiala, ki ga je bilo v akvariju dosti več, posledično pa tudi več manjših prostorčkov, kamor so se osebki lahko skrili. V testne čaše pa smo dali le disk, premera 50 mm, ki ga je moralo vseh deset osebkov uporabljati kot hrano in kot skrivališče. Za tako velikost diska hrane smo se odločili na osnovi testov, ki so jih izvajali Weltje in sod. (2006). Premer diskov, ki so jih uporabljali v testih z individualnimi testi, je 15 mm, premer diskov z 10 osebki pa 50 mm. Sklepamo, da je v našem primeru prišlo do močnejše izražene kompeticije. Pojavi se vprašanje, ali so osebki poginili sami od sebe ali je prišlo do kanibalizma, kar se prav tako občasno dogaja, kot to navajajo v literaturi (Rauch in Morrison, 1999). Pomislili smo, da bi bil vzrok lahko tudi pomanjkanje kisika, saj so bili akvariji prezračevani, testne čaše pa ne, vendar se je to zdelo nelogično, saj so se vodni oslički izkazali kot zelo nezahtevni, kar se tiče kisika. Zato smo z oksimetrom izmerili koncentracijo kisika v testnih čašah. Ugotovili smo, da se je koncentracija kisika res zmanjševala. Takoj po menjavi medija se je gibala med 7 in 8 mg/l, pred ponovno menjavo pa je padla na 5–6 mg/l. Kljub temu menimo, da zmanjševanje koncentracije kisika v testnih čašah ni bistveni razlog za pogin osebkov, saj so v akvariju pri takih razmerah vodni oslički rasli in se razmnoževali.

V nadaljnjih poskusih bi bilo potrebno preveriti, kako bi na preživetje vplivala večje število diskov hrane in vpliv prezračevanja. Lahko bi uporabili pretočni sistem, saj bi na ta način preprečili biodegradacijo, posledica katere sta lahko zmanjševanje koncentracije kisika in akumulacija iztrebkov, ki je prisotna v statičnih testnih sistemih (Tišler, 1999).

5.4.2 Prehranjevanje kontrole

V kontrolnih testih smo spremljali tudi stopnjo prehranjevanja. Izkazalo se je, da tip življenjskega prostora in frekvenca hranjenja ne vplivata na stopnjo prehranjevanja. Rezultate smo primerjali tudi s stopnjo prehranjevanja kontrolne skupine iz kroničnih testov strupenosti, kjer ponovno ni bistvenih razlik.

Primerjali smo tudi stopnjo prehranjevanja v kontrolnih skupinah vseh poskusov (Priloga C). Opazili smo, da se pri živalih, ki so v laboratoriju več kot 2 meseca, prehranjevanje med tritedenskim poskusom poveča (poveča se v tretjem tednu). Pri živalih, ki so bile v laboratoriju le en mesec, tega pojava nismo opazili.

Takšni rezultati kažejo, da se živali med poskusom prilagodijo na razmere v testni čaši in zato povečajo stopnjo prehranjevanja. Ker tega nismo opazili pri živalih, ki so bile prej v laboratoriju le en mesec, to morda nakazuje, da živali še niso bile dovolj prilagojene na razmere v laboratoriju. Naj omenimo, da smo razlike v odvisnosti od časa prilagajanja opazili le, ko smo spremljali prehranjevanje osličkov. Razlik v preživetju živali v odvisnosti od prilagojenosti nismo opazili.

V literaturi ni tovrstnih podatkov o vplivu prilagojenosti na prehranjevanje vodnih osličkov, zato primerjava ni možna. Večina avtorjev za teste strupenosti z vodnimi oslički za potrebno dobo prilagoditve na laboratorijske razmere navaja obdobje 14 dni ali več (Blockwell in sod., 1998; Lukančič in sod., 2010; Prus, 1976), vendar so v teh testih vedno spremljali samo preživetje. Naši rezultati kažejo, da je potrebno za test strupenosti, še posebno, če spremljamo prehranjevanje, vedno vzeti isto populacijo organizmov, nabrano na istem mestu in ob istem času, ki je bila enako dolgo gojena v laboratoriju. Le tako lahko rezultate primerjamo med seboj.

5.5 TESTI STRUPENOSTI

Preverili smo stabilnost BPA v mediju M4. Po 4 dneh izpostavljenosti enakim razmeram, kot so bile v testih strupenosti, se koncentracija BPA v M4 ni bistveno spremenila, kar pomeni da je kemikalija v tem mediju razmeroma stabilna. Zato smo vse rezultate testov strupenosti podajali pri nominalnih koncentracijah BPA v mediju (0, 2.5, 5, 10, 15, 20 in 25 mg/l).

S HPLC-aparatom smo izmerili koncentracijo bisfenola A v mediju M4 pred dodatkom k sedimentu in po pripravi sedimenta. Na ta način smo želeli ugotoviti, koliko bisfenola A se veže na sediment in koliko ga ostane v mediju M4. Ugotovili smo, da se na sediment veže zelo malo kemikalije. Zato smo pri rezultatih testov strupenosti s sedimenti vse koncentracije BPA podali kot koncentracije BPA v mediju M4.

Vezava BPA na sediment je na splošno skromna (Sun in sod., 2005), kar smo potrdili tudi z našimi rezultati. Na vezavo vplivajo fizikalne in kemijske lastnosti sedimenta, kot so kemikalije, ki so v njem že prisotne, mineralne in organske komponente, raztopljene organske snovi, vsebnost ionov, razmerje voda – sediment, pH-vrednost raztopine, temperatura in gostota sedimenta. pH-vrednost sedimenta, ki smo ga uporabili v naših

poskusih, je bila nevtralna, sediment ni vseboval organskih snovi in drugih kemikalij, gostota sedimenta pa je bila $2,4 \text{ g/cm}^3$, zato je bil delež na sediment vezanega BPA po pričakovanjih nizek.

V naših testih smo uporabili relativno visoke koncentracije BPA, glede na tiste, ki se nahajajo v vodnih okoljih. Koncentracije BPA v vodnih območjih ponavadi nihajo od nekaj nanogramov do $0,15 \text{ mg BPA na liter}$, najvišje vrednosti v najbolj onesnaženih vodnih okoljih pa ne presežejo $0,4 \text{ mg/l}$ (Huang in sod., 2011). Najnižja koncentracija, uporabljena v naših testih strupenosti pa je $2,5 \text{ mg/l}$. Glede na dobljene rezultate kratkotrajna izpostavljenost vodnih osličkov vodotokom, onesnaženim z BPA, zaradi nizke koncentracije tega, ne povzroči takojšnje smrtnosti. Vsekakor pa bi bilo potrebno ugotoviti, kaj se dogaja z organizmi na dolgi rok, in kakšen vpliv ima dolgotrajna izpostavitvev organizmov nizkim koncentracijam kemikalije, na procese, kot sta razmnoževanje in levitev.

V testih strupenosti z BPA smo primerjali vpliv tega glede na spol testnega organizma. Razlik v občutljivost glede na spol nismo opazili pri nobenem od merjenih parametrov.

