

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina LEVART

**DOLOČEVANJE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI
VTOKOV IN IZTOKOV ČISTILNIH NAPRAV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina LEVART

**DOLOČEVANJE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI VTOKOV IN
IZTOKOV ČISTILNIH NAPRAV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF ESTROGENIC ACTIVITY OF INFLUENTS
AND EFFLUENTS FROM WASTEWATER TREATMENT PLANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 4. 6. 2009 za mentorico diplomskega imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za somentorico dr. Tatjano Tišler.

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: doc. dr. Tatjana TIŠLER
Kemijski inštitut Ljubljana

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Katarina Levart

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 502/504(043.2)=163.6
KG ekotoksikologija/varstvo okolja/biološki testi/test YES/čistilne naprave/odpadne vode/estrogenska aktivnost/Slovenija
KK AGRIS T01
AV LEVART, Katarina
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/TIŠLER, Tatjana (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2009
IN DOLOČEVANJE ESTROGENSKE AKTIVNOSTI VTOKOV IN IZTOKOV ČISTILNIH NAPRAV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 61 str., 8 pregl., 34 sl., 48 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Že nekaj let predstavlja prisotnost hormonskih motilcev z estrogenim delovanjem v vodah pereč problem v mnogih deželah sveta. To je skupina spojin, v katero spadajo naravni in sintetični hormoni ter spojine, ki oponašajo delovanje hormonov. Njihovo nepopolno odstranjevanje iz odpadnih vod vpliva na hormonska ravnovesja ter posledično na razvoj, razmnoževanje in obnašanje organizmov, ki živijo v vodotokih za iztoki teh odpadnih voda. Namen našega dela je bil ugotoviti prisotnost estrogensko aktivnih spojin v odpadnih vodah na vtoku in izoku čistilnih naprav ter identificirati in kvantificirati omenjene spojine z estrogensko aktivnostjo. Za to smo uporabili biološko metodo (test YES) in kemijsko analitsko metodo SPME/GC-MS (Solid phase microextraction/Gas chromatography mass spectrometry). Najprej smo vzorce skoncentrirali s postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE). Pri tej metodi smo uporabili kolone Water Oasis in topili metanol in etilacetat. Koncentrirane vzorce smo nato analizirali na estrogensko aktivnost s testom YES, kjer smo uporabili gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da je test YES primeren za zaznavanje spojin z estrogensko aktivnostjo, saj smo estrogensko aktivnost dokazali v večini primerov. Težave pri ugotavljanju estrogenske aktivnosti se kažejo pri zaviranju rasti kvasovk zaradi prisotnih strupenih snovi v odpadnih vodah. Rešitev se ponuja v dodatnem predčiščenju vzorcev. Ugotovili smo, da so v slovenskih odpadnih vodah prisotni estrogeni in ksenoestrogeni. V iztokih čistilnih naprav se nahajajo delno ali pretežno v neaktivni obliki in se lahko na svoji poti iz čistilnih naprav ponovno aktivirajo. Kot taki predstavljajo grožnjo vodnim ekosistemom in zdravju ljudi, saj se zaradi nepopolnega odstranjevanja lahko pojavijo tudi v pitni vodi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 502/504(043.2)=163.6
CX ecotoxicology/environmental protection/biological tests/test YES/wastewater treatment plants/waste waters/estrogenic activity/Slovenia
CC AGRIS T01
AU Levart, Katarina
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/TIŠLER, Tatjana (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2009
TI DETERMINATION OF ESTROGENIC ACTIVITY OF INFLUENTS AND EFFLUENTS FROM WASTEWATER TREATMENT PLANTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 61 p., 8 tab., 34 fig., 48 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the last few decades the presence of endocrine disrupters in water has become a major concern worldwide. This group of chemical substances consists of a natural and man-made hormones and substances that mimic the effect of hormones (xenoestrogens). Their difficult removal from waste water affects aquatic organisms' endocrine systems and consequently their development, reproduction and behavior. The purpose of our work was to determine the presence of compounds with estrogenic properties in influents and effluents of wastewater treatment plants and to quantify them. Therefore we used the biological YES (Yeast estrogen screen) test and chemical analytical method SPME/GC-MS (Solid phase microextraction/Gas chromatography mass spectrometry). In the first part of our experiment, the SPE technique was used for the concentration of samples. We used Water Oasis columns and two different solvents (methanol and ethyl acetate) for elution of bonded analits. In the second part of the experiment we tested concentrated samples for an estrogenic activity with the YES test, where we used genetic modified yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Within this test we also examined the inhibition of growth, which was higher in samples from influents. Based on results we can conclude that the YES test is appropriate for determine compounds with estrogenic activity, the only problem was, that the usually detected inhibition of growth was too high. For the solution we propose additional purification of samples. We detected endocrine disrupters in Slovenian wastewaters. In effluents they are in an inactive form and they can be reactivated during their way from wastewater treatment plants. This fact represents a threat to the aquatic ecosystems and eventually also to human's health, because of their appearance in drinking water.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MONITORING ODPADNIH VODA	4
2.2 HORMONSKI MOTILCI OZ. MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA	4
2.3 NARAVNI IN SINTETIČNI STEROIDNI HORMONI	6
2.4 DEKONJUGACIJA	8
2.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV	8
2.5.1 Biološke metode	9
2.5.1.1 Imunološke metode	9
2.5.1.2 Biotesti <i>in vivo</i>	9
2.5.1.3 Biotesti <i>in vitro</i>	10
2.5.1.3.1 Test YES	11
2.5.2 Metode koncentriranja	12
2.5.2.1 Ekstrakcija na trdni fazni (SPE)	12
2.5.2.2 Princip ekstrakcije na trdni fazni	13
2.5.3 Kemijo-fizičke metode	14
2.5.3.1 GC/MS	14
2.5.3.2 SPME/GC-MS	15
3 MATERIAL IN METODE	17

3.1	VZORCI	17
3.1.1	Čiščenje vodnih vzorcev	17
3.1.2	Kolone Water Oasis	17
3.2	POSTOPEK KONCENTRIRANJA	17
3.2.1	Začetni volumni posameznih vzorcev	17
3.2.2	Postopek koncentriranja	18
3.3	POSTOPEK DEKONJUGACIJE	21
3.4	TESTNI ORGANIZEM	21
3.4.1	Kvasovka <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	21
3.4.1.1	Priprava gojišč	22
3.4.1.1.1	Priprava minimalnega gojišča (pH = 7,1)	22
3.4.1.1.2	Priprava rastnega gojišča	23
3.4.1.1.3	Raztopina glukoze	23
3.4.1.1.4	Raztopina aspartata	23
3.4.1.1.5	Priprava raztopine vitaminov	23
3.4.1.1.6	Raztopina treonina	24
3.4.1.1.7	Bakrov (II) sulfat	24
3.5	NANOS VZORCA NA MIKROTITERSKO PLOŠČO	24
3.6	IZRAČUN ESTROGENSKE AKTIVNOSTI VZORCEV	25
3.7	IZRAČUN ZAVIRANJA RASTI KVASOVK	26
4	REZULTATI	27
4.1	ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE A	27
4.1.1	Vtok	27
4.1.1.1	Zaviranje rasti kvasovk	27
4.1.1.2	Rezultati testa YES	28
4.1.2	Iztok	29
4.1.2.1	Zaviranje rasti kvasovk	29
4.1.2.2	Rezultati YES testa	29
4.2	ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE B	32
4.2.1	Vtok	32

4.2.1.1	Zaviranje rasti kvasovk	32
4.2.1.2	Rezultati testa YES	32
4.2.2	Iztok	35
4.2.2.1	Zaviranje rasti	35
4.2.2.2	Rezultati testa YES	35
4.3	ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE C	37
4.3.1	Vtok	37
4.3.1.1	Zaviranje rasti kvasovk	37
4.3.1.2	Rezultati testa YES	37
4.3.2	Iztok	39
4.3.2.1	Zaviranje rasti kvasovk	39
4.3.2.2	Rezultati testa YES	40
4.4	ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE D	42
4.4.1	Vtok	42
4.4.1.1	Zaviranje rasti kvasovk	42
4.4.1.2	Test YES	42
4.4.2	Iztok	44
4.4.2.1	Zaviranje rasti kvasovk	44
4.4.2.2	Rezultati testa YES	45
4.5	GC-MS	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	TEST YES	48
5.1.1	Zaviranje rasti kvasovk	48
5.1.2	Estrogenska aktivnost vzorcev iz čistilnih naprav	50
5.1.3	Estrogenska aktivnost vzorcev vode po dekonjugaciji	51
6	POVZETEK	56
7	VIRI	58
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave A pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	28
Preglednica 2: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave A pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	31
Preglednica 3: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave B pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	34
Preglednica 4: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave B pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	36
Preglednica 5: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave C pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	39
Preglednica 6: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave C pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	41
Preglednica 7: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave D pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	44
Preglednica 8: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave D pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.	46

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: 17 β -estradiol (E2)	7
Slika 2: 17 α -etinilestradiol (EE2)	7
Slika 3: Shematski prikaz estrogensko aktiviranega ekspresijskega sistema v kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Routledge in Sumpter, 1996)	12
Slika 4: Primer vakuumskoga razdelilnika pri ekstrakciji na trdni fazi (Dean, 1998).	14
Slika 5: Postopek adsorpcije spojin iz vzorca v viali na nitko SPME (Bulletin 923B, 2004)	15
Slika 6: Postopek termalne desorpcije spojin iz nitke SPME v injektorju (Bulletin 923B, 2004)	16
Slika 7: Shema koncentriranja vzorcev skozi WATERS OASIS HLB.	19
Slika 8: Prikaz, kako smo pridobili koncentrate in izračunali koncentracijske vrednosti.	20
Slika 9: Prikaz načina izračuna estrogenske aktivnosti	26
Slika 10: Zaviranje rasti kvasovk <i>S. cerevisiae</i> izpostavljenih vzorcu vtoka na čistilni napravi A	27
Slika 11: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	28
Slika 12: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	28
Slika 13: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave A	29
Slika 14: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	30
Slika 15: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	30
Slika 16: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave B.	32
Slika 17: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	33
Slika 18: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	33

Slika 19: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave B.	35
Slika 20: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	35
Slika 21: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	36
Slika 22: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave C.	37
Slika 23: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	38
Slika 24: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	38
Slika 25: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave C.	39
Slika 26: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	40
Slika 27: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	40
Slika 28: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave D.	42
Slika 29: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	43
Slika 30: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	43
Slika 31: Zaviranje rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave D.	44
Slika 32: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	45
Slika 33: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.	45

Slika 34: Kromatogram vzorca iz vtoka čistilne naprave D (analiza SPME/GC-MS).

47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ER	estrogenski receptor
EA	estrogenska aktivnost
SPE	ekstrakcija na trdni fazi
SPME	mikroekstrakcija na trdni fazi
E1	Estron
E2	17β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17α -etinilestradiol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (imunološka metoda, ki temelji na reakcijah estrogenov s protitelesi)
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry (plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo)
YES	Yeast estrogen screen (biološki test, pri katerem uporabljamo kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
MetOH	Metanol
EtAc	Etilacetat

1 UVOD

Leta 1996 je ameriška agencija za zaščito okolja objavila neželene zdravstvene vplive spojin z estrogenским delovanjem in jih označila kot okoljski problem (Barlow, 2001). Povod za to so bila prva alarmna sporočila iz Velike Britanije leta 1993, ko je za iztokom čistilne naprave prišlo do pojava hermafroditizma pri ribah (ENDS, 1993, cit. po De Mes, 2007). Na področju hormonskih motilcev se je opravilo veliko raziskav in že od leta 1995 so se na to temo pojavile prve znanstvene publikacije. Rezultat teh raziskav je bila med drugim tudi identifikacija spojin, ki imajo negativen vpliv na endokrini sistem. Te spojine, ki jih je proizvedel človek in ki delujejo tako, da oponašajo delovanje naravnih estrogenov, imenujemo ksenoestrogeni in vključujejo alkilfenole, pesticide, poliklorirane spojine, plastifikatorje in polibromirane difeniletre (IEH, 1995). Poleg njih predstavljajo pomemben del hormonskih motilcev tudi hormoni z estrogenским delovanjem – tako naravni kot sintetični. Med naravne prištevamo estriol (E3), 17β -estradiol (E2) in estron (E1), 17α -etinilestradiol (EE2) pa je sintetični hormon, ki je sestavina kontracepcijskih tablet. Omenjeni hormoni so odgovorni za 90 % estrogenskega delovanja v iztokih gospodinjskih odpadnih vod (Körner in sod., 2001; Onda in sod., 2003). Čeprav te spojine niso vključene v končni seznam prednostnih snovi, ki ga je zasnovala Evropska unija v sklopu direktive o vodi (EU, 2001), potrebujejo posebno pozornost, kar so potrdili številni raziskovalci, ki so v njih prepoznali potencialno tveganje za vodno okolje (Bursch in sod., 2004; Ternes in sod., 2004).

Pomemben vir spojin z estrogenским delovanjem so iztoki čistilnih naprav, od koder se omenjene spojine širijo naprej v površinske vode, v tla in tudi v podtalnico. Njihovo nepopolno odstranjevanje iz odpadnih vod dokazano vpliva na hormonska ravnovesja ter posledično na razvoj, razmnoževanje in obnašanje organizmov, ki živijo v vodotokih za iztoki teh odpadnih voda. Povzročajo feminizacijo ribjih samcev, veliko študij pa je že dokazalo, da vplivajo tudi na endokrini sistem ptic, plazilcev in sesalcev. Izvzeti nismo niti ljudje, saj so znanstveniki ugotovili, da izpostavljenost spojinam z estrogenско aktivnostjo pri moških povzroči zmanjšano število in aktivnost semenčic (Auger in sod., 1995) ter da spojine z estrogenско aktivnostjo pospešujejo tvorbo določenih tipov tumorjev (Adami in sod., 1994).

Hormonski motilci, ksenoestrogeni, estrogensko aktivne spojine, motilci endokrinega sistema ... (v nadaljevanju hormonski motilci) so imena, ki se uporabljajo za skupino spojin, ki oponašajo delovanje estrogenov. Nekateri hormonski motilci so aktivni že v zelo majhnih koncentracijah (ng/l), zato je za njihovo učinkovito odstranjevanje in s tem zaščito pred onesnaženjem vodotokov pomembna njihova identifikacija. Z biološkimi metodami tako ugotavljamo prisotnost estrogensko aktivnih spojin v vodi, medtem ko jih s kemijskimi analitskimi metodami nato natančno identificiramo in kvantificiramo.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

V diplomski nalogi smo preverjali prisotnost hormonskih motilcev v vtokih in iztokih različnih čistilnih naprav. Vzorce smo pred samo analizo koncentrirali s t. i. postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE), pri čemer smo za elucijo uporabili bolj polaren metanol in manj polaren etilacetat, da bi zaobjeli širok spekter spojin z estrogensko aktivnostjo. S postopkom dekonjugacije smo želeli aktivirati konjugirane in zato neaktivne naravne in sintetične estrogene (E2, EE2).

Vzorce smo po koncentriranju (in dekonjugaciji) analizirali na estrogensko aktivnost z biološkim testom YES, pri katerem smo uporabili gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*.

Namen našega dela je bil z biološkim testom YES ugotoviti prisotnost estrogensko aktivnih spojin v odpadnih vodah na vтуku in iztoku čistilnih naprav ter z kemijsko metodo SPME/GC-MS (mikroekstrakcija na trdni fazi/plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo) identificirati in kvantificirati omenjene spojine z estrogensko aktivnostjo.

V diplomski nalogi smo preverjali naslednje hipoteze:

1. s testom YES lahko zaznamo estrogensko aktivnost v odpadnih vodah;
2. s testom YES lahko zaznamo prisotnost spojin E2 in EE2 v vtokih in iztokih različnih komunalnih čistilnih naprav;
3. s testom YES lahko preverimo učinkovitost čistilnih naprav pri odstranjevanju estrogensko aktivnih spojin;

4. s procesom dekonjugacije z encimom β -glukuronidaza se bo estrogenska aktivnost povečala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MONITORING ODPADNIH VODA

Znanstveniki iz več evropskih držav so se združili v projektu COMPREHEND, v katerem so izvedli 3-letni (1999–2001) monitoring iztokov iz komunalnih čistilnih naprav. Rezultati so pokazali, da so hormonski motilci na splošno razširjeni po Evropi. Tako so pri približno tretjini preiskovanih komunalnih odpadnih vod in tudi pri nekaterih industrijskih odpadnih vodah določili snovi z estrogenskim delovanjem. Estrogenko aktivnost so določali tako z *in vivo* kot z *in vitro* tehnikami (Eggen in sod., 2003).

Povprečne koncentracije estrogenov, merjenih v iztokih čistilnih naprav, so v območju od 1 do 11 ng/l za E1, E2 in EE2 na Švedskem (Larsson in sod., 1999), v Nemčiji in Kanadi (Ternes in sod., 1999), v jugozahodni Nemčiji (Spengler in sod., 2001), Veliki Britaniji (Desbrow in sod., 1998), Italiji (Baronti in sod., 2000) in na Nizozemskem (Belfroid in sod., 1999). Vrednosti za individualne meritve so lahko večje, maksimalna vrednost, izmerjena za E1, je bila 76 ng/l v Veliki Britaniji (Desbrow in sod., 1998) ter 64 ng/l za E2 in 42 ng/l za EE2, obe vrednosti sta bili izmerjeni v Kanadi (Ternes in sod., 1999).

2.2 HORMONSKI MOTILCI OZ. MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

Endokrini sistem skupaj z živčnim in imunskim sistemom predstavlja glavni regulatorni mehanizem, ki nadzoruje različne ključne funkcije v telesu človeka in živali.

Celice z endokrinim izločanjem sintetizirajo in izločajo hormone v zelo majhnih koncentracijah v krvni obtok, preko katerega le-ti prispejo do tarčnega organa. Hormoni se prenašajo po krvi v prosti obliki ali s pomočjo prenašalnih proteinov in se v tarčnih organih vežejo na posebne receptorje na površini oz. znotraj celice. Vezava hormon-receptor temelji na principu »ključ in ključavnica«. Hormoni vplivajo na številne pomembne regulatorne, rastne, razvojne in homeostatske mehanizme organizma, kot so razmnoževanje, vzdrževanje normalne koncentracije glukoze in ionov v krvi, krvni pritisk, splošni metabolizem, in na druge funkcije mišičnega in živčnega sistema. Ravnotežje hormonov (homeostaza) v organizmu je nujno potrebno za preprečevanje funkcionalnih nepravilnosti. Endokrini sistem ima zato številne povratne mehanizme, ki telesu omogočajo fleksibilni odziv na spremembe v koncentracijah hormonov. Vendar je ta

kompleksni sistem zelo občutljiv na zunanje vplive, ki lahko resno škodujejo celotnemu razvoju organizma (Lintelmann in sod., 2003).

Hormonski motilci so organizmu načeloma tuje snovi, ki vplivajo na sintezo, izločanje, transport, vezavo, delovanje in odstranjevanje naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje ravnotesja v organizmu, razmnoževanje, razvoj ali/in obnašanje (U.S. EPA, 1997).

V okolju najpogosteje povzročajo težave naravni in sintetični estrogeni kot tudi umetno proizvedene snovi, ki posnemajo delovanje estrogenov (ksenoestrogeni). Hormonski motilci z estrogenskim delovanjem so:

- **naravni in sintetični steroidni hormoni**, ki uravnavajo razmnoževanje in vplivajo na rast človeka in živali;
- **fitoestrogeni**, ki so naravni rastlinski proizvodi, najpomembnejši med njimi so izoflavoni in lignani, ki izkazujejo estrogenско aktivnost, ter proizvodi gliv **mikoestrogeni**;
- **pesticidi** – obsežna skupina biološko aktivnih snovi, npr. DDT, ciklodieni, atrazin, metoksiklor, pesticidi, ki imajo na organsko skupino vezano kovino živo srebro, svinec ali tributil kositer (TBT);
- **poliklorirane spojine**, npr. poliaromatski ogljikovodiki (PAH), ki nastajajo pri nepopolnem izgorevanju, poliklorirani bifenili (PCB), ki jih uporabljam v industriji kot plastifikatorje, maziva, hladilne tekočine, ter **polibromirani difeniletri**, ki se dodajajo v materiale za zaviranje gorenja;
- **organske kisikove spojine**, kamor uvrščamo bisfenole, ftalate, ki jih uporabljam v proizvodnji plastike, in dioksine, ki so prav tako prisotni v plastiki ter tudi v smolah in belilih in
- **površinsko aktivne snovi** – skupina kemikalij, ki se pretežno uporablja v proizvodnji detergentov, npr. alkilfenolni etoksilati (APnEO), predvsem nonilfenolne in oktilfenolne spojine (Lintelmann in sod., 2003).

Mehanizmi delovanja hormonskih motilcev so različni. Lahko se vežejo neposredno na hormonske receptorje, lahko pa posredno vplivajo na endokrini sistem na različnih ravneh.

Pri neposredni vezavi na hormonske receptorje lahko delujejo kot agonisti oz. antagonisti. Kot agonist se spojina veže na receptor na enak način kot naravni hormon, kar sproži aktivacijo hormonskega receptorja in celotnega hormonskega sistema. Večina ksenoestrogenov, ki so po strukturi podobni estrogenom, deluje kot agonisti. Drugi način vezave hormonskega motilca na hormonski receptor je antagonističen. Antagonist je spojina, ki s svojo vezavo na receptor inhibira ali zmanjša odzive receptorja in s tem tudi naravnega hormona. Zaviranje receptorja je lahko kompetitivno (naravni hormon in antagonist tekmujeta za isto vezavno mesto) ali nekompetitivno (antagonist se veže na receptor, vendar ne na njegovo aktivno vezavno mesto). Tipični antagonisti so nekateri herbicidi. Tako pri agonistični kot antagonistični reakciji med ligandi in hormonskimi receptorji igra ključno vlogo koncentracija liganda. (Kelce in sod., 1995, cit. po Lintelmann, 2003; Cook in sod., 1993, cit. po Lintelmann, 2003).

Posreden vpliv hormonskih motilcev na endokrini sistem je vpliv na samo koncentracijo hormonov v organizmu, kar počnejo z zaviranjem pomembnih encimsko kataliziranih reakcij. Primer je encim aromataza, ki pretvarja testosteron v estrogen. Zaviranje tega encima vodi v povišano koncentracijo testosterona in zmanjšano koncentracijo estrogena (Bettin in sod., 1996, cit. po Lintelmann, 2003). Na porušeno ravnotesje hormonov vpliva tudi indukcija encimov, ki spadajo v skupino citokrom P450. Ti encimi imajo ključno vlogo pri sintezi in razgradnji steroidnih hormonov (Soontornchat in sod., 1994, cit. po Lintelmann, 2003; Safe in Krishnan, 1995, cit. po Lintelmann, 2003).

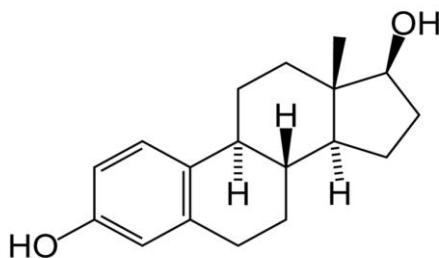
2.3 NARAVNI IN SINTETIČNI STEROIDNI HORMONI

Estrogeni vplivajo na rast, razvoj, diferenciacijo in na samo delovanje perifernih tkiv ženskih in moških reproduktivnih organov, kot so mlečna žleza, maternica, vagina, testis ... Igrajo tudi pomembno vlogo pri vzdrževanju optimalnega stanja kardiovaskularnega in centralnega živčnega sistema (Shimada in sod., 2001). Najbolj značilna predstavnika steroidnih hormonov sta 17β -estradiol (E2) in estron (E1). Proizvajajo ju žleze z notranjim izločanjem (ovariji in testisi), iz človeškega telesa pa se izločijo z urinom in fecesom. Williams in Stancel (1996, cit. po De Mes, 2007) navajata, da naj bi se dnevna količina

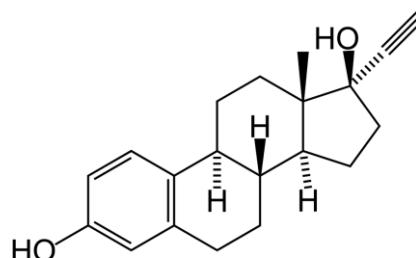
izločenih naravnih estrogenov gibala v območju med 10 in 100 µg za ženske oz. 5–10 µg za ženske v menopavzi in 2–25 µg za moške.

Sintetični estrogen 17α -etinilestradiol (EE2) je glavni estrogen v oralnih kontraceptikih (Williams in Stancel, 1996, cit. po De Mes, 2007). Povprečna dnevna doza sintetičnega hormona EE2 v kontracepcijijski tabletì znaša 35 µg (Katzung, 1995, cit. po De Mes, 2007).

In vivo testi pri ribah so pokazali, da je EE2 11-krat do 130-krat bolj aktiven kot E2, medtem ko je E2 2,3-krat do 3,2-krat bolj aktiven kot E1 (Legler, 2001, cit. po De Mes, 2007; Thorpe in sod., 2003, cit. po De Mes, 2007; Metcalfe in sod., 2001, cit. po De Mes, 2007). E2, E1 in EE2 so glavni krivci za prisotno estrogenско aktivnost v komunalnih odpadnih vodah (Körner in sod., 2001; Onda in sod., 2003).



Slika 1: 17β -estradiol (E2)



Slika 2: 17α -etinilestradiol (EE2)

2.4 DEKONJUGACIJA

Estrogenki hormoni so topni v maščobah in se zato ne morejo učinkovito izločiti iz telesa. Njihov metabolizem vključuje proces konjugacije v jetrih, med katerim se molekulam estrogenov doda vodotopna molekula – glukuronid ali sulfat na pozicijo 3 in/ali 17 (Williams in Stancel, 1996, cit. po De Mes, 2007). Tako se povečata njihova topnost v vodi in s tem tudi mobilnost in tako se lahko iz telesa izločijo v okolje. Konjugirani estrogeni hormoni so biološko neaktivni in v okolju nimajo estrogenске aktivnosti (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2003). Le-to lahko spet pridobijo s procesom dekonjugacije, pri katerem glavno vlogo odigrajo mikroorganizmi, ki s svojimi encimi odstranijo glukuronsko oz. fosfatno skupino iz molekule estrogenih hormonov. Ljudje največ estrogenskih hormonov v okolje izločamo z urinom in ti so v neaktivni (konjugirani) obliki. Del estrogenskih hormonov pa izločamo tudi s fecesom, kjer pa so, zaradi prisotnosti nekaterih bakterij kot npr. *E. coli*, v aktivni (nekonjugirani) obliki. Bakterije v fecesu vsebujejo encim β -glukuronidazo, ki hidrolizira glukuronske konjugirane hormone nazaj v njihovo nekonjugirano (torej aktivno) obliko (Dray in sod., 1972).

2.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI HORMONSKIH MOTILCEV

Metode za ugotavljanje prisotnosti in aktivnosti hormonskih motilcev v vodnih ekosistemih vključujejo tako kemijske analitske kot tudi biološke metode. Na ta način dobimo informacije o identiteti in koncentraciji hormonskih motilcev v vodah kakor tudi o vplivu le-teh na žive organizme.

Najprej uporabimo ustrezno biološko metodo, s katero ugotovimo morebitno prisotnost hormonskih motilcev. Nato na vzorcih, kjer se pokaže estrogenска aktivnost, izvedemo še kemijsko analizo, s katero natančneje identificiramo in kvantificiramo spojine z estrogenско aktivnostjo. Takšen pristop je zaželen tudi zaradi prisotnosti medsebojnih vplivov med spojinami v okoljskem vzorcu, ki lahko bistveno spremenijo lastnosti mešanic v primerjavi s posameznimi spojinami in jih lahko »izmerimo« le z izpostavitvijo organizmov celotnemu vzorcu. Samo poznavanje vsebnosti spojin v odpadnih vodah nam

ne da odgovora o škodljivih učinkih na organizme zaradi nepoznavanja biološke dostopnosti teh spojin (Wharfe, 2004).

2.5.1 Biološke metode

V skupino bioloških metod spadajo imunološke metode, testi *in vitro* in *in vivo*.

2.5.1.1 Imunološke metode

Imunološke metode vključujejo teste ELISA in RIA, ki temeljijo na reakcijah estrogenov s protitelesi. Antigen, estrogen iz vzorca, se bo vezal na ustrezna protitelesa, ki so adsorbirana na stene luknjic mikrotitrskih plošč. Z dodatkom encimsko ali radioaktivno označenega estrogena zapolnimo preostala prosta mesta na protitelesih. Več estrogena je prisotnega v vzorcu, manj označenega estrogena se bo vezalo na protitelesa. Z dodatkom obarvanega substrata za encim, vezan na estrogenu, lahko določimo količino encimsko vezanega estrogena, ki zasede mesta na protitelesih (test ELISA), oz. v primeru testa RIA uporabimo še scintilacijski števec, s katerim izmerimo radioaktivno sevanje označenega estrogena, ki je vezan na protitelesa (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

2.5.1.2 Biotesti *in vivo*

Najpogosteje uporabljeni metoda *in vivo* je metoda, ki temelji na določanju vitelogenina v krvi samcev in mladih rib zebri *Danio rerio*, t. i. ELISA-Vtg (Vtg Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Med spolnim dozorevanjem samice v gonadah sintetizirajo E2 (17β -estradiol). V hepatocitah se E2 veže na receptor, kar sproži transkripcijo gena za vitelogenin. Vitelogenin je prekursor jajčnega rumenjaka, ki se praviloma izraža le pri samicah. Kadar je v vodi prisotna povečana koncentracija estrogensko aktivnih spojin, se vitelogenin tvori tudi pri samcih in mladicah. Test je osnovan na specifični vezavi med vitelogeninom in z markerji označenimi protitelesi. Encimska aktivnost markerja na protitelesu je proporcionalna koncentraciji vitelogenina in jo določamo spektrofotometrično (Sumpter in Jobling, 1995). Uporaba vitelogenina kot biomarkerja je omogočila dokazati, da imajo iztoki iz čistilnih naprav estrogenско aktivnost in da je le-ta lahko prisotna tudi nekaj kilometrov stran od izliva odpadne vode iz čistilnih naprav v reke (Jobling in sod., 1998). Njegova slabost je v tem, da je vitelogenin nestabilen protein in da se njegova koncentracija v plazmi spreminja.

2.5.1.3 Biotesti *in vitro*

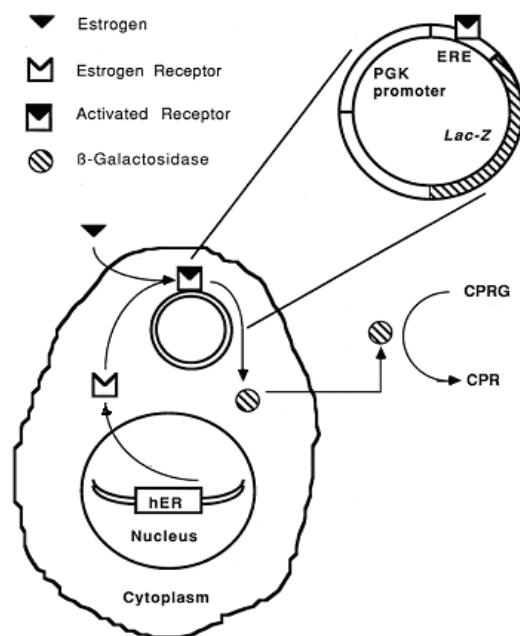
V skupino biotestov *in vitro* spadajo testi, ki vključujejo pomnoževanje celic, testi s kompetitivno vezavo ligandov in testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov. Ti biotesti so narejeni po enakem vzorcu kot poteka delovanje estrogenov v vretenčarjih. Hormonski motilci se v krvi vežejo na globuline in z njimi potujejo po organizmu. Prosti hormonski motilci preidejo z difuzijo preko celične membrane in se vežejo na receptorje za estrogene (ER). Le-ti so prisotni v različnih tkivih, vključujuč razmnoževalne organe, možgane, jetra in kosti. Dimer hormonski motilec-receptor se veže na zaporedje ERE (estrogen response elements) v DNA, kar omogoči transkripcijo in translacijo receptorja (De Mes, 2007).

- Metode pomnoževanja celic oz. »E-screen« temeljijo na uporabi linij človeških celic, ki jih izpostavimo hormonskim motilcem, ki povzročijo pomnoževanje celic (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).
- Testi s kompetitivno vezavo ligandov temeljijo na predpostavki, da se agonisti in antagonisti estrogenov vežejo na estrogenске receptorje in oboji dajo pozitiven odgovor (Bunce in sod., 2000, cit. po De Mes, 2007). Na receptorje so vezani radioaktivno označeni estrogeni, s katerimi estrogeni v vzorcu tekmujejo za vezavo. Primerjava vzorcev s kontrolo, kjer imamo le radioaktivno označene estrogene, vezane na receptorje, nam omogoči kvantifikacijo estrogenov v vzorcu. Slabost omenjenih testov je, da sam test ne razlikuje med agonističnimi in antagonističnimi vplivi preiskovanih spojin (De Mes, 2007).
- Testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov, vključujejo gensko spremenjene celice sesalcev ali gensko spremenjene kvasovke. Celice so gensko spremenjene tako, da imajo v jedru tujo, rekombinantno DNA, ki ob prisotnosti estrogenov proizvaja določen protein, poleg tega pa še encim. Dva primera takih testov sta test ER-Calux in test YES. Test ER-Calux vključuje gensko spremenjene človeške celice raka dojke (Legler, 2002), ki v prisotnosti hormonskih motilcev producirajo encim luciferazo. Z dodatkom substrata luciferina bo potekla reakcija z luciferazo, kar zaznamo kot spremembo intenzitete svetlobe, ki jo merimo s spektrofotometrom. V praksi pogosto uporabljammo tudi test YES (yeast estrogen screen), ki je podrobnejše razložen v nadaljevanju.

Metode, ki se uporabljamjo pri testiranju *in vitro* so hitre, ponovljive in cenovno ugodne, ne dajo pa nam odgovora o učinkih na celoten organizem. Zato je nujna tudi uporaba biotestov *in vivo*, s katerimi preučujemo vplive na celoten endokrini sistem organizma (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

2.5.1.3.1 Test YES

V testu YES uporabljamo gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (prof. Sumpter, GLAXO, UK). Te imajo v svoj genom vstavljen gen za humani receptor za estrogen (hER). Poleg tega imajo vstavljen tudi ekspresijski plazmid, ki nosi zapis za reporterski gen lac-Z, ki kodira zapis za encim β -galaktozidazo. Encim omogoča merjenje aktivnosti receptorja. Kadar je v vzorcu prisoten estrogen oz. snov, ki posnema njegovo delovanje, se bo le-ta vezal na hER. Dimerni kompleks se je nato sposoben vezati na del zaporedja DNA, ki se odziva na estrogen, t. i. ERE (estrogen responsive element). To zaporedje se nahaja pod močnim promotorjem v ekspresijskem plazmidu – to je isti promotor, pod kontrolo katerega je gen za lac-Z. Tako pride ob vezavi dimera hER-E na zaporedje ERE do izražanja β -galaktozidaze, ki se izloča v medij, v katerem so kvasovke. Encim razgradi substrat CPRG (klorofenol rdeče galaktopiranozid), kar zaznamo kot spremembo barve, in sicer iz rumene v rdeče-vijolično obarvan produkt CPR (klorofenol rdeče), katerega abosorbanco izmerimo pri 575 nm (Routledge in Sumpter, 1996). Test YES ima limitno detekcijo za E2 10 pM (Murk in sod., 2002).



Slika 3: Shematski prikaz estrogensko aktiviranega ekspresijskega sistema v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (Routledge in Sumpter, 1996)

2.5.2 Metode koncentriranja

Ker so hormonski motilci v naravi aktivni že v zelo majhnih koncentracijah (ng/l oz. pg/l), moramo okoljske vodne vzorce najprej skoncentrirati. Skoncentrirane vzorce uporabimo v nadalnjih postopkih, s katerimi dokazujemo prisotnost hormonskih motilcev (test YES).

2.5.2.1 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

Prednost metode SPE pred drugimi vrstami ekstrakcij (npr. ekstrakcija tekoče/tekoče) je v tem, da omogoča popolno fazno ločevanje, zagotavlja velik izkoristek ekstrakcije, manjšo uporabo organskih topil (kar tudi zmanjša možnost nastanka emulzij) in je hitra metoda, ki je lahko tudi avtomatizirana (Bulletin 910, 1998; Wells, 2000). Ena izmed njenih največjih prednosti je ta, da lahko v analizi uporabljam velike volumne vzorcev. Ravno zaradi tega razloga se SPE pogosto uporablja kot metoda za koncentriranje vodnih vzorcev, v katerih želimo ugotoviti prisotnost organskih onesnažil.

2.5.2.2 Princip ekstrakcije na trdni fazi

Osnovni princip ekstrakcije na trdni fazi je porazdelitev komponent iz vzorca med trdno in tekočo fazo. Trdno fazo predstavlja kolona z ustreznim polnilom, mobilno fazo pa predstavlja vzorec (Wells, 2003).

Kadar imamo opravka z zelo nečistim vzorcem, ki vsebuje večje delce, moramo pred samim nanosom vzorca na kolono SPE le-tega ustrezzo obdelati (npr. filtriranje). Priporočena je uporaba filtrov iz materialov, ki nimajo veznih mest za organske snovi in zato ne omogočajo adsorbcije preiskovanih komponent (Wells, 2000).

Proces ekstrakcije sestoji iz petih faz: kondicioniranje kolone, odstranitev aktivacijskega topila, nanos vzorca, spiranje interferenčnih sestavin ter elucija merjenih sestavin. Za učinkovito izvedeno ekstrakcijo je ključnega pomena izbira kolone s primernim polnilom in primernega eluentnega topila. Izbira temelji na volumnu vzorca, sveži teži spojin v vzorcu (bed weight) in na lastnostih sorbenta (Bulletin 910, 1998).

S kondicioniranjem površine trdne faze kolono aktiviramo. V tem koraku aktiviramo površino polnila, da se lahko pozneje merjena sestavina bolje veže (Wells, 2003).

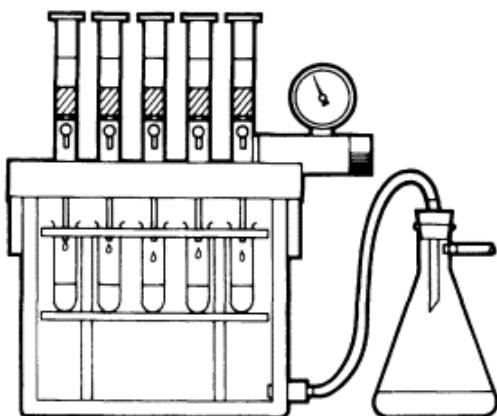
Naslednji korak ekstrakcije je odstranitev aktivacijskega topila. To storimo s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks našega preiskovanega vzorca. Običajno speremo polnilo z vodo ali s pufrom vrednosti pH, pri kateri poteka ekstrakcija merjenih sestavin (Wells, 2003).

Sledi nanos vzorca s pipeto. V primeru večjih volumnov lahko vzorec dovajamo preko cevk, ki ob nadtlaku omogočajo kapljično doziranje vzorca. Pri prehodu vzorca čez kolono se bodo merjene sestavine zadržale oz. vezale na polnilo. Pri spuščanju vzorca čez kolono je pomembna sama hitrost pretoka vzorca, saj je od nje odvisna kvantitativnost vezave želenih komponent na polnilo (Bulletin 910, 1998; Wells, 2003). V praksi uporabljeni pretoki so med 5 in 10 ml/min (Kuch in Ballschmiter, 2001; Liu in sod., 2004; Benijts in sod., 2004).

Naslednji korak ekstrakcije je spiranje interferenčnih sestavin iz kolone. Le-te odstranimo iz kolone s spiranjem z vodo ali s primernim pufrom (Bulletin 910, 1998).

Polnilo običajno sušimo v vakuumu ali z dušikom. Sušenje običajno traja nekaj minut.

Zadnji korak procesa SPE je elucija iskanih sestavin s primernim organskim topilom. Pri tem je ključnega pomena, da elucija poteka počasi, saj je izkoristek ekstrakcije najbolj odvisen od hitrosti pretoka (Wells, 2003).



Slika 4: Primer vakuumskoga razdelilnika pri ekstrakciji na trdni fazi (Dean, 1998).

2.5.3 Kemijske metode

2.5.3.1 GC/MS

Najpogosteje uporabljena kemijska analiza za identifikacijo hormonskih motilcev je plinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (GC-MS), uporablja pa se tudi tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (LC-MS).

Pri plinski kromatografiji temelji ločitev snovi iz mešanice na porazdelitvi med stacionarno fazo, ki je lahko trdna ali pa tekoča in je adsorbirana na nosilec, in mobilno plinasto fazo. Ločujemo pline in visoko hlapne tekočine, ki se pred neposrednim vstopom v kolono uplinijo v injektorju. Ločitev snovi iz mešanice poteka v koloni, detekcija posameznih snovi pa na detektorju. V koloni je stacionarna faza adsorbirana na steno kolone ali pa je adsorbirana na inertne nosilce, ki so dodani v kolono. Ločitev komponent mešanice poteka na podlagi porazdelitve posamezne snovi med stacionarno in mobilno fazo (Grob, 1985).

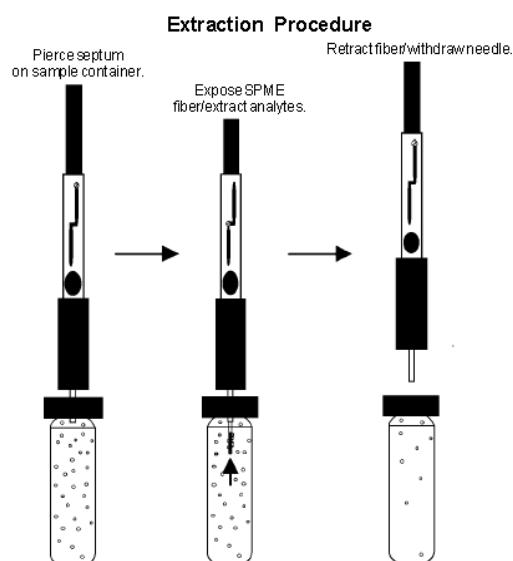
Masna spektrometrija (MS) je analitična metoda, s katero za posamezno spojino določimo razmerje masa: naboj (m/z), ki ga prikažemo kot masni spekter (vrednost m/z in relativna količina obravnavane spojine v celotnem vzorcu) (Kitson, 1996).

Hormonske motilce analiziramo na GC-MS, raztopljene v ustreznem topilu, ki pred prehodom vzorca na kolono izpari. Ustrezni temperaturni program nam omogoči ločitev posameznih spojin med potovanjem po koloni in nato detekcijo in identifikacijo na MS. Wylie (2006) je v svojem članku opisal pogoje za GC-MS, ki so potrebni za ločevanje in identifikacijo hormonskih motilcev, med katere spadajo tudi spojine 17β -estradiol (E2), etilestradiol (EE2), bisfenol A, atrazin, metolaklor, genistein ... Tako navaja, da za samo analizo omenjenih spojin z GC-MS ni potreben predhoden postopek derivatizacije. Drugi avtorji (Ballesteros, 2006; Brossa, 2005 ...) pa opisujejo še dodaten postopek derivatizacije vzorca pred nanosom le-tega na kolono. Z ustreznimi derivatizacijskimi agensi (BSTFA, MSTFA ...) in ustreznim postopkom derivatizacije (T, čas) pripravimo trimetilsilikatne etre obravnavanih spojin, ki jih nato analiziramo na GC-MS z določenim temperaturnim programom ločbe na GC ter analizo na MS.

2.5.3.2 SPME/GC-MS

»Solid phase microextraction« (SPME) oz. mikroekstrakcija na trdnih nosilcih je metoda, ki hkrati vključuje tako ekstrakcijo analita iz vzorca kot tudi njegovo koncentriranje.

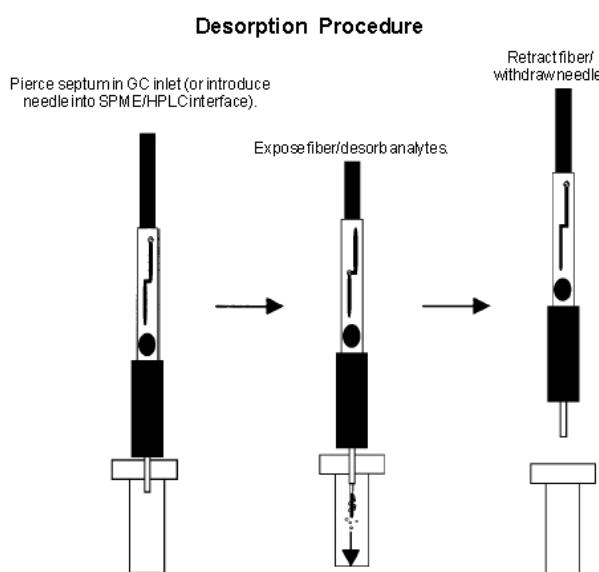
Pri procesu adsorpcije pride do vezave spojin iz vzorca v epruveti na nitko SPME (slika 5).



Slika 5: Postopek adsorpcije spojin iz vzorca v viali na nitko SPME (Bulletin 923B, 2004)

Adsorpcija spojin na nitko SPME je linearja, kar pomeni, da je količina vezanih spojin na nitko SPME linearno odvisna od količine spojin v vzorcu. Proses adsorpcije lahko poteka v tekočini ali pa v zraku, ki je nad tekočino, kar velja za vzorce, ki vsebujejo hlapne spojine. Tak postopek adsorpcije (v zraku nad tekočino) imenujemo »headspace« izvedba SPME (Bulletin 923B, 2004).

Po poteku adsorpcije vzorec prenesemo v injektor na GC-MS, kjer poteče termalna desorpcija spojin iz nitke SPME v injektor (slika 6).



Slika 6: Postopek termalne desorpcije spojin iz nitke SPME v injektorju (Bulletin 923B, 2004)

Spojine so nato usmerjene na kolono GC-MS, kjer pride do ločevalnega procesa na osnovi razlikovanja v temperaturi vrelišča spojine ter nato na masni detektor, ki zazna posamezno spojino in njeno molekulsko maso (Bulletin 923B, 2004).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Vzorce, ki smo jih pri našem delu testirali, smo odvzeli na vtoku in tudi na iztoku iz štirih čistilnih naprav po Sloveniji. Na te čistilne naprave teče komunalna odpadna voda, v enem primeru pa je odpadna voda mešana, in sicer komunalna in industrijska odpadna voda. Vzorci so označeni s črkami A, B, C in D.

Ker so spojine z estrogenско aktivnostjo prisotne v naravi v zelo majhnih koncentracijah (ng/l), smo pred samim poskusom ugotavljanja prisotnosti le-teh s testom YES izvedli še postopek koncentriranja oz. ekstrakcijo na trdni fazi.

3.1.1 Čiščenje vodnih vzorcev

Vodne vzorce smo pred samim koncentriranjem filtrirali čez filtre s porami 0,3 µm. Vzorce, ki so vsebovali večje delce, pa smo najprej centrifugirali, nato pa še filtrirali čez filtre s porami velikosti 0,8 in 0,3 µm.

3.1.2 Kolone Water Oasis

Pri postopku SPE smo uporabili kolone proizvajalca Waters® Oasis® s polnilom Oasis® HLB 60µm. Kolone tehtajo 500 mg. Specifična površina polnila je v območju 727–889 m²/g, povprečni premer por znaša od 73 do 89 Å. Vsebujejo polnilo, ki ima po sestavi ustrezno ravnotežje hidrofilno/lipofilno, kar omogoča visok izkoristek za kisle, bazične in nevtralne snovi (OASIS® HLB Extraction Cartridges, 2000).

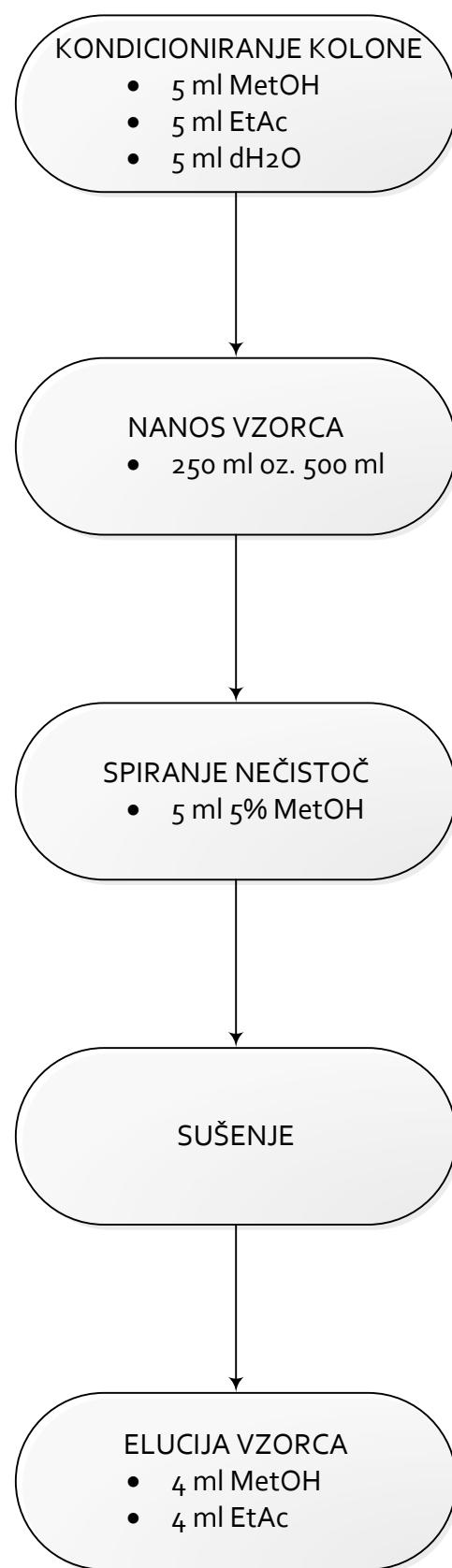
3.2 POSTOPEK KONCENTRIRANJA

3.2.1 Začetni volumni posameznih vzorcev

1. Čistilna naprava A: vtok 500 ml in iztok 500 ml
2. Čistilna naprava B: vtok 250 ml in iztok 250 ml
3. Čistilna naprava C: vtok 250 ml in iztok 250 ml
4. Čistilna naprava D: vtok 250 ml in iztok 500 ml

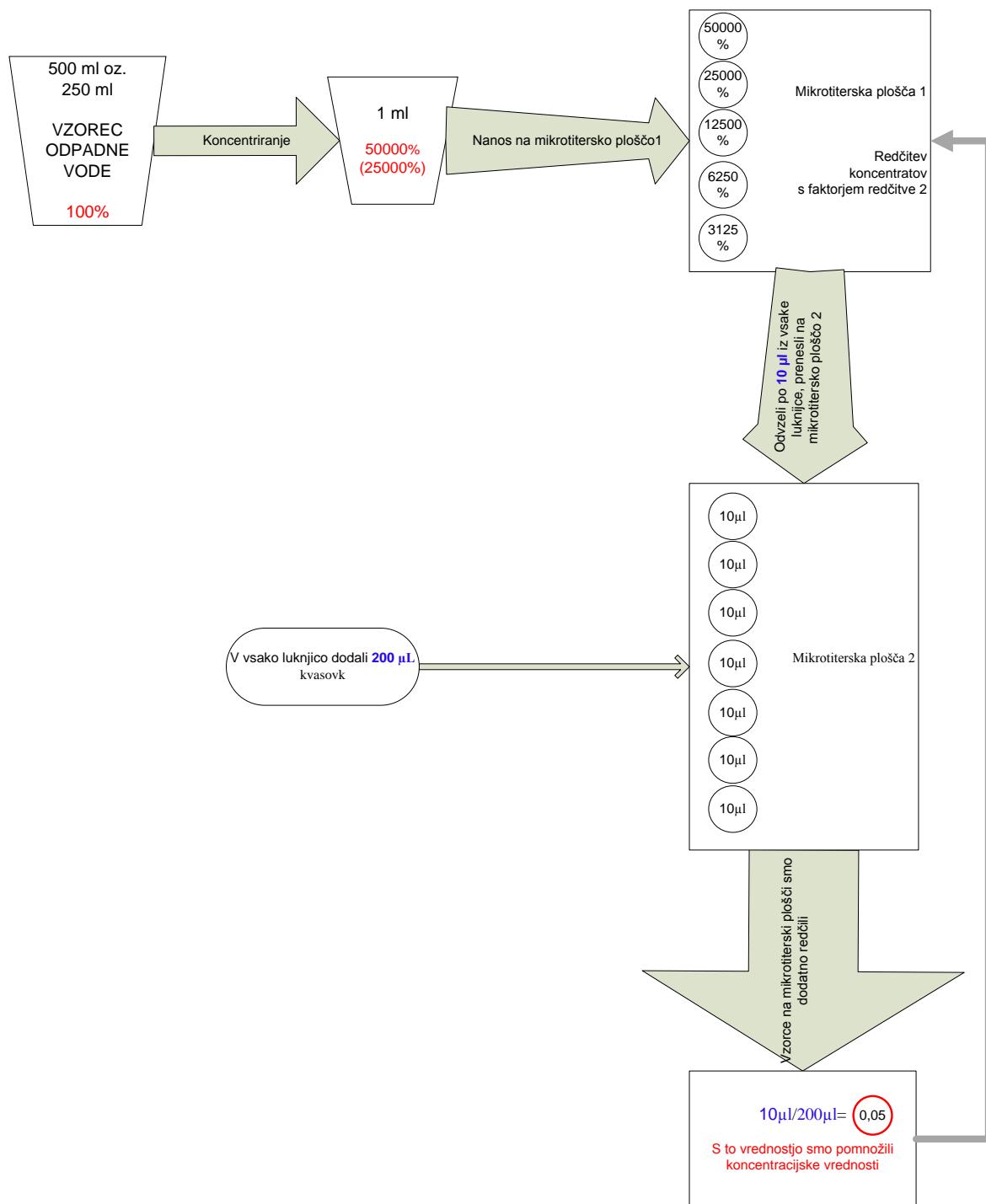
3.2.2 Postopek koncentriranja

Kondicioniranje kolon je potekalo s 5 ml metanola in etilacetata. Ostanek topil smo spirali s 5 ml dH₂O in nato nanesli vzorec (250 ml oz. 500 ml). Za tem je sledilo spiranje nečistoč s 5 ml 5-odstotnega MetOH. Kolone smo sušili s prepihovanjem z dušikom skozi Visidry™ Drying Attachment (Supelco, Bellefonte, ZDA). Po končanem sušenju je sledila elucija iskanih snovi z metanolom (4 ml) in nato še z etilacetatom (4 ml). Ker je etilacetat pri testu YES reagiral s plastiko in tako onemogočal nadaljnje delo, smo ga po eluciji izsušili iz epruvete in nato snovi v epruveti raztopili v etanolu. Po končanem koncentriranju smo imeli končni volumen 1 ml.



Slika 7: Shema koncentriranja vzorcev skozi WATERS OASIS HLB.

Koncentracijske vrednosti, ki smo jih uporabljali pri naših testih, smo dobili kot prikazuje slika 8.



Slika 8: Prikaz, kako smo pridobili koncentrate in izračunali koncentracijske vrednosti.

Volumen vzorcev, ki smo jih koncentrirali, je znašal 500 ml oz. v nekaterih primerih 250 ml. Po koncentriranju je znašal njihov volumen 1 ml, kar pomeni, da smo jih dejansko skoncentrirali 500-kratno (oz. 250-kratno) glede na originalni vzorec. Izraženo v odstotkih pomeni, da smo po koncentriranju imeli 50000-odstotne (oz. 25000-odstotne) koncentracijske vrednosti. Koncentrat smo nato redčili s faktorjem redčitve 2, potem pa smo dodali 200 µl kvasovk, kar je vse koncentracijske vrednosti znižalo. V nadaljevanju bomo uporabljali koncentracijske vrednosti v odstotkih. Koncentracijske vrednosti, ki so manjše od 100 %, predstavljajo že redčene vrednosti originalnega vzorca.

3.3 POSTOPEK DEKONJUGACIJE

Dekonjugacijo smo izvedli z namenom, da aktiviramo morebitno neaktivne spojine z estrogenским delovanjem, saj so lahko le-te prisotne v vodnih vzorcih v konjugirani obliki in so kot take biološko neaktivne.

Koncentriranemu vzorcu z volumnom 1 ml v viali smo dodali 1 mL 0,1 M acetatnega pufra (pH = 5) in encim β -glukoronidazo (100 000 enot glukoronidazne in 7500 enot fosforilazne aktivnosti) proizvajalca Supelco. Sledila je inkubacija 24 ur pri 40 °C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom zakisane vode s pH = 3 in vzorec ponovno koncentrirali po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2. Tako pripravljen vzorec smo nato uporabili pri testu YES.

3.4 TESTNI ORGANIZEM

3.4.1 Kvasovka *SACCHAROMYCES CEREVIAE*

V naših poskusih (test YES) smo uporabljali gensko spremenjeno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* BJ1991, ki je last korporacije GLAXO (UK), kjer so jo razvili pod vodstvom prof. dr. Sumpterja. Z njegovim privoljenjem smo dobili dovoljenje za uporabo omenjene kvasovke za izvedbo testa YES v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.4.1.1 Priprava gojišč

3.4.1.1.1 Priprava minimalnega gojišča (pH = 7,1)

V oklepaju so navedeni proizvajalci.

- 13,61 g KH₂PO₄ (Merck)
- 1,98 g (NH₄)₂SO₄ (Kemična tovarna Podnart)
- 4,2 g KOH (Merck)
- 0,41 g MgSO₄ * 7 H₂O (Merck)
- 1 ml Fe₂(SO₄)₃ raztopine (40mg/50ml H₂O) (Merck)
- 50 mg leucina (Fluka)
- 50 mg histidina (Fluka)
- 50 mg adenina (Fluka)
- 20 mg arginina- HCl (Fluka)
- 20 mg metionina (Fluka)
- 30 mg tirozina (Fluka)
- 30 mg izoleucina (Fluka)
- 30 mg lizin- HCl (Fluka)
- 25 mg fenilalanina (Fluka)
- 100 mg glutaminske kisline (Fluka)
- 150 mg valina (Fluka)
- 375 mg serina (Fluka)

Vse kemikalije raztopimo v 1 l MiliQ vode.

Minimalno gojišče razlijemo po 45 ml v 200 ml erlenmajerice in ga nato avtoklaviramo (121 °C, 20 minut). Erlenmajerice z minimalnim gojiščem hranimo na sobni temperaturi.

3.4.1.1.2 Priprava rastnega gojišča

Rastni medij pripravimo sterilno po spodnjem receptu, tako da dodamo ustrezne snovi v minimalni medij (45 ml).

- 5 ml raztopine glukoze (Fluka)
- 1,25 ml raztopine aspartatne kisline (Fluka)
- 0,5 ml raztopine vitaminov
- 0,4 ml raztopine treonina (Fluka)
- 125 µl bakrovega (II) sulfata (Carlo Erba reagenti)

3.4.1.1.3 Raztopina glukoze

Sterilizirali smo 20 % w/v (20 g glukoze/100 ml destilirane vode) raztopino glukoze z avtoklaviranjem 20 minut pri 121 °C in 1,1 bar ter jo shranili na sobni temperaturi.

3.4.1.1.4 Raztopina aspartata

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

3.4.1.1.5 Priprava raztopine vitaminov

- 8 mg tiamina (Sigma)
- 8 mg piridoksin (Sigma)
- 8 mg pantotenske kisline (Sigma)
- 40 mg inositol (Fluka)

Vse kemikalije raztopimo v 180 ml MiliQ vode ter dodamo 20 ml biotinske raztopine (2mg/100mL miliQ H₂O) (Fluka). Nato vitaminsko raztopino steriliziramo s filtriranjem čez 0,2 µm filter. Hranimo jo v hladilniku (4 °C).

3.4.1.1.6 Raztopina treonina

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

3.4.1.1.7 Bakrov (II) sulfat

20 mM bakrov (II) sulfat smo sterilizirali s filtriranjem čez filter z 0,2 µm porami in shranili pri sobni temperaturi.

Tako pripravljeno rastno gojišče inokuliramo z 0,25 ml koncentrirane kulture kvasovk in inkubiramo pri 28 °C od 24 do 28 h na orbitalnem mešalu (140 rpm), dokler absorbanca, izmerjena pri 620 nm, ni približno 1.0, kar pomeni, da so kvasovke v logaritemski fazi rasti.

3.5 NANOS VZORCA NA MIKROTITERSKO PLOŠČO

Najprej smo si na posebni mikrotitrski plošči izven laminarija pripravili vzorce in vse potrebne standarde. Na njej smo izvedli redčenje s faktorjem redčitve 2. Vzorce in standarde smo redčili v etanolu. Nato smo po 10 µl vzorcev in standardov iz vsake luknjice sterilno prenesli na novo mikrotitrsko ploščo. Standard E2 je predstavljal pozitivno kontrolo in standard P je predstavljal negativno. P je oznaka za progesteron, ki je steroiden hormon, vendar nima estrogenskega učinka. Plošče smo nato pustili v laminariju odprte, da je izhlapel ves etanol oz. metanol. Nato smo dodali 200 µl kvasovk, pripravljenih v rastnem mediju z dodanim substratom CPRG. Poleg zgoraj omenjenih kontrol smo imeli tudi kontrolo, s katero smo se prepričali, da je rastno gojišče primerno za rast kvasovk in da v njem niso prisotne snovi, ki bi dale lažno pozitiven rezultat (Bb; kvasovke + rastni medij). Za kontrolo CPRG-ja smo rastnemu gojišču dodali le CPRG. Za ničelne vzorce oz. B (slepa kontrola) smo uporabili rastno gojišče s kvasovkami in CPRG-jem. Mikrotitrsko plošče smo nato za 48 do 52 ur inkubirali pri 34 °C. Po končanem testu smo na mikročitalcu pri valovni dolžini 575 in 620 nm odčitali absorbanco.

3.6 IZRAČUN ESTROGENSKE AKTIVNOSTI VZORCEV

Po dvodnevni inkubaciji vzorcev s kvasovkami pri 34 °C smo izmerili absorbanco pri 575 nm in pri 620 nm. Pri 575 nm smo merili absorbanco barve razgradnega produkta CPRG, pri 620 nm pa smo merili absorbanco rasti kvasovk. Aktivnost encima, ki je razgradil CPRG, smo nato izračunali po naslednjih korakih:

$$T_a = A_{575} - (A_{620} - B_{povp}) \quad \dots (1)$$

Kjer je T_a = aktivnost β -galaktozidaze

A_{575} = absorbanca, izmerjena pri 575 nm

A_{620} = absorbanca, izmerjena pri 620 nm

B_{povp} = absorbanca povprečja ničelnega vzorca (izmerjena pri 620 nm)

Estrogenko aktivnost naših vzorcev smo izračunali po naslednji enačbi:

$$EA = \frac{T_a - X}{\Delta} \times 100 \quad \dots (2)$$

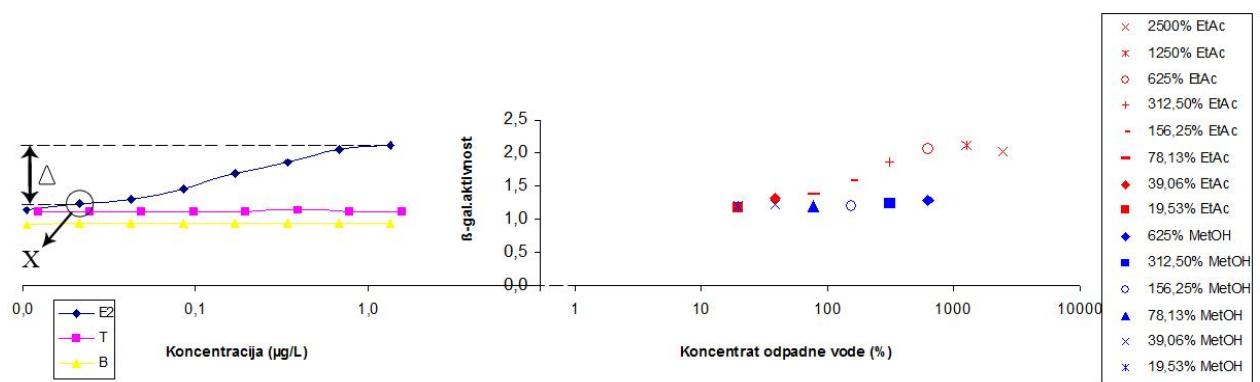
Kjer je EA = estrogenka aktivnost vzorca (%)

T_a = vrednost aktivnosti β -galaktozidaze, izračunana po enačbi (1)

X = začetna točka intervala estrogenosti (ki je točka na krivulji standarda E2, najbližja krivulji ničelnega vzorca B)

Δ = interval estrogenosti, določen na krivulji standarda E2 z začetno točko X, ki je točka na krivulji standarda E2, najbližja krivulji ničelnega vzorca B, ter končno

točko v zadnji točki krivulje standarda E2.



Slika 9: Prikaz načina izračuna estrogenske aktivnosti

3.7 IZRAČUN ZAVIRANJA RASTI KVASOVK

Zaviranje rasti kvasovk smo izračunali s pomočjo izmerjene rasti po enačbi (3). Rast smo prikazali kot vrednosti absorbance posameznih vzorcev, izmerjene pri 620 nm, ki smo jih delili s povprečno vrednostjo izmerjene absorbance pri 620 nm ničelnih vzorcev B in dobljeno vrednost pomnožili s 100. Nato smo to vrednost odšteli od 100 in tako dobili vrednosti zaviranja rasti. Pri vzorcih, kjer je bilo prisotno več kot 50-odstotno zaviranje rasti, nismo izračunali estrogenske aktivnosti.

$$Zaviranje\ rasti\ (\%) = 100 - \left(\frac{A_{620} * 100}{B_{povp}} \right) \quad \dots (3)$$

4 REZULTATI

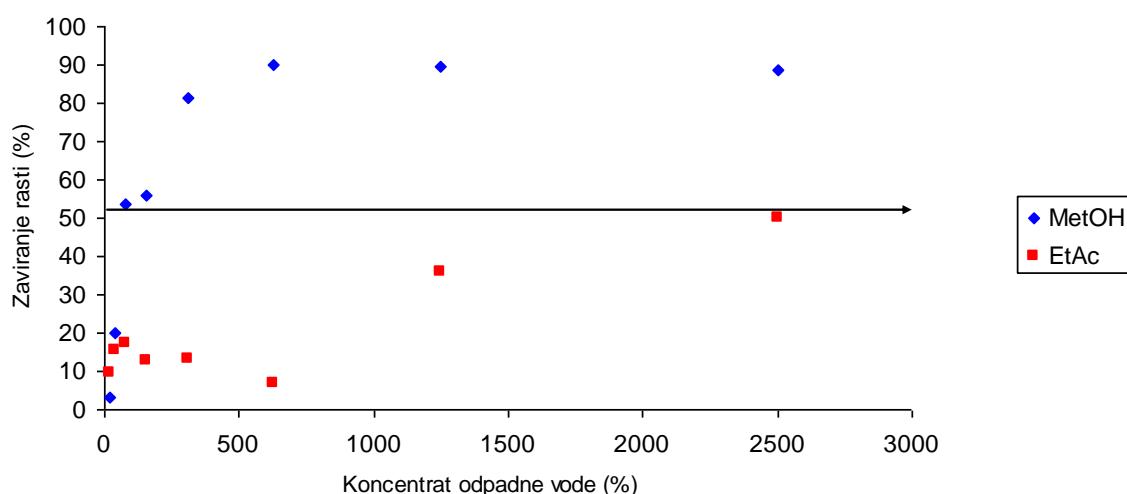
4.1 ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE A

Pri čistilni napravi A smo zaznali zaviranje rasti pri vzorcih vtoka, spranih z metanolom (slika 10), medtem ko na iztoku nismo zaznali zaviranja rasti (slika 13). Estrogenško aktivnost smo zaznali na vtoku in iztoku (sliki 11 in 14) v primeru spiranja vzorcev z etilacetatom. Estrogenška aktivnost se je po dodatku encima povečala pri vzorcih iz vtoka (slika 12), na iztoku (slika 13) se je izrazila tudi pri vzorcih, eluiranih z metanolom (preglednici 1 in 2).

4.1.1 Vtok

4.1.1.1 Zaviranje rasti kvasovk

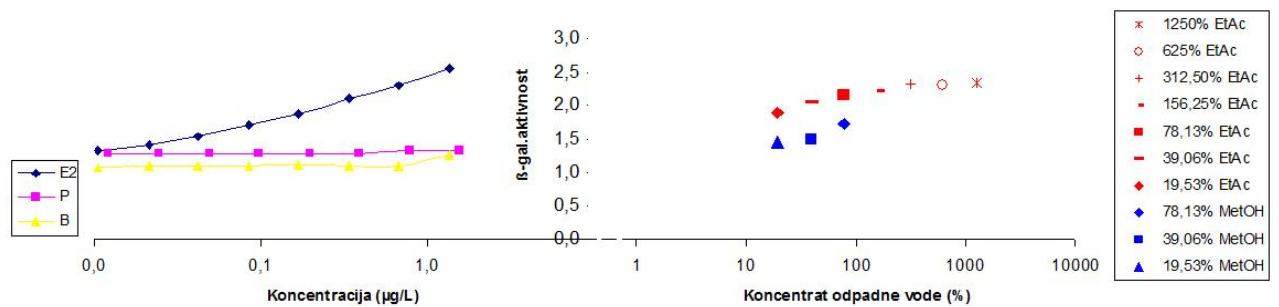
Zaviranje je bilo prisotno pri vzorcih, eluiranih z metanolom, vse do nižjih koncentracijskih vrednosti oz. že pri redčenih koncentracijskih vrednostih (78-odstotni koncentrat).



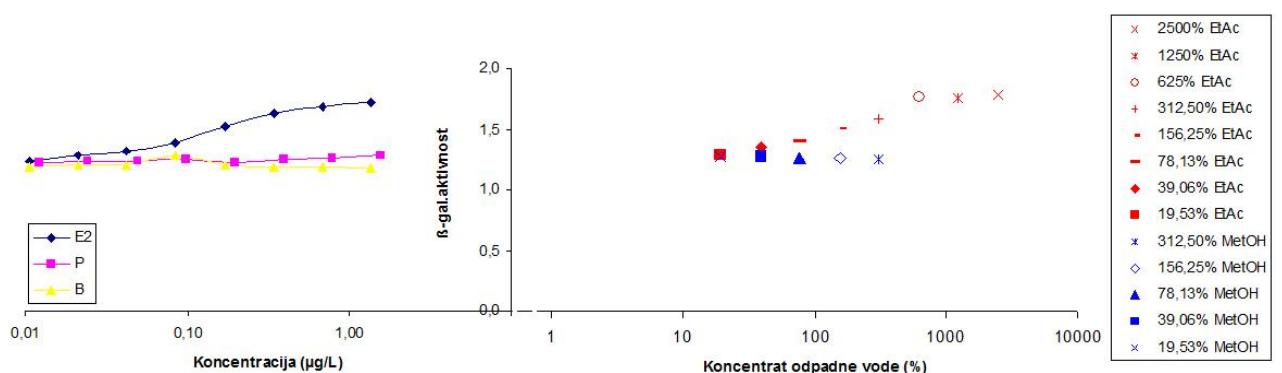
Slika 10: Zaviranje rasti kvasovk *S. cerevisiae* izpostavljenih vzorcu vtoka na čistilni napravi A

4.1.1.2 Rezultati testa YES

Kot lahko vidimo na sliki 11, estrogenska aktivnost (EA) pada z manjšanjem koncentracijske vrednosti tako v primeru spiranja vzorcev z metanolom kot z etilacetatom. Pri vzorcih, spranih z etilacetatom, je bila najvišja (69 %) pri koncentracijski vrednosti 1250 % (preglednica 1). Po dodatku encima se je EA povišala pri največjih koncentracijskih vrednostih (slika 12 in preglednica 1).



Slika 11: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 12: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Preglednica 1: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave A pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

Koncentrat odpadne vode (%)	2500,00	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53
Topilo						Estrogenska aktivnost (%)		

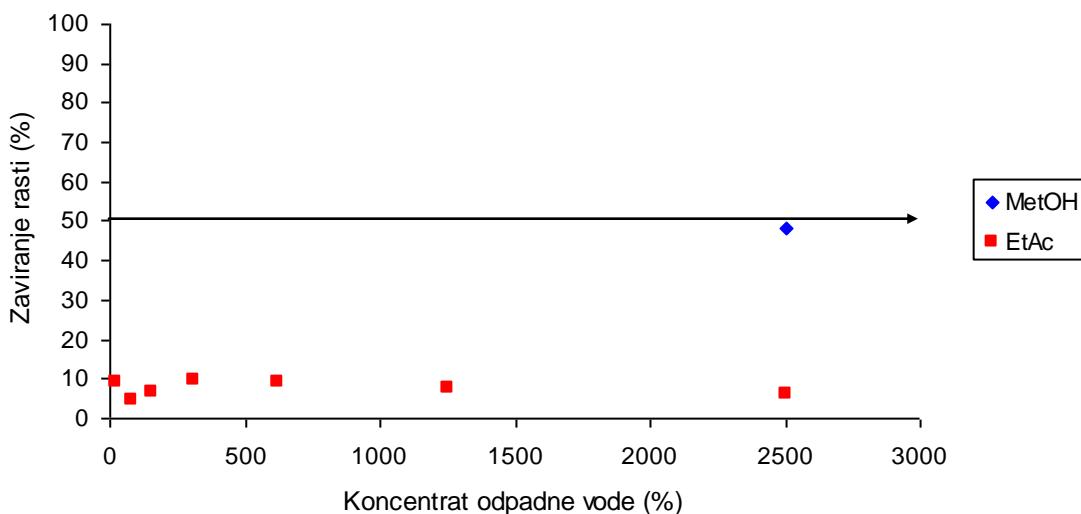
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	*	*	*	23	0	0
Etilacetat (pred dodatkom encima)	*	69	67	67	60	55	48	37
Metanol (po dodatku encima)	*	*	*	0	0	0	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	103	98	100	65	47	26	16	0

*Zaviranje rasti je veče od 50 %, zato estrogenске aktivnosti nismo računali.

4.1.2 Iztok

4.1.2.1 Zaviranje rasti kvasovk

Zaviranja rasti na iztoku čistilne naprave A nismo zaznali (slika 13).

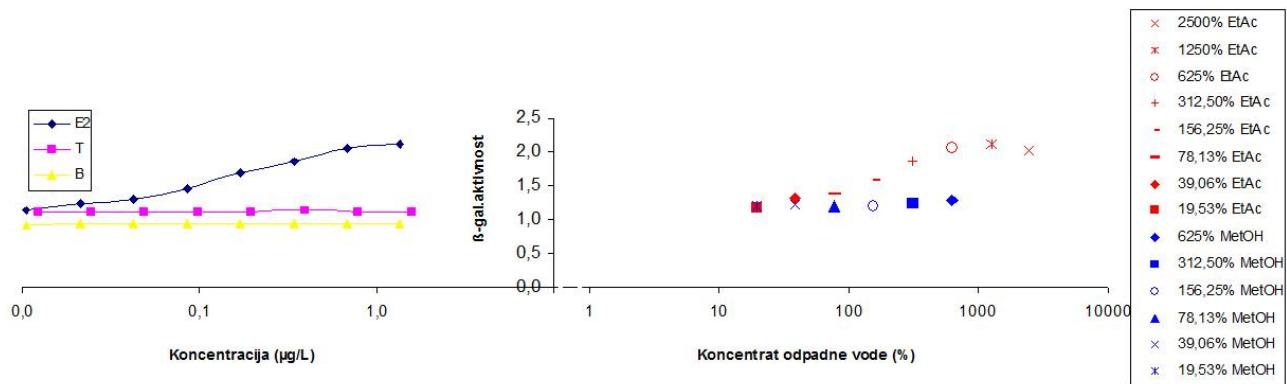


Slika 13: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave A

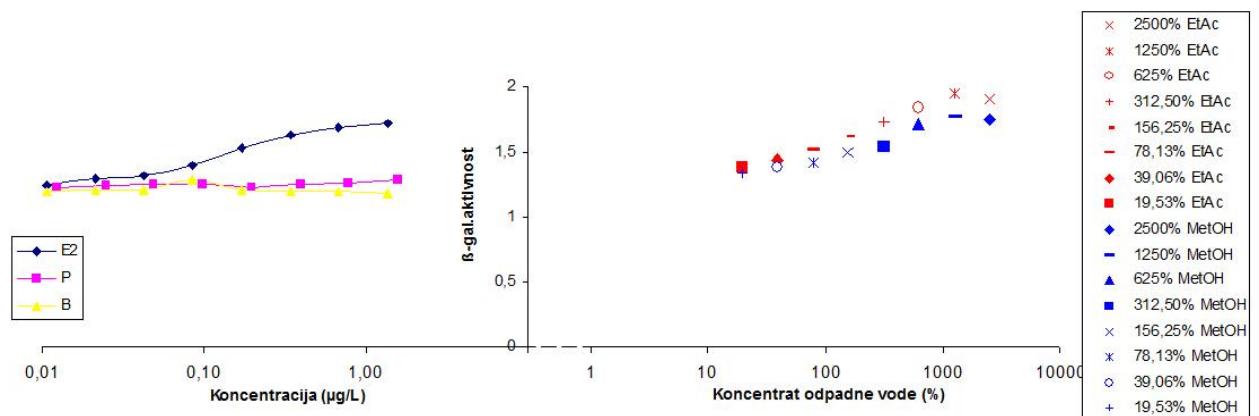
4.1.2.2 Rezultati YES testa

EA je bila prisotna le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (slika 14), vse tja do koncentracijske vrednosti 625 %, kjer je znašala 64 % (preglednica 2). Po dodatku encima se je pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, EA povečala za cca 30 %. Pojavila se je tudi pri

vzorcih, eluiranih z metanolom (slika 15), kjer je pred dodatkom encima sploh nismo zaznali.



Slika 14: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolno, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 15: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave A, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukuronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolno, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Preglednica 2: Estrogenска aktivnost iztoka čistilne naprave A pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

Koncentrat odpadne vode (%)	2500,00	125,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53
	Estrogenска aktivnost (%)							
Topilo								
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	0	0	0	0	0	0
Etilacetat (pred dodatkom encima)	62	70	64	50	27	11	0	0
Metanol (po dodatku encima)	77	81	70	36	27	13	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	105	115	93	73	51	31	16	0

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenске aktivnosti nismo računali.

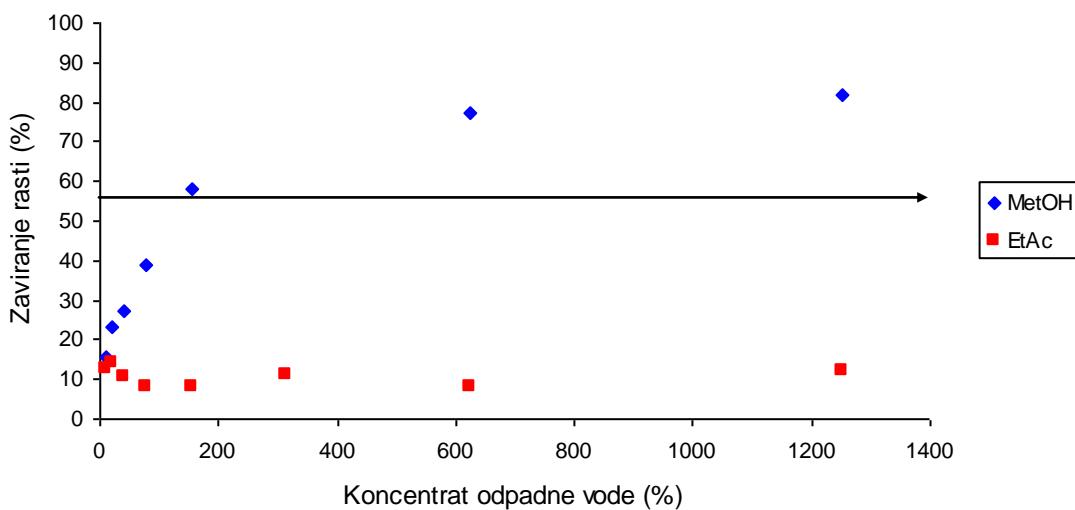
4.2 ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE B

Tudi na čistilni napravi B smo zaznali zaviranje rasti le pri vzorcih, eluiranih z metanolom (sliki 16 in 19). Večje zaviranje je bilo na vtoku kot na iztoku. Estrogenko aktivnost smo zaznali pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, in pri vzorcih, eluiranih z metanolom (sliki 17 in 20), dodatek encima je povečal EA na vtoku in iztoku pri višjih koncentracijskih vrednostih (preglednici 3 in 4).

4.2.1 Vtok

4.2.1.1 Zaviranje rasti kvasovk

Zaviranje rasti je bilo na vtoku čistilne naprave B (slika 16) prisotno pri vzorcih, eluiranih z metanolom, do 1,56-kratnega koncentrata originalnega vzorca (oz. 156,25-odstotnega koncentrata).

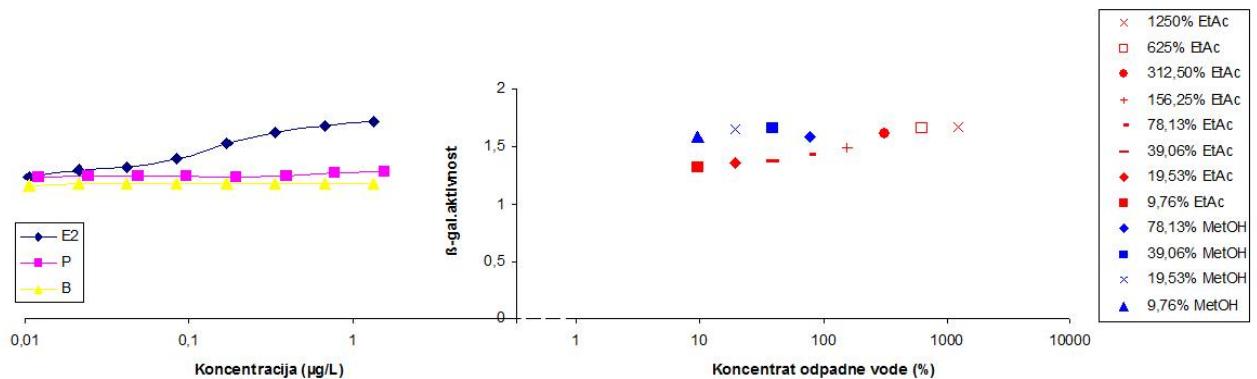


Slika 16: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave B.

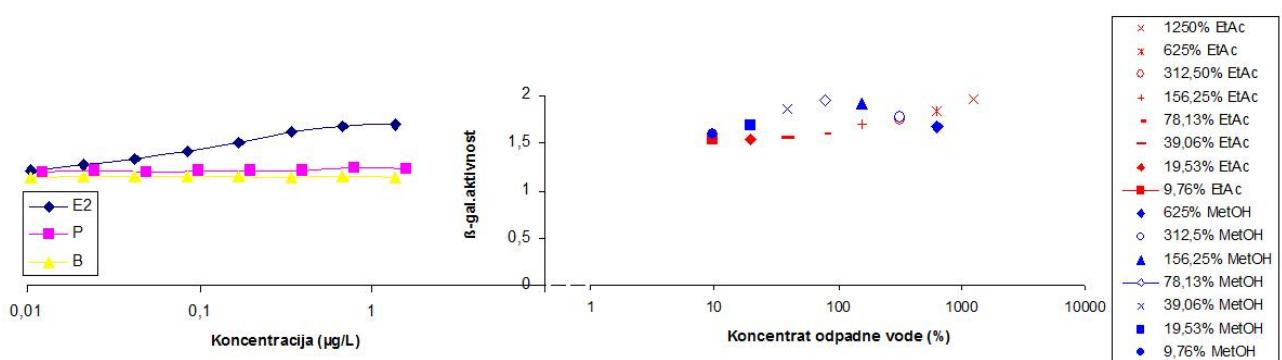
4.2.1.2 Rezultati testa YES

EA smo zaznali tako pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, kot pri vzorcih, eluiranih z metanolom (slika 17 in preglednica 3). Pri vzorcih, eluiranih z metanolom, je bila najvišja

pri 78,12-odstotnem koncentratu (znašala je 61 %). Dodatek encima je pri isti koncentracijski vrednosti EA povišal na 63 %, največje povečanje vrednosti EA pa smo zaznali pri koncentracijski vrednosti 156 % (povišala s 46 % na 81 %) (slika 18 in preglednica 3). Pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, je bila EA najvišja pri najvišjem koncentratu in je padala sorazmerno s koncentracijsko vrednostjo (slika 17), po dodatku encima se je EA povečala le pri največji vrednosti koncentrata (za 17 %).



Slika 17: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 18: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukuronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Preglednica 3: Estrogenska aktivnost vtoka čistilne naprave B pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

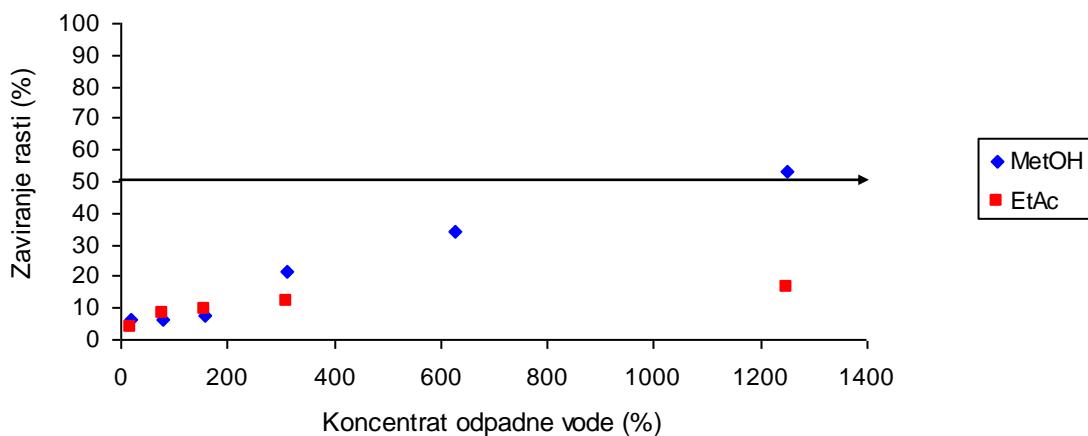
Koncentrat odpadne vode (%) Topilo	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53	9,76
	Estrogenska aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	*	*	46	61	58	47
Etilacetat (pred dodatkom encima)	65	62	52	26	12	0	0	0
Metanol (po dodatku encima)	*	26	44	73	81	63	28	0
Etilacetat (po dodatku encima)	82	55	38	29	0	0	0	0

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenske aktivnosti nismo računali.

4.2.2 Iztok

4.2.2.1 Zaviranje rasti

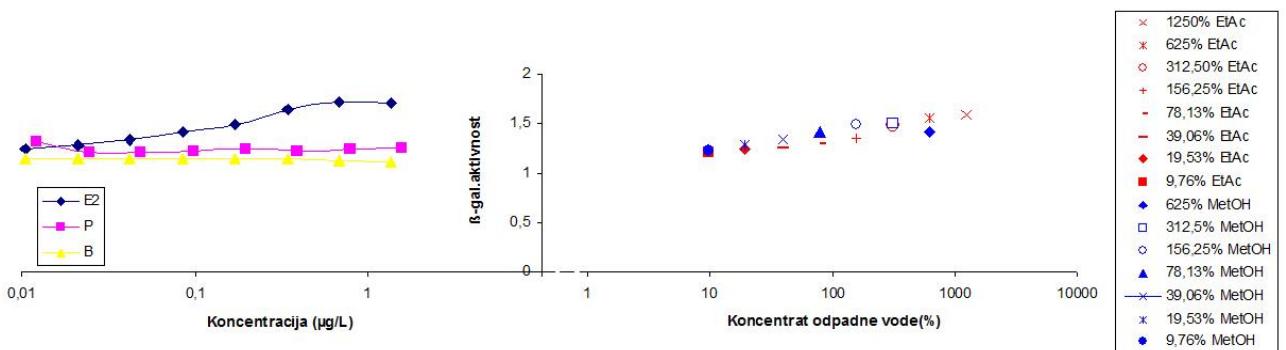
Zaviranje rasti kvasovk je bilo prisotno le pri najvišji (1250-odstotni) koncentracijski vrednosti vzorca, eluiranega z metanolom.



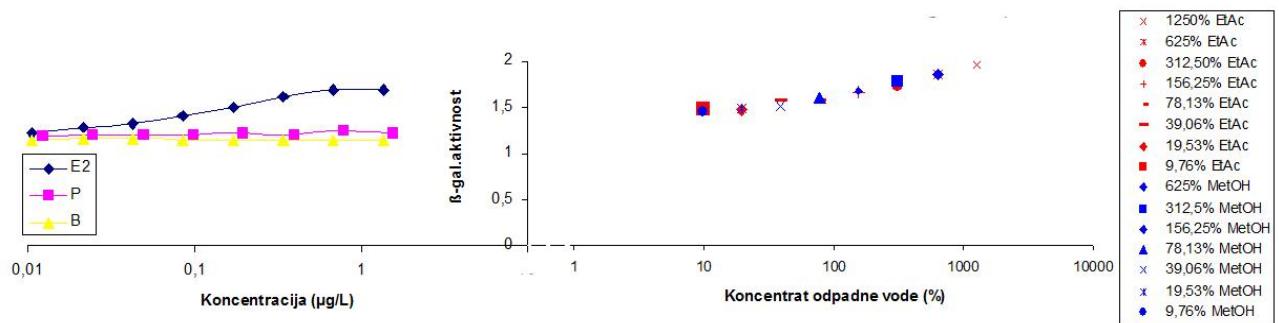
Slika 19: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave B.

4.2.2.2 Rezultati testa YES

EA je bila na iztoku čistilne naprave B najvišja (62 %) pri vzorcu, eluiranem z etilacetatom najvišje koncentracijske vrednosti. Dodatek encima jo je povišal na 96 % (preglednica 4). Estrogenksa aktivnost je padala z manjšanjem koncentracijskih vrednosti (sliki 20 in 21).



Slika 20: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 21: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave B, eluiran z metanolom in etilacetatom po dodatku encima β -glukoroniidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelnii vzorec.

Preglednica 4: Estrogenска aktivnost iztoka čistilne naprave B pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoroniidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

Koncentrat odpadne vode (%)	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53	9,76
Topilo	Estrogenска aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	*	24	45	40	24	0	0	0
Etilacetat (pred dodatkom encima)	62	57	42	0	0	0	0	0
Metanol (po dodatku encima)	*	74	61	38	22	0	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	96	74	50	34	18	16	0	0

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenске aktivnosti nismo računali.

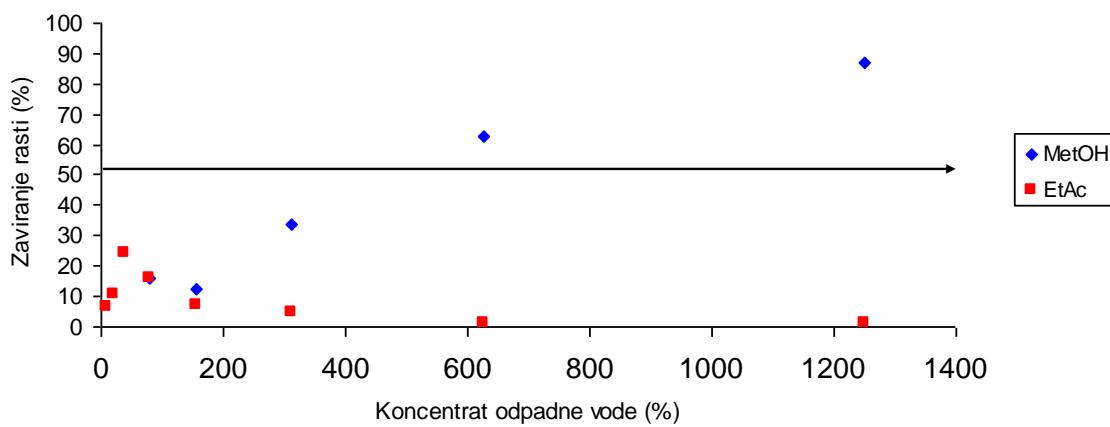
4.3 ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE C

Pri čistilni napravi C smo zaznali najmanjše zaviranje rasti na vtoku, medtem ko je bila rast kvasovk na iztoku nemotena (sliki 22 in 25). EA smo na vtoku zaznali le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (slika 23). Dodatek encima (slika 24) v tem primeru ni povečal EA (preglednica 5). Na iztoku je bila EA zaznana le po dodatku encima (sliki 26 in 27), in sicer pri obeh elucijskih topilih.

4.3.1 Vtok

4.3.1.1 Zaviranje rasti kvasovk

Zaviranje rasti kvasovk je bilo prisotno pri vzorcih, eluiranih z metanolom, le pri dveh najvišjih koncentracijskih vrednostih, in sicer je bilo pri 1250-odstotni koncentracijski vrednosti skoraj 90 % in pri 625-odstotni koncentracijski vrednosti dobrih 60 % (slika 22).

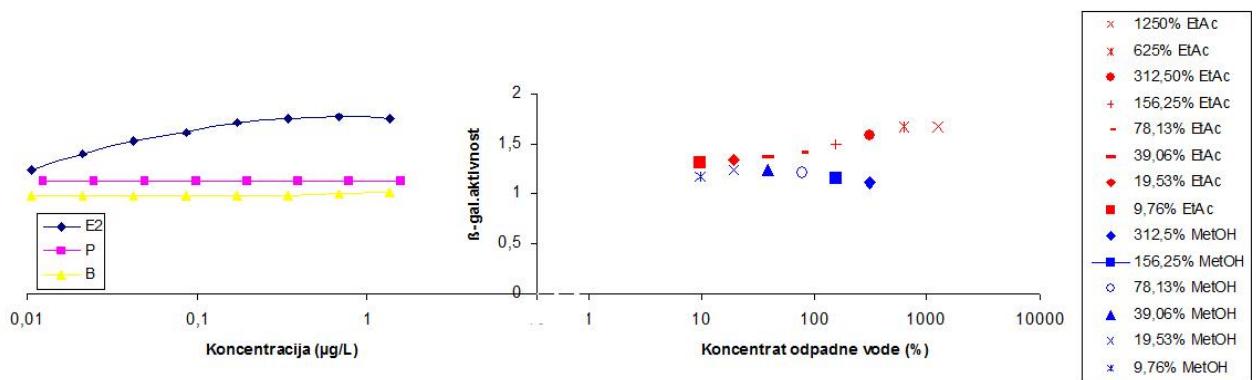


Slika 22: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave C.

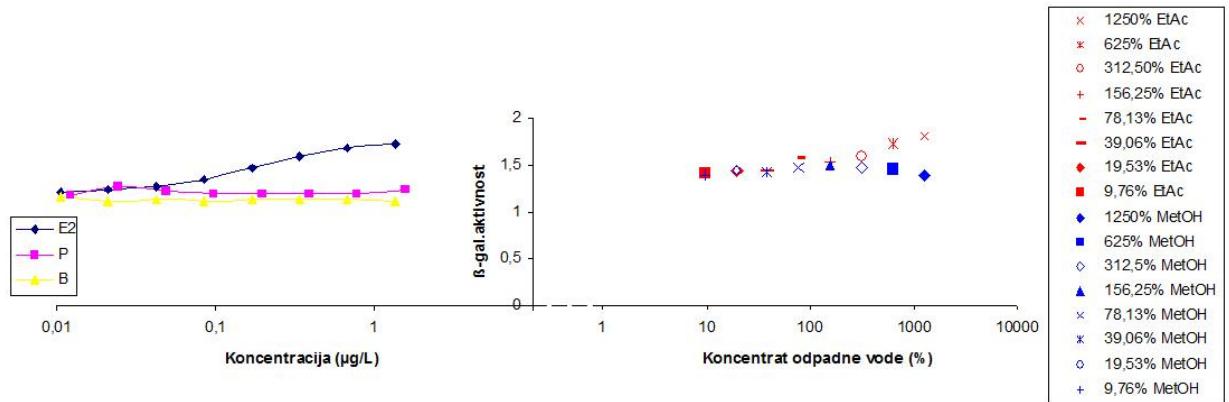
4.3.1.2 Rezultati testa YES

Estrogenска aktivnost je bila prisotna le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (sliki 23 in 24). Najvišja je bila pri najvišji koncentracijski vrednosti koncentrata in je padala z

manjšanjem koncentracijske vrednosti, kar je lepo vidno na sliki 23. Dodatek encima estrogenске aktivnosti ni povečal (slika 24), kar potrjujejo tudi izračunane vrednosti estrogenске aktivnosti v preglednici 5.



Slika 23: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 24: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukuronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Preglednica 5: Estrogenска aktivnost vtoka čistilne naprave C pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

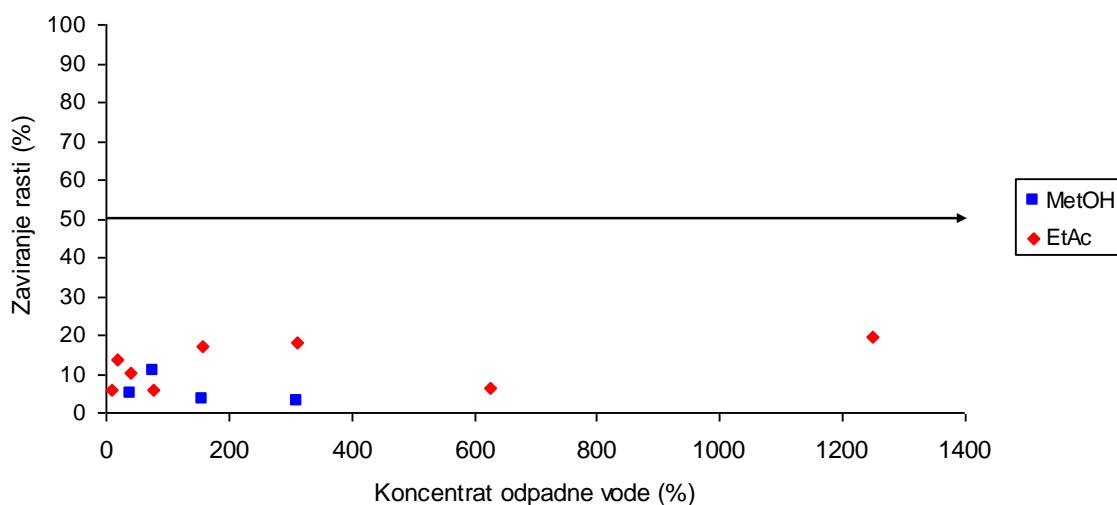
Koncentrat odpadne vode (%)	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53	9,76
Topilo	Estrogenска aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	0	0	0	0	0	0
Etilacetat (pred dodatkom encima)	63	62	46	30	14	0	0	0
Metanol (po dodatku encima)	0	0	0	0	0	0	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	62	49	27	15	23	0	0	0

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenске aktivnosti nismo računali.

4.3.2 Iztok

4.3.2.1 Zaviranje rasti kvasovk

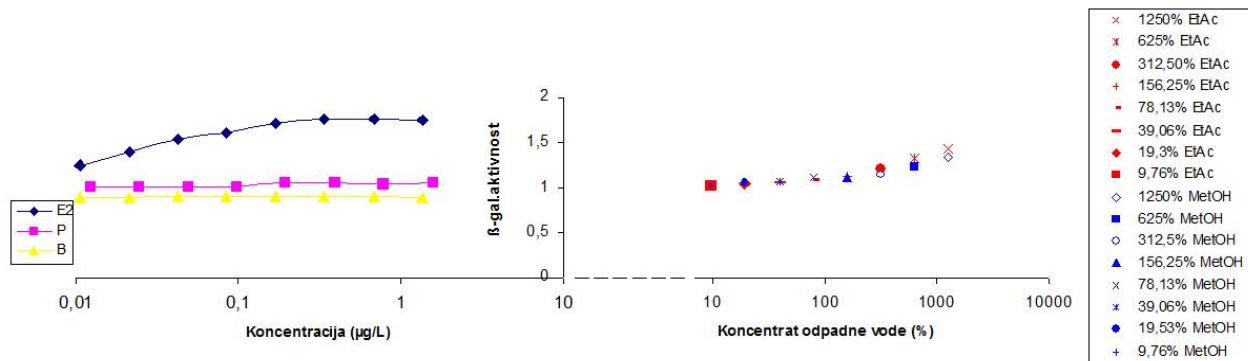
Rast kvasovk je bila na iztoku čistilne naprave C nemotena. Zaviranja rasti kvasovk nismo zaznali niti pri vzorcih, eluiranih z metanolom, niti pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom.



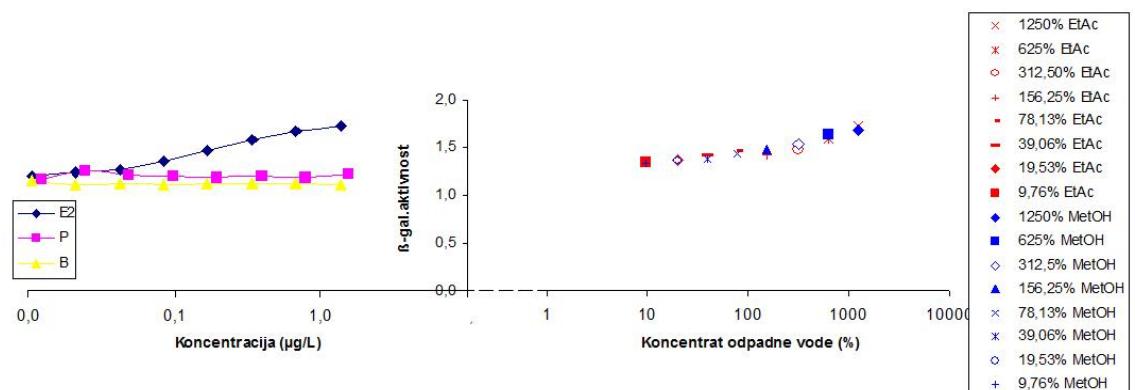
Slika 25: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave C.

4.3.2.2 Rezultati testa YES

Estrogenске aktivnosti brez dodatka encima nismo zaznali v iztoku čistilne naprave C (slika 26), prisotna je bila po dodatku encima pri vzorcih, eluiranih z metanolom in etilacetatom (slika 27), in je bila najvišja (61 %) pri najvišji koncentracijski vrednosti vzorca, eluiranega z etilacetatom (preglednica 6).



Slika 26: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 27: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave C, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukoronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

Preglednica 6: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave C pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

Koncentrat odpadne vode (%) Topilo	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53	9,76
	Estrogenska aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	0	0	0	0	0	0	0	0
Etilacetat (pred dodatkom encima)	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol (po dodatku encima)	55	47	31	19	12	0	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	61	39	21	10	17	10	0	0

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenske aktivnosti nismo računali.

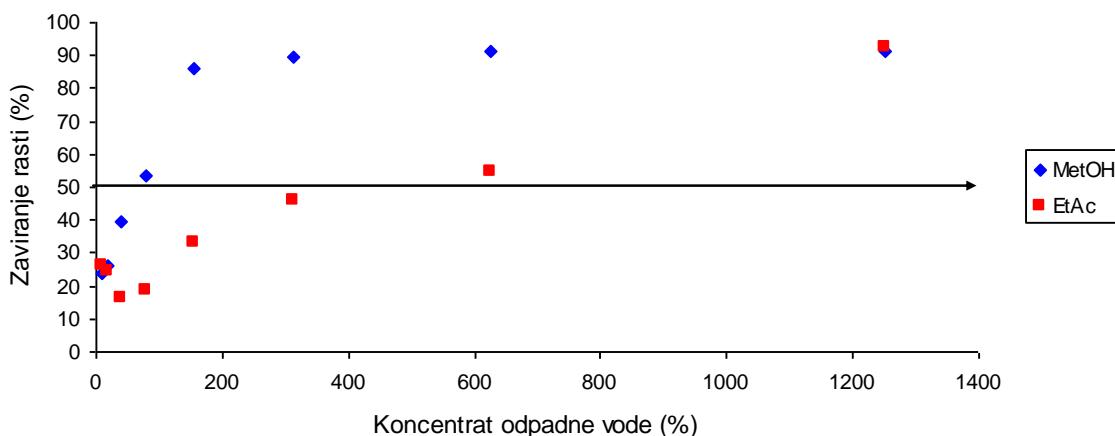
4.4 ZAVIRANJE RASTI KVASOVK IN ESTROGENSKA AKTIVNOST V VZORCIH VTOKA IN IZTOKA ČISTILNE NAPRAVE D

Pri čistilni napravi D smo na vtoku zaznali največje zaviranje rasti kvasovk, saj smo zaviranje zaznali tudi pri redčeni vrednosti originalnega vzorca (slika 28). Zaviranje rasti je bilo tudi na iztoku v primerjavi z ostalimi vzorci iz čistilnih naprav visoko (slika 31). Visoko zaviranje rasti na vtoku je onemogočilo zaznanje estrogenске aktivnosti, ki smo jo zaznali šele po dodatku encima. Na iztoku smo zaznali EA pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, pri vseh koncentracijskih vrednostih, medtem ko smo pri vzorcih, eluiranih z metanolom, zaznali EA pri nižjih koncentracijskih vrednostih (slika 32 in preglednica 8).

4.4.1 Vtok

4.4.1.1 Zaviranje rasti kvasovk

Na sliki 28 je prikazano zaviranje rasti kvasovk, ki je bilo prisotno pri vzorcih, eluiranih z metanolom in etilacetatom. Zaviranje rasti kvasovk se pojavlja tudi pri nizkih koncentracijskih vrednostih oz. že pri redčeni vrednosti originalnega vzorca. Prisotno je tudi pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom.

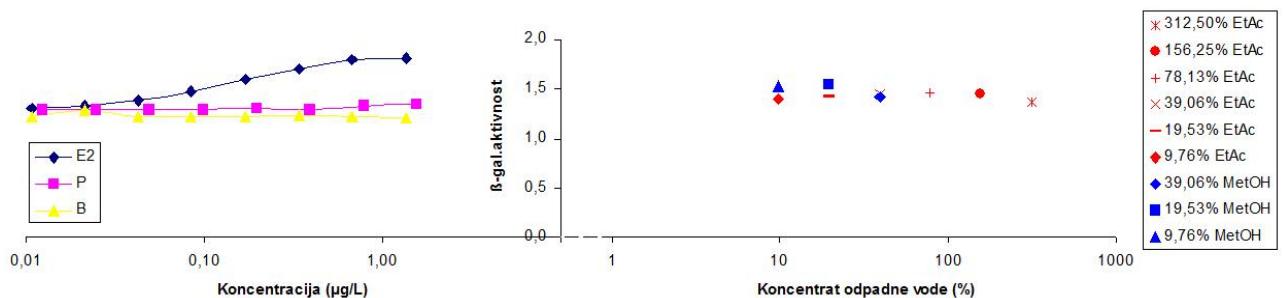


Slika 28: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu vtoka čistilne naprave D.

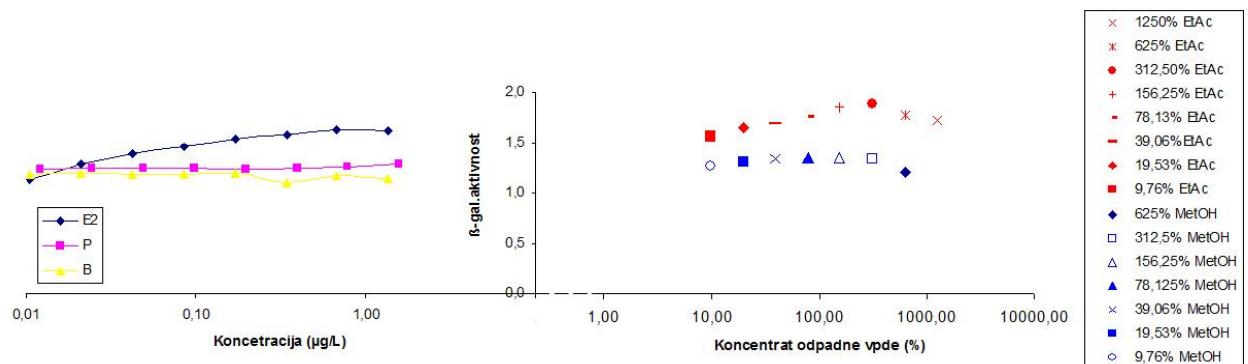
4.4.1.2 Test YES

EA se ni pokazala v nobeni od koncentracijskih vrednosti, kar je razvidno na sliki 29 in tudi v preglednici 7. Po dodatku encima se je zelo povečala le pri vzorcih, eluiranih z

etilacetatom (slika 30). Najvišja vrednost je bila zaznana pri 6,25-kratnem koncentratu originalnega vzorca, le-ta je znašala 128 % (preglednica 7).



Slika 29: Aktivnosť β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitívnu kontrolo, P negatívnu, B pa predstavuje níčelní vzorec.



Slika 30: Aktivnosť β -galaktozidaze za vzorec vtoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukuronidaze. E2 predstavlja pozitívnu kontrolo, P negatívnu, B pa predstavuje níčelní vzorec.

Preglednica 7: Estrogenска aktivnost vtoka čistilne naprave D pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

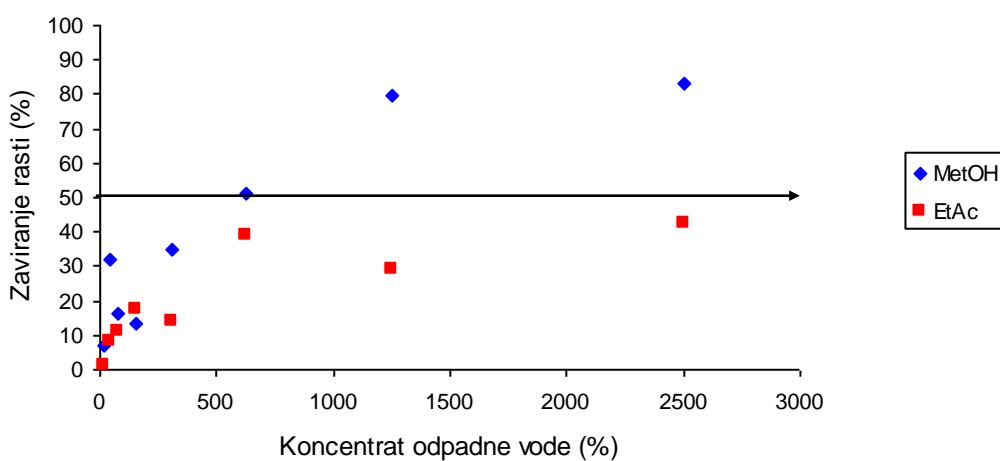
Koncentrat odpadne vode (%)	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53	9,76
Topilo	Estrogenска aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	*	*	*	0	21	20
Etilacetat (pred dodatkom encima)	*	*	0	0	0	0	0	0
Metanol (po dodatku encima)	*	0	0	0	0	0	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	80	93	128	115	92	73	63	37

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenске aktivnosti nismo računali.

4.4.2 Iztok

4.4.2.1 Zaviranje rasti kvasovk

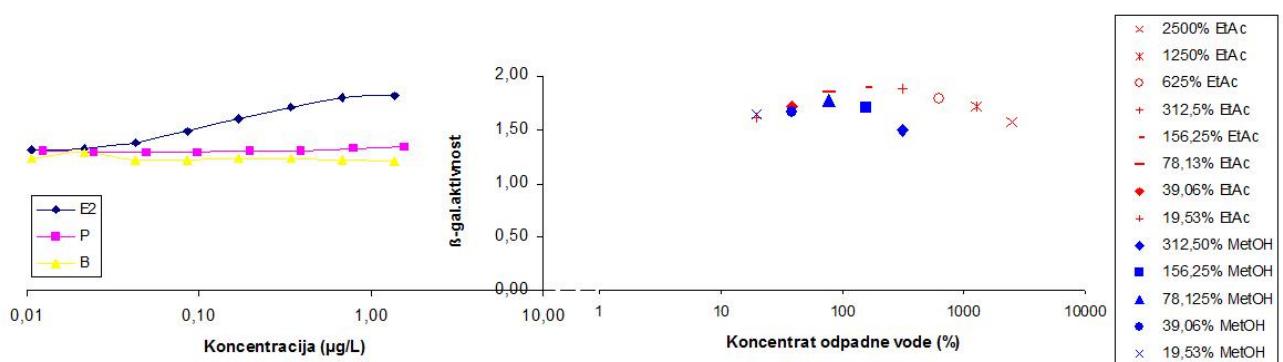
Tudi pri vzorcu iztoka čistilne naprave D je bilo prisotno zaviranje rasti kvasovk in se pojavlja vse do koncentracijske vrednosti 625 % pri vzorcih, eluiranih z metanolom (slika 31).



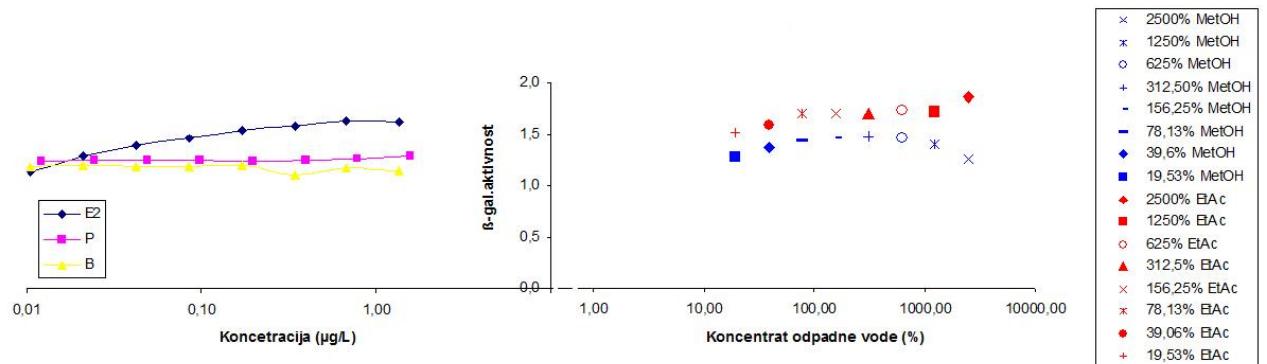
Slika 31: Zaviranje rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, izpostavljenih vzorcu iztoka čistilne naprave D.

4.4.2.2 Rezultati testa YES

Na iztoku čistilne naprave D je bila EA prisotna pri vzorcih, ki smo jih eluirali z metanolom (slika 32), najvišja (68 %) je bila pri koncentracijski vrednosti 78,12 % (preglednica 8). Pri vzorcih, ki smo jih eluirali z etilacetatom, je bila EA večja od 80 % pri srednjih koncentracijskih vrednostih (preglednica 8). Dodatek encima je povišal EA pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (slika 33), največ (za več kot 100 %) se je povečala pri najvišjem koncentratu (2500-odstotnem).



Slika 32: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.



Slika 33: Aktivnost β -galaktozidaze za vzorec iztoka čistilne naprave D, eluiran z metanolom in etilacetatom, po dodatku encima β -glukuronidaze. E2 predstavlja pozitivno kontrolo, P negativno, B pa predstavlja ničelni vzorec.

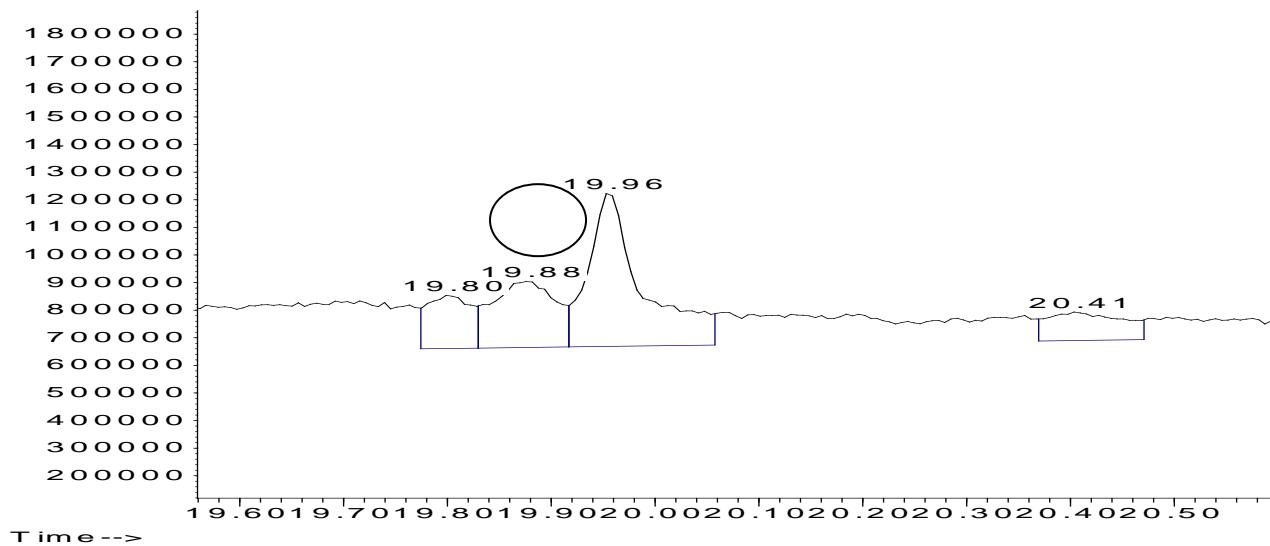
Preglednica 8: Estrogenska aktivnost iztoka čistilne naprave D pred dodatkom in po dodatku encima β -glukoronidaze, izračunana glede na dobljeno vrednost β -gal pri najvišji koncentraciji E2.

Koncentrat odpadne vode (%)	2500,00	1250,00	625,00	312,50	156,25	78,12	39,06	19,53
Topilo	Estrogenska aktivnost (%)							
Metanol (pred dodatkom encima)	*	*	*	12	54	68	56	42
Etilacetat (pred dodatkom encima)	28	56	69	86	89	82	56	36
Metanol (po dodatku encima)	0	0	24	27	23	15	0	0
Etilacetat (po dodatku encima)	138	95	101	93	92	94	60	40

*Zaviranje rasti je večje od 50 %, zato estrogenske aktivnosti nismo računali.

4.5 GC-MS

Z analizo na SPME/GC-MS smo zaznali E2 le pri vzorcu vtoka čistilne naprave D, ki je bil eluiran z metanolom. V vzorcu je bilo zaznati E2 v koncentraciji 0,02 µg/L.



Slika 34: Kromatogram vzorca iz vtoka čistilne naprave D (analiza SPME/GC-MS).

Slika 34 prikazuje kromatogram za vzorec iz vtoka čistilne naprave D, kjer x-os predstavlja retencijski čas (čas potovanja spojine po koloni GC), y-os pa površino pod pikom (pogostost pojavljanja spojine v vzorcu).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 TEST YES

5.1.1 Zaviranje rasti kvasovk

Na čistilno napravo A doteka mešanica komunalne, industrijske in padavinske odpadne vode. Kar 37 volumskih % od celotne dotočne odpadne vode je industrijskega izvora iz različnih panog (farmacevtska, klavniška, prehrambna, pohištvena, kemijska, kovinskopredelovalna, tekstilna industrija, pralnice tekstila, deponijska izcedna in odpadne vode ostalih profitnih dejavnosti ter ostalega gospodarstva). Naši rezultati merjenja zaviranja rasti kvasovk, izpostavljenih temu vzorcu, so bili temu primerni. Rast kvasovk je bila zelo slaba, visoko zaviranje rasti smo izmerili pri višjih vrednostih koncentratov odpadne vode, zaviranje pa je bilo prisotno tudi pri visokih redčitvah koncentrata (slika 10). Na iztoku iste čistilne naprave zaviranja rasti ni bilo (slika 13). Pri tem je treba omeniti razliko v zaviranju rasti v primeru uporabe različnega elucijskega topila. Pri uporabi metanola kot elucijskega topila je bilo namreč zaviranje rasti zelo visoko, medtem ko je bilo v primeru uporabe etilacetata zelo nizko oz. ga ni bilo. Zaviranje na vtoku je bilo najvišje pri 25-kratnem koncentratu originalnega vzorca (oz. 2500-odstotnem koncentratu) in pri 12,5-kratnem koncentratu originalnega vzorca (oz. 1250-odstotnem koncentratu), eluirana z metanolom (88- in 89-odstotno), pri etilacetatu je bilo zaviranje najvišje (50-odstotno) pri najvišjem koncentratu, 2500-odstotnem. Na iztoku je bilo prisotno 50-odstotno zaviranje rasti le pri vzorcu, eluiranem z metanolom, in sicer pri najvišji vrednosti koncentrata, 2500-odstotni, pri drugih vrednostih koncentratov zaviranja ni bilo. Pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, je bilo zaviranje izredno majhno (cca 10 %) oz. ga ni bilo.

Tudi pri analizi vzorca B, kamor dtekata tako gospodinjska kot industrijska odpadna voda, opazimo razliko v zaviranju rasti na vtoku in iztoku. Zaviranje rasti kvasovk je bilo v primeru izpostavljenosti le-teh vtoku vzorca B, eluiranem z metanolom, prisotno do 1,56-kratnem koncentratu originalnega vzorca (oz. 156,25-odstotnega koncentrata). V primeru izpostavljenosti kvasovk istega vzorca, eluiranega z etilacetatom, zaviranja rasti kvasovk ni bilo zaznati (slika 16). Analiza iztoka vzorca B je pokazala, da je bilo zaviranje rasti

kvasovk prisotno samo pri kvasovkah, izpostavljenim vzorcu, eluiranim z metanolom, pri najvišji vrednosti koncentrata (1250 %) – ta je znašala 53 % (slika 19).

Pri analizi vzorca C, ki zbira gospodinjsko odpadno vodo, je bilo prisotno zaviranje rasti kvasovk na vtoku pri vzorcih, spranih z metanolom, in sicer je bilo pri 1250-odstotnem koncentratu 86,8-odstotno zaviranje rasti in pri 625-odstotnem koncentratu 62,7-odstotno zaviranje rasti (slika 22). Na iztoku je bila rast kvasovk nemotena, tako v primeru uporabe elucijskega topila metanola kot tudi v primeru etilacetata (slika 23).

Vrednosti zaviranja rasti kvasovk so bile največje pri analizi vzorca D, pri katerem imamo opravka z odpadno vodo iz objektov reje domačih živali. Pri 1250- in 625-odstotnem koncentratu vtoka, eluiranega z metanolom, je bilo zaviranje rasti kvasovk 91-odstotno, najnižje (53,8 %) pa je bilo že pri redčeni vrednosti originalnega vzorca. V primeru izpostavljenosti kvasovk vtoku vzorca D je bilo mogoče zaznati zaviranje rasti tudi v vzorcih, eluiranih z etilacetatom. Pri najvišji vrednosti koncentrata, eluiranega z etilacetatom, je bilo zaviranje rasti kvasovk zelo podobno vrednostim pri vzorcih, eluiranih z metanolom (92 %) (slika 28). Tudi ob izpostavljenosti kvasovk iztoku iz čistilne naprave D je bilo prisotno zaviranje rasti, vendar se v nasprotju z ostalimi odpadnimi vodami le-to pojavlja vse do 6,25-kratnega koncentrata originalnega vzorca (slika 31).

Iz dobljenih rezultatov za zaviranje rasti kvasovk lahko sklepamo, da je bilo le-to največje ob izpostavljenosti kvasovk vzorcem čistilnih naprav, v katere dotečajo poleg komunalne odpadne vode tudi odpadne vode iz industrije. Na tem mestu še posebej izstopa odpadna voda iz vzorčnega mesta D, saj je bilo zaviranje rasti kvasovk prisotno tudi na iztoku pri nižjih vrednostih koncentrata.

Na splošno je bilo zaviranje rasti kvasovk pri vzorcih, eluiranih z metanolom, višje kot pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom. Razlog za to je najverjetnejše dejstvo, da smo kolone najprej izpirali z metanolom, ki je iz kolone izpral strupene snovi, ki so zavirale rast kvasovk. Pri drugem izpiranju, kjer smo uporabili etilacetat, je bilo le-teh posledično manj, ker je očitno že metanol spral strupene snovi. Rešitev najverjetnejše ponuja dodaten korak čiščenja vzorcev. V praksi se uporabljajo kolone s silika gelom (Ternes in sod., 1999), HPLC frakcioniranje (Huang in Sedlak, 2001), frakcioniranje v amino (NH_2) kolonah (Belfroid in sod., 1999) in gelska kromatografija (Ternes in sod., 2002).

Vzorcev, pri katerih je bilo prisotno več kot 50-odstotno zaviranje, nismo uporabili za nadaljnje računanje estrogenske aktivnosti.

5.1.2 Estrogenska aktivnost vzorcev iz čistilnih naprav

Čistilne naprave so v okolju pomemben točkovni vir hormonskih motilcev. Veliko ksenoestrogenov se v iztokih pojavlja v rangu $\mu\text{g/l}$, medtem ko se naravni estrogeni gibljejo v rangu ng/l . Mnogo avtorjev (Desbrow in sod., 1998; Körner in sod., 2001; Onda in sod., 2003; Routledge in sod., 1998) potrjuje, da so na iztokih komunalnih čistilnih naprav prisotni steroli, naravna hormona E2 in E1 ter sintetični hormon EE2, ki so glavni povzročitelji estrogenske aktivnosti.

Pri analizi vzorca čistilne naprave A smo na vtoku zaznali estrogensko aktivnost (EA) pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (slika 11), in ta je padala premo sorazmerno z manjšanjem vrednosti koncentrata. Najvišja estrogenska aktivnost (70 %) je tako bila zaznana pri 12,50-kratnem koncentratu originalnega vzorca (oz. 1250-odstotnem koncentratu) (preglednica 1), zaznali pa smo jo tudi še pri redčenih vzorcih. Tudi na izoku je bila prisotna estrogenska aktivnost le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom (slika 14), vse tja do 625-odstotnega koncentrata, kjer je znašala dobrih 64 % (preglednica 2). Pri 1250-odstotni koncentracijski vrednosti je bila estrogenska aktivnost na izoku enaka kot na vtoku. Pri ostalih vrednostih koncentrata pa je bila EA na izoku manjša kot na vtoku.

Pri analizi vzorca čistilne naprave B smo estrogensko aktivnost zaznali pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom in metanolom. Na vtoku pri 1250-odstotnem koncentratu je bila ugotovljena 65-odstotna estrogenska aktivnost in je sorazmerno padala z vrednostjo koncentratov vse do 312,50-odstotnega koncentrata, kjer je znašala 52 % (preglednica 3). Na izoku (preglednica 4) je bila prisotna pri 1250-odstotnem koncentratu (62 %) in pri 625-odstotnem (57 %) pri vzorcih, ki smo jih eluirali z etilacetatom.

Tudi pri analizi vzorca čistilne naprave C smo estrogensko aktivnost zaznali le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom. Opazili smo, da estrogenska aktivnost pada sorazmerno z manjšanjem vrednosti koncentrata. Tako je bila najvišja EA (63 %) zaznana pri najvišjem koncentratu (1250-odstotnem), pri 625-odstotnem koncentratu je bila zaznana nižja EA (61 %) itn. (preglednica 5). Na izoku iste čistilne naprave (vzorec C) nismo zaznali

nobene estrogenske aktivnosti, ne pri vzorcih, eluiranih z metanolom, kakor tudi ne pri vzorcih, ki smo jih eluirali z etilacetatom (preglednica 6).

Vzorec iz vtoka čistilne naprave vzorčnega mesta D zaradi previsoke inhibicije rasti kvasovk ni pokazal nobene estrogenske aktivnosti. Na iztoku, kjer je bilo manjše zaviranje rasti kvasovk, pa se je pokazala estrogenska aktivnost. EA je bila prisotna pri vzorcih, ki smo jih eluirali z metanolom, najvišja (68 %) pa je bila že pri redčenem vzorcu originalnega vzorca (78,12-odstotnem koncentratu). Vzorci, ki so bili elurani z etilacetatom, pa so pokazali najvišjo EA pri koncentratih 312,50 %, 156,25 % in 78,12 %, kjer je le-ta znašala več kot 80 % (preglednica 8).

Vzorce za analizo smo poskušali pripraviti isti dan, kot je potekala analiza, kar se je že v preteklosti pokazalo za dobro prakso (McArdell in sod., 2006). Pri pripravi vzorcev smo naleteli na določene težave, ki bi morda lahko imele vpliv na končne rezultate. Priprava vzorcev za analizo je vključevala filtracijo, včasih pa je bilo treba vzorce predhodno tudi centrifugirati. Zato smo pred postopkom SPE vzorce, ki so vsebovali veliko nečistoč oz. usedljivih delcev, najprej filtrirali oz. zelo nečiste vzorce smo pred tem še centrifugirali.

Vzorce smo do analize hranili na 4 °C. V nekaterih eksperimentih so za hranjenje vzorcev pred analizo uporabili tudi konzervanse, ki bi naj dodatno preprečili biološko razgradnjo estrogenov med samim hranjenjem vzorcev. Za to se uporablja postopek acidifikacije, s katerim uravnamo pH na 3 ali 4 (Rutishauser in sod., 2004).

5.1.3 Estrogenska aktivnost vzorcev vode po dekonjugaciji

Pri vzorcu, odvzetem na vtoku čistilne naprave A, se je estrogenska aktivnost po dodatku encima, ki dekonjugira estrogene, povišala pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom pri najvišjih koncentracijskih vrednostih (1250-odstotne in 625-odstotne) (preglednica 1). EA je pri teh vzorcih dosegla skoraj 100 % estrogenske aktivnosti E2. Zanimivo je, da se je podobno visoka estrogenska aktivnost pojavila pri 25-kratnem koncentratu originalnega vzorca (2500-odstotni koncentrat), kjer je pred dodatkom encima rasti sploh ni bilo. Pri manjših vrednostih koncentrata se je estrogenska aktivnost nekoliko zmanjšala v primerjavi z estrogensko aktivnostjo vzorca, ki ni bil izpostavljen procesu dekonjugacije. Na iztoku (preglednica 2) smo po dodatku encima zaznali estrogensko aktivnost tudi pri vzorcih, eluiranih z metanolom. Le-ta je bila visoka, 81 % pri 1250-odstotnem koncentratu.

Pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, se je estrogenска aktivnost povečala pri vseh koncentratih, kjer je bila prisotna pred dodatkom encima (za cca 30 %), pojavila pa se je tudi pri 156-odstotni koncentracijski vrednosti (znašala je 51 %), kjer je pred dodatkom encima ni bilo. Vrednosti EA padajo sorazmerno z vrednostjo koncentrata – manjši je koncentrat, manjša je EA. Na splošno je na izoku opaziti, da se po dodatku encima EA zviša pri vseh vrednostih koncentrata, medtem ko se na vtoku ob dodatku encima povišala samo pri najvišjih vrednostih koncentrata.

Analiza vzorca B po dodatku encima za dekonjugacijo estrogenov je podobno kot analiza vzorca A pokazala, da se je EA zaradi dodatka encima na vtoku pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, povečala le pri najvišji vrednosti koncentrata (za slabih 20 %), medtem ko se je pri ostalih dveh vrednostih koncentrata EA znižala, pri 625-odstotnem koncentratu se je znižala za 7 %, pri 312,50-odstotnem pa za dobrih 13 % (preglednica 3). Encim je povečal število aktivnih spojin z estrogenim delovanjem pri vzorcih, eluiranih z metanolom. Najvišja EA je bila pri 78,12-odstotnem koncentratu, in sicer 81 %. Na izoku (preglednica 4) se je pojavila EA pri vzorcih, spranih z metanolom, šele po dodatku encima (pri 625-odstotnem koncentratu) je znašala dobrih 74 %, pri 312,50-odstotnem koncentratu pa 61 %. Pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, se je EA po dodatku encima povečala pri vseh vrednostih koncentrata. Največ, za 34 % se je povečala pri najvišjem koncentratu (1250-odstotnem). Tudi na izoku vzorca B opazimo, da vrednosti po dodatku encima narastejo pri vseh vrednostih koncentrata in da linearno padajo z vrednostjo koncentrata.

Dodan encim v vzorcu iz vtoka čistilne naprave C ni bistveno povečal EA pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, pri vzorcih, eluiranih z metanolom, pa je povzročil, da se je EA sploh zaznala (preglednica 5). Ko smo vzorcem iz izoka čistilne naprave C dodali encim, je bila ugotovljena EA pri vseh vzorcih, najvišja je bila pri vzorcu, eluiranem z etilacetatom (pri najvišjem koncentratu), in sicer je znašala 62 %. Tudi tukaj rezultati nakazujejo na soodvisnost med vrednostmi koncentrata in EA, saj EA pada z vrednostjo koncentrata (preglednica 6).

Dodatek encima je na vtoku čistilne naprave D (preglednica 7) močno spremenil sliko o prisotnosti spojin z estrogenskim delovanjem, saj se je pokazalo, da so le-te prisotne, vendar so bile v neaktivni obliki. Tudi v tem primeru smo zaznali EA le pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom. Po dodatku encima je bila le-ta zelo visoka. Najvišjo vrednost je

dosegla pri 3,12-kratnem koncentratu originalnega vzorca, in sicer kar 128 %. Od te vrednosti koncentrata EA pada sorazmerno z vrednostjo koncentrata. Pri prvih dveh najvišjih koncentratih je bila EA manjša, kot bi pričakovali. V primerjavi z vzorci iz ostalih čistilnih naprav je bila visoka še pri redčenem vzorcu originalnega vzorca (64 % EA). Na iztoku (preglednica 8) je dodatek encima povisal EA pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, in sicer je prišlo do največje spremembe pri najvišjem koncentratu (2500-odstotnem) za več kot 100 % (z 28 % na 138 %). Pri 1250-odstotnem koncentratu se je povečala za dobrih 40 % (s 56 % na 95 %), pri 312,5-odstotnem koncentratu za 7 % (s 86 % na 93 %), povečala se je tudi pri drugih vrednostih koncentratov. Pri vzorcih, eluiranih z metanolom, se estrogenska aktivnost ni povečala v nobenem primeru. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko podamo naslednje sklepe:

- Zaviranje rasti kvasovk je bilo večje na vtokih na čistilne naprave kot na iztokih iz čistilnih naprav, kar pomeni, da obstoječe čistilne naprave učinkovito odstranijo strupene snovi, ki zavirajo rast kvasovk.
- Večje zaviranje rasti kvasovk je bilo pri bolj koncentriranih vzorcih odpadne vode.
- Pri vzorcih, eluiranih z metanolom, je bilo pri najvišjih koncentratih prisotno zaviranje rasti kvasovk, ki je onemogočilo preverjanje prisotnosti estrogenske aktivnosti v vzorcih. Za izboljšavo tega problema predlagamo dodatno čiščenje z npr. uporabo kolon s silika gelom, s čimer bomo odstranili še več strupenih snovi in s tem zmanjšali zaviranje rasti kvasovk.
- Estrogenska aktivnost se je pojavila v večini primerov pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, in je padala sorazmerno z manjšanjem vrednosti koncentrata.
- Po procesu dekonjugacije se je estrogenska aktivnost povečala, kar je lepo vidno na iztokih. Najvišje povečanje EA smo zaznali pri 2500-odstotnem koncentratu vzorca iz iztoka čistilne naprave D (z 28 % na 138 %). Pojavila se je tudi pri vzorcih, eluiranih z metanolom, kjer pred dodatkom encima rasti kvasovk sploh ni bilo.

- V iztokih preiskovanih čistilnih naprav se spojine z estrogenskim delovanjem nahajajo delno ali pretežno v neaktivni obliki, medtem ko se na vtokih nahajajo delno v neaktivnih oblikah.
- Kemijska analiza s SPME/GC-MS-jem ni pokazala prisotnosti E2 oz. EE2 v vzorcih iz čistilnih naprav A, B, C in D. Razlog se nahaja v tem, da obstoječa analitska metoda ni dovolj občutljiva. Izjema je vtok vzorca čistilne naprave D, ki smo ga eluirali z metanolom, kjer je bilo zaznati spojino E2.
- Z biološkim testom YES smo zaznali spojine z estrogensko aktivnostjo, s kemijsko metodo SPME/GC-MS pa le-teh nismo identificirali (izjema vzorec vtoka čistilne naprave D). Razloga sta dva. Prvi je ta, da estrogensko aktivnost v naših vzorcih povzročajo druge spojine, ki jih z metodo SPE/GC-MS nismo niti iskali. Drugi možen vzrok pa je, da so bile koncentracije E2 oz. EE2 v vzorcih tako nizke, da jih z obstoječo metodo nismo mogli zaznati, so pa povzročile estrogenski odgovor v testu YES.
- Tudi v slovenskih odpadnih vodah so prisotne spojine z estrogenskim delovanjem, najvišje vrednosti estrogenske aktivnosti smo zaznali na čistilni napravi D na iztoku pri 156,25-odstotnem koncentratu, kjer je znašala 89 %.

Glede na rezultate lahko:

1. potrdimo, da s testom YES lahko zaznamo estrogensko aktivnost v odpadnih vodah;
2. potrdimo, da s testom YES lahko zaznamo prisotnost spojin E2 in EE2 v vtokih in iztokih različnih komunalnih čistilnih naprav;
3. potrdimo, da s testom YES lahko preverimo učinkovitost čistilnih naprav pri odstranjevanju estrogensko aktivnih spojin;
4. potrdimo, da se s procesom dekonjugacije z encimom β -glukuronidaza estrogenska aktivnost poveča.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je test YES primerna metoda za zaznavanje spojin z estrogenskim delovanjem. in predlagamo, da bi test uzakonili kot

biološko metodo pri oceni in kontroli kakovosti odpadnih voda. Skupaj z že uzakonjenimi kemijskimi analitskimi metodami bi ta metoda dala bolj natančen in celovit odgovor o prisotnosti ksenoestrogenov v slovenskih odpadnih vodah.

Predlagamo tudi, da bi detekcijski prag testa YES z ustreznimi metodami genskega inžineringa še znižali, da bi lahko zaznavali spojine z estrogenskim delovanjem tudi v pitni vodi.

6 POVZETEK

V skupino hormonskih motilcev spadajo naravni in sintetični hormoni ter spojine, ki oponašajo delovanje hormonov (pesticidi, fitofarmacevtska sredstva, površinske aktivne snovi, organske kisikove spojine, poliklorirane spojine itn.). S svojim delovanjem vplivajo predvsem na reprodukcijski sistem in posledično na rast in razvoj celotnega organizma.

Za ugotavljanje prisotnosti in aktivnosti hormonskih motilcev v vodnih ekosistemih se uporabljam tako kemijske metode kakor tudi biološke metode. Z uporabo biološkega preskusa dobimo bolj celovit pogled na to, kakšen vpliv ima dejansko mešanica kemikalij v vzorcu na določen organizem v vodnem ekosistemu.

Iztoni čistilnih naprav predstavljajo pomemben vir onesnaženja s steroli, naravnima hormonoma E2 in E1 ter sintetičnim hormonom EE2, ki so glavni povzročitelji estrogenске aktivnosti. Glede na globalno prisotnost motilcev v vodnih okoljih smo predvidevali, da tudi slovenski iztoni in reke niso izjema glede onesnaženja s hormonskimi motilci.

V nalogi smo preverjali prisotnost hormonskih motilcev z estrogenским delovanjem na vtokih in iztokih različnih čistilnih naprav. Vzorce smo najprej koncentrirali s t. i. postopkom ekstrakcije na trdnih nosilcih v kolonski izvedbi (SPE). Pri tej metodi smo uporabili Water Oasis kolone in dve topili – metanol in etilacetat. Koncentrirane vzorce smo analizirali na estrogenko aktivnost s testom YES. To je biološki test, pri katerem za ugotavljanje prisotnosti estrogenov in estrogenko aktivnih snovi v vodnih vzorcih uporabljam gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

Izvedli smo tudi dekonjugacijo z dodajanjem encima β -glukoronidazo in nato opazovali, ali se je estrogenka aktivnost vzorcev povečala.

Rezultati so pokazali, da je prisotno visoko zaviranje rasti kvasovk, ki je bilo po naših pričakovanjih večje na vtokih kot na iztokih čistilnih naprav. Večje zaviranje rasti je bilo pri vzorcih, eluiranih z metanolom, saj je bilo to prvo topilo, s katerim smo eluirali vzorce, in je posledično iz vzorca odstranilo več strupenih snovi kot pozneje etilacetat.

Estrogenска aktivnost se je pojavila v večini primerov pri vzorcih, eluiranih z etilacetatom, in je padala sorazmerno z manjšanjem vrednosti koncentrata.

Po izvedbi dekonjugacije se je estrogenска aktivnost povečala, kar je lepo vidno na iztokih. To pomeni, da čistilne naprave ne odstranijo spojin z estrogenско aktivnostjo oz. da med samim procesom čiščenja preidejo v neaktivno obliko in nato v vodno okolje, kjer je mogoča njihova ponovna aktivacija. Pojavila se je tudi pri vzorcih, eluiranih z metanolom, kjer pred dodatkom encima rasti kvasovk zaradi strupenih snovi sploh ni bilo.

S kemijsko analizo SPME/GC-MS smo zaznali E2 le pri vzorcu iz vtoka čistilne naