

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja ŠKET

**PREVERJANJE GENOTOKSIČNOSTI
HORMONSKEGA MOTILCA BISFENOL A PRED IN
PO OBDELAVI Z OZONACIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anja ŠKET

**PREVERJANJE GENOTOKSIČNOSTI HORMONSKEGA MOTILCA
BISFENOL A PRED IN PO OBDELAVI Z OZONACIJO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**GENOTOXICITY ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTOR
BISPHENOL A BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH
OZONATION**

M.Sc. THESIS
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo predstavlja zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja Šket

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 502:575(043.2)
KG	varstvo okolja/genotoksičnost/hormonski motilci/bisfenol A/ozonacija
AV	ŠKET, Anja, dipl. bioteh. (UN)
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	PREVERJANJE GENOTOKSIČNOSTI HORMONSKEGA MOTILCA BISFENOL A PRED IN PO OBDELAVI Z OZONACIJO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)
OP	XI, 53 str., 27 pregl., 10 sl., 3 pril., 91 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Bisfenol A je industrijska kemikalija, ki se uporablja v proizvodnji polikarbonatnih plastik in epoksidnih smol. V magistrskem delu smo preučevali genotoksičnost bisfenola A in njegovih razgradnih produktov po ozonaciji. Ozonacija je učinkovit postopek za odstranjevanje bisfenola A iz voda. Raztopinam bisfenola A (10 in 20 mg/L) pred in po ozonaciji ter ozonirani demineralizirani vodi smo preverjali genotoksičnost z alkalno verzijo kometnega testa <i>in vitro</i> ter <i>in vivo</i>. Kot testni organizem smo uporabili pražival <i>Tetrahymena thermophila</i>. Možne genotoksične učinke smo ocenili s kometnim parametrom OTM (rejni moment po Olivu). Pri kometnem testu <i>in vivo</i> nismo dokazali statistično značilnih razlik vrednosti OTM med negativno kontrolo in vzorci, pri relativnem OTM pa se je pokazala genotoksičnost vzorca raztopine bisfenola A (20 mg/L) po ozoniranju. Pri kometnem testu <i>in vitro</i> smo dokazali statistično značilne razlike. V vseh vzorcih smo izmerili statistično značilno povečano stopnjo poškodb DNA v primerjavi z negativno kontrolo, največjo pri vzorcu raztopine bisfenola A (20 mg/L) po ozonaciji. Rezultati kažejo, da je genotoksičnost razgradnih produktov bisfenola A nastalih po ozonaciji podobna oz. celo večja kot genotoksičnost bisfenola A. Poškodbe DNA smo zaznali tudi v vzorcu ozonirane vode brez bisfenola A. Postopek ozonacije odstrani bisfenol A, vendar voda ohrani genotoksični potencial zaradi razgradnih produktov in preostalega ozona.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 502:575(043.2)
CX environmental protection/genotoxicity/endocrine disruptors/bisphenol A/ozonation
AU ŠKET, Anja
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2015
TI GENOTOXICITY ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTOR BISPENOL A BEFORE AND AFTER TREATMENT WITH OZONATION
DT M. SC. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
NO XI, 53 p., 27 tab., 10 fig., 3 ann., 91 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Bisphenol A is an industrial chemical commonly used in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. In the master work we studied genotoxicity of bisphenol A and its degradation products after ozonation. Ozonation is an efficient process for removing bisphenol A from waters. We examined the genotoxicity of bisphenol A solutions (10 and 20 mg/L) before and after ozonation and of ozonated demineralized water. We used the alkaline *in vitro* and *in vivo* comet assay. As a test organism we used protozoa *Tetrahymena thermophila*. We assessed possible genotoxic effects with comet parameter OTM (Olive tail moment). Statistical significant differences between OTM of negative control and samples at the *in vivo* comet assay were not proven, relative OTM showed genotoxicity of bisphenol A solution (20 mg/L) after ozonation. At the *in vitro* comet assay were statistical significant differences. In all samples we measured statistical significant higher level of the DNA damage according to negative control, the biggest in the solution of bisphenol A (20 mg/L) after ozonation. The results show that genotoxicity of degradation products of bisphenol A after ozonation is similar or even higher than genotoxicity of bisphenol A. The DNA damage was also detected in the ozonated water without bisphenol A. The process of ozonation remove bisphenol A but the water keeps genotoxic potential due to degradation products and residual ozone.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	VIII
SIMBOLI IN OKRAJŠAVE	X
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 BPA KOT HORMONSKI MOTILEC	3
2.1.1 Estrogensko delovanje BPA.....	3
2.1.2 BPA v okolju	4
2.2 GENOTOKSIČNOST	5
2.2.1 Testi genotoksičnosti.....	5
2.2.2 Kometni test	6
2.2.2.1 Vrste kometnega testa	7
2.2.2.2 Vrste organizmov in celic, ki se lahko uporabljajo za kometni test.....	7
2.2.2.3 <i>Tetrahymena thermophila</i>	8
2.2.1 Genotoksičnost BPA	8
2.3 NAPREDNI OKSIDACIJSKI PROCESI ZA ODSTRANJEVANJE BPA.....	9
3 MATERIALI IN METODE.....	11
3.1 MATERIALI.....	11
3.1.1 Kultura <i>T. thermophila</i>	11
3.1.2 Gojišča	11
3.1.1 Vzorci vode in raztopin BPA	13

3.1.2	Raztopine za kometni test	13
3.1.3	Drugi materiali, uporabljeni pri kometnem testu	14
3.1.4	Ostali material.....	14
3.1.4.1	Aparature	14
3.1.4.2	Uporabljena steklovina in potrošni material	15
3.2	PRIPRAVA VZORCEV VODE IN RAZTOPIN BPA	15
3.2.1	Vzorci	15
3.2.2	Postopek ozonacije.....	16
3.2.3	Določanje koncentracije BPA	17
3.3	KOMETNI TEST	17
3.3.1	<i>T. thermophila</i>.....	17
3.3.2	Priprava celic	18
3.3.2.1	Štetje celic pod mikroskopom	18
3.3.2.2	Priprava celic za <i>in vitro</i> kometni test	18
3.3.2.3	Priprava celic za <i>in vivo</i> kometni test.....	18
3.3.2.4	Ugotavljanje primerne prilagojenega gojišča za kometni test <i>in vivo</i>	18
3.3.2.5	Izbira najprimernejšega prilagojenega gojišča	19
3.3.3	Preverjanje viabilnosti kulture za test <i>in vivo</i>	19
3.3.4	Priprava minigelov	19
3.3.5	Postopek kometnega testa	20
3.3.6	Barvanje z etidijevim bromidom.....	20
3.3.7	Odčitavanje rezultatov	20
3.4	STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	21
3.4.1	ANOVA – analiza variance.....	22
3.4.1.1	Enosmerna analiza variance	22
3.4.2	Levenov test.....	23
3.4.3	Post hoc primerjave	23
3.4.3.1	Test HSD	24
3.4.3.2	Duncanov test.....	24

4 REZULTATI	25
4.1 KOMETNI TEST <i>IN VIVO</i>	25
4.1.1 Viabilnost celic <i>T. thermophila</i> v prilagojenih gojiščih za test <i>in vivo</i>	25
4.1.2 Viabilnost kulture celic pred izvedbami kometnega testa <i>in vivo</i>	26
4.1.3 Rezultati kometnega testa <i>in vivo</i>	27
4.1.3.1 Rezultati statistične analize vrednosti OTM po kometnem testu <i>in vivo</i>	27
4.1.3.2 Rezultati statistične analize relativnega OTM po kometnem testu <i>in vivo</i>	27
4.1.4 Predstavitev rezultatov kometnega testa <i>in vivo</i>	29
4.2 KOMETNI TEST <i>IN VITRO</i>	32
4.2.1 Rezultati kometnega testa <i>in vitro</i>	32
4.2.1.1 Rezultati statistične analize vrednosti OTM po kometnem testu <i>in vitro</i>	32
4.2.1.2 Rezultati statistične analize relativnega OTM po kometnem testu <i>in vitro</i>	32
4.2.2 Predstavitev rezultatov kometnega testa <i>in vitro</i>	34
5 RAZPRAVA	37
6 SKLEPI	42
7 POVZETEK	43
8 VIRI	45
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava bogatega gojišča za kulturo <i>T. thermophila</i>	11
Preglednica 2: Sestava raztopine sulfatov	11
Preglednica 3: Sestava raztopine kloridov.....	12
Preglednica 4: Sestava prilagojenega gojišča 1	12
Preglednica 5: Sestava prilagojenega gojišča 2	12
Preglednica 6: Sestava revnega gojišča	12
Preglednica 7: Seznam vzorcev z oznakami.....	13
Preglednica 8: Sestava založne raztopine K-Na PBS	13
Preglednica 9: Sestava raztopine vodikovega peroksida (500 µM)	13
Preglednica 10: Sestava raztopine za alkalno lizo.....	14
Preglednica 11: Raztopina etidijevega bromida	14
Preglednica 12: Priprava agaroze v pufri PBS	14
Preglednica 13: Koncentracije BPA izmerjene na Kemijskem inštitutu z metodo HPLC ..	17
Preglednica 14: Sestava prilagojenih gojišč	19
Preglednica 15: Viabilnost kulture <i>T. thermophila</i> po 6 urah	25
Preglednica 16: Viabilnost kulture <i>T. thermophila</i> po 24 urah	25
Preglednica 17: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega testa <i>in vivo</i> (1. poskus).....	26
Preglednica 18: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega test <i>in vivo</i> (2. poskus).....	26
Preglednica 19: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega testa <i>in vivo</i> (3. poskus).....	26
Preglednica 20 : Rezultati Duncanovega testa (kometni test <i>in vivo</i>)	27
Preglednica 21 : Rezultati testa HSD (kometni test <i>in vivo</i>)	27
Preglednica 22: Rezultati Duncanovega testa (kometni test <i>in vivo</i>)	28
Preglednica 23: Osnovna statistika po izvedbi kometnega testa <i>in vivo</i>	31
Preglednica 24 : Rezultati testa HSD in Duncanovega testa (kometni test <i>in vitro</i>).....	32
Preglednica 25 : Rezultati testa HSD (kometni test <i>in vitro</i>)	33
Preglednica 26: Rezultati Duncanovega testa (kometni test <i>in vitro</i>)	33
Preglednica 27: Osnovna statistika pri izvedbi kometnega testa <i>in vitro</i>	36

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Strukturna formula BPA	3
Slika 2: Fotografija celic <i>Tetrahymena thermophila</i> v kometnem testu.	6

Slika 3: Glavni sestavni deli eksperimentalnega sistema preskusa ozonacije.....	16
Slika 4: Pogovorno okno programa za analizo slike Komet 5.0.	21
Slika 5: Vrednosti OTM posameznih ponovitev pri kometnem testu <i>in vivo</i>	29
Slika 6: Povprečni OTM posameznih vzorcev po treh poskusih kometnega testa <i>in vivo</i> ...30	
Slika 7: Relativni OTM vzorcev pri kometnem testu <i>in vivo</i>	31
Slika 8: Vrednosti OTM posameznih ponovitev pri kometnem testu <i>in vitro</i>	34
Slika 9: Povprečni OTM posameznih vzorcev po treh poskusih kometnega testa <i>in vitro</i> ..35	
Slika 10: Relativni OTM vzorcev pri kometnem testu <i>in vitro</i>	36

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

ACHN	celična linija humanega kolorektalnega raka
ANOVA	analiza variance
BPA	bisfenol A
dH ₂ O	deionizirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EFSA	evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
GC-MS/MS	plinska kromatografija s tandemsko masno spekrometrijo
H2AX	gen, ki kodira histon H2A (angl. H2A histone family, member X)
γ -H2AX	fosforiliran H2AX
HepG2	celična linija humanega hepatocelularnega karcinoma
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (angl. high pressure liquid chromatography)
HSD	resnična značilna razlika (angl. honestly significant difference)
IPCS	mednarodni program za kemijsko varnost (angl. International Programme on Chemical Safety)
LC- MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektrometrijo
LMP agarosa	agarosa z nižjo točko taljenja (angl. low melting point agarose)
LS174T	celična linija humanega adenokarcinoma črevesja
Mbp	mega bazni par
voda MQ	ultračista voda
NMP agarosa	agarosa z normalno točko taljenja (angl. normal melting point agarose)
OTM	repni moment po Olivu (angl. Olive tail moment)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)
PVC	polivinil klorid (angl. polyvinyl chloride)

SOS	mednarodni Morsejev znak za stisko
UV	ultravijoličen
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World health organization)

1 UVOD

Bisfenol A (BPA) je hormonski motilec, kar pomeni, da ima sposobnost povzročanja okvar endokrinega oz. hormonskega sistema organizmov. Pokazalo se je, da ima podobno kemijsko strukturo kot estrogen in kaže afiniteto do estrogenskih receptorjev (Umar in sod., 2013). BPA je kemikalija z velikim obsegom proizvodnje, saj so ga na primer leta 2003 proizvedli več kot dva milijona ton (Garoma in Matsumoto, 2009), njegove potrebe pa se vsako leto povečujejo. Tako je bilo leta 2012 proizvedenega 4,6 milijonov ton, do leta 2015 pa naj bi proizvodnja preseгла 5,4 milijone ton BPA (PRWeb, 2014). V velikem obsegu se uporablja pri proizvodnji polikarbonatnih plastik in epoksidnih smol (Staples in sod., 1998). Uporablja se v potrošniških proizvodih že več desetletij, vendar so pozornost javnosti spodbudila poročila več agencij, ki so se spraševale o njegovi varnosti, še posebej o njegovi uporabi v pakirnih materialih za hrano in pijačo (Garoma in Matsumoto, 2009). V okolje prihaja na različne načine in tako pristane v zraku, vodi in zemlji. Zaradi izpostavljenosti ljudi in živali temu hormonskemu motilcu lahko potencialno pride do različnih negativnih učinkov na njihovo zdravje.

Poleg potrebnih omejitev uporabe BPA, so potrebne tudi ustrezne metode za odstranjevanje BPA iz vod. Zaradi tega se preverja njihova učinkovitost pri odstranjevanju hormonskih motilcev ter hkrati toksičnost razgradnih produktov, ki nastanejo na koncu obdelave. V našem primeru so na Kemijskem inštitutu v Ljubljani obdelali raztopino BPA z ozonacijo. To je postopek s katerim mešanico zraka in ozona uvajamo v reaktor, napolnjen z želeno raztopino. Ozonacija se je v preteklosti izkazala kot učinkovit postopek za odstranjevanje BPA iz vodnih raztopin (Umar in sod., 2013). Znano pa je, da po ozonaciji nastanejo stranski oziroma razgradni produkti BPA (Deborde in sod, 2008; Gültekin in sod. 2009; Garoma in sod., 2010; Tay in sod., 2012), ki pa še niso popolnoma raziskani.

V našem eksperimentu smo s testom genotoksičnosti, in sicer z alkalno verzijo kometnega testa, preverjali genotoksičnost hormonskega motilca BPA pred in po obdelavi z ozonacijo. Kometni test *in vitro* in *in vivo* smo izvedli s testnim organizmom, migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*. Test smo prilagodili glede na eksperimentalne pogoje. Zanimalo nas je predvsem ali je bolj genotoksičen hormonski motilec BPA ali njegovi razgradni produkti po obdelavi s postopkom ozonacije.

1.1 NAMEN DELA

Hormonski motilec BPA je prisoten v našem okolju. Najdemo ga v površinskih vodah, podtalnici, odplakah ipd. Zaradi tega se iščejo metode, s katerimi bi ga lahko najučinkoviteje odstranili, hkrati pa ne bi povzročili nastanka enako ali celo bolj zdravju škodljivih spojin. Na Kemijskem inštitutu v Ljubljani so s postopkom ozonacije odstranjevali BPA iz deionizirane vode. Ugotovili so, da se je po postopku zmanjšala koncentracija BPA v raztopini. Njihovo delo smo nadaljevali s tem magistrskim delom. Naš namen je bil ugotoviti, kakšna je genotoksičnost raztopin BPA pred in po obdelavi z ozonacijo. Zanimalo nas je predvsem ali je bolj genotoksičen BPA ali pa njegovi razgradni produkti, ki nastanejo po obdelavi z ozonacijo. Genotoksičnost smo preverili z alkalno verzijo kometnega testa in testnim organizmom, migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*.

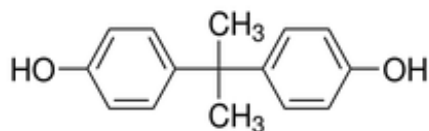
1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. S prilagojenim kometnim testom z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila* je možno potrditi ali ovreči genotoksične učinke hormonskega motilca BPA in njegovih razgradnih produktov.
2. Postopek ozonacije bo zmanjšal genotoksičnost modelne raztopine BPA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BPA KOT HORMONSKI MOTILEC

Hormonski motilec je eksogena substanca, ki spremeni funkcijo oz. funkcije hormonskega sistema in povzroči škodljive učinke na zdravje organizma, njegovih potomcev ali (sub)populacij. Škodljiv učinek je sprememba v morfologiji, fiziologiji, rasti, razvoju, razmnoževanju ali življenjski dobi organizma, sistema ali (sub)populacije, ki pripelje do okvare funkcionalnih sposobnosti, okvare zmožnosti izravnave dodatnega stresa ali do povečanja občutljivosti na druge vplive (EFSA Scientific Committee, 2013). Hormonski motilci lahko motijo proizvodnjo, sproščanje, metabolizem in eliminacijo naravnih hormonov ali pa naravne hormone oponašajo (Tabb in Blumberg, 2006).