5.5.1 Akutni testi strupenosti

Akutne teste smo izvajali s sedimentom ali brez ter z odraslimi ali juvenilnimi osebki. Uporabili smo naraščajoče koncentracije BPA, za kontrolo pa smo uporabili le medij M4. Zanimalo nas je, pri kateri koncentraciji BPA se pojavijo prvi učinki kemikalije, pri kateri pogine polovica osebkov (LC_{50}) in pri kateri koncentraciji že poginejo vsi osebki.

Smrtnost v akutnih testih strupenosti po pričakovanju narašča z naraščanjem koncentracije BPA. Pri vseh štirih akutnih testih (odrasli osebki s sedimentom ali brez ter juvenilni osebki s sedimentom ali brez) smo dobili zelo podobne rezultate, kar smo preverili tudi s primerjavo LC-vrednosti. Razlike v smrtnosti se, zaradi dodatka sedimenta oz. uporabe juvenilnih vodnih osličkov kot testnih osebkov, ne pojavijo. To pomeni, da je BPA enako strupen za odrasle in juvenilne organizme ter da je strupenost enaka ob dodatku sedimenta. Pričakovali smo, da so juvenilni osebki zaradi svoje velikosti bolj občutljivi kot odrasli, vendar pa se je izkazalo nasprotno. Enaka strupenost v mediju M4 s sedimentom in brez njega je pričakovana, saj je bila vezava BPA na sediment zelo nizka in so bili organizmi praktično izpostavljeni enakim koncentracijam. Ker BPA ni bil vezan na sediment, torej vodni oslički niso bili dodatno izpostavljeni zaradi stika s sedimentom.

V preteklih raziskavah z BPA kot testno kemikalijo se je pokazal negativen vpliv na preživetje in fiziološke procese pri različnih nevretenčarjih. Pri vodni bolhi, *Daphnia magna*, je BPA povzročil negibnost, otrplost ali smrt osebka z EC_{50} po 48 urah: 16 mg/l (95% interval zaupanja, 15,9–16,4) (Mu in sod., 2005), zaviral je razvoj navplija pri

copepodu *Acartia tonsa* z EC_{10} 0,22 mg/l (Andersen in sod., 2001) in razvoj obustnih okončin pri *Chironomus riparius* pri 1 mg/l (Watts in sod., 2003). Glede na naše rezultate so vodni oslički na BPA nekoliko bolj občutljivi kot vodne bolhe, saj je vrednost LC_{50} po 48 urah nižja kot pri vodnih bolhah, s tem da smo v naših rezultatih upoštevali le smrt testnih osebkov.

V večini naših primerov je negibnosti oz. otrplosti testnega osebkov takoj sledila smrt, kar je verjetno posledica visokih koncentracij BPA. Ob uporabi zaporedja nižjih koncentracij BPA v mediju (do 5mg/l), bi lahko spremljali tudi EC vrednosti

5.5.2 Kronični test strupenosti

Izvedli smo tritedenski kronični test v dveh paralelkah. Ker smo opazili, da se smrtnost kontrolne skupine v tretjem tednu poveča, smo za nadaljnje prikaze rezultatov upoštevali le dva tedna izpostavitve, ko je smrtnost v kontroli 10% ali manj. Tak odstotek je namreč še dopusten v kontrolni skupini. Podobno kot pri akutnih testih smo v testih uporabili naraščajoče koncentracije bisfenola A, in sicer od 2,5 mg/l do 30 mg/l ter kontrolo (0 mg/l). Uporabili smo le odrasle testne osebkove in samo medij M4 brez sedimenta.

Odstotek smrtnosti testnih osebkov po pričakovanjih narašča s časom izpostavitve in z naraščanjem koncentracije bisfenola A, enako kot v akutnih testih.

Pri kroničnih testih smo spremljali tudi stopnjo prehranjevanja, saj s tem preverimo fitness populacije. Opazovali smo le prehranjevanje pri kontrolnih skupinah in pri najnižji preizkušeni koncentraciji bisfenola A, torej 5 mg/l. Splošna ugotovitev je, da prisotnost BPA zniža stopnjo prehranjevanja, kar pomeni, da BPA negativno vpliva na vedenje osebkov.

Da izpostavljenost testnih organizmov kemikalijam zmanjša stopnjo prehranjevanja, so dokazali že Bundschuh in sod. (2011), ki so izpostavili *Gammarus fossarum* sekundarno očiščeni odpadni vodi. V njej so se nahajali razni mikropolutanti, od herbicidov do beta blokatorjev.

5.5.3 Vpliv bisfenola A na levitev po akutni in kronični izpostavitvi

Levitve smo spremljali pri vseh izvedenih testih, razen pri testih s sedimentom in pri testih z desetimi osebki v isti testni čaši. Prikazani so rezultati levitev pri testih strupenosti (akutnih in kroničnih), in sicer pri kontrolni skupini brez dodanega BPA ter pri skupini s koncentracijo BPA 5 mg/l.

Iz naših rezultatov je razvidno, da BPA ne vpliva bistveno na levitve pri *A. aquaticus* (Preglednica 4), kar pa se ne sklada z raziskavami na drugih testnih organizmih. Watts in

sod. (2003) poročajo o zakasnjenih levitvah pri vrsti *Chironomus riparius*, in sicer pri koncentraciji 1 mg/l BPA. Vpliv BPA na levitve so proučevali tudi pri vodnih bolhah, *Daphnia magna* (Mu in sod. 2005). Rezultati kažejo, da BPA izzove antiestrogeno aktivnost pri vodnih bolhah, kar se pokaže v podaljšani fazi med dvema levitvama. EC_{50} za antiestrogeno aktivnost v žuželčjih celicah po 48 urah zaradi BPA je 23 mg/l (Dinan in sod., 2001). Ta koncentracija je precej visoka, saj je skoraj enkrat višja kot LC_{50} pri *A. aquaticus* po 48 urah. Iz tega sklepamo, da bi višja koncentracija morda izzvala spremenjene levitve pri morebitnih preživelih osebkih.

Weltje in sod. (2006) ugotovijo, da se obdobje med dvema levitvama pri *A. aquaticus* povečuje s starostjo organizma, vendar razlika v njihovih testih ni statistično značilna. Občutljivost testa bi torej lahko povečali tako, da bi v testih strupenosti izpostavili mlade, torej manjše izopode. Povprečna frekvenca levitev v vseh kontrolnih testih, ki so jih izvedli Weltje in sod. (2006), na posamezni osebek je bila $0,022\text{ d}^{-1}$. V našem primeru je povprečna vrednost stopnje levitev pri juvenilnih organizmih sicer nekoliko večja, vendar statistično prav tako slabo dokazljiva.

Ugotovili smo, da je stopnja levitve v primeru akutnih testov nekoliko višja kot pri kroničnih. Preverili smo, kaj se dogaja z osebki v 14-dnevnih testih (kontrolnih in kroničnih), in ugotovili, da je tudi pri teh povečana stopnja levitev v prvih štirih dneh. Očitno novo okolje, v našem primeru testne čaše, inducira levitve pri vodnih osličkih, zato je stopnja teh v prvih štirih dnevih močno povečana.

5.6 POVZETEK UGOTOVITEV PRI OPTIMIZACIJI TESTOV STRUPENOSTI Z *A. AQUATICUS*

Eden izmed pogojev, ki jih mora testni sistem izpolnjevati, je ponovljivost. Ponovljivost je mogoče doseči, če so pogoji testnega sistema in gojenja natančno opisani. Pomembni parametri, ki vplivajo na ponovljivost so:

- **Starost testnih organizmov:** Organizmi, ki jih uporabimo v testu, morajo biti podobne starosti, saj se s starostjo spreminja občutljivost na kemikalije. V našem sistemu smo kot odrasle organizme šteli tiste s telesno dolžino nad 4 mm in kot juvenilne tiste s telesno dolžino nad 2 mm.
- **Populacija:** Najbolje je, da v testih strupenosti uporabimo organizme iz iste populacije, torej tiste, ki smo jih vzorčili na istem kraju ob istem času. Odgovor živali je namreč odvisen od njene nedavne zgodovine, ki vključuje bolezni, življenjski stadij, prehrano in izpostavljenost onesnažilom.

- **Čas prilagajanja na razmere v laboratoriju:** Preden organizme uporabimo v testih strupenosti, morajo določen čas preživeti v laboratoriju, da se aklimatizirajo na laboratorijske razmere. Čas aklimatizacije mora biti enak za vse testne osebkke, saj v nasprotnem primeru lahko dobimo neprimerljive rezultate.

Predlagamo nekaj iztočnic za nadaljnje strupenostne teste z oslički kot testnimi organizmi:

- **Opazovanje učinkov po izpostavitvi:** Najpogostejša tipa testov strupenosti sta akutna in kronična izpostavitve testnih organizmov kemikaliji. Tako dobimo odgovor organizmov na kratkotrajno in dolgotrajno izpostavljenost onesnažil. Ker se vnos onesnažil v površinske vode največkrat pojavlja v pulzih, bi bilo smiselno organizem kratkotrajno izpostaviti kemikaliji, nato pa opazovati reakcije po izpostavitvi.
- **Opazovanje odziva testnih osebkov na daljšo izpostavitve nižjim koncentracijam onesnažila:** V naših testih strupenosti smo uporabili precej višje koncentracije onesnažila, kot jih dejansko najdemo v okolju. V nadaljnjih raziskavah bi testne osebkke lahko izpostavili koncentracijam, najdenim v okolju in opazovati dolgoročne vplive onesnažila na testne osebkke
- **Skupinski testi:** Ko smo preučevali učinke večjega števila osebkov v testnih čašah na preživetje, nismo bili prepričani, kateri izmed dejavnikov je povzročil povečano smrtnost pri testnih organizmih. Eden izmed razlogov bi lahko bil zmanjšanje koncentracije kisika. Vodni oslički v naravnem okolju sicer lahko preživijo tudi pri zelo nizkih koncentracijah kisika, vendar bi bilo potrebno preveriti, kako se na enake koncentracije odzivajo v kombinaciji z laboratorijskimi razmerami. Menimo, da bi bilo poskuse smiselno ponoviti še s prezračevanjem testnih posod. Drugi razlog za pogin osebkov pa bi lahko bila kompeticija zaradi premalo organskega materiala, kamor bi se osebkke lahko skrili. Zato bi lahko poskuse ponovili z večjo količino dodanih listov.
- **Primerjava občutljivosti glede na čas prilagajanja testnih osebkov na laboratorijske razmere:** Rezultati naših testov so pokazali, da prihaja do razlike v stopnji prehranjevanja glede na čas prilagajanja testnih osebkov na laboratorijske razmere. V nadaljnjih raziskavah bi lahko preverili, ali se pojavijo tudi razlike v občutljivosti na testno kemikalijo med gojenimi in negojenimi organizmi.

6 SKLEPI

- Po pričakovanjih izopodni raki vrste *Asellus aquaticus* niso zahtevni za gojenje v laboratorijskih razmerah. Osebkci so se v laboratoriju pri stalnih pogojih prehranjevali, rasli in se razmnoževali.
- Parametri, ki smo jih spremljali v kontrolnih testih in testih strupenosti, so smrtnost, prehranjevanje, levitev in iztrebljanje. Našteti parametri so pogosto uporabljeni v poskusih s testnimi nevretenčarji in so enostavno merljivi.
- Ugotovili smo, da tip testnega medija ne vpliva bistveno na preživetje osebkov, zato smo vse teste strupenosti izvajali v testnih čašah s sintetično pripravljenim medijem M4.
- Bolj primeren način izpostavljanja je tak, kjer osebkce izpostavimo posamično, enega na testno posodo. Primerna menjava medija je dvakrat tedensko, menjava hrane pa enkrat tedensko.
- Testni osebkci morajo biti v laboratorijski kulturi gojeni enako dolgo, njihova starost ob izpostavitvi v strupenostnem testu pa mora biti primerljiva.
- Bisfenol A je povzročil smrtnost testnih osebkov. Ta se je večala s povečevanjem koncentracije kemikalije in s časom izpostavitve. Na levitve vodnih osličkov BPA v koncentracijah do 30 mg/L ni imel statistično značilnih učinkov, medtem ko se je stopnja prehranjevanja zmanjšala. Odrasli in juvenilni osebkci so bili enako občutljivi na BPA.
- Dodan sediment ni vplival na učinke kemikalije na testne organizme, saj se je na sediment vezala zelo majhna količina BPA.
- Zaključujemo, da je predstavljeni test strupenosti s sedimentnim testnim organizmom rakom vrste *Asellus aquaticus* primeren za testiranje potencialnih učinkov onesnažil na okolje.

7 POVZETEK

Vodni osliček (*Asellus aquaticus*) je ena izmed reprezentativnih vrst v vodnih okoljih, še posebej pogosto pa jo najdemo v organsko bogatih vodotokih. Vezana je na sediment, po katerem raje in se na njem prehranjuje. *A. aquaticus* je občutljiv na antropogene toksične snovi in zato primeren sedimentni testni organizem v testih strupenosti, kar smo tudi preverili z bisfenolom A (BPA) kot testno kemikalijo.

Testne osebke smo gojili v akvariju z vodo iz reke Lške, ki je bila že prej uporabljena kot referenčna voda pri strupenostnih testih na Kemijskem inštitutu. Akvarij smo rahlo prezračevali. Testne osebke smo hranili z vzdrževanimi listi črne jelše (*Alnus glutinosa*). Po pričakovanjih vrsta *A. aquaticus* ni zahtevna za gojenje v laboratorijski kulturi. Osebki so se v njej prehranjevali, rasli in se razmnoževali.

Teste strupenosti smo izvajali v paralelkah z desetimi osebki, ki smo jim prej izmerili dolžino in jim določili spol. Osebke smo izpostavili v sintetično pripravljene mediju M4. Izpostavili smo jih posamično, enega na testno posodo s sedimentom ali brez. Dodan sediment ni imel vpliva na testne osebke. Medij smo menjali dvakrat na teden, hrano (del lista črne jelše) pa enkrat. Za tak sistem smo se odločili na osnovi optimizacijskih testov, s pomočjo katerih smo ugotovili, da več osebkov v isti testni posodi in pogostejša menjava hrane povečata smrtnost testnih osebkov.

BPA je pomembno onesnažilo s širokim spektrom vplivov na okolje, katerega uporaba se je v zadnjih letih močno povečala. BPA ima lahko nepredviden vpliv na hormonsko aktivnost vodnih organizmov in lahko moti hormonsko regulirane fiziološke procese. Kot tak je primeren za preučevanje v testih strupenosti.

V testih strupenosti smo spremljali smrtnost, prehranjevanje in levitve testnih osebkov. Ugotovili smo, da ima BPA negativen vpliv na testne osebke, kar je bilo v skladu z literaturnimi podatki. V testih strupenosti z BPA se je povečevala smrtnost testnih osebkov s povečevanjem koncentracije kemikalije in s časom izpostavitve. Na levitve vodnih osličkov BPA v koncentracijah do 30 mg/L ni imel statistično značilnih učinkov, medtem ko se je stopnja prehranjevanja zmanjšala. Dodan sediment ni vplival na učinke kemikalije na testne organizme, saj se je na sediment vezala zelo majhna količina BPA. Ugotovili smo, da so odrasli in juvenilni osebki enako občutljivi na BPA.

Opazili pa smo, da je prišlo do povečane stopnje prehranjevanja v tretjem tednu izpostavitve v primerih, ko so bili osebki v laboratorijski kulturi več kot en mesec. Čas, preživet v laboratoriju, je torej ključen parameter pri izvajanju testov strupenosti. Vsi osebki, uporabljeni v poskusih, morajo biti v laboratorijski kulturi gojeni enako dolgo, saj

so v nasprotnem primeru osebki različno aklimatizirani na razmere v laboratoriju, kar se kaže v neprimerljivosti rezultatov testov strupenosti. Drugi pomembni parameter, ki ga je potrebno upoštevati pri izvajanju testov strupenosti, je starost testnih organizmov, saj se s starostjo spreminja občutljivost organizmov. Z našimi testi tega sicer nismo potrdili, smo pa podatke o spremenjeni občutljivosti glede na starost organizma večkrat zasledili v pregledanih objavah. Tretji parameter, na katerega moramo biti pozorni, pa je populacija osebkov, ki jih uporabimo v testih strupenosti. Najbolje je, da uporabimo populacijo, ki smo jo nabrali ob istem času na istem kraju, saj tako vsaj malo zmanjšamo že tako prisotno variabilnost med osebki. Pomembno je, da uporabimo osebke iz neonesnaženega območja, saj so v nasprotnem primeru osebki lahko bolj odporni na nekatera onesnažila.

V magistrskem delu smo vpeljali način dela z vodnimi oslički kot testnimi organizmi in BPA kot testno kemikalijo. Ker so se vodni oslički izkazali kot primerni testni organizmi, predlagamo nekaj iztočnic, na katerih bi bile možne raziskave vplivov BPA. Smiselno bi bilo ponoviti skupinske teste z večjo količino organskega materiala in s prezračevanjem. Tako bi morda lahko zmanjšali smrtnost osebkov v skupinskih testih. Glede na to, da je izpostavljenost onesnažilom v naravi redko kontinuirana in se večkrat pojavlja občasno, bi bilo potrebno narediti teste strupenosti z začasno izpostavljenostjo testni kemikaliji in opazovati učinke kemikalije po izpostavitvi. Ker smo v testih uporabili precej višje koncentracije onesnažila, kot jih dejansko najdemo v okolju, bi teste strupenosti lahko ponovili z realnimi koncentracijami in opazovali učinke na daljši rok izpostavitve. Ker se pokažejo razlike v stopnji prehranjevanja testnih osebkov glede na čas prilagajanja na laboratorijske razmere, bi bilo smiselno preveriti, ali prihaja tudi do razlik v občutljivosti na testno kemikalijo med gojenimi in negojenimi organizmi.

8 SUMMARY

Waterlouse (*Asellus aquaticus*) is one of the representative species in water environment, especially in regulated streams. The species is bound to sediment into which it digs and where it feeds. *A. aquaticus* is sensitive to anthropogenic toxic substances and for this reason an appropriate sediment test organism in toxicity tests, which we confirmed with bisphenol A (BPA) as the testing chemical.

Test organisms were maintained in an aquarium filled with water from river Iška, which had been previously used as a reference water for toxicity tests at National Institute of Chemistry in Slovenia. The aquarium was slightly aerated. Test organisms were fed with conditioned black alder (*Alnus glutinosa*) leaves. As it was expected, *A. aquaticus* is not overly demanding as an in laboratory culture. Organisms feed, grow and reproduce in it.

Toxicity tests were performed in series with ten organisms, which were previously measured and sexed. We decided to use the synthetically prepared medium M4. Organisms were exposed individually, one in each test beaker with or without sediment. Added sediment did not influence test organisms. The medium was replaced twice a week, food (disc of black alder leaf) was replaced once a week. Such a system was chosen based on optimisation tests, which showed that more individuals in same test beaker and frequently replaced food increase mortality of test organisms.

BPA is important toxicant with a wide range of effects on the environment. Its usage increased in the last few years. BPA has unexpected influences on freshwater organisms' hormonal activity and can interrupt hormonally regulated physiological processes. As such it is appropriate for studying in toxicity tests.

In toxicity tests we monitored mortality, feeding rate and moulting of test organisms. Results showed negative influences of BPA on test organisms, which was expected regarding the reviewed publications. In toxicity tests with BPA, mortality of test organisms increased with increasing chemical concentration and with exposure duration. BPA had no significant influence on test organisms moulting up to 30 mg/L of BPA while it reduced their feeding rate. Addition of sediment did not influence effects of chemical on test organisms due to low binding of BPA to sediment. Adult and juvenile organisms showed same sensitivity to BPA. Results showed increased feeding rate in third week of exposure, when test organisms were maintained more than one month as an in laboratory culture.

Time spent in laboratory cultivation is therefore a main parameter of performance for toxicity tests. Each organism, used in test has to be maintained in laboratory for same time. If not, individuals are unequally acclimatised to laboratory conditions. Another parameter

to consider at toxicity testing is age of test organisms as with different age, sensitivity of test organisms changes. Our results did not confirm that statement, however it was mentioned in publications several times. The third important parameter is the population of organisms used in toxicity tests. The best way is to use a population, which was sampled at the same time and the same location. By this means variability in population is decreased. Organisms have to be sampled from unpolluted area. If not, they can be more resistant to certain toxicants.

In Master's thesis work, we introduced a method for using waterlouse as a test organism and BPA as a test chemical. As waterlouse turned out as suitable test organisms, some entries for further researches are suggested. It is reasonable to repeat group tests, this time with higher amount of organic matter and with aeration. This might be the way to reduce mortality in group tests. As regards contamination in environment, it is rarely continuous and is more likely to appear episodically, thus it is required to perform toxicity tests with temporary presence of test chemical and observe effects after exposure. Lower concentrations of toxicant were used in our tests than found in natural environment. We should repeat our tests with existing concentrations and observe long-term effects. Our results show differences in feeding rate according to acclimation time of test organisms. It would be reasonable to test if there are differences in sensitivity between laboratory culture and organisms from their natural habitat.

9 VIRI

- Andersen H. R., Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K. O. 2001. Development of copepod nauplii to copepodites – a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 12: 2821–2829
- Anderson N. H., Sedell J. R. 1979. Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems. *Annual Review of Entomology*, 24, 1: 351–377
- Beketov M. A., Liess M. 2008. Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 2: 461–470
- Benesh D. P., Sepälä O., Valtonen E. T. 2009. Acanthocephalan size and sex affect the modification of intermediate host colouration. *Parasitology*, 136, 8: 847–845
- Benesh D. P., Valtonen E. T. 2007. Effects of *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala) on intermediate host survival and growth: implications for exploitation strategies. *American Society of Parasitologists*, 93, 4: 735–714
- Bengtsson G. 1982. Energetic costs of amino acids exudation in the interaction between the predator *Gammarus pulex* L. and the prey *Asellus aquaticus* L. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 10: 1271–1281
- Bertin A., Cezilly F. 2003. Sexual selection, antennae length and the mating advantage of large males in *Asellus aquaticus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 4: 698–707
- Bjelke U. 2005. Processing of leaf matter by lake-dwelling shredders at low oxygen concentrations. *Hydrobiologia*, 539, 1: 93–98
- Blockwell S. J., Pascoe D., Taylor E.J. 1996. Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere*, 32, 9: 1795–1803
- Blockwell S. J., Taylor E. J., Jones I., Pascoe D. 1998. The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 1: 41–47

- Bloor M. C. 2011. Dietary preference of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus* during a laboratory breeding programme for ecotoxicological studies. *International Journal of Zoology*, 5 str.
- Bloor M. C., Banks C. J. 2006. Acute and sub lethal toxicity of landfill leachate towards two aquatic macroinvertebrates. *Hydrobiologia*, 31, 8: 387–397
- Bloor M. C., Banks C. J., Krivtsov V. 2005. Acute and sub-lethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environment International*, 31, 2: 269–273
- Bloor M. C., Banks C. J., Krivtsov V. 2006. Population dynamics in *Asellus aquaticus* as modified by chronic leachate stress. *Engineering Geology*, 85, 1–2: 9–13
- Bloor, M. C. 2010. Animal standardisation for mixed species ecotoxicological studies: establishing a laboratory breeding programme of *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Zoologica Baetica*, 21: 179–190
- Borgmann U. 1996. Systematic analysis of aqueous ion requirements of *Hyalella azteca*: a standard artificial medium including the essential bromide ion. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 30, 3: 356–363
- Borowsky B., Aitken-Ander P., Tanacredi J. T. 1997. Changes in reproductive morphology and physiology observed in the amphipod crustacean, *Melita nitida* Smith, maintained in the laboratory on polluted estuarine sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 214, 1–2: 85–95
- Bouskill N. J., Handy R. D., Ford T. E., Galloway T. S. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 3: 342–349
- Brotons J. A., Olea-Serrano M. F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N. 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environmental Health Perspectives*, 103, 6: 608–612
- Bueler C. M. 1984. Feeding preference of *Pteronarcys pictetii* (Plecoptera: Insecta) from a small, acidic, woodland stream. *The Florida Entomologist*, 67, 3: 393–401
- Buikema A. L., Niederlehner B. R., Cairns J. 1982. Biological Monitoring, Part IV - Toxicity Testing. *Water Research*, 16, 3: 269-273

- Bundschuh M., Zubrod J. P., Schulz R. 2011. The functional and physiological status of *Gammarus fossarum* (Crustacea; Amphipoda) exposed to secondary treated wastewater. *Environmental Pollution*, 159, 1: 244–249
- Cook J. A., Chub J. C., Veltkamp C. J. 2002. Epibionts of *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda): an SEM study. *Freshwater Biology*, 39, 3: 423–438
- De Lange H. J., Lürling M., Van Den Borne B., Peeters T. H. M. E. 2005. Attraction of the amphipod *Gammarus pulex* to water-borne cues of food. *Hydrobiologia*, 544, 1: 19–25
- De Lange H. J., Van Griethuysen C., Koelmans A. A. 2008. Sampling method, storage and pretreatment of sediment affect AVS concentrations with consequences for bioassay responses. *Environmental Pollution*, 151, 1: 243–251
- Dinan L., Bourne P., Whiting P, Dhadialla T. S., Hutchinson T. H. 2001. Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B(II) cell in vitro assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 9: 2038–2046
- Eimers M. C., Evans R. D., Welbourn P. M. 2001. Cadmium accumulation in the freshwater isopod *Asellus racovitzai*: the relative importance of solute and particulate sources at trace concentrations. *Environmental Pollution*, 111, 2: 247–253
- Eimers M. C., Evans R. D., Welbourn P. M. 2002. Partitioning and bioaccumulation of cadmium in artificial sediment systems: application of a stable isotope tracer technique. *Chemosphere*, 46, 4: 543–551
- European Union Risk Assessment Report on 4,4-isopropylidenediphenol (bisphenol A). 2010. European Commission. Environment Agency, Chemicals Assessment Unit, Wallingford, United Kingdom.
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/15069/1/lbna24589enn.pdf> (12. okt. 2012)
- Feltmate B. W., Baker R. L., Pointing P. J. 1986. Distribution of the stonefly nymph *Paragnetina media* (Plecoptera: Perlidae): influence of prey, predators, current speed and substrate composition. *Canadian Journal Fisheries & Aquatic Sciences*, 43, 8: 1582–1587
- Fitter R., Manuel R. 1986. *A Field Guide to Freshwater Life in Britain and North-west Europe* (Collins Field Guide). 1st ed. London, Collins: 464 str.

- Ford A., Fernandes T. F., Rider S. A., Read P. A., Robinson C. D., Davies I. M. 2004. Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation. *Marine Environmental Research*, 58, 2–5: 169–173
- Gaskell P. N., Brooks A. C., Maltby L. 2007. Variation in the bioaccumulation of a sediment-sorbed hydrophobic compound by benthic macroinvertebrates: Patterns and mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 41, 5: 1783–1789
- Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Noël C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G., Charmantier-Daures M. 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 10: 2249–2259
- Giudici M. N., Migliore L., Gambardelle C., Marotta A. 1988. Effect of chronic exposure to cadmium and copper on *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). *Hydrobiologia*, 157, 3: 265–269
- Gollady S. W., Webster J. R., Benfield E. F. 1983. Factors affecting food utilization by a leaf shredding aquatic insect: leaf species and conditioning time. *Holarctic Ecology*, 6: 157–162
- Graca M. A. S., Maltby L., Calow P. 1994. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) population dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia*, 281, 3: 155–162
- Green D. W. J., Williams K. A., Pascoe D. 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 15, 5: 457–471
- Gross M. Y., Maycock D. S., Thorndyke M. C., Morrith D., Crane M. 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatments work. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 8: 1792–1797
- Happ G. M. 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology*, 37: 303–320
- Hasu T., Jokela J., Valtonen E. T. 2008. Effect of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. *Aquatic Ecology*, 42, 1: 141–150

- Hasu T., Valtonen E. T., Jokela J. 2006. Costs of parasite resistance for female survival and parental care in a freshwater isopod. *Oikos*, 114, 2: 322–328
- Hellawell J. M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. London, Elsevier Applied Science Publishers: 546 str.
- Horn D. H. S., Middleton E. J., Wunderlich J. A., Hampshire F. 1996. Identity of the moulting hormones of insects and crustaceans. *Chemical Communications*, 11: 339–340
- Howard P. H., 1989. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Large Production and Priority Pollutants, Vol. I. Ann Arbor, Lewis Publishers: 600 str.
- Huang Y. Q., Wong C. K., Zheng J. S., Bouwman H., Barra R., Wahlström B., Neretin L., Wong M. H. 2011. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42: 91–99
- Hyne V. R. 2011. Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30, 12: 2647–2657
- ISO 10706. Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). 2000
- ISO 6341. Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test. 1996
- Iversen T. M. 1974. Ingestion and growth in *Sericostoma personatum* (Trichoptera) in relation to the nitrogen content of ingested leaves. *Oikos*, 25, 3: 278–282
- Jacobson T., Sundelin B. 2006. Reproductive effects of the endocrine disruptor fenarimol on a Baltic amphipod *Monoporeia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 4: 1126–1131
- Jemec A., Tišler T., Erjavec B., Pintar A. 2012. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 1: 213–218
- Jugovic J. 2005. Rasna diferenciacija vodnega oslička, *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

- Krishnan A. V., Stathis P., Permuth S. F., Tokes L., Feldman D. 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132, 6: 2279–2286
- Lagerspetz K. Y. H. 2003. Thermal acclimation without heat shock and motor responses to a sudden temperature change in *Asellus aquaticus*. *Journal of Thermal Biology*, 28, 5: 421–427
- LeBlanc G. A. 2007. Crustacean endocrine toxicology: A review. *Ecotoxicology*, 16, 1: 61–81
- Lukančič S., Žibrat U., Mezek T., Jerebic A., Simčič T., Brancelj A. 2010. A new method for early assessment of effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* and *Gammarus fossarum*, to pesticides, a laboratory study. *Toxicology and Industrial Health*, 26, 4: 217–228
- Marinković M., Kraak M. H. S. 2010. Development of an easily made artificial sediment that reduces experimental variability. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*. 21: 95–101
- Migliore L., Giudici M. N. 1990. Toxicity of heavy metals to *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea, Isopoda). *Hydrobiologia*, 203, 3: 155–164
- Minshall G. W. 1984. Aquatic insect-substratum relationships. V: *The Ecology of Aquatic Insects*. Resh V. H., Rosenberg D.M. (eds). New York, Praeger Publishers: 358 – 400
- Morrissey R. E., George J. D., Price C. J., Tyl R. W., Marr M. C., Kimmel C. A. 1987. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 8, 4: 571–582
- Mu X., LeBlanc G. A. 2002. Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *The Journal of Experimental Zoology*, 292, 3: 287–292
- Mu X., Rider C. V., Hwang G. S., Hoy H., LeBlanc G. A. 2005. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1: 146–152
- Mulliss R., Ellis J. B., Revitt D. M., Shutes R. B. E. 1994. An Evaluation of the Toxic Influences on *Asellus Aquaticus* (L) in an Urban Stream Environment. *Water Science and Technology*, 29, 1–2: 199–207

- Neff J. M. 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, fates and biological effects. London, Applied Science Publishers: 262 str.
- Nilsson L. M. 1974. Energy budget of a laboratory population of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Oikos*, 25, 1: 35–42
- OECD 218. Guidelines for the Testing of Chemicals; Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. 2004, 21 str.
- Pascoe D., Gower D. E. McCahon C. P., Poulton M. J., Whiles A. J., Wuhlforth J. 1991. Behavioural responses to pollutant-application in freshwater bioassays. V: Bioindicators and environmental management. Jeffrey D. W., Madden B. (eds). Academic Press: 245–254
- Peeters E. T., De Jager T. J., Beijer J. A., Koelmans A. A. 2000. Effects of benzo(a)pyrene and size of organic matter particles on bioaccumulation and growth of *Asellus aquaticus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 3: 307–314
- Peeters E. T. H. M., Camu, J. M., Beijer. J. A. J., Scheffer M., Gardeniers J. J. P. 2002. Response of the waterlouse *Asellus aquaticus* to multiple stressors: effects of current velocity and mineral substratum. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 9, 3: 193–203
- Plantan N. 2012. Validacija metode za določanje bisfenola A v izcedni vodi s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti. Diplomsko delo, Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju
- Plenet S. 1995. Freshwater amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems. *Freshwater Biology*, 33, 1: 127–137
- Predstavitev Načrta upravljanja voda 2009–2015. 2010. Ministrstvo za okolje in prostor.
http://www.arhiv.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/publikacije/drugo/skrbi_mo_za_vode_skupna.pdf (12. okt. 2012)
- Prevorčnik S., Jugovic J., Sket B. 2009. Geography of morphological differentiation in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 47, 2: 124–131
- Prus T. 1976. Experimental and Field Studies on Ecological Energetics of *Asellus Aquaticus* L. (Isopoda). *Ekologia Polska*, 24: 461–472

- Rand G. M., Wells P. G., McCarty L. S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. V: Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environment Fate, and Risk Assessment. Rand G. M. (ed). 2nd ed. Washington, Taylor and Francis group: 3–66
- Rasmussen A. D. 2000. Effects of cadmium exposure on volume regulation in the lugworm, *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology*, 48, 2–3: 151–16
- Rauch S., Morrison G M. 1999. Platinum uptake by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* in urban rivers. *Science of The Total Environment*, 235, 1–3: 261–268
- Rosenthal G. A., Janzen D. H., Applebaum S. W. 1979. Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. New York, Academic Press: 718 str.
- Segner H., Carroll K., Fenske M., Janssen C. R., Maack G., Pascoe D., Schäfers C., Vandenberg G. F., Watts M., Wenzel A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 3: 302–314
- Sprague J. B. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish: III: Sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Research*, 5, 6: 245–266
- Sun W. L., Ni J. R., O'Brien K. C., Hao P. P., Sun L. Y. 2005. Adsorption of bisphenol A on sediments in the Yellow River. *Water, Air and Soil Pollution*, 167, 1–4: 353–364
- Sundelin B., Eriksson A.-K. 1998. Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 171: 165–180
- Sundelin B., Ryk C., Malmberg G. 2000. Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*. *Environmental Toxicology*, 15, 5: 518–526
- Termit d.d. Termit, mivka za otroško igro. 2010.
http://www.termit.si/01_proizvodni_program/_tehnichni_varnostni_listi_peskokopi/020061.pdf (14. mar. 2012)
- Termit d.d. Varnostni list. 2009.
http://www.termit.si/01_proizvodni_program/_tehnichni_varnostni_listi_peskokopi/varnostni%20list%20kremenovi%20peski.pdf (14. Mar. 2012)

- Vandenbergh G. F., Adriaens D., Verslycke T., Janssen C. R. 2003. Effects of 17 alpha-ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 2: 216–222
- Ward J. V. 1992. *Aquatic Insect Ecology*. 1. Biology and Habitat. Wiley, New York, 438 str.
- Watts M. M., Pascoe D., Carroll K. 1992. Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2: 445–450
- Watts M. M., Pascoe D., Carroll K. 2003. Exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A--effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 2: 207–215
- Weltje L., Oehlmann J. 2006. Effects of endocrine disrupting compounds and temperature on the moulting frequency of the freshwater isopod *Asellus aquaticus* L. (Isopoda: Asellota). *Acta Biologica Benroids*, 13: 105–115
- Willoughby L. G., Sutcliffe D. W. 1976. Experiments on feeding and growth of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) related to its distribution in the River Duddon. *Freshwater Biology*, 6, 6: 577–586
- Zeng G., Zhang C., Huang, G., Yu J., Wang Q., Li J., Xi B., Liu H. 2006. Adsorption behaviour of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central- south China. *Chemosphere*, 65, 9: 1490–1499

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Aniti Jemec za čas, ki si ga je vzela, strokovno pomoč, ideje in potrpežljivost.

Zahvaljujem se tudi mentorju prof. dr. Mihaelu J. Tomanu za nasvete glede dela in pisanja ter prof. dr. Damjani Drobne za recenzijo.

Zahvala gre tudi dr. Albinu Pintarju, ki mi je omogočil delo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani ter vsem zaposlenim v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo za pomoč pri praktičnem delu.

Posebna zahvala gre mojemu fantu Primožu in njegovi družini, ki so doživeli in preživeli vse stranske učinke pisanja mojega magistrskega dela. Hvala tudi prijateljicam za take in drugačne ekstreme.

Najbolj pa sem hvaležna svoji družini za vse spodbudne besede, za skrb in ljubezen, ki mi jo namenjajo in ker so tudi v najtežjih trenutkih verjeli vame. Ati, mami in Anže, hvala vam za vse!

PRILOGE

Priloga A: Razmere gojenja *A. aquaticus*, ki jih navajajo različni avtorji (viri so v oklepaju): (1): Bjelke, 2005; (2): Blockwell in sod., 1998; (3): Bloor in sod., 2005; (4): Bloor in sod., 2006; (5): Borgmann, 1996; (6): De Lange in sod., 2005; (7): Eimers in sod., 2002; (8): Hasu in sod., 2006; (9): Lukančič in sod., 2010; (10): Peeters in sod., 2002; (11): Prus, 1976; (12): Weltje in Oehlmann, 2006

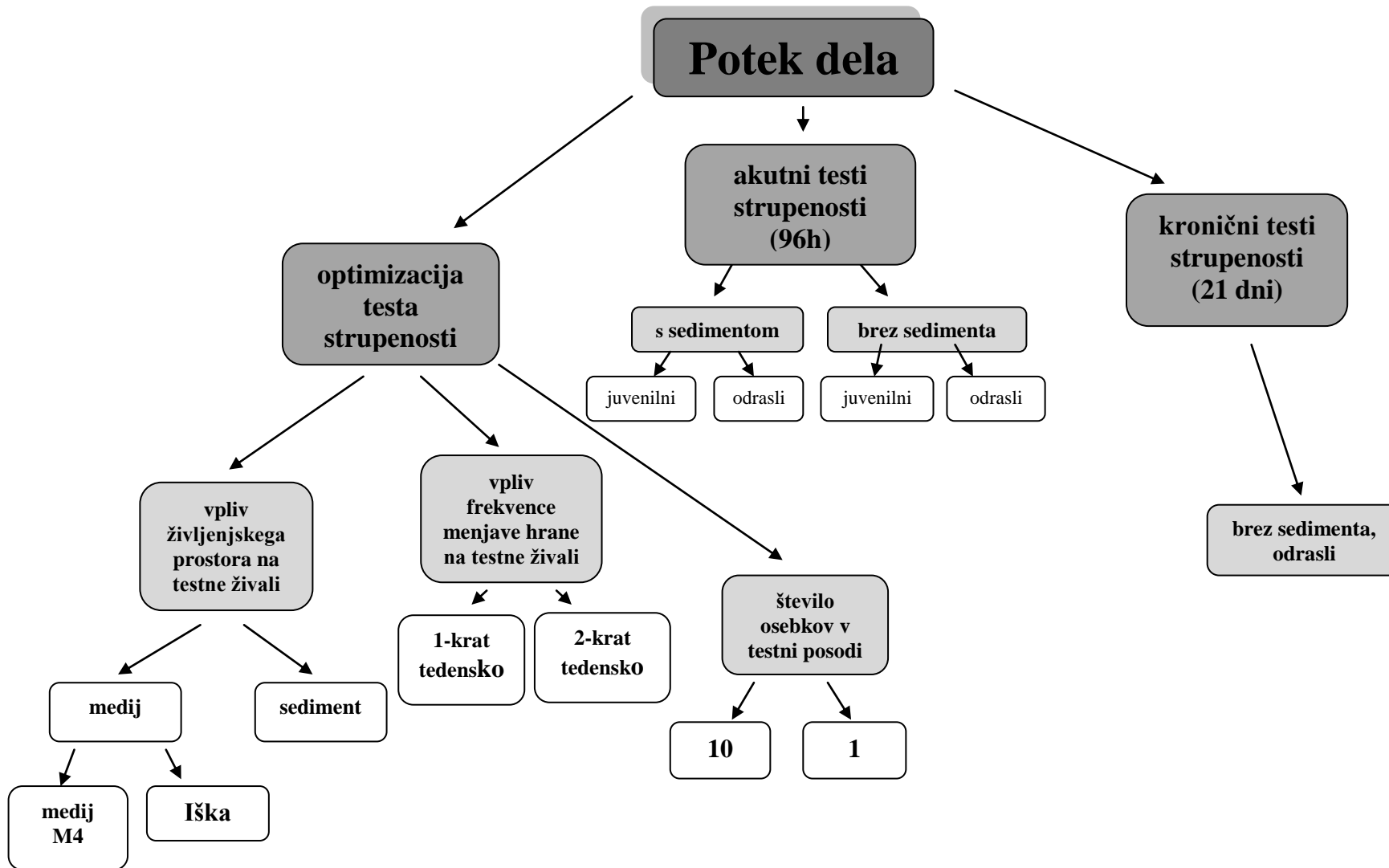
GOJENJE						
medij	starana deklorirana vodovodna voda (2); (8)	voda, filtrirana s filtrom iz aktivnega oglja (3)	DSW (Dutch standard water) (6)	mešanica vode iz nahajališča in sintetične vode (ISO 6341, 1996) (9)	sintetična voda (pH $8,2 \pm 0,2$) (12), (ISO 6341, 1996) (9) razredčevalna voda (7)	podtalnica (10)
temperatura	10 °C (9); (11)	13 °C (2)	15 °C (3); (12)	7 °C (1)	18 °C (10)	20 °C (8)
osvetlitev (razmerje svetloba : tema)	16:8 (5); (12)	12:12 (9); (10)	konstantna svetloba (8)			
ostalo	prezračevanje (1); (3); (12)	kroženje medija (3)	mladi ločeni od odraslih za preprečevanje kanibalizma (3)			
čas aklimatizacije	4 h (1)	14 dni (11)	4 tedni (2)	3 meseci (9)		
HRANA	listi črne jelše (<i>Alnus glutinosa</i>) (1); (3); (4); (8); (9); (11); (12)	listi divjega kostanja (<i>Aesculus hippocastanum</i>) (2)	listi črnega topola (<i>Populus nigra</i>) (10)	ribja hrana, rezine kumare in korenja (kot dodatek listom črne jelše) (12)		
priprava listov črne jelše v primeru uporabe kot hrane	pred uporabo za gojenje hranjeni v vodi na sobni temperaturi (11)	pred uporabo za gojenje hranjeni v vodi iz nahajališča in detritu (3)	pred uporabo za gojenje hranjeni v prezračevani vodi, obogateni z $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (8)	pred uporabo v testih razrezani na diske (1); (3)		
čas vzdrževanja listov črne jelše pred uporabo za gojenje v primeru uporabe kot hrane	10 dni (3)	2 tedna (8)	nekaj mesecev (11)			

Se nadaljuje.

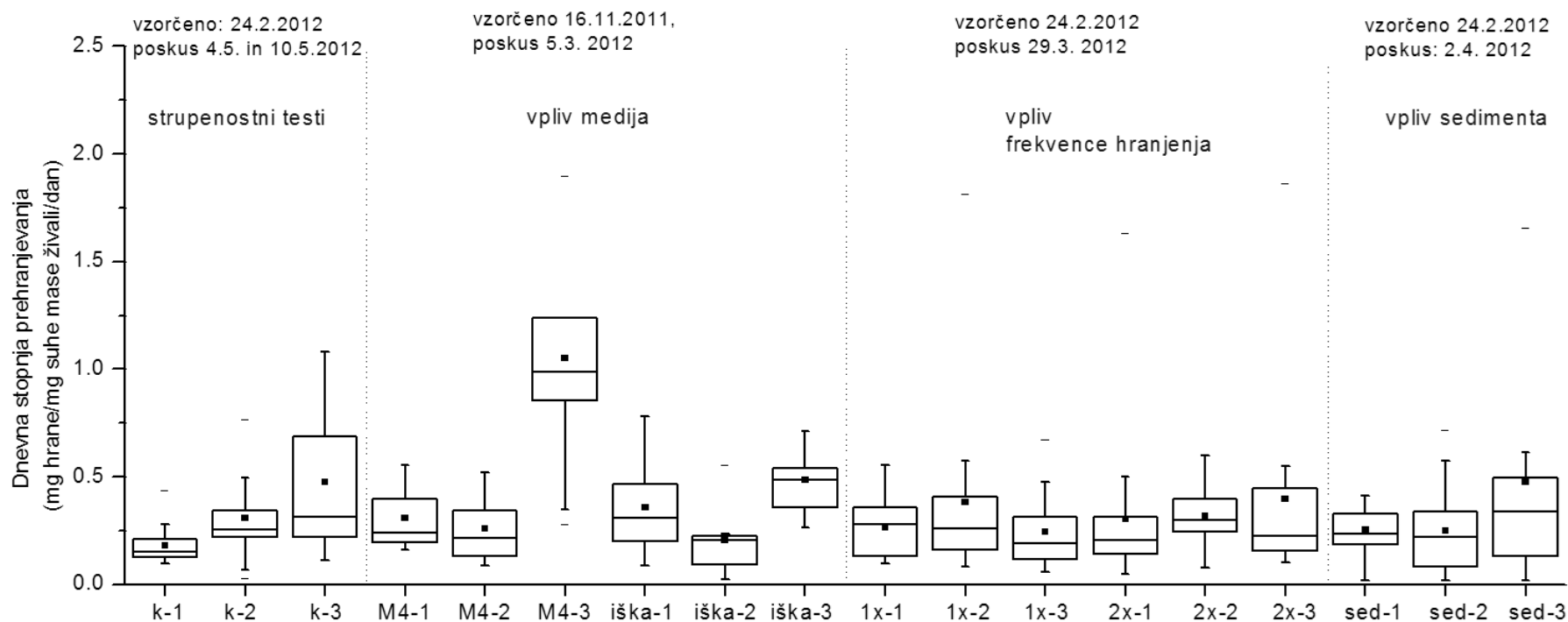
Nadaljevanje Priloge A: Razmere testov strupenosti z *A. aquaticus*, ki jih navajajo različni avtorji (viri so v oklepaju): (1): Bjelke, 2005; (2): Blockwell in sod., 1998; (3): Bloor in sod., 2005; (4): Bloor in sod., 2006; (5): Borgmann, 1996; (6): De Lange in sod., 2005; (7): Eimers in sod., 2002; (8): Hasu in sod., 2006; (9): Lukančič in sod., 2010; (10): Peeters in sod., 2002; (11): Prus, 1976; (12): Weltje in Oehlmann, 2006

TESTNI SISTEM						
število osebkov na testno posodo	individualno (1); (2); (8); (12)	6 (7)	10 (3); (8); (12)	25 (10)	30(3); (4)	100 (11)
menjava medija	delna menjava enkrat dnevno (8) ali tedensko (3); (4)	menjava medija enkrat tedensko (12)				
menjava hrane	ko jo osebki požrejo (10)	ko so diski listov požrti do 75 % (12)				
ostalo	prezračevanje (4); (7)	prehranjevanje (4) (12)	sediment (7); (10)	kroženje medija (1) (9)		
opazovani parametri	smrtnost (2); (3); (8); (9); (10)	stopnja prehranjevanja (1); (2); (10); (11)	količina iztrebkov (11)	rast osebkov (3); (4); (8); (10)	paraliza osebkov (9)	vedenje (10)

Priloga B: Potek dela v laboratoriju



Priloga C: Stopnja prehranjevanja testnih živali v vseh poskusih, prikazana po tednih. Primerjamo prehranjevanje kontrolne skupine v kroničnih testih strupenosti (K-1, K-2, K-3: stopnja prehranjevanja v kontrolni skupini kroničnih testov strupenosti prvi, drugi in tretji teden izpostavitve) ter prehranjevanje v optimizacijskih testih, in sicer glede na tip življenjskega prostora (M4-1, M4-2, M4-3: stopnja prehranjevanja v mediju M4 prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; Iška-1, Iška-2, Iška-3: stopnja prehranjevanja v mediju vode iz reke Iške prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; sed-1, sed-2, sed-3: stopnja prehranjevanja v testih s sedimentom, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve) ter glede na frekvenco menjave hrane (1X-1, 1X-2, 1X-3: menjava hrane enkrat tedensko, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve; 2X-1, 2X-2, 2X-3: menjava hrane dvakrat tedensko, prvi, drugi in tretji teden izpostavitve)



Peternel A. Optimizacija strupenostnih testov s sedimentnimi organizmi. Magistrsko delo. Ljubljana. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja PETERNEL

**OPTIMIZACIJA STRUPENOSTNIH TESTOV S
SEDIMENTNIMI ORGANIZMI**

Magistrsko delo

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana 2013