Slika 1: Strukturna formula BPA

BPA je organska spojina, sestavljena iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom, na katerem sta pripeti dve metilni funkcionalni skupini (sl. 1). Najpogosteje se uporablja v proizvodnji plastičnih izdelkov iz polikarbonata in epoksidnih smol (Staples in sod., 1998). Epoksidne smole se uporabljajo kot lakirne prevleke površin, ki so v kontaktu s hrano, kot so pločevinke, kovinski pokrovi za kozarce, zaščitne prevleke in laki. Uporabljajo se tudi za dele avtomobilov, lepila ter v letalski in vesoljski industriji. Polikarbonatne plastike imajo visoko udarno trdnost, zdržljivost, transparentnost, odpornost na temperature v območju med $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in okrog $145\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter odpornost na različne kisline in olja. Zaradi tega se uporabljajo v proizvodnji kompaktnih diskov, avtomobilskih stekel, gospodinjskih aparatov, pakiranjih za hrano in plastenk (Kang in sod., 2006). BPA se uporablja tudi kot tesnilna masa v zobotehniki, njegovi halogenirani derivati pa se pogosto uporabljajo kot zaviralci gorenja za gradbene materiale, barve, plastične izdelke, vključno z epoksidnimi smolami, elektronska vezja in drugo elektronsko opremo.

2.1.1 Estrogensko delovanje BPA

BPA lahko deluje kot estrogen. Prvič so to aktivnost odkrili leta 1938 (Dodds in Lawson, 1938). Številne študije kažejo, da je BPA kemikalija z veliko višjim estrogenskim potencialom, kakor so predhodno poročale korporacije in regulatorne agencije (Mohapatra in sod., 2010). Njegovi učinki so specifični za vrsto celic (Wetherill in sod., 2007).

Estrogenski hormonski motilci, kot je BPA, so vključeni v metabolne motnje preko kompleksnih interakcij s hormonskimi receptorji, kot so estrogenski receptor, receptor za tiroidne hormone in glukokortikoidni receptor. Ti receptorji so pomembni za kontrolo adipogeneze, pridobivanja telesne mase in nivoja inzulina, čeprav osnovni mehanizmi še niso dobro raziskani (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Potencialna tveganja zaradi BPA vključujejo učinke na razmnoževanje in razvoj ter nevrokemične učinke in učinke na obnašanje (vom Saal in sod., 2005). Obstaja tudi povezava med visoko koncentracijo BPA v urinu in boleznimi srca (Melzer in sod., 2012). Povezuje se tudi nivo BPA v krvi z boleznimi jajčnikov in splavi (Takeuchi in sod., 2004; Sugiura-Ogasawara in sod., 2005). Porajajo se dvomi o možnosti prenosa raziskovalnih rezultatov iz živalskih modelov na ljudi. So pa Taylor in sod. (2011) odkrili, da je farmakokinetika BPA pri ženskah, opicah ženskega spola in miših zelo podobna in da je izpostavljenost ljudi večja kot je bilo predhodno ocenjeno. Zaradi potencialnega vpliva BPA na zdravje ljudi in živali je EFSA leta 2006 uveljavila maksimalni skupni dnevni vnos, ki znaša 0,050 mg BPA/kg telesne mase.

2.1.2 BPA v okolju

Naravne in sintetične hormonske motilce sprostijo v okolje ljudje, živali in industrija. Hormonski motilci pridejo v stik z zemljo, površinskimi vodami, sedimentom in podtalnico šele po obdelavi odpadnih vod v čistilnih napravah (Liu in sod., 2009). BPA so zaznali v odpadnih vodah in obdelanih odpadnih vodah, kakor tudi v odpadnem blatu čistilnih naprav (Körner in sod., 2000; Fürhacker in sod., 2000). V okolje se spošča tudi z izcednimi vodami odlagališč (preko hidrolize BPA iz plastičnih materialov) ali naravno razgradnjo polikarbonatnih plastik, zaradi zmerne vodotopnosti in nizkega parnega tlaka. BPA se uporablja v proizvodnji papirja s toplotno občutljivo plastjo. Zato so odpadne vode papirnic (izdelava papirja ali recikliranje) in izdelki iz recikliranega papirja, npr. toaletni papir, eden glavnih virov BPA v odpadnih vodah in odpadnem blatu (Fürhacker in sod., 2000; Rigol in sod., 2002). Z BPA je onesnažena tudi podtalnica v bližini kmetijskih in industrijskih območij (Latorre in sod., 2003). BPA se sprosti v okolje tudi z odvajanjem odpadnih vod, ki nastajajo pri sami proizvodnji BPA, s spiranjem iz potrošniških izdelkov, ki vsebujejo BPA, na odlagališčih nevarnih odpadkov, usedanje delcev ali prahu iz proizvodnje BPA, predelave, skladiščenja in izlitja v primeru nesreče. Študije opravljene v ZDA in po svetu poročajo o razširjenem pojavu BPA v okolju, vključno s površinskimi vodami, obdelano pitno vodo, deževnico, sedimentnimi vzorci iz rek, jezer in kanalov ter tkivi vodnih živali (Garoma in Matsumoto, 2009).

2.2 GENOTOKSIČNOST

Genotoksičnost je neželen učinek na genetski material (DNA) živih celic in na replikacijo celic, ki se izraža kot mutagen ali karcinogen dogodek (Hodgson, 2011). Snovi, ki imajo lastnost genotoksičnosti, so genotoksini. Genotoksin lahko povzroča mutacije v genih, stabilne kromosomske aberacije in spremembe v številu kromosomov (mutagen), sproži rakava obolenja (kancerogen), lahko pa povzroči napake v razvoju ploda (teratogen) (Definition of Genotoxin, 2013).

Človeški genom je konstantno izpostavljen snovem, ki poškodujejo DNA. Hoeijmakers klasificira tri glavne kategorije snovi ali mehanizmov, ki inducirajo poškodbe DNA: 1) okoljski dejavniki, kot je ultravijolična svetloba, ionizirajoče sevanje in številne genotoksične kemikalije, ki povzročajo spremembe v strukturi DNA, 2) proizvodi normalnega celičnega metabolizma, ki predstavljajo stalen vir poškodb, ki prizadenejo integriteto DNA, 3) nekatere kemične snovi, ki se vežejo na DNA in po navadi povzročijo spontani razpad DNA pri fizioloških pogojih. Ti predstavljajo različne mehanizme poškodb DNA in povzročijo mešan spekter poškodb DNA, ki so na splošno škodljive za človeški genom in lahko vodijo do razvoja raka (Liao in sod., 2009).

2.2.1 Testi genotoksičnosti

Številni *in vitro* (izolirane celice) in *in vivo* (organizem) testi se uporabljajo za spremljanje genotoksičnega potenciala kemikalij (Collins in sod., 2008).

Salmonella typhimurium test (*Salmonella* test; Ames-ov test) je široko sprejet bakterijski hitri test za identifikacijo spojin, ki lahko povzročajo genetske poškodbe in vodijo do genskih mutacij. Pri testu uporabljajo selekcionirane seve bakterije *Salmonella* z obstoječimi mutacijami. Zaradi teh mutacij bakterija ni sposobna sinteze aminokislina histidina, ki je potreben za njeno rast in tvorbo kolonij. Nove mutacije na mestih že obstoječih mutacij, ali blizu njih lahko obnovijo funkcijo gena in celicam omogočijo sintezo histidina. Te ponovno mutirane celice lahko nato rastejo in tvorijo kolonije (Mortelmans in Zeiger, 2000).

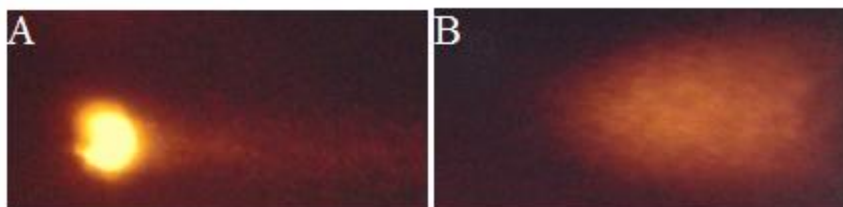
Naslednji primer je mikronukleus test, ki je hitra in preprosta tehnika za analizo pojavljanja mikrojedrov med interfazo (Matsumoto in sod., 2006). *In vitro* mikronukleus test je privlačno orodje za testiranje genotoksičnosti, ker je enostaven in se lahko uporablja pri različnih vrstah celic. Dva osnovna mehanizma vodita do tvorbe mikronukleusov, to so prelomi kromosomov in motnje ločevanja kromosomov v mitozni. Zaradi tega je za dokazovanje mikronukleusov obvezna mitotska in mejotska delitev v prisotnosti testirane spojine (Decordier in Kirsch-Volders, 2006).

Z SOS/*umu* testom ugotavljajo sposobnost testirane snovi ali vzorca povzročanja poškodb DNA. Test temelji na spremljanju indukcije SOS odziva kot posledice poškodb DNA. Plazmid (pSK1002), ki nosi zlit gen *umuC'*-*lacZ*, vključijo v bakterijo *Salmonella typhimurium* TA1535. Sev TA1535/pSK1002 nam omogoča, da spremljamo nivoje izražanja *umu* operona z merjenjem β -galaktozidazne aktivnosti v celicah (Oda in sod., 1985).

Nedavno so razvili nov test genotoksičnosti, ki temelji na fosforilaciji histona H2AX. Uporabili so celično linijo humanega amniona ter celice pljuč kitajskega hrčka (Zhou in sod., 2006). Test temelji na odkritju, da prelomi dvojne verige inducirajo fosforilacijo histona H2AX v γ -H2AX. Tako dogodek fosforilacije H2AX odraža zgodnjo in občutljivo reakcijo na genotoksični učinek, do česar pride zaradi različnega tipa poškodb DNA (npr. AP mesta, prelomi DNA verig, poškodbe replikacije ali transkripcije DNA). γ -H2AX test se je izkazal za občutljivejšega kot je kometni test (Audebert in sod., 2011).

2.2.2 Kometni test

Osnovna tehnika kometnega testa kot testa za dokazovanje genotoksičnih učinkov je bila opisana leta 1984 (Ostling in Johanson, 1984). Ostling in Johanson (1984) sta bila namreč prva, ki sta kvantificirala poškodbe DNA v sesalčjih celicah (po izpostavitvi žarkom γ) z uporabo tehnike mikrogelske elektroforeze, znane kot gelska elektroforeza posameznih celic oz. kometni test. Kometni test omogoča občutljivo zaznavanje poškodb DNA na ravni posameznih celic. Pri tej mikrogelski elektroforetski tehniki majhno število celic suspendiramo v tankem agaroznem gelu na mikroskopskem steklu. Celice nato liziramo z detergentom in obdelamo z visoko koncentracijo soli. S tem se tvorijo nukleoidi, ki vsebujejo DNA brez nukleosomov, vendar še vseeno superzvito DNA. Po elektroforezi in barvanju s fluorescentnim DNA barvilom, celice s povečano poškodbo DNA prikažejo povečano migracijo kromosomalne DNA iz jedra proti anodi, kar spominja na obliko komete (Speit in Hartman, 2005).



Slika 2: Fotografija celic *Tetrahymena thermophila* v kometnem testu. A-negativna kontrola, B-pozitivna kontrola (foto: Šket A., 2013)

2.2.2.1 Vrste kometnega testa

Originalni kometni test je nevtralni test (Ostling and Johanson, 1984), kjer pri nevtralnih pogojih zaznamo prelome dvojne verige DNA. Singh in sod. (1988) so spremenili protokol z vključitvijo razvijanja DNA pri alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13$). Pri tej vrednosti pH je večja migracija DNA povezana s povečano stopnjo enoverižnih prelomov, enoverižnih prelomov z nepopolnim izrezom popravljalnih mest in alkalno labilnih mest. Drugo alkalno verzijo testa so uvedli Olive in sod. (1990). Elektroforeza se izvaja pri vrednosti pH okoli 12,3. Collins in sod. (1997) so modificirali kometni test, s čimer se je povečala občutljivost, specifičnost in razpon. Po lizi celic v gelu so dodali poškodbam specifične popravljalne endonukleaze, ki povzročajo prelome na mestu poškodb. Med manj pogoste različice spada komet-FISH. Tehnika komet-FISH je uporabno orodje za detekcijo celokupnih in regijsko-specifičnih poškodb DNA in popravil na istih vzorcih. Združuje dve dobro uveljavljeni metodi, kometni test in fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH), ki se uporabi po razvitju verig in elektroforezi (Glei in sod., 2009). Kometni test omogoča ločevanje fragmentirane od nefragmentirane DNA, FISH pa pomaga detektirati specifično označena želena zaporedja DNA, vključno s celimi kromosomi (Liehr in sod., 2004). Razširjena verzija kometnega testa lahko vključuje tudi uporabo monoklonskih protiteles, označenih s fluorescentnim barvilom, ki detektirajo specifične poškodbe (Sauavigo in sod., 1998).

2.2.2.2 Vrste organizmov in celic, ki se lahko uporabljajo za kometni test

Za kometni test se lahko uporabljajo različni organizmi. Teoretično se lahko pri kometnem testu uporabljajo katere koli evkariontske celice, vendar se izmed humanih celic najpogosteje uporabljajo levkociti, predvsem limfociti (Vijayalaxmi in sod., 1993). Sesalčki levkociti in živalske celične linije so še danes največ v uporabi. Pri genotoksičnih raziskavah se od humanih celic uporabljajo tudi epitelne celice, reproduktivne celice, črevesne celice, neonatalni fibroblasti (Rojas in sod., 1999). Med praživalmi se veliko uporablja migetalkar *Tetrahymena thermophila* (Lah in sod., 2004). Miloshev in sod. (2002) so začeli uporabljati tudi kvasovke, in sicer kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, čeprav imajo ti organizmi manjšo količino DNA na celico kot višji evkarionti. Tudi živalski modeli se že dolgo uporabljajo za ocenjevanje toksičnosti kemikalij oz. končnih produktov. Med nevretenčarji se uporabljajo školjke, deževniki, vinska mušica *Drosophila* in ostali. V študije vretenčarjev, kjer se uporablja kometni test, so vključene ribe, dvoživke, ptiči in sesalci (miši, podgane, človek). Za ocenjevanje *in vivo* in *in vitro* genotoksičnosti kemikalij se uporabljajo celice (kri, škrge, ledvica, jetra) različnih rib, paglavcev in odraslih žab, pa tudi glodavcev. Tudi rastline nam zagotavljajo informacije o širokem spektru genskih poškodb, vključno z genskimi mutacijami in kromosomskimi

abercijami. Kometni test se izvaja s koreninami, listi in poganjki rastlin. Izmed višjih rastlin se uporabljata bob (*Vicia faba*) in tobak (*Nicotiana tabacum*). V uporabi so tudi glive: *Schizosaccharomyces pombe*, *Sordaria macrospora* in alge: enocelična zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis*, *Rhodomonas* sp.(Cryptophyta) (Dhawan in sod., 2009). Singh in sod. (1999) so izvedli prvo raziskavo ocenitve genetske poškodbe bakterije z uporabo kometnega testa. Uporabili so bakterijo *Escherichia coli* JM101.

2.2.2.3 *Tetrahymena thermophila*

Migetalkar *Tetrahymena thermophila* je enocelična pražival, ki se pogosto uporablja za genetske študije zaradi njenega dobro okarakteriziranega in v celoti sekvenciranega genoma (Nicolau in sod., 2001). Posebnost praživali *T. thermophila* je ta, da ima somatsko in zarodno jedro v isti celici. V kometnem testu uporabljamo enojedro linijo (brez mikrojedro) migetalkarja *Tetrahymena thermophila*, ki se razmnožuje samo z delitvijo in ne tudi spolno. Zaradi navedenega je bila potrjena kot modelni organizem za ocenjevanje DNA poškodb z uporabo postopka kometnega testa, standardiziranega z znanimi mutageni, kot so fenol, vodikov peroksid in formaldehid (Lah in sod., 2004). Pražival *T. thermophila* je pokrita z migetalkami in ima korteks, zelo kompleksno štirislojno membrano (Asai in Forney, 2000), ki lahko ovira potovanje DNA med elektroforezo. Ima tudi relativno velik genom, približno 220 Mbp (Asai in Forney, 2000), ki je podobne velikosti genoma *Drosophila* in okoli 10 % genoma človeka. Povprečni premer jedra praživali *T. thermophila* je približno 15 µm (Lah in sod., 2004).

2.2.1 Genotoksičnost BPA

Objavljeni rezultati o BPA večinoma nakazujejo na njegovo genotoksičnost, čeprav se pojavljajo tudi rezultati o njegovi neškodljivosti. BPA inducira morfološko transformacijo, anevplodijo, tvorbo DNA aduktov, zamenjave sestrskih kromatid, kromosomske aberacije v gojenih sesalskih celicah (Tsutsui in sod., 1998; Tayama in sod., 2008). BPA ni induciral značilnega povečanja prelomov verig DNA v celični liniji humanega hepatocelularnega karcinoma (HepG2) po štirih urah, so se pa povečali prelomi po 24-urni izpostavitvi (Fic in sod., 2013). Naik in Vijayalaxmi (2009) sta ugotovila, da se genotoksični učinek BPA v celicah kostnega mozga albino miši Swiss pozna v obliki akromatskih lezij in c-mitotskih učinkov, ne inducira pa konvencionalnih kromosomskih aberacij in mikronukleusa. BPA je povzročil nastanek DNA aduktov pri DNA telečjega timusa ter tudi v mišjih jetrih in celicah mlečnih žlez po zaužitju pitne vode z dodanim BPA (Izzotti in sod., 2009). Dobrzyńska in sod. (2013) so potrdili mutageno sposobnost BPA. Po izpostavitvi se je zmanjšalo število in kvaliteta spermijev, BPA je induciral prelome verig DNA v limfocitih in celicah vranice, ledvic, pljuč ter zarodnih celicah. BPA je lahko genotoksičen *in vivo*

tudi za podgane, čeprav verjetno ni tako kritičen pri nizkih odmerkih (Ulutaš in sod., 2011). Izpostavljenost podgan BPA za šest dni vodi do značilnega povečanja klastogene aktivnosti v celicah kostnega mozga in do fragmentacije DNA v krvnih limfocitih. Negativni rezultati Ames testa pa kažejo na to, da je BPA klastogen in ne mutagen. Možno je tudi, da je lahko oksidativni stres eden izmed mehanizmov za genotoksično aktivnost BPA (Tiwari in sod., 2012). Izpostavitve BPA lahko vodi do značilnega povečanja poškodb DNA spermatocitov podgan ter lahko spremeni relativni delež zarodnih celic v različnih razvojnih fazah (Wu in sod., 2013). BPA je lahko genotoksičen za sladkovodnega raka *Daphnia magna* in komarja *Chironomus riparius* (Park in Choi, 2009). Lee in sod. (2003) so opazili genotoksičnost BPA z uporabo kometnega testa v celicah mišjega limfoma, vendar so zaključili, da je bil učinek lažno pozitiven zaradi celične smrti. Pri Iso in sod. (2006) so bili odmerki BPA genotoksični v celicah iz raka dojke (MCF-7), niso pa bili citotoksični, razen možnosti, da je do genotoksičnosti prišlo zaradi citotoksičnosti. Negenotoksičnost BPA so dokazali tudi Ibuki in sod. (2008), saj ta ni povzročil fosforilacije histona H2AX. Audebert in sod. (2011) so preučevali sposobnost humanih celic treh različnih linij biotransformacije BPA, s poudarkom na citotoksičnosti ter genotoksičnosti in ugotovili, da BPA ni bil genotoksičen

Glede na te podatke je potrebna nadaljnja ocena genotoksičnosti bisfenolov, da bi bolje razumeli njihove neželene učinke na zdravje ljudi. Veliko kemikalij je toksičnih samo po bioaktivacijskih procesih, ki vodijo do tvorbe reaktivnih metabolitov (ali intermediatov). Biotransformacijski procesi, ki lahko proizvajajo metabolite ali reaktivne intermediate, močno variirajo v njihovem izražanju med vrstami, kakor tudi med celičnimi linijami iz različnih organov. Informacije o metabolnih značilnostih humanih intestinalnih celic so zanimive, ker so prebavila prvo tarčno tkivo za onesnažila v hrani, kot je npr. BPA (Audebert in sod., 2011).

2.3 NAPREDNI OKSIDACIJSKI PROCESI ZA ODSTRANJEVANJE BPA

BPA se ne odstrani iz odpadnih vod s konvencionalnimi procesi obdelave na bioloških čistilnih napravah. Nekateri pogosto uporabljeni pristopi obdelave, kot je adsorpcija z aktiviranim ogljikom, so omejeni zaradi nizke hidrofobnosti BPA, ki omejuje njegovo adsorpcijo (Choi in sod., 2006). BPA ima zelo nizko Henryjevo konstanto, kar pomeni, da je slabo hlapen, manj kot voda (Staples in sod., 1998). Izpihovanje z zrakom se tako ne bi izvajalo enostavno, kajti razmerje zrak-voda bi moralo biti zelo visoko za učinkovito odstranjevanje BPA, s čimer bi se obdelava podražila (Garoma in Matsumoto, 2009). Zaradi tega naj bi bili napredni oksidacijski procesi, kot so katalitska mokra oksidacija,

heterogena fotokataliza, tehnologije na osnovi ozona in ultrazvočna oksidacija, primerne alternative za razgradnjo BPA v vodi in odpadnih vodah (Gültekin in Ince, 2007).

V preteklosti se je izkazalo, da je ozonacija učinkovita za oksidacijo fenola (Wu in sod., 2000), p-klorofenola (Andreozzi in Marotta, 1999), ftalata (Legube in sod., 1983) in drugih organskih onesnažil. Zaradi tega se povečuje preučevanje uporabe ozona za obdelavo vode in odpadne vode. Ozonacija naj bi zmanjšala estrogensko aktivnost BPA (Bertranza in sod., 2010). Je eden najpogosteje uporabljenih naprednih oksidacijskih procesov v velikem merilu za obdelavo vode in odpadne vode. Pri ozonaciji se razgradnja tarčne spojine začne z direktno reakcijo z molekularnim ozonom in hidroksilnim radikalom ($\bullet\text{OH}$), ki nastane pri razgradnji molekularnega ozona. V čisti vodi molekularni ozon reagira s hidroksidnim ionom (OH^-), kar vodi do nastanka radikalov, ki sprožijo verigo reakcij s tvorbo hidroksilnih radikalov ($\bullet\text{OH}$) (Stahelin in Hoigne, 1982). Pri ozonaciji nastanejo spojine z manjšo molekulsko maso, kar olajša biorazgradljivost na tak način obdelane vode (Umar in sod., 2013). Ozonacija je v primerjavi z drugimi naprednimi oksidacijskimi procesi energijsko in cenovno bolj učinkovita kot procesi na osnovi UV, kot je npr. $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Rosendfeldt in sod., 2006).

Za ozonacijo je dokazano, da je učinkovita pri razgradnji BPA tako v modelni vodi kot tudi v odpadni vodi, čeprav se večina literature osredotoča na obnašanje BPA pri veliko višjih koncentracijah kot pa jih lahko najdemo v naravi. V raziskavah se uporablja široko območje začetnih koncentracij BPA v vzorcih vode, in sicer od 0,09 ng/mL do 91 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Zaradi velikih razlik v koncentracijah BPA so različni tudi ozonacijski časi (od 2 sekund do 80 minut), pri čemer se doseže 70-100 % učinkovitost razgradnje BPA (Umar in sod., 2013). Garoma in Matsumoto (2009) sta opazila, da se stopnja odstranitve BPA iz vodnih raztopin linearno povečuje z dozo ozona. Višanje vrednosti pH iz 2,0 na 7,0 izboljša odstranjevanje BPA, saj ozon pri nizkih vrednostih pH počasneje tvori proste radikale (Stahelin in Hoigne, 1982). Čeprav je učinke različnih delovnih parametrov ozonacije (čas, pH...) obravnavalo že mnogo raziskovalcev, obstaja osnovno pomanjkanje procesne optimizacije (Umar in sod., 2013).

S pomočjo ozonacije so iz raztopine BPA učinkovito odstranili ta hormonski motilec tudi na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Podobno, kakor v večini predhodnih raziskav, niso preverjali genotoksičnosti BPA pred ozonacijo in njegovih razgradnih produktov po opravljenem postopku ozonacije. Genotoksičnost smo zato preverili mi s kometnim testom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kultura *T. thermophila*

V kometnem testu smo uporabljali kulturo migetalkarja *T. thermophila* brez mikro jeder. Pridobili smo jo iz Microbiotest (Deinze, Belgium) kot del seta Protox FTM. Kulturo smo gojili v 50 mL bogatega gojišča za praživali (Schultz, 1997) pri 30 °C. Sestava gojišča je opisana v preglednicah 1, 2 in 3.

3.1.2 Gojišča

Bogato gojišče (pregl. 1) smo uporabljali za gojenje celic *T. thermophila*. Po odtehtanju in odmerjanju sestavin smo vse skupaj premešali in uravnali vrednost pH na 7,35. Nato smo po 50 mL gojišča nalili v serumske stekleničke in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Sestava bogatega gojišča je podana v preglednicah 1, 2 in 3.

Preglednica 1: Sestava bogatega gojišča za kulturo *T. thermophila*

Sestavina	Koncentracija
Bakteriološki pepton (Biolife, 4122592)	5 g/L
D-glukoza (Kemika, 0705007)	5 g/L
Kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202)	1 g/L
Tris baza (Merck, 648310)	1,2114 g/L
Raztopina kloridov	10 mL/L
Raztopina sulfatov	10 mL/L
dH ₂ O	do 1 L

*Vrednost pH popravimo na 7,35.

Preglednica 2: Sestava raztopine sulfatov

Sestavina	Koncentracija
MgSO ₄ x 7H ₂ O	10 g/L
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) x 6H ₂ O	2,5 g/L
MnCl ₂ x 6H ₂ O	0,05 g/L
ZnCl ₂	0,005 g/L
H ₂ O	1 L

Preglednica 3: Sestava raztopine kloridov

Sestavina	Koncentracija
CaCl ₂ x 2H ₂ O	5 g/L
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,5 g/L
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,125 g/L
H ₂ O	1 L

Prilagojena gojišča smo uporabljali za inkubacijo celic *T. thermophila* z vzorci, ki smo jih pozneje uporabili v *in vivo* kometnem testu. Gojiščem smo uravnali vrednost pH na 7,35 in jih avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Sestava prilagojenih gojišč je opisana v preglednicah 4, 5 in 6.

Preglednica 4: Sestava prilagojenega gojišča 1

Sestavina	Koncentracija
Tris baza (Merck, 648310)	1,211 g/L
D-glukoza (Kemika, 0705007)	2 g/L
Sulfati	10 mL/L
dH ₂ O	do 1 L

*Vrednost pH popravimo na 7,35.

Preglednica 5: Sestava prilagojenega gojišča 2

Sestavina	Koncentracija
Tris baza (Merck, 648310)	1,211 g
D-glukoza (Kemika, 0705007)	2 g
Sulfati	10 mL
Vodovodna voda	do 1000 mL

*Vrednost pH popravimo na 7,35.

Preglednica 6: Sestava revnega gojišča

Sestavina	Koncentracija
Tris baza (Merck, 648310)	1,2114 g
D-glukoza (Kemika, 0705007)	5 g
Kloridi	10 mL
Sulfati	10 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

*Vrednost pH popravimo na 7,35.

3.1.1 Vzorci vode in raztopin BPA

Vzorci vode in raztopin BPA (pregl. 7) smo pridobili s Kemijskega inštituta (Ljubljana).

Preglednica 7: Seznam vzorcev z oznakami

Oznaka vzorca	Vzorec	Postopek obdelave
BPA 10	Raztopina 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi	Pred ozoniranjem
BPA 20	Raztopina 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi	Pred ozoniranjem
O3-S	Demineralizirana voda	Po ozoniranju
O3-BPA 10	Raztopina 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi	Po ozoniranju
O3-BPA 20	Raztopina 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi	Po ozoniranju

3.1.2 Raztopine za kometni test

Pri kometnem testu smo uporabili naslednje raztopine (od pregl. 8 do pregl. 11):

Preglednica 8: Sestava založne raztopine K-Na PBS

Sestavina	Koncentracija
NaCl	80 g/L
KCl	2 g/L
KH ₂ PO ₄ (ali 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	2 g/L
dH ₂ O	1 L

*Vrednost pH popravimo na 7,2-7,4 in shranjujemo na sobni temperaturi (sicer kristalizira).

Preglednica 9: Sestava raztopine vodikovega peroksida (500 µM)

Sestavina	Količina
Založni H ₂ O ₂ (30% = 30 g H ₂ O ₂ v 100 g H ₂ O)	5,7 µl
Delovni K-Na PBS	100 mL

Preglednica 10: Sestava raztopine za alkalno lizo

Sestavina	Koncentracija
NaOH	1,23 g/L
NaCl	70,1 g/L
N-laurilsarkozinat	1 g/L
Triton X 100	0,5 mL
dH ₂ O	do 1 L

*Raztopina mora biti vedno sveža (stara je lahko največ 1 teden). Shranjujemo jo v hladilniku.

Pripravili smo 2 L elektroforetskega pufra (30 mM NaOH, 2 mM EDTA), za nevtralizacijo pa uporabili 0,4 M puffer Tris-HCl. Hranili smo ju v hladilniku.

Preglednica 11: Raztopina etidijevega bromida

Sestavina	Količina
Delovna raztopina K-Na PBS	3 mL
Založna raztopina etidijevega bromida	30 µL

*Shranjujemo v hladilniku.

3.1.3 Drugi materiali, uporabljeni pri kometnem testu

Za pripravo minigelov s tremi sloji gela, smo potrebovali naslednje vrste in koncentracije agaroze:

Preglednica 12: Priprava agaroze v pufu PBS

	Vrsta agaroze	Koncentracija (g/L)
1.sloj	NMP (Sigma, A9539)	10
2.sloj	NMP (Sigma, A9539)	6
3.sloj	LMP	7

3.1.4 Ostali material

3.1.4.1 Aparature

Pri delu smo uporabili naslednje aparature:

- tehtnica
- pH meter
- avtoklav
- vodna kopel
- mikrovalovna pečica
- računalnik

- epifluorescentni mikroskop
- svetlobni mikroskop
- kamera
- hladilnik
- aparatura za elektroforezo
- centrifuga
- magnetno mešalo
- avtomatske pipete
- brezprašna komora
- inkubator za *T.thermophila*

3.1.4.2 Uporabljena steklovina in potrošni material

Pri delu smo uporabili še:

- objektna stekelca
- obrušena objektna stekelca
- centrifugirke
- čaše
- pinceta
- plastične posodice
- erlenmajerice
- steklenice
- kapalka
- Neubauerjeva števna komora
- aluminijasta folija
- papirnate brisače
- pladenj
- rokavice
- magneti
- merilni valji
- mikrocentrifugirke
- nastavki za avtomatske pipete
- steklene petrijevke
- plinski gorilnik

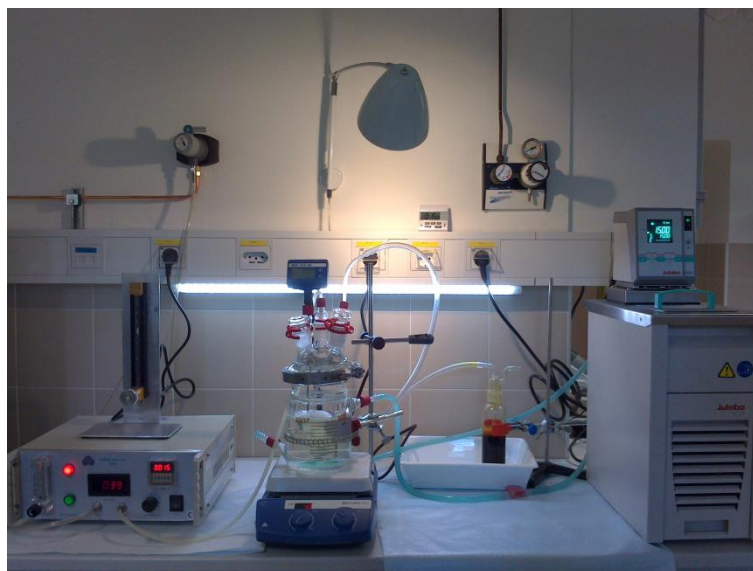
3.2 PRIPRAVA VZORCEV VODE IN RAZTOPIN BPA

3.2.1 Vzorci

Vzorci smo pridobili s Kemijskega inštituta (Ljubljana, Slovenija) in jih v času izvajanja testa hranili v hladilniku. Vzorci so bili naslednji: demineralizirana voda po ozoniranju

(O3-S), raztopina 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred ozoniranjem (BPA 10) in po ozoniranju (O3-BPA 10) ter raztopina 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred ozoniranjem (BPA 20) in po ozoniranju (O3-BPA 20).

3.2.2 Postopek ozonacije



Slika 3: Glavni sestavni deli eksperimentalnega sistema preskusa ozonacije. Na levi strani fotografije je generator ozona, na sredini stoji reaktor; poleg je past za odstranjevanje presežnega ozona, na desni je termostat (foto: Kemijski inštitut, 2014).

Glavni sestavni deli eksperimentalnega sistema, v katerem so izvajali postopek ozonacije, so bili: generator ozona, pol-šaržni reaktor in past za odstranjevanje presežnega ozona. Ozon so proizvajali v ozonatorju (generator ozona) tipa A2ZS-4GLAB M z zračnim hlajenjem. Na osnovi predhodnih preskusov so se odločili, da bodo v preskusih uporabili mešanico zraka in ozona (10 vol. %) ter s pretokom plinske mešanice 60 L/h. Mešanico ozona in zraka so s pomočjo perforiranega diska uvajali na dno litrskega pol-šaržnega reaktorja iz Pyrex™ stekla. Zraven je bila tudi past za odstranjevanje presežnega ozona. Reaktor je bil opremljen s hladilnim plaščem povezanim s termostatom (Julabo, model FP 25), kar je zagotavljalo stalno temperaturo 15 °C, ki so jo določili kot optimalno v predhodnih preskusih. Reaktor so napolnili s 0,5 L raztopine BPA. Koncentraciji BPA v demineralizirani vodi sta bili 10 mg/L oziroma 20 mg/L. Poleg raztopine BPA so pri istih eksperimentalnih pogojih ozonirali tudi demineralizirano vodo (vzorec O3-S). Postopek ozonacije je trajal dve uri (Kemijski inštitut).

3.2.3 Določanje koncentracije BPA

Med ozonacijo so v različnih časovnih intervalih s pipeto odvzemali iz reaktorja po 2 mL raztopine, ki so jo uporabili za določanje koncentracije BPA na sistemu HPLC (Kemijski inštitut).

Preglednica 13 kaže izmerjene koncentracije BPA v vzorcih. Vzorec O3-S, ki predstavlja demineralizirano vodo po ozoniranju, ne vsebuje BPA. Zaradi tega je bila izmerjena koncentracija BPA pod mejo zaznavnosti. Raztopini BPA v demineralizirani vodi s koncentracijo 10 mg/L (BPA 10) so izmerili 9,90 mg/L, raztopini BPA v demineralizirani vodi s koncentracijo 20 mg/L (BPA 20) pa 19,10 mg/L. Raztopini 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi se je po obdelavi v poskusu ozonacije koncentracija BPA zmanjšala pod mejo zaznavnosti. Po ozonaciji raztopine 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi se je koncentracija hormonskega motilca zmanjšala na 0,36 mg/L.

Preglednica 13: Koncentracije BPA izmerjene na Kemijskem inštitutu z metodo HPLC

Oznaka vzorca	Vzorci in postopek obdelave	Končna konc. BPA (mg/L)
BPA 10	Raztopina 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred ozoniranjem	9,90 mg/L
BPA 20	Raztopina 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred ozoniranjem	19,10 mg/L
O3-S	Demineralizirana voda po ozoniranju	Pod mejo zaznavnosti
O3-BPA 10	Raztopina 10 mg/L BPA obdelana v poskusu ozonacije	Pod mejo zaznavnosti
O3-BPA 20	Raztopina 20 mg/L BPA obdelana v poskusu ozonacije	0,36 mg/L

3.3 KOMETNI TEST

3.3.1 *T. thermophila*

V kometnem testu smo uporabljali kulturo migetalkarja *T. thermophila* brez mikrojedr. Pridobili smo jo iz Microbiotest (Deinze, Belgium) kot del seta Prottox FTM. Celice kulture smo gojili v 50 mL bogatega gojišča za praživali (Schultz, 1997) pri 30 °C. Sestava gojišča je podana v preglednicah 1, 2 in 3.

3.3.2 Priprava celic

3.3.2.1 Štetje celic pod mikroskopom

Po zgostitvi oz. centrifugiranju razrasle kulture, je bilo potrebno prešteti celice pod mikroskopom, da smo pozneje imeli primerno koncentracijo celic v 3. sloju gela. Primerna koncentracija je okoli $1,4 \times 10^5$ celic/mL. Za štetje celic smo uporabili Neubauerjevo števno komorico.

3.3.2.2 Priprava celic za *in vitro* kometni test

Za kometni test *in vitro* smo precepili tridnevno kulturo v sveže bogato gojišče in jo inkubirali pri 30 °C 24 ur. Nato smo naslednja dva dni vsak dan precepili 1000 µL kulture na 50 mL svežega bogatega gojišča. Kulturo smo shranjevali v temi pri 30 °C. Zadnjo kulturo smo prelili v 50 mL centrifugirko in centrifugirali 3 minute pri 300 X g in 25 °C. Supernatant smo odlili, celice pa do uporabe hranili v temi na ledu.

3.3.2.3 Priprava celic za *in vivo* kometni test

Pri testu *in vivo* smo tridnevno kulturo nacepili v sveže bogato gojišče in jo inkubirali pri 30 °C 48 ur (Lindič, 2007). V 20 mL prilagojenega gojišča z vzorčnimi raztopinami smo nacepili 2000 µL 48-urne kulture in jo inkubirali 6 ur pri 30 °C v temi. Celice kulture smo po 6-urni inkubaciji koncentrirali s centrifugiranjem (3 minute pri 300 X g in 25 °C). Do uporabe smo jih hranili v temi na ledu.

3.3.2.4 Ugotavljanje primerne prilagojenega gojišča za kometni test *in vivo*

Pri kometnem testu *in vivo* moramo celice testnega organizma izpostaviti vzorcem pred vključitvijo v gel. Ker lahko reagirajo sestavine bogatega gojišča s sestavinami vzorca, smo morali pripraviti primerno prilagojeno gojišče. To naj bi bilo podobno bogatemu gojišču (kar predstavlja naravno okolje migetalkarja *T. thermophila*), hkrati pa bi vsebovalo čim manj sestavin, ki bi lahko bile moteč dejavnik.

Pri ugotavljanju primerne prilagojenega gojišča za kulturo *T. thermophila* smo preiskusili tri različna gojišča. Celice smo gojili 24 ur in viabilnost preverili po 6 in 24 urah, kar nam je omogočilo določitev primerne dolžine inkubacije celic.

Preglednica 14: Sestava prilagojenih gojišč

Sestavine	Prilagojeno gojišče 1	Prilagojeno gojišče 2	Revno gojišče
Tris baza		1,211 g/L	
D-glukoza	2 g/L	2 g/L	5 g/L
Sulfati		10 mL/L	
Kloridi	/	/	10 mL/L
Voda	dH ₂ O	vodovodna voda	dH ₂ O

*pH popravili na 7,4

3.3.2.5 Izbira najprimernejšega prilagojenega gojišča

Po predhodnih ugotovitvah (Lindič, 2007) in po našem preverjanju viabilnosti kulture, smo izbrali prilagojeno gojišče 1.

Za pozitivno in negativno kontrolo smo uporabili prilagojeno gojišče 1, za vzorce pa smo uporabili namesto demineralizirane vode vzorec sam.

3.3.3 Preverjanje viabilnosti kulture za test *in vivo*

Za vsak vzorec smo na objektno steklo nanesti 30 µL kulture *T. thermophila*. Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli vse mrtve celice (celice, ki se niso gibale). Nato smo dodali 10 µL 4% raztopine formalina in prešteli vse celice. Odstotek viabilnosti smo določili po naslednji formuli (Dias in Lima, 2002):

$$\text{Viabilnost (\%)} = \left[\frac{\text{število vseh celic} - \text{število mrtvih celic}}{\text{število vseh celic}} \right] \times 100$$

Viabilnost mora presegati 90 %, da je kultura celic uporabna za nadaljnje delo.

3.3.4 Priprava minigelov

Za pripravo minigelov na mikroskopskih objektnikih smo uporabili obrušena objektna stekelca. Agarozo smo raztopili v pufru PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH₂PO₄ (ali 14,4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O)) in jo raztopili v mikrovalovni pečici.

Za nanos 1. sloja agaroze NMP (1 %) smo mikroskopske objektnike namočili v raztopljeni agarozo, spodnjo stran objektnika smo obrisali s papirnato brisačo. Pokrili smo jih s folijo in jih sušili čez noč.

Na posušeni 1. sloj smo nanесли 600 μL 2. sloja agaroze NMP (0,6 %) in nato pokrili z objektnim stekelcem. Pred svetlobo smo jih zavarovali s folijo in dali v hladilnik za 30 minut, da se je gel strdil.

Ko je bil 2. sloj agaroze strjen, smo odstranili stekelca z 2. sloja in zmešali 220 μL celic z 10 mL agaroze v pufru PBS ($1,4 \times 10^5$ celic/mL). Agarozo za 3. sloj smo pred dodatkom celic ohladili na 30 °C v vodni kopeli, da ni prišlo do poškodb celic. Na prejšnji sloj smo nanесли 450 μL 3. sloja agaroze LMP (0,7 %) in pokrili z objektnim stekelcem. Vse skupaj smo dali pokrito z aluminjasto folijo v hladilnik za 30 minut.

Ko se je 3. sloj agaroze strdil, smo odstranili stekelca. Pripravljena stekelca z minigeli smo inkubirali v paralelkah v steklenih petrijevkah z vzorci 20 minut. Pozitivno kontrolo smo inkubirali 5 minut v raztopini H_2O_2 pufru PBS (pregl. 9) ter jo nato 2-krat spirali v pufru PBS. Negativno kontrolo smo inkubirali 20 minut v bogatem gojišču.

Za razliko od *in vitro* kometnega testa smo pri *in vivo* kometnem testu za 3. sloj zmešali 100 μL celic s 3 mL agaroze v pufru PBS ($1,4 \times 10^5$ celic/mL). Ko se je strdil 3. sloj agaroze, smo le pozitivno kontrolo inkubirali 5 minut v raztopini H_2O_2 (pregl. 9).

3.3.5 Postopek kometnega testa

Predhodno pripravljene minigele smo prestavili v banjico in jih prelili z raztopino za alkalno lizo (pregl. 10). Banjico smo pokrili s folijo in dali v hladilnik (4 °C) za 1 h. V tem času je potekala liza celic. Raztopino smo nato odlili in stekelca z minigeli prelili z elektroforetskim pufrom (EP). Spirali smo 3-krat po 5 minut (pokrito s folijo). Pri tem se je DNA razvila. Nato smo stekelca postavili v banjico za elektroforezo in dolili približno 1900 mL elektroforetskega pufra. Banjico smo pokrili s pokrovom in nato še s folijo. Elektroforeza je potekala 15 minut pri 25V. Zatem smo stekelca prestavili v banjico, dolili puffer Tris-HCl in inkubirali 20 minut na sobni temperaturi. S tem smo nevtralizirali alkalno vrednost pH, ki smo jo dosegli zaradi elektroforetskega pufra.

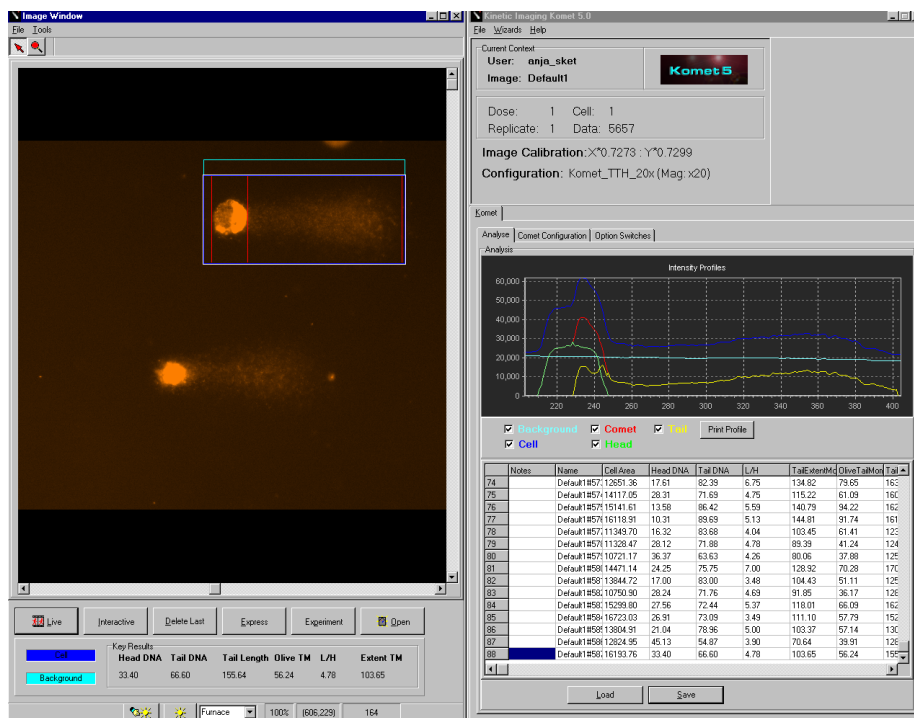
3.3.6 Barvanje z etidijevim bromidom

Po inkubaciji v pufru Tris-HCl smo na minigele tik pred odčitavajem rezultatov nanесли dve kapljici raztopine etidijevega bromida s koncentracijo 10 $\mu\text{g/mL}$ v pufru PBS (pregl. 11).

3.3.7 Odčitavanje rezultatov

Po barvanju z etidijevim bromidom smo minigele pregledali pod epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX 50) pri 400-kratni povečavi. Pri pregledovanju vzorcev smo

uporabili filter U-MSWG z eksitacijskim filtrom od 490 nm do 550 nm in zapornim filtrom 590 nm. Digitalna kamera (Hamamatsu Orca 2) nam je omogočila prenos slike na računalnik s programom Komet 5.0. Ta program določi regije kometa (glavo in rep) in nam ovrednoti stopnjo poškodb jedrne DNA, saj s hitro analizo rezultatov izračuna parametre, ki jih želimo dobiti. Za statistično analizo stopnje poškodb jedrne DNA smo uporabili parameter repni moment po Olivu (OTM).



Slika 4: Pogovorno okno programa za analizo slike Komet 5.0.

Repni moment po Olivu združuje dva vidika oblike kometa, dolžino kometa in intenziteto kometa. Definira se kot zmnožek dolžine repa in frakcije celotne DNA v repu. Repni moment vključuje mere najmanjše zaznane velikosti potujoče DNA (odraža se v dolžini repa kometa) in števila prelomljenih koščkov (kar predstavlja intenziteto DNA v repu) (Dhawan in Anderson, 2009).

$$\text{OTM} = (\text{povprečje rep (težišče)} - \text{povprečje glava (težišče)}) \times \% \text{ repna DNA} / 100$$

Poškodbe DNA smo prikazali tudi kot relativni OTM, ki se izračuna za vsak vzorec v povezavi z ustrežajočo negativno kontrolo.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Pri obeh izvedbah kometnega testa, pri *in vivo* in pri *in vitro* pogojih, smo imeli 3 ponovitve. Vsak vzorec smo imeli v paralelkah (2 objektni stekelci). Na vsakem objektu

stekelcu smo ocenili poškodbe 50 jeder (kometov). Tako smo v posameznem poskusu za vsak vzorec dobili 100 meritev, v treh poskusih skupaj 300.

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili program R i386 3.0.1, s katerim smo izdelali grafični prikaz rezultatov (okvirji z ročaji). Zatem smo naredili analizo variance (ANOVA). Rezultati so bili primerni za analizo s testom HSD in Duncanovim testom.

3.4.1 ANOVA – analiza variance

Razvitih je več testov za testiranje statističnih značilnosti povprečnih vrednosti določene lastnosti dveh ali več skupin. Analiza variance (ANOVA) je daleč najmočnejša, ker ni omejena na primerjavo povprečij zgolj dveh skupin. Sposobna je testirati vpliv več kot ene same spremenljivke, kar pomeni, da izvede analize, kjer je več kot ena neodvisna spremenljivka. Če imamo dve neodvisni spremenljivki se ANOVA opiše kot dvosmerna, v primeru treh neodvisnih spremenljivk trosmerna itd. Pri analizi variance je izmerjena spremenljivka znana kot odvisna spremenljivka, ker se predpostavlja, da so njene vrednosti odvisne od druge spremenljivke. Sledi obliki zvonca oz. normalni porazdelitvi, kar pomeni, da je večina vrednosti blizu povprečja. Spremenljivka, za katero se predpostavlja, da vpliva na odvisno spremenljivko je znana kot neodvisna spremenljivka (Miller in Brewer, 2003).

3.4.1.1 Enosmerna analiza variance

Za analizo rezultatov smo uporabili enosmerno analizo variance (imenovana tudi preprosta ANOVA), ki testira značilne razlike med dvema ali več povprečji. Enosmerna ANOVA oceni povprečje razlik med skupinami (vzorci), ki so sestavljene iz različnih populacij, ene populacije ali več identičnih populacij. Enosmerna ANOVA je matematični podaljšek neodvisnega t-testa. Za razlike se lahko testira katero koli število povprečij. Pri enosmerni ANOVA je ena neodvisna spremenljivka (z dvema ali več nivoji ali pogoji) in ena odvisna spremenljivka. Odvisna spremenljivka v enosmerni ANOVA se mora kontinuirno normirati na ravni intervala ali razmerja. Za uporabo enosmerne ANOVA morajo biti izpolnjene sledeče tri predpostavke:

- Normalnost: rezultati odvisne spremenljivke so za vsak pogoj normalno porazdeljeni okrog njihovega povprečja.
- Homogenost variance: varianca rezultatov odvisne spremenljivke morajo biti čez pogoje konstantne.
- Neodvisnost opazovanj: opazovanja so neodvisna drug od drugega in niso povezana med seboj (Martin in Bridgmon, 2012).

3.4.2 Levenov test

Levenov test je test homogenosti variance, ki je manj odvisen od domneve normalnosti kot večina testov in je tako še posebej uporaben pri analizi variance. Rezultate tega testa pridobimo z izračunanjem absolutnih razlik iz povprečja za vsaki primer, nato pa se na teh razlikah izvede enosmerna analiza variance. Če je statistika Levenovega testa značilna, potem skupine niso homogene in v tem primeru moramo morda transformirati izvirne podatke ali pa uporabiti neparametrično statistiko. Rezultati Levenovega testa so podani skupaj z rezultati enosmerne ANOVA, kar nam omogoča pregled vseh rezultatov hkrati (Martin in Bridgmon, 2012).

Rezultate Levenovega testa dobimo podane v tabeli. Testiramo ničelno hipotezo, ki pravi, da so variance in variance napake odvisne spremenljivke enake čez dve pogojni skupini: $H_0: \sigma^2_{\text{Napaka(Obravnavanje)}} = \sigma^2_{\text{Napaka(Kontrola)}}$. Za testiranje ničelne hipoteze uporabimo $\alpha=0.05$. Če je verjetnost Levenovega testa $p>0.05$, ne moremo zavrniti ničelne hipoteze (H_0). Iz Levenovega testa lahko tako zaključimo, da so variance in varianca napake enake čez pogoje in pridemo do predpostavke homogenosti variance. Oba, Levenov test in razmerje variance, podpirata prisotnost homogenosti varianc skozi porazdelitev rezultatov dveh vzorcev. Sledi razprava o rezultatih enosmerne ANOVA, ki so tudi v danih informacijah Levenovega testa (Martin in Bridgmon, 2012).

3.4.3 Post hoc primerjave

Te primerjave primerjajo povprečja obravnavanj, s čimer se ugotovi, katera izmed različnih povprečij se razlikujejo med seboj. Če je F značilen in imamo več kot dve skupini, nadaljujemo z ugotavljanjem, kje obstajajo razlike. Pri primerjavi parov povprečij, ne smemo uporabiti konvencionalnega t-testa, ker bo stopnja α , pri kateri bomo testirali, višja kot stopnja α , ki smo jo določili. To se zgodi, ker so nekatere značilne razlike, ki jih pridobimo, posledica naključja. Potrebno je poudariti, da ko se povečuje število primerjav, verjetnost napake tipa I tudi narašča (Broota, 1989).

Post hoc testi so dodatni testi hipotez, ki se izvedejo po analizi variance (ANOVA). Z njimi se točno določi, katere razlike med povprečji so značilne in katere ne. Bolj specifično, ti testi se izvedejo po analizi variance, če zavrnemo ničelno hipotezo (H_0) in v primeru, da imamo tri ali več obravnavanj (k je večje ali enako 3). Zavrnitev H_0 kaže na to, da obstaja vsaj ena razlika med obravnavanji. Če imamo le dva obravnavanja, potem ni pod vprašajem, katera povprečja so različna in tako ni potrebe po post hoc testih. Pri treh ali več obravnavanjih pa je problem točno določiti, katera povprečja so značilno različna (Gravetter in Wallnau, 2013).

3.4.3.1 Test HSD

S tem testom izračunamo vrednost, ki določa minimalno razliko med povprečji obravnavanj, ki je nujna za značilnost. Ta vrednost, imenovana »honestly significant difference« oz. HSD, se uporabi za primerjavo katerih koli pogojev dveh obravnavanj. Če razlika med povprečjem presega Turkeyev HSD, potem zaključimo, da obstaja značilna razlika med obravnavanji. Drugače ne moremo zaključiti, da so obravnavanja značilno različna (Gravetter in Wallnau 2013).

3.4.3.2 Duncanov test

Za post hoc primerjave se pogosto uporablja tudi Duncanov test (Duncan Multiple range test). Tudi v tem testu se uporablja q statistika. Duncanov test lahko uporabljamo ne glede na to ali je F-test v analizi variance značilen ali neznačilen. Bistvo izračuna tega testa je, da se namesto uporabe standardne napake razlik med dvema povprečjema, uporabi standardna napaka povprečja primera (Sahu, 2013).

4 REZULTATI

4.1 KOMETNI TEST *IN VIVO*

4.1.1 Viabilnost celic *T. thermophila* v prilagojenih gojiščih za test *in vivo*

Viabilnosti kulture *T. thermophila* smo preverjali v dveh prilagojenih gojiščih (pregl. 4 in 5) in revnem gojišču (pregl. 6) ter v prilagojenem gojišču z vzorcem. Prilagojeni gojišči 1 in 2 sta vsebovali enake sestavine, razlika med njima je bila le ta, da smo v prvem sestavine raztopili v dH₂O, v drugem pa v vodovodni vodi. Za preverjanje viabilnosti smo uporabili vzorec raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/L, ker smo pričakovali največji vpliv na viabilnost. Po 6-ih urah je viabilnost pri vseh gojiščih preseгла zahtevano mejo 92 % in so zato bila vsa primerna za poskus (pregl. 15). Za nadaljnje delo smo izbrali prilagojeno gojišče 1, kjer je bila zagotovljena največja viabilnost kulture.

Preglednica 15: Viabilnost kulture *T. thermophila* po 6 urah

Gojišče	Število mrtvih celic	Število vseh celic	Viabilnost
Prilagojeno gojišče 1	5	247	98 %
Prilagojeno gojišče 2	10	248	96 %
Prilagojeno gojišče z BPA 20	5	179	97 %
Revno gojišče	9	180	95 %

Viabilnost smo preverjali tudi po 24 urah (pregl. 16). Kulturo *T. thermophila* smo namreč izpostavili trem prilagojenim gojiščem in prilagojenemu gojišču z vzorcem, ki je tukaj zopet bila demineralizirana voda z vsebnostjo 20 mg/L BPA, za 24 ur. Pri tem smo ugotovili, da je tudi po 24-urni izpostavitvi kulture najprimernejše prilagojeno gojišče 1.

Po 24 urah smo v vzorcu BPA 20 (raztopina BPA s koncentracijo 20 mg/L) ugotovili zelo majhno viabilnost, zato smo za kometni test *in vivo* kulturo izpostavili vzorcem za 6 ur.

Preglednica 16: Viabilnost kulture *T. thermophila* po 24 urah

Gojišče	Število mrtvih celic	Število vseh celic	Viabilnost
Prilagojeno gojišče 1	6	336	98 %
Prilagojeno gojišče 2	12	255	95 %
Prilagojeno gojišče z BPA 20	210	230	9 %
Revno gojišče	15	287	95 %

4.1.2 Viabilnost kulture celic pred izvedbami kometnega testa *in vivo*

Pred vsako ponovitvijo kometnega testa *in vivo* smo pregledali tudi viabilnost kulture po 6-urni izpostavitvi vzorcem in kontrolam. Viabilnost je vedno presegala zahtevano vrednost (pregl. 17, 18, 19).

Preglednica 17: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega testa *in vivo* (1. poskus)

Gojišče	Viabilnost
NK	99,2 %
BPA 10	97,4 %
BPA 20	98,4 %
O3-S	98,0 %
O3-BPA 10	95,0 %
O3-BPA 20	98,4 %
PK	99,2 %

Preglednica 18: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega testa *in vivo* (2. poskus)

Gojišče	Viabilnost
NK	100 %
BPA 10	98,4 %
BPA 20	100 %
O3-S	98,9 %
O3-BPA 10	100 %
O3-BPA 20	98,6 %
PK	100 %

Preglednica 19: Viabilnost celic pred izvedbo kometnega testa *in vivo* (3. poskus)

Gojišče	Viabilnost
NK	100 %
BPA 10	99,0 %
BPA 20	99,4 %
O3-S	100 %
O3-BPA 10	99,1 %
O3-BPA 20	99,2 %
PK	100 %

4.1.3 Rezultati kometnega testa *in vivo*

Rezultate kometnega testa *in vivo* (vrednosti parametrov OTM in relativnega OTM) smo statistično analizirali.

4.1.3.1 Rezultati statistične analize vrednosti OTM po kometnem testu *in vivo*

Po Levenovem testu in analizi variance smo ugotovili, da pri stopnji značilnosti 0,05 ni statistično značilnih razlik med obravnavanji (vzorci). So pa rezultati na meji statistične značilnosti, ker je p-vrednost v tem primeru 0,07. Zaradi tega so opazne določene razlike med povprečji vrednosti OTM (pregl. 20). Vzorec O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, se na meji statistične značilnosti razlikuje od negativne kontrole in vseh preostalih vzorcev.

Preglednica 20 : Rezultati Duncanovega testa (kometni test *in vivo*)

Skupine	Vzorec	Povprečje OTM
a	O3-BPA 20	78,56
b	O3-BPA 10	54,57
b	NK	54,35
b	BPA 20	54,30
b	BPA 10	51,77
b	O3-S	49,89

4.1.3.2 Rezultati statistične analize relativnega OTM po kometnem testu *in vivo*

Pri analizi vrednosti relativnega OTM smo dobili statistično značilne razlike med vzorci. Pri vzorcu O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, smo statistično značilno dokazali njegovo genotoksičnost (pregl. 22).

Preglednica 21 : Rezultati testa HSD (kometni test *in vivo*)

Skupine	Vzorec	Povprečje relativni OTM
a	PK	1,495
ab	O3-BPA 20	1,446
ab	O3-BPA 10	1,031
ab	BPA 20	1,017
ab	NK	1
ab	BPA 10	0,960
b	O3-S	0,926

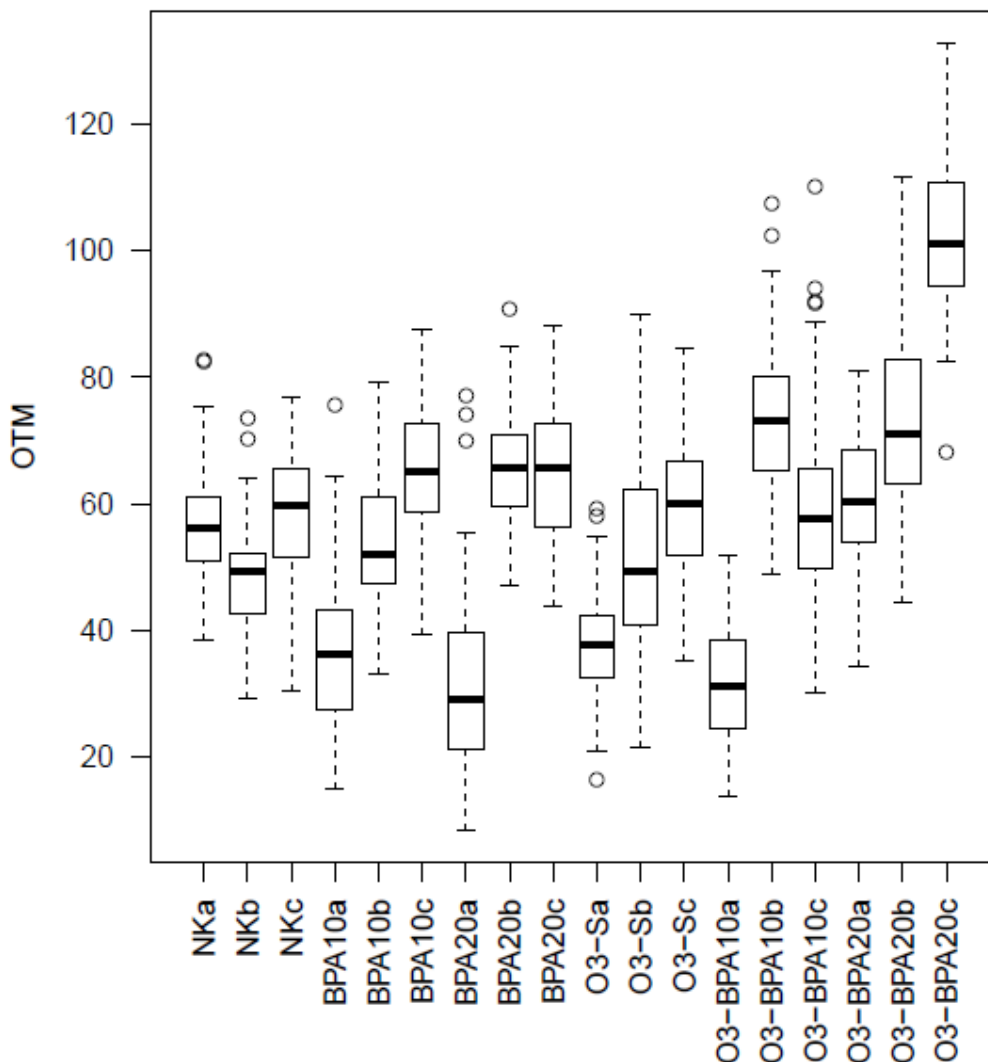
*Povprečja z enakimi črkami niso značilno različna ($\alpha = 0,05$).

Preglednica 22: Rezultati Duncanovega testa (kometni test *in vivo*)

Skupine	Vzorec	Povprečje relativni OTM
a	PK	1,495
a	O3-BPA 20	1,446
b	O3-BPA 10	1,031
b	BPA 20	1,017
b	NK	1
b	BPA 10	0,960
b	O3-S	0,926

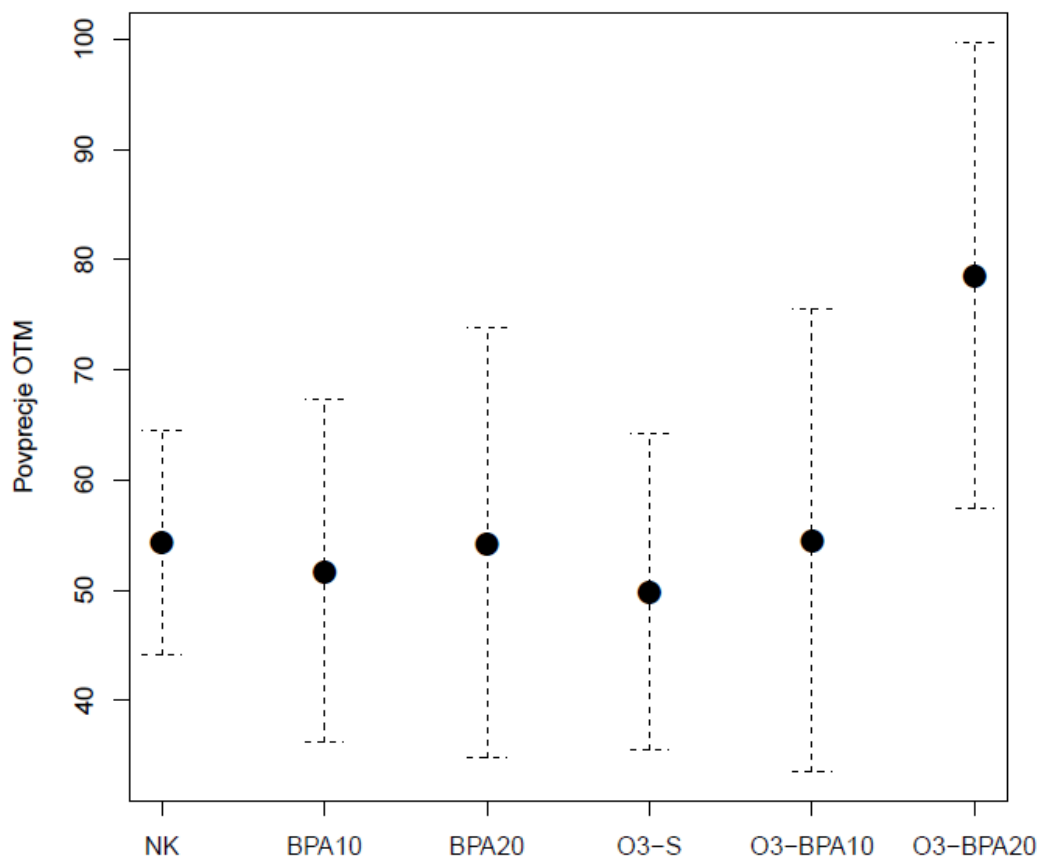
*Povprečja z enakimi črkami niso značilno različna ($\alpha = 0,05$).

4.1.4 Predstavitev rezultatov kometnega testa *in vivo*



Slika 5: Vrednosti OTM posameznih ponovitev pri kometnem testu *in vivo*. a,b,c – ponovitve, NK - negativna kontrola, BPA10 – BPA 10 mg/L, BPA20 – BPA 20 mg/L, O3-S - demineralizirana voda po ozoniranju; O3-BPA10 - BPA 10 mg/L po ozoniranju, O3-BPA20 – BPA 20 mg/L po ozoniranju.

Pri kometnem testu *in vivo* je bila narejena analiza variance za slučajne bloke s podvzorčenjem, kjer blok predstavlja ponovitev poskusa. Rezultati kažejo, da so razlike med poskusi veliko večje kot pa med vzorci (sl. 5). Ugotovili smo, da pri stopnji značilnosti 0,05 ni statistično značilnih razlik med vzorci in negativno kontrolo, kar pomeni, da nismo dokazali genotoksičnosti vzorcev. So pa rezultati na meji statistične značilnosti, ker je p-vrednost 0,07.

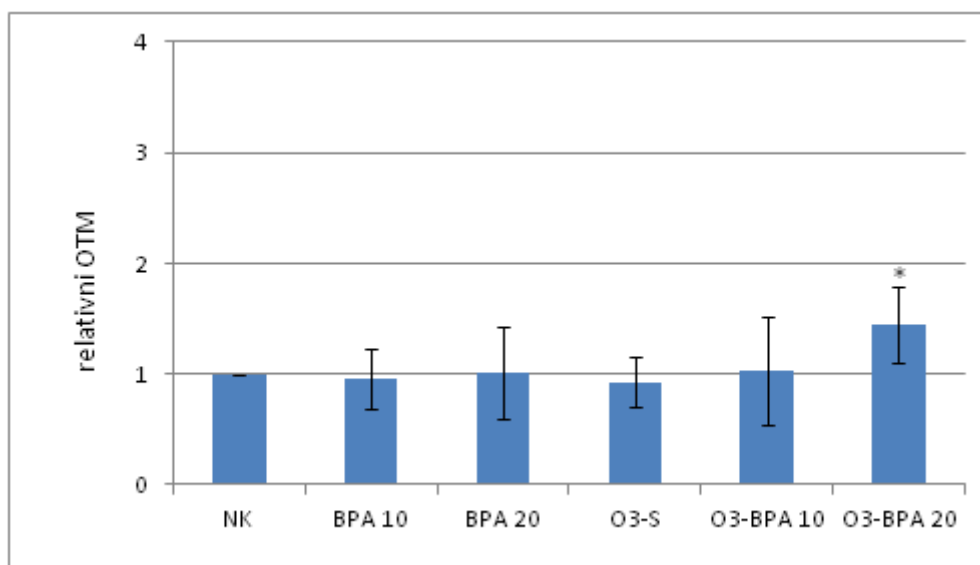


Slika 6: Povprečni OTM posameznih vzorcev po treh poskusih kometnega testa *in vivo*. NK - negativna kontrola, BPA10 – BPA 10 mg/L, BPA20 – BPA 20 mg/L, O3-S - demineralizirana voda po ozoniranju; O3-BPA10 - BPA 10 mg/L po ozoniranju, O3-BPA20 – BPA 20 mg/L po ozoniranju.

Iz povprečnih vrednosti OTM posameznih vzorcev po treh ponovitvah kometnega testa *in vivo* opazimo najvišji povprečni OTM pri vzorcu O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA z začetno koncentracijo 20 mg/L (sl. 6). Rezultati so na meji statistične značilnosti ($p=0,07$), vendar se omenjeni vzorec po Duncanovem testu statistično značilno razlikuje od vseh ostalih. Preostali vzorci ne kažejo statistično značilnih razlik med seboj. Največjo vrednost OTM in na meji statistično značilno genotoksičnost smo torej dokazali pri vzorcu, ki je vseboval ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L.

Preglednica 23: Osnovna statistika po izvedbi kometnega testa *in vivo*

Vzorec	Št. meritev	Povprečni OTM	Standardni odklon	Mediana	Minimum	Maksimum
NK	300	54,35	5,56	56,27	29,16	82,79
BPA 10	300	59,86	14,36	52,07	15,09	87,56
BPA 20	300	54,30	19,83	65,72	8,30	90,68
O3-S	300	49,89	11,08	49,21	16,47	89,80
O3-BPA 10	300	54,57	21,09	57,60	13,79	110,01
O3-BPA 20	300	70,47	32,97	71,14	34,29	132,77



Slika 7: Relativni OTM vzorcev pri kometnem testu *in vivo*

Iz rezultatov kometnega testa *in vivo* smo izračunali tudi relativne vrednosti OTM vzorcev (Priloga C). Na sliki 7 je z zvezdico označen vzorec, ki se statistično značilno razlikuje od negativne kontrole. V tem primeru se od negativne kontrole statistično značilno razlikuje vzorec O3-BPA 20, kar pomeni, da smo ozonirani raztopini BPA s koncentracijo 20 mg/L dokazali genotoksičnost.

4.2 KOMETNI TEST *IN VITRO*

4.2.1 Rezultati kometnega testa *in vitro*

Rezultate kometnega testa *in vitro* smo statistično analizirali preko parametra OTM in relativnega OTM.

4.2.1.1 Rezultati statistične analize vrednosti OTM po kometnem testu *in vitro*

Po Levenovem testu in analizi variance smo ugotovili, da pri stopnji značilnosti 0,05 obstajajo statistično značilne razlike med vzorci. Pri vseh vzorcih smo statistično značilno dokazali genotoksičnost, pri vzorcu O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, pa je bila genotoksičnost statistično značilno večja kot pri vzorcu O3-S, ki je predstavljal ozonirano demineralizirano vodo (pregl. 24).

Preglednica 24 : Rezultati testa HSD in Duncanovega testa (kometni test *in vitro*)

Skupine	Vzorec	Povprečje OTM
a	O3-BPA 20	75,39
ab	BPA 20	69,12
ab	O3-BPA 10	68,59
ab	BPA 10	67,33
b	O3-S	57,58
c	NK	28,24

*Povprečja z enakimi črkami niso značilno različna ($\alpha = 0,05$).

4.2.1.2 Rezultati statistične analize relativnega OTM po kometnem testu *in vitro*

Po Levenovem testu in analizi variance smo ugotovili, da pri stopnji značilnosti 0,05 obstajajo statistično značilne razlike. Vsem vzorcem smo statistično značilno dokazali genotoksičnost. Med vzorci ni bilo statistično značilno večje ali manjše genotoksičnosti po HSD testu (pregl. 25). Duncanov test (pregl. 26) pa je pokazal, da je bila pri vzorcu O3-BPA 20 (ozonirana raztopina BPA s koncentracijo 20 mg/L) genotoksičnost statistično značilno večja kot pa pri vzorcu O3-S, ki je predstavljal ozonirano demineralizirano vodo (enako kot pri analizi rezultatov vrednosti OTM).

Preglednica 25 : Rezultati testa HSD (kometni test *in vitro*)

Skupine	Vzorec	Povprečje relativni OTM
a	PK	3,246
ab	O3-BPA 20	2,700
b	BPA 20	2,467
b	O3-BPA 10	2,452
b	BPA 10	2,397
b	O3-S	2,054
c	NK	1

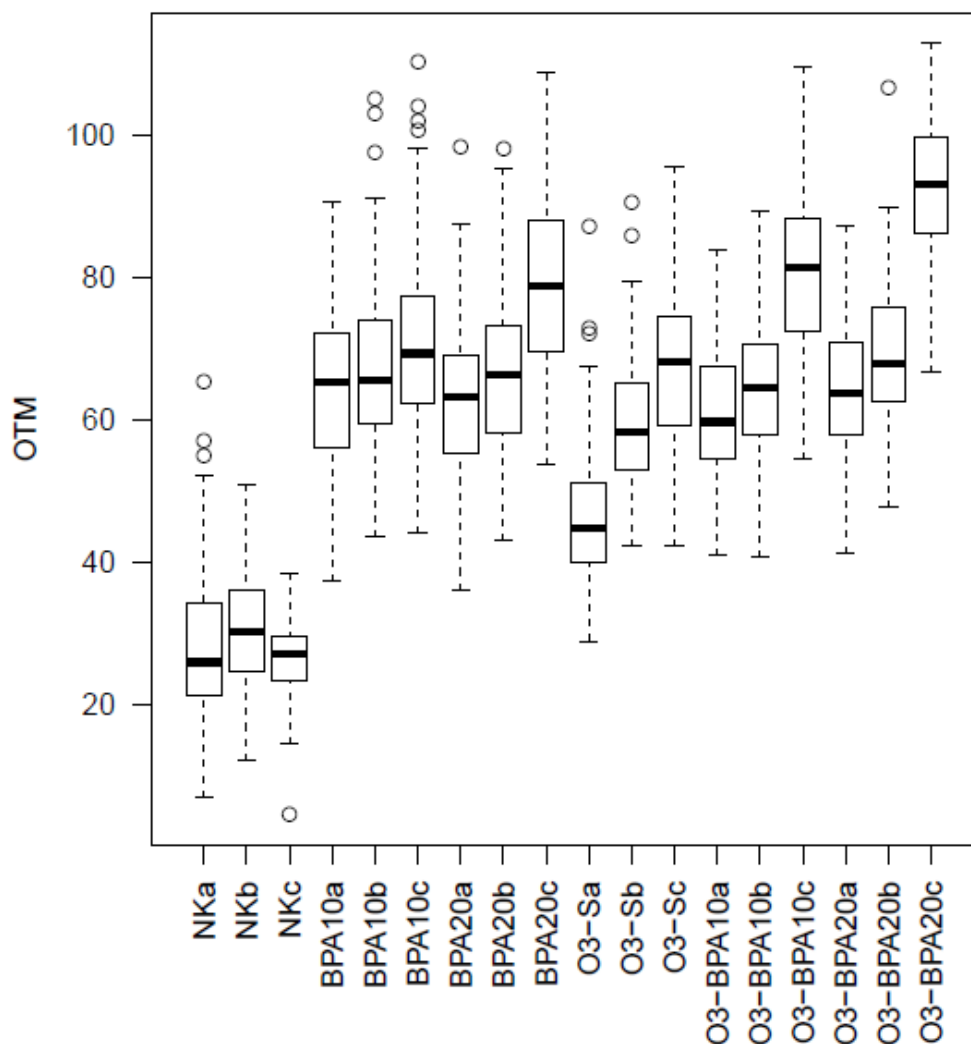
*Povprečja z enakimi črkami niso značilno različna ($\alpha = 0,05$).

Preglednica 26: Rezultati Duncanovega testa (kometni test *in vitro*)

Skupine	Vzorec	Povprečje relativni OTM
a	PK	3,246
b	O3-BPA 20	2,700
bc	BPA 20	2,467
bc	O3-BPA 10	2,452
bc	BPA 10	2,397
c	O3-S	2,054
d	NK	1

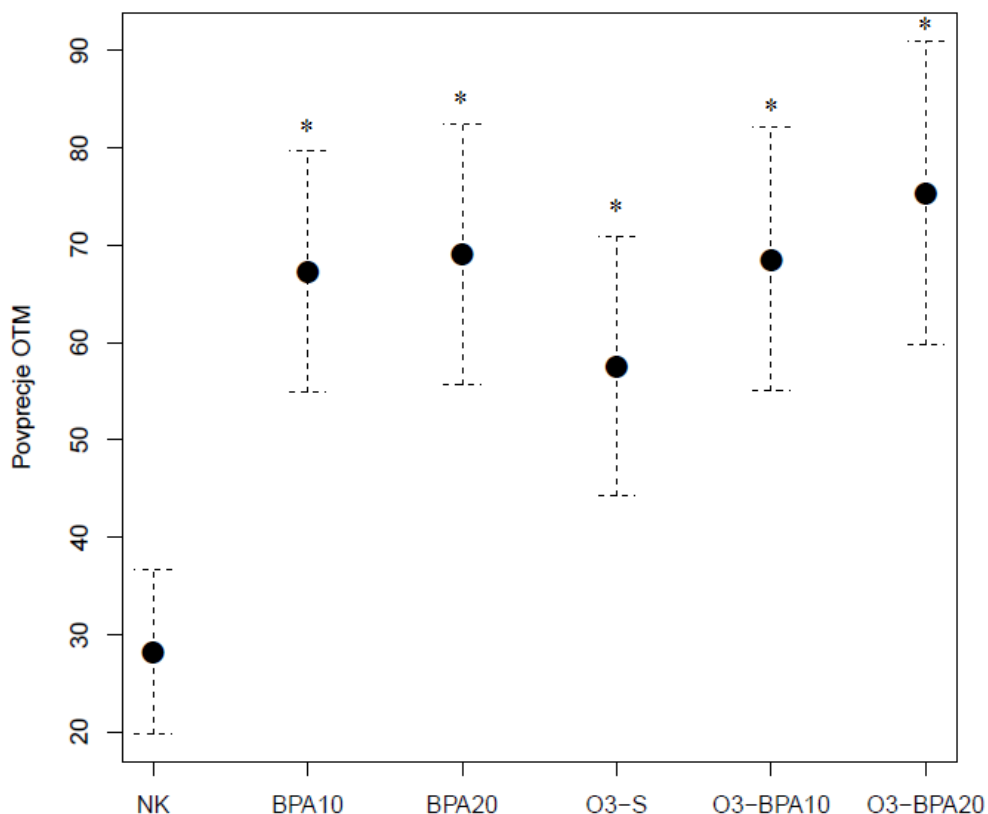
*Povprečja z enakimi črkami niso značilno različna ($\alpha = 0,05$).

4.2.2 Predstavitev rezultatov kometnega testa *in vitro*



Slika 8: Vrednosti OTM posameznih ponovitev pri kometnem testu *in vitro*. a,b,c – ponovitve, NK - negativna kontrola, BPA10 – BPA 10 mg/L, BPA20 – BPA 20 mg/L, O3-S - demineralizirana voda po ozoniranju; O3-BPA10 - BPA 10 mg/L po ozoniranju, O3-BPA20 – BPA 20 mg/L po ozoniranju.

Po statistični analizi vrednosti OTM pri kometnem testu *in vitro* smo prišli do naslednjih rezultatov. Pri stopnji zaupanja 0,05 se vsi vzorci statistično značilno razlikujejo od negativne kontrole, kar pomeni, da smo pri vseh vzorcih dokazali genotoksične učinke na testni organizem *T. thermophila*. Statistično značilne razlike so tudi med demineralizirano vodo po ozoniranju (O3-S) in raztopino BPA z začetno koncentracijo 20 mg/L po ozonaciji (O3-BPA 20) (sl. 8). Genotoksičnost ozonirane raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/L je torej statistično značilno večja kot pri vzorcu ozonirane demineralizirane vode (O3-S).

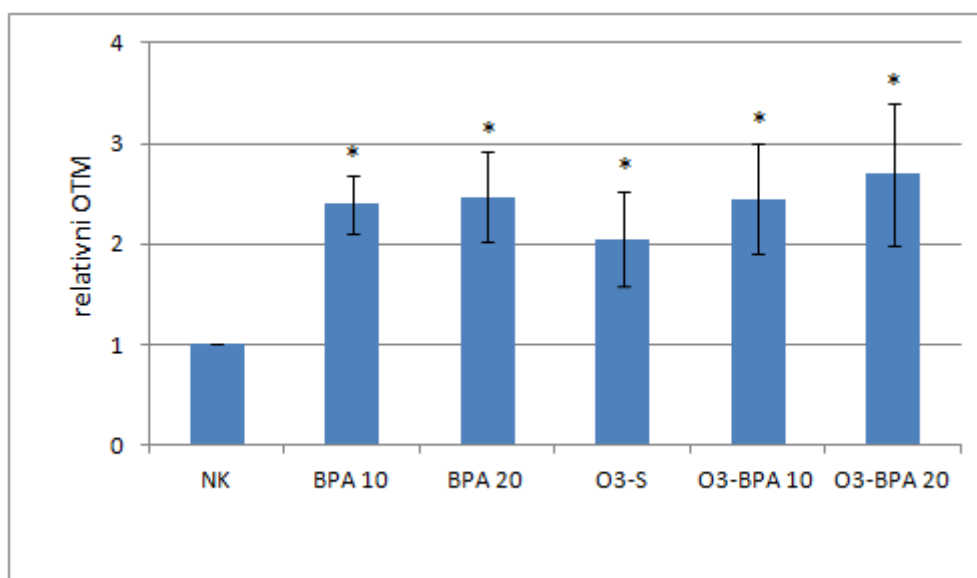


Slika 9: Povprečni OTM posameznih vzorcev po treh poskusih kometnega testa *in vitro*. NK - negativna kontrola, BPA10 – BPA 10 mg/L, BPA20 – BPA 20 mg/L, O3-S - demineralizirana voda po ozoniranju; O3-BPA10 - BPA 10 mg/L po ozoniranju, O3-BPA20 – BPA 20 mg/L po ozoniranju. *Statistično značilne razlike glede na NK.

Pri povprečnih vrednostih OTM posameznih vzorcev po treh ponovitvah kometnega testa *in vitro* (sl. 9) se vidi, da je najnižji povprečni OTM pri negativni kontroli, pri vzorcih pa ima najnižji povprečni OTM vzorec O3-S (ozonirana demineralizirana voda). Najvišja povprečna vrednost OTM je pri vzorcu O3-BPA 20 (raztopina BPA z začetno koncentracijo 20 mg/L po ozonaciji). Vsem vzorcem smo statistično značilno dokazali genotoksičnost, pri vzorcu O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, pa je bila genotoksičnost še značilno večja od vzorca O3-S, ozonirane demineralizirane vode.

Preglednica 27: Osnovna statistika pri izvedbi kometnega testa *in vitro*

Vzorec	Št. meritev	Povprečni OTM	Standardni odklon	Mediana	Minimum	Maksimum
NK	300	28,24	2,11	27,16	4,53	65,31
BPA 10	300	67,33	3,72	65,56	37,35	110,43
BPA 20	300	69,12	8,09	66,38	36,12	108,63
O3-S	300	57,58	10,51	58,16	28,89	95,48
O3-BPA 10	300	68,59	10,44	64,45	40,72	109,61
O3-BPA 20	300	75,39	14,62	67,91	41,33	112,82
PK	300	91,33	8,61	92,93	59,40	137,74



Slika 10: Relativni OTM vzorcev pri kometnem testu *in vitro*

Izračunane relativne vrednosti OTM kometnega testa *in vitro* (Priloga C) so prikazane na Sliki 10. Z zvezdicami so označeni vzorci, ki se statistično značilno razlikujejo od negativne kontrole. Od negativne kontrole se statistično značilno razlikujejo vsi vzorci, kar pomeni, da smo pri vseh vzorcih statistično značilno dokazali genotoksičnost. Prav tako pa je bila genotoksičnost vzorca O3-BPA 20, ki predstavlja ozonirano raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, statistično značilno večja od vzorca O3-S, ki predstavlja ozonirano demineralizirano vodo.

5 RAZPRAVA

Pri kometnem testu *in vivo* nismo dobili statistično značilnih razlik med OTM vzorcev in OTM negativne kontrole oz. nismo statistično značilno dokazali genotoksičnosti pri nobenem od testiranih vzorcev. Vzrok za takšne rezultate so lahko tudi uporabljene metode in materiali pri eksperimentu. Prilagojenega gojišča za kometni test *in vivo* nismo filtrirali, kar bi bilo hitrejša, boljša, vendar dražja metoda, zato smo gojišče avtoklavirali. S tem smo tvegali, da bo prišlo do določenih pretvorb BPA v raztopini pri visokih temperaturah, čeprav je njegovo vrelišče okrog 150 °C, avtoklaviranje pa poteka pri 121 °C. Pri testu smo ves čas uporabljali plastične posodice, ki morda že same vsebujejo BPA. So pa rezultati na meji statistične značilnosti in na podlagi le-teh lahko zaključimo, da se kaže genotoksičnost vzorca BPA s koncentracijo 20 mg/L po ozoniranju. To dokazuje tudi izračun relativnega OTM. S statistično analizo vrednosti relativnega OTM vzorcev smo dokazali statistično značilno razliko med negativno kontrolo in vzorcem O3-BPA 20. To dokazuje genotoksičnost vzorca z 20 mg/L BPA po ozoniranju za migetalkarja *T. thermophila*. Ta primer kaže na to, da so razgradni produkti BPA bolj genotoksični kot sam BPA. Ozonacija je odstranila večino BPA, vendar pa povzročila nastanek razpadnih produktov tega hormonskega motilca.

Iz rezultatov je razvidno, da je povprečni OTM pri dveh vzorcih (BPA 10 in O3-S) manjši od negativne kontrole, kar pomeni, da gre za tehnično motnjo pri izvedbi kometnega testa. Verjetno je nek dejavnik zmanjšal mobilnost DNA med elektroforezo. Vzrok za to je eventualno lahko prisotnost snovi, ki prečno povežejo verige DNA.

Pri kometnem testu *in vivo* smo tako kot pri kometnem testu *in vitro* uporabili migetalkarja *T. thermophila*. Ta pražival je, kakor pravijo Lah in sod. (2004), primerna za ugotavljanje genotoksičnosti različnih snovi v raztopinah. Ker je enoceličar, že sama celica predstavlja celotni organizem. Zaradi tega se naš kometni test *in vivo* razlikuje od večine drugih. Mi smo naše celice izpostavili vzorcem tako, da smo jih gojili nekaj ur v prilagojenem gojišču skupaj s testnimi raztopinami. Za razliko pa so npr. Park in sod. (2009), Ulutaš in sod. (2011), Wu in sod. (2013), Bertanza in sod. (2010) v primeru kometnega testa *in vivo*, testne organizme izpostavili vzorcem tako, da so jih te užile, npr. so jim jih oralno administrirali v določenih koncentracijah in časovnih presledkih. Zatem pa so za kometni test uporabili izolirane celice organizmov, ki so uživali BPA.

Pri *in vitro* kometnem testu smo za vse testirane vzorce, ozonirano demineralizirano vodo (O3-S), raztopini 10 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred in po ozonaciji (BPA 10 in O3-BPA 10) ter raztopini 20 mg/L BPA v demineralizirani vodi pred in po ozonaciji (BPA

20 in O3-BPA 20), dokazali genotoksični učinek. Vsi vzorci se statistično značilno razlikujejo od negativne kontrole, tako v primeru statistične analize parametra OTM kot tudi relativnega OTM. Ti rezultati se skladajo z našimi pričakovanji. Kot negativno kontrolo smo pri kometnem testu uporabili bogato gojišče za migetalkarja *T. thermophila*. To seveda ne bi smelo nanj delovati genotoksično, saj je to približek njegovega naravnega okolja. Kljub temu so bile opazne poškodbe, kar je lahko posledica poškodb celic med njihovo pripravo za vklopitev v sam gel. Statistično značilne razlike rezultatov kometnega testa med vzorci in negativno kontrolo pomenijo, da so vzorci povzročili večje poškodbe jedrne DNA kot samo gojišče (negativna kontrola). Tudi pri vzorcu O3-S, ki predstavlja ozonirano demineralizirano vodo, smo statistično značilno dokazali genotoksični učinek. To kaže na to, da naj bi že demineralizirana voda po ozoniranju genotoksično vplivala na naš testni organizem. Vzrok je lahko rezidualni ozon ali pa že sama deionizirana voda. V naših preliminarnih poskusih se deionizirana voda ni izkazala za primerno okolje testnega organizma *T. thermophila* (rezultati niso prikazani). Če je vzrok v rezidualnem ozonu, potem je ta po vsej verjetnosti povečeval stopnjo poškodb jedrne DNA pri vseh ozoniranih vzorcih. Pred analizo vzorcev bi morali odstraniti rezidualni ozon z eno od metod (natrijev tiosulfat (Garoma in Matsumoto, 2009), čisti helij (Alum in sod., 2004)). Vzorcju ozonirane raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/L smo dokazali statistično značilno večjo genotoksičnost kot vzorcju O3-S (ozonirana demineralizirana voda). To kaže na to, da je vzorec s koncentracijo 20 mg/L BPA po ozoniranju povzročil določene dodatne poškodbe jedrne DNA kot vzorec O3-S, čemur so bili verjetno vzrok razgradni produkti BPA, ki so nastali med ozoniranjem. Vzorec z 20 mg/L BPA po ozoniranju ima najvišji OTM izmed vseh testiranih vzorcev, kar pomeni, da ima največji genotoksični učinek na jedro DNA celic *T. thermophila*. Kljub temu razlike z drugimi vzorci niso statistično značilne, kar nakazuje na podobno stopnjo genotoksičnosti BPA in njegovih razgradnih produktov, ki nastanejo po ozonaciji.

Pri primerjavi rezultatov kometnega testa *in vitro* in *in vivo* opazimo, da je OTM negativne kontrole kometnega testa *in vitro* precej manjši od OTM negativne kontrole pri kometnem testu *in vivo*. Pri *in vitro* pogojih smo za negativno kontrolo uporabili bogato gojišče, pri *in vivo* pa prilagojeno gojišče, saj smo se želeli čim bolj izogniti reagiranju BPA in njegovih razgradnih produktov s sestavinami gojišča. Prav tako je bil različen čas izpostavljanja celic, pri *in vitro* pogojih 20 minut, pri *in vivo* pa 6 ur. Smo pa pri kometnem testu *in vivo* dokazali statistično značilne razlike med relativnim OTM negativne in pozitivne kontrole, kar pomeni, da so bili pogoji testiranja ustrezni. Kljub temu je verjetno *in vitro* metoda kometnega testa bolj primerna za ugotavljanje genotoksičnosti, saj je razpon razlik med

OTM vrednostmi negativne kontrole in testiranih vzorcev dovolj velik, da razlike v genotoksičnosti lahko relevantno dokažemo oz. potrdimo.

Naši vzorci so bili le raztopine BPA in ne odpadna voda z BPA. Tudi v predhodnih raziskavah so večinoma uporabljali zgolj vodne raztopine BPA (Alum in sod., 2004; Rivas in sod., 2009; Garoma in sod., 2010; Hernández-Leal in sod., 2011; Garoma in Matsumoto, 2009; Deborde in sod., 2005; Deborde in sod., 2008) in ne dejanske odpadne vode, kar bi bilo veliko bolj ustrezno, saj bi s tem vključili tudi interakcije med organskimi snovmi, ki so prisotne v odpadnih vodah oz. interakcije med BPA in ostalimi organskimi snovmi. Koncentracije BPA v dejanskih odpadnih vodah so realno nižje (okoli 1 mg/L) od koncentracij modelnih vodnih vzorcev, s katerimi izvajajo teste. Postopek ozoniranja so sicer izvajali tudi na dejanski odpadni vodi (Nakada in sod., 2007; Zhang in sod., 2008; Schaar in sod., 2010; Bertanza in sod., 2011; Bertanza in sod., 2010), vendar so po koncu obdelave ocenjevali le estrogenost ali pa zgolj uspešnost odstranitve hormonskega motilca. Mi smo genotoksičnost BPA in njegovih razgradnih produktov preverjali z alkalno verzijo kometnega testa, ki se je v preteklosti izkazal kot občutljiv in enostaven test. Prepozna eno- in dvoverižne prelome DNA in alkalno labilna mesta. Genotoksične snovi običajno povzročajo več enoverižnih prelomov in alkalno labilnih mest, kakor pa dvoverižnih prelomov DNA. In čeprav je alkalna verzija testa manj specifična kot nevtralna, ima v primeru genotoksičnosti večjo občutljivost za zaznavanje DNA poškodb (Speit in Hartman, 2005).

Glede na naše rezultate so opazne dodatne poškodbe DNA pri vzorcu O3-BPA20, ki je predstavljal ozonirano raztopino s predhodno vsebnostjo BPA v koncentraciji 20 mg/L v primerjavi z ostalimi vzorci. Na podlagi tega lahko sklepamo, da naj bi bili razpadni produkti BPA, ki nastanejo po ozoniranju enako ali morda celo bolj genotoksični kot sam BPA. So pa že Chiang in sod. (2004) in Staples in sod. (1998) pokazali, da lahko napredni oksidacijski procesi včasih pripeljejo do sekundarnih produktov, ki se ne morejo odstraniti z enako metodo kakor originalna spojina in so lahko bolj škodljivi kot originalna spojina. BPA intermediati, ki lahko povečajo toksičnost tretiranih odplak so lahko fenol, 4-izopropilfenol in semikvinon derivati BPA (Staples in sod., 1998).

Med raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L pred in po ozoniranju nismo dokazali statistično značilnih razlik, ne pri kometnem testu *in vivo*, kakor tudi ne pri kometnem testu *in vitro*. To pomeni, da nismo dokazali večje ali manjše statistično značilne genotoksičnosti med tema dvema vzorcema. Enako velja za raztopino BPA s koncentracijo 10 mg/L pred in po ozoniranju. Velja pa omeniti, da je bilo povprečje vrednosti OTM in relativnega OTM raztopine BPA po ozoniranju vedno večje, in sicer pri obeh verzijah

kometnega testa in pri obeh koncentracijah BPA. To kaže na to, da ima ozonirana raztopina BPA večji genotoksični potencial kot neozonirana, kar je verjetno posledica razgradnih produktov BPA in/ali rezidualnega ozona.

Stranski in vmesni produkti po ozonaciji BPA še niso dokončno identificirani in zaradi tega ne vemo zagotovo, katere so te snovi s škodljivim biološkim učinkom na žive organizme. Deborde in sod. (2008) so raziskovali razgradne produkte BPA. Identificirali so do pet glavnih transformacijskih produktov, katerih kemijske strukture se ujemajo s kateholom, ortokvinon, mukonsko kislino (derivat BPA), benzokvimon in 2-(4-hidroksifenil)-propan-2-olom. Opazili so tudi druge transformacijske produkte, vendar je njihova kemijska struktura še neznan. Glavni stranski produkti naj bi imeli slabo stabilnost, ker naj bi varirali glede na uporabljeno dozo ozona. Zato se lahko transformirajo naprej v manjše in bolj polarne spojine, kot so kisline in aldehidi. Gültekin in sod. (2009) so kot stranske produkte ozonacije dobili p-terta-butilfenol, hidrokvinon, metildihidrobenzofuran in n-butil acetat. Garoma in sod. (2010) so razdelili intermediate BPA med ozoniranjem v tri skupine, po korakih. Pri prvem koraku ozonacije nastanejo resorcinol, katehol, aceton in formaldehid. Reakcija pri tem koraku je hitra, intermediati dosežejo vrh v koncentraciji že pri 15 minutah. Ti štirje intermediati se potem v času 40-90 minut ozonacije oksidirajo v organske kisline, in sicer v očetno, mravljinčno, maleinsko in oksalno kislino. Končno se organske kisline razgradijo do ogljikovega dioksida. Za to popolno oksidacijo organskih kislin je potrebna podaljšana ozonacija. Sam BPA pa naj bi se že po 5 minutah ozonacije učinkovito oksidiral. Če se BPA ne obdela dovolj, lahko pride do nastanka različnih razgradnih stranskih produktov (Tay in sod., 2012). Kusvuran in Yildirim (2013) sta opazila 10 različnih intermediatov med ozonacijo, po prvih petih minutah sta nastali malonska in oksalna kislina.

Kemijska analiza HPLC je pokazala, da je po ozonaciji modelnih vodnih raztopin BPA prišlo do zmanjšanja vsebnosti BPA v njej. Vodna raztopina BPA s koncentracijo 10 mg/L, izmerjena vrednost je bila 9,9 mg/L, je po ozonaciji imela koncentracijo BPA pod mejo zaznavnosti uporabljene metode. Koncentracija raztopine BPA z začetno koncentracijo 20 mg/L oz. izmerjeno 19,1 mg/L, pa je na koncu ozonacije znašala 0,36 mg/L. Na podlagi tega lahko rečemo, da je postopek ozonacije učinkovit za odstranjevanje hormonskega motilca BPA iz vode. To so ugotovile že predhodne raziskave. Vseeno pa je iz poskusa, ki so ga predhodno naredili na Kemijskem inštitutu, razvidno, da vpliva koncentracija BPA v vodi na stopnjo odstranitve z ozoniranjem. Modelna vodna raztopina z nižjo koncentracijo hormonskega motilca je po koncu postopka namreč vsebovala koncentracijo BPA pod mejo zaznavnosti, koncentracija vodne raztopine z višjo koncentracijo BPA pa je še bila v

območju detekcije metode. Obe raztopini sta bili ozonirani enako dolgo (2 h) in morda bi potrebovala vodna raztopina z višjo koncentracijo daljši čas ozoniranja. Iz naših poskusov je razvidno, da ozoniranje verjetno ni najbolj ustrezna metoda za odstranjevanje hormonskega motilca BPA iz voda, saj pri tem nastajajo razgradni produkti, ki so genotoksični.

6 SKLEPI

- S kometnim testom *in vitro* in uporabo testnega organizma *Tetrahymena thermophila* smo potrdili genotoksične učinke BPA in njegovih razgradnih produktov. Sta pa bili naši uporabljeni koncentraciji raztopin BPA (10 mg/L in 20 mg/L) višji od koncentracij, ki jih najdemo v dejanskih odpadnih vodah.
- Postopek ozonacije učinkovito odstrani BPA iz modelne raztopine BPA, ne zmanjša pa se njena genotoksičnost. Ta je ostala podobna oz. se je celo povečala. Raztopini BPA sta po ozonaciji ohranili genotoksični potencial zaradi razgradnih produktov BPA, ki so nastali po ozoniranju ter rezidualnega ozona.
- Genotoksičnost smo dokazali tudi v vzorcu ozonirane demineralizirane vode brez BPA, kar nakazuje na genotoksične učinke rezidualnega ozona. Ta verjetno povečuje stopnjo poškodb jedrne DNA pri vseh ozoniranih vzorcih.
- Kometni test *in vitro* se je izkazal za bolj primerne za ugotavljanje genotoksičnosti BPA in njegovih razgradnih produktov po ozonaciji kot kometni test *in vivo*.

7 POVZETEK

BPA je organska snov, ki se uporablja v proizvodnji polikarbonatnih plastik in epoksidnih smol. Najvišje koncentracije BPA vsebujejo industrijske odpadne vode in izcedki odlagališč odpadkov. Najdemo pa ga tudi v ostalih vodah (obdelane odpadne vode, reke, morja) ter v zemlji in v zraku. Zemlja se onesnaži predvsem z odpadki, ki jih odvržemo ljudje. BPA tako s svojo prisotnostjo v okolju povzroča akutno toksičnost za žive organizme in deluje kot hormonski motilec. V telo ljudi pride predvsem z uživanjem hrane z vsebnostjo BPA (migracija BPA iz embalaž hrane, ki so proizvedene iz BPA).

Zaradi možnih negativnih učinkov na zdravje ljudi in živali je potrebno odstranjevanje BPA iz okolja. Konvencionalni načini odstranjevanja BPA so neučinkoviti, saj je BPA obstojna spojina in ni primerna za biološko razgradnjo. Velik del hormonskih motilcev se v konvencionalnih čistilnih napravah odstrani z adsorpcijo v aktivno blato, kar lahko povzroči nadaljnje probleme pri obvladovanju blata. Zaradi tega se iščejo novi načini odstranjevanja tega hormonskega motilca in ena izmed možnosti so napredni oksidacijski procesi.

V našem primeru so modelno vodo z vsebnostjo BPA obdelali s postopkom ozonacije, ki je eden izmed alternativnih načinov odstranjevanja onesnažil iz voda. To pomeni, da so mešanico zraka in ozona uvajali v reaktor z vzorcem. Ozonacija se je v preteklosti izkazala kot učinkovit postopek za odstranjevanje BPA iz vodnih raztopin. Pri teh novih metodah pa moramo biti pazljivi, saj lahko ob teh postopkih nastanejo vmesni ali končni produkti, ki imajo enake ali celo večje biološke učinke na vodne organizme kot izhodna onesnažila.

To je bil tudi predmet našega raziskovanja. Z alkalno verzijo kometnega testa smo namreč ugotavljali genotoksičnost BPA in njegovih razgradnih produktov po ozonaciji. Kometni test *in vitro* in *in vivo* smo izvedli s evkariontskim organizmom, migetalkarjem *T. thermophila*. Za kulturo *T. thermophila* je znano, da je primeren organizem za ugotavljanje genotoksičnosti snovi. Možne genotoksične učinke BPA in njegovih razgradnih produktov po ozonaciji smo ocenili s kometnim parametrom OTM (repni moment po Olivu).

S postopkom ozonacije so uspešno odstranili hormonski motilec BPA iz modelne vode z njegovo vsebnostjo, kar potrjujejo že predhodne ugotovitve o učinkovitosti tega postopka. Vendar odstranitev BPA ni rešila problema, kajti genotoksični potencial v vodni raztopini je ostal. Rezultati kažejo, da je genotoksičnost raztopine BPA po obdelavi z ozonacijo podobna oz. celo večja kot pred obdelavo. V kometnem testu *in vivo* smo dokazali na meji statistično značilno genotoksičnost vodne raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/L po

ozonaciji, v kometnem testu *in vitro* pa smo dokazali genotoksičnost vseh vzorcev, najvišjo pa prav tako pri vzorcu BPA s koncentracijo 20 mg/L po ozonaciji. V vseh primerih je bila v raztopinah BPA po ozonaciji vrednost OTM večja kot pri raztopinah BPA pred ozonacijo. To kaže na genotoksičnost razgradnih produktov BPA, ki nastanejo po tem postopku. Ne ve se natančno, kateri so ti razgradni in vmesni produkti, saj še niso dokončno identificirani. Spreminjajo se tudi glede na trajanje ozonacije in doze ozona, ki se pri tem uporabi. Vzrok večje genotoksičnosti raztopin BPA po ozonaciji pa je lahko tudi rezidualni ozon, ki ostane v raztopinah po obdelavi s postopkom ozonacije.

Metode za odstranjevanje hormonskih motilcev niso uspešne, če zgolj odstranijo izhodno spojino. Preveriti je potrebno tudi vmesne ali končni produkte, ki nastanejo med samo obdelavo z določenim postopkom, in njihove biološke učinke na organizme.

8 VIRI

- Alum A., Yoon Y., Westerhoff P., Abbaszadegan M. 2004. Oxidation of Bisphenol A, 17 β -Estradiol, and 17 α -Ethinyl Estradiol and Byproduct Estrogenicity. *Environmental Toxicology*, 19, 3: 257–264
- Andreozzi R., Marotta R. 1999. Ozonation of p-chlorophenol in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 69: 303–317
- Asai D.J., Forney J.D. 2000. *Tetrahymena thermophila*. *Methods in cell biology*. London, Academic Press: 580 str.
- Audebert M., Dolo L., Perdu E., Cravedi J.-P., Zalko D. 2011. Use of the γ H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Archives of Toxicology*, 85: 1463–1473
- Bertanza G., Pedrazzani R., Papa M., Mazzoleni G., Steimberg N., Caimi L., Montani C., Dilorenzo D. 2010. Removal of BPA and NPnEOs from Secondary Effluents of Municipal WWTPs by Means of Ozonation. *Ozone: Science & Engineering*, 32: 204–208
- Bertanza G., Pedrazzani R., Dal Grande M., Papa M., Zambarda V., Montani C., Steimberg N., Mazzoleni G., Di Lorenzo D. 2011. Effect of biological and chemical oxidation on the removal of estrogenic compounds (NP and BPA) from wastewater: An integrated assessment procedure. *Water Research*, 45: 2473-2484
- Broota K.D. 1989. *Experimental Design in Behavioural Research*. New Delhi, New Age International: 460 str.
- Casals-Casas C., Desvergne B. 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annual Review Physiology*, 73: 135-162
- Chiang K., Lim T. M., Tsen L., Lee C. C. 2004. Photocatalytic Degradation and Mineralization of Bisphenol A by TiO₂ and Platinized TiO₂. *Applied Catalysis A*, 261, 2: 225-237
- Choi K.J., Kim S.G., Kim C.W., Park J.K. 2006. Removal efficiencies of endocrine disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular activated carbon adsorption, and chlorination. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 23, 3: 399-408

- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183–193
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Štětina R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23, 3: 143-151
- Deborde M., Rabouan S., Duguet J.-P., Legube B. 2005. Kinetics of Aqueous Ozone-Induced Oxidation of Some Endocrine Disruptors. *Environmental Science and Technology*, 39: 6086-6092
- Deborde M., Rabouan S., Mazellier P., Duguet J.-P., Legube B. 2008. Oxidation of bisphenol A by ozone in aqueous solution. *Water Research*, 42: 4299-4308
- Decordier I., Kirsch-Volders M. 2006. The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*, 607: 2–4
- Definition of Genotoxin. MedicineNet.com.
<http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=17538> (2. sept. 2013)
- Dhawan A., Anderson D. 2009. *The Comet Assay in Toxicology*. Cambridge, RSC Publishing: 478 str.
- Dhawan A., Baypayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 5-32
- Dias N., Lima N. 2002. A comparative study using a fluorescence-based and a direct-count assay to determine cytotoxicity in *Tetrahymena pyriformis*. *Research in Microbiology*, 153: 313–322
- Dobrzyńska M.M., Radzikowska J. 2013. Genotoxicity and reproductive toxicity of bisphenol A and X-ray/bisphenol A combination in male mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 36, 1: 19-26
- Dodds E.C., Lawson W. 1938. Molecular Structure in Relation to Oestrogenic Nucleus Activity. Compounds without a Phenanthrene. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 125: 222-232
- EFSA Scientific Committee. 2013. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA Journal*, 11, 3: 3132

- Fic A., Žegura B., Sollner Dolenc M., Filipič M., Peterlin Mašič L. 2013. Mutagenicity and DNA damage of bisphenol A and its structural analogues in HepG2 cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64: 189-200
- Fürhacker M., Scharf S., Weber H. 2000. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, 41: 751-756
- Garoma T., Matsumoto S. 2009. Ozonation of aqueous solution containing bisphenol A: Effect of operational parameters. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 1185-1191
- Garoma T., Matsumoto S.A., Wu Y., Klinger R. 2010. Removal of bisphenol A and its reaction-intermediates from aqueous solution by ozonation. *Ozone Science and Engineering*, 32: 338-343
- Glei M., Hovhannisyann G., Pool-Zobel B.L. 2009. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research*, 681: 33-43
- Gravetter F.J., Wallnau L.B. 2009. *Essentials of Statistics for The Behavioral Sciences*. 8th ed. Belmont, Cengage Learning: 648 str.
- Gültekin I., Ince N.H. 2007. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*, 85: 816-832
- Gültekin I., Mavrov V., Ince N.H. 2009. Degradation of Bisphenol-A by Ozonation. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 12, 2: 242-248
- Hernández-Leal L., H. Temmink, Zeeman G., Buisman C.J.N. 2011. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. *Water Research*, 45: 2887-2896
- Hodgson E. 2010. *A Textbook of Modern Toxicology*. 4th ed. New Jersey, Wiley: 672 str.
- Ibuki Y., Tani Y., Toyooka T. 2008. UVB-Exposed Chlorinated Bisphenol A Generates Phosphorylated Histone H2AX in Human Skin Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 2: 1770-1776
- Iso T., Watanabe T., Iwamoto T., Shimamoto A., Furuichi Y. 2006. DNA Damage Caused by Bisphenol A and Estradiol through Estrogenic Activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2: 206-210

- Izzotti A., Kanitz S., D'Agostini F., Camoirano A., De Flora S. 2009. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA *in vitro* and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation Research*, 679: 28-32
- Kang J.-H., Kondo F., Katayama Y. 2006. Human Exposure to Bisphenol A. *Toxicology*, 226, 2-3: 79-89
- Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H. 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, 40: 1131-1142
- Kusvuran E., Yildirim D. 2013. Degradation of bisphenol A by ozonation and determination of degradation intermediates by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemical Engineering Journal*, 220: 6–14
- Lah B., Malovrh S., Narat M., Cepeljnik T., Marinsek-Logar R. 2004. Detection and Quantification of Genotoxicity in Wastewater-Treated *Tetrahymena thermophila* Using the Comet Assay. *Environmental Toxicology*, 19: 545-553
- Latorre A., Lacorte S., Barceló D. 2003. Presence of Nonylphenol, Octylphenol and Bisphenol a in Two Aquifers Close to Agricultural, Industrial and Urban Areas. *Chromatographia*, 57, 1-2: 111-116
- Lee M., Kwon J., Chung M.-K. 2003. Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing comet assay and apoptotic assay in combination. *Mutation Research*, 541: 9-19
- Legube B., Guyon S., Sugimitsu H., Dore M. 1983. Ozonation of some aromatic compounds in aqueous-solution-styrene, benzaldehyde, naphthalene, diethylphthalate, ethyl and chloro benzenes. *Ozone Science and Engineering*, 5: 151– 170
- Liao W., McNutt M.A., Zhu W.-G. 2009. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48: 46–53
- Liehr T., Starke H., Weise A., Lehrer H., Claussen U. 2004. Multicolor FISH probe sets and their applications. *Histology and Histopathology*, 19: 229-237

- Lindič N. 2008. Ugotavljanje genotoksičnosti jezerskih voda v Šaleški dolini s kometnim testom na praživali *Tetrahymena thermophila*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 47 str.
- Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of the Total Environment*, 407: 731-748
- Martin W.E., Bridgmon K.D. 2012. *Quantitative and Statistical Research Methods: From Hypothesis to Results*. San Francisco, Wiley: 496 str.
- Matsumoto S.T., Mantovani M.S., Malagutti M.I.A., Dias A.L., Fonseca I.C., Marin-Morales M.A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 1: 148-158
- Melzer D., Osborne N.J., Henley W.E., Cipelli R., Young A., Money C., McCormack P., Luben R., Khaw K., Wareham N.J., Galloway T.S. 2012. Urinary Bisphenol A Concentration and Risk of Future Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. *Circulation*, 125: 1482-1490
- Miller R.L., Brewer J.D. 2003. *The A-Z of Social Research*. London, Sage Publications: 362 str.
- Miloshev G., Mihaylov I., Anachkova B. 2002. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. *Mutation Research*, 513: 69–74
- Mohapatra D.P., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. 2010. Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge – Fate of bisphenol A. *Chemosphere*, 78: 923-941
- Mortelmans K., Zeiger E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29–60
- Naik P., Vijayalaxmi K.K. 2009. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of Bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice. *Mutation Research*, 676: 106-112

- Nakada N., Shinohara H., Murataa A., Kiri K., Managaki S., Sato N., Takada H. 2007. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 41: 4373-4382
- Nicolau A., Dias N., Mota M., Lima N. 2001. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Research in Microbiology*, 152: 621–630
- Oda Y., Nakamura S., Oki I. 1985. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutation Research*, 147: 219-229
- Olive P.L., Banáth J., Durand R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122: 86-94
- Ostling, O. and Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123: 291-298
- Park S.-Y., Choi J. 2009. Genotoxic Effects of Nonylphenol and Bisphenol A Exposure in Aquatic Biomonitoring Species: Freshwater Crustacean, *Daphnia magna*, and Aquatic Midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 83: 463–468
- PRWeb. 2014. Global BPA Production to Exceed 5.4 Mln Tonnes by 2015, According to In-demand Report by Merchant Research & Consulting: 3 str.
<http://www.prweb.com/pdfdownload/11761146.pdf> (26. jun. 2014)
- Rigol A., Latorre A., Lacorte S., Barceló D. 2002. Determination of toxic compounds in paper-recycling process waters by gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 963: 265–275
- Rivas F.J., Encinas Á., Acedo B., Beltrán F.J. 2009. Mineralization of bisphenol A by advanced oxidation processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84: 589–594
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254

- Rosenfeldt E.J., Linden K.G., Canonica S., von Gunten U. 2006. Comparison of the efficiency of dOH radical formation during ozonation and the advanced oxidation processes O_3/H_2O_2 and UV/H_2O_2 . *Water Research*, 40: 3695-3704
- Sahu P.K. 2013. *Research Methodology: A Guide for Researchers In Agricultural Science, Social Science and Other Related Fields*. New Delhi, Springer: 400 str.
- Sauvaigo S., Serres C., Signorini N., Emonet N., Richard M.-J., Cadet J. 1998. Use of the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay for the Immunofluorescent Detection of Specific DNA Damage. *Analytical Biochemistry*, 259: 1-7
- Schaar H., Clara M., Gans O., Kreuzinger N. 2010. Micropollutant removal during biological wastewater treatment and a subsequent ozonation step. *Environmental Pollution*, 158: 1399–1404
- Schultz T.W. 1997. Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint – a surrogate for fish lethality. *Toxicology Methods*, 7: 289-309
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191
- Singh N.P., Stephens R.E., Singh H., Lai H. 1999. Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutation Research*, 429: 159-168
- Speit G., Hartmann A. 2005. A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage. *Methods in Molecular Biology*, 291: 85-95
- Stahelln J., Holgné J. 1982. Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen Peroxide. *Environmental Science and Technology*, 16, 10: 676-681
- Staples C. A., Dorn P. B., Klecka G. M., O'Blook S. T., Harris L. R. 1998. A Review of the Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 10: 2149-2173
- Sugiura-Ogasawara M., Ozaki Y., Sonta S., Makino T., Suzumori K. 2005. Exposure to bisphenol A is associated with recurrent Miscarriage. *Human Reproduction*, 20, 8: 2325–2329

- Tabb M.M., Blumberg B. 2006. New Modes of Action for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Molecular Endocrinology*, 20, 3: 475–482
- Takeuchi T., Tsutsumi O., Ikezuki Y., Takai Y., Taketani Y. 2004. Positive Relationship between Androgen and the Endocrine Disruptor, Bisphenol A, in Normal Women and Women with Ovarian Dysfunction. *Endocrine Journal*, 51, 2: 165-169
- Tay K.S., Abd Rahman N., Bin Abas M.R. 2012. Degradation of bisphenol A by ozonation: rate constants, influence of inorganic anions, and by-products. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 6, 1: 77-94
- Tayama S., Nakagawa Y., Tayama K. 2008. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutation Research*, 649: 114-125
- Taylor J.A., vom Saal F.S., Welshons W.V., Drury B., Rottinghaus G., Hunt P.A., Toutain P.-L., Laffont C.M., VandeVoort C.A. 2011. Similarity of Bisphenol A Pharmacokinetics in Rhesus Monkeys and Mice: Relevance for Human Exposure. *Environmental Health Perspectives*, 119, 4: 422-430
- Tiwari D., Kamble J., Chilgunde S., Patil P., Maru G., Kawle D., Bhartiya U., Joseph L., Vanage G. 2012. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutation Research*, 743: 83-90
- Tsutsui T., Tamura Y., Yagi E., Hasegawa K., Takahashi M., Maizumi N., Yamaguchi F., Barrett J.C. 1998. Bisphenol-a Induces Cellular Transformation, Aneuploidy and DNA Adduct Formation in Cultured Syrian Hamster Embryo Cells. *International Journal of Cancer*, 75: 290–294
- Ulutaş O.K., Yıldız N., Durmaz E., Ahbab M.A., Barlas N., Çok İ. 2011. An *in vivo* assessment of the genotoxic potential of bisphenol A and 4-tert-octylphenol in rats. *Archives of Toxicology*, 85: 995–1001
- Umar M., Roddick F., Fan L., Aziz H.A. 2013. Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater – A review. *Chemosphere*, 90: 2197-2207
- Vijayalaxmi, Strauss G.H.S., Tice R.R. 1993. An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutation Research*, 292: 123-128

- vom Saal F.S., Hughes C. 2005. An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 113, 8: 926-933
- Wetherill Y.B., Akingbemi B.T. Kannod J., McLachlan J.A., Nadal A., Sonnenschein C., Watson C.S., Zoeller R.T., Belcher S.M. 2007. *In vitro* molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology*, 24: 178–198
- Wu H.-J., Liu C., Duan W.-X., Xu S.-C., He M.-D., Chen C.-H., Wang Y., Zhou Z., Yu Z.-P., Zhang L., Chen Y. 2013. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutation Research*, 752: 57– 67
- Wu J., Rudy K., Spark J. 2000. Oxidation of aqueous phenol by ozone and peroxidase. *Advances in Environmental Research*, 4: 339–346
- Zhang H., Yamada H., Tsuno H. 2008. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals during Ozonation of Municipal Sewage with Brominated Byproducts Control. *Environmental Science and Technology*, 42: 3375-3380
- Zhou C., Li Z., Diao H., Yu Y., Zhu W., Dai Y., Chen F.F., Yang J. 2006. DNA damage evaluated by γ H2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutation Research*, 604, 1-2: 8–18

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, da mi je omogočila izdelavo magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi za pomoč in pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se asist. dr. Maši Zorec za vso pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu ter za popravke in pomoč pri pisanju magistrskega dela.

Prof. dr. Damjani Drobne se zahvaljujem za pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se gospe Marti Majdič za pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi staršem in bratu za podporo skozi celotni študij.

PRILOGE

Priloga A

Rezultati posameznih poskusov kometnega testa *in vivo*

Priloga A1: Poskus št. 1 kometnega testa *in vivo*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	56,7754
BPA 10	100	36,5369
BPA 20	100	31,4063
O3-S	100	37,8406
O3-BPA 10	100	31,6689
O3-BPA 20	100	60,8112
PK	100	72,1911

Priloga A2: Poskus št. 2 kometnega testa *in vivo*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	47,9949
BPA 10	100	53,7145
BPA 20	100	65,7708
O3-S	100	52,1792
O3-BPA 10	100	73,1879
O3-BPA 20	100	72,5005
PK	100	73,6127

Priloga A3: Poskus št. 3 kometnega testa *in vivo*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	58,281
BPA 10	100	65,0689
BPA 20	100	65,7332
O3-S	100	59,6483
O3-BPA 10	100	58,8515
O3-BPA 20	100	102,3764
PK	100	97,9434

Priloga B

Rezultati posameznih poskusov kometnega testa *in vitro*

Priloga B1: Poskus št. 1 kometnega testa *in vitro*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	28,1275
BPA 10	100	63,9219
BPA 20	100	62,4159
O3-S	100	46,3686
O3-BPA 10	100	60,9044
O3-BPA 20	100	64,7305
PK	100	81,3976

Priloga B2: Poskus št. 2 kometnega testa *in vitro*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	30,408
BPA 10	100	66,7741
BPA 20	100	66,8387
O3-S	100	59,1849
O3-BPA 10	100	64,3891
O3-BPA 20	100	69,38
PK	100	96,5827

Priloga B3: Poskus št. 3 kometnega testa *in vitro*

Vzorec	Število meritev	Povprečni OTM
NK	100	26,1846
BPA 10	100	71,3089
BPA 20	100	78,1069
O3-S	100	67,201
O3-BPA 10	100	80,4689
O3-BPA 20	100	92,0616
PK	100	96,016

Priloga C

Izračunane vrednosti relativnega OTM

Priloga C1: Povprečne vrednosti relativnega OTM kometnega testa *in vivo*

Vzorec	Povprečni relativni OTM
NK	1,00000
BPA 10	0,95972
BPA 20	1,01713
O3-S	0,92571
O3-BPA 10	1,03083
O3-BPA 20	1,44609
PK	1,49527

Priloga C2: Povprečne vrednosti relativnega OTM kometnega testa *in vitro*

Vzorec	Povprečni relativni OTM
NK	1,00000
BPA 10	2,39728
BPA 20	2,46668
O3-S	2,05377
O3-BPA 10	2,45198
O3-BPA 20	2,69961
PK	3,24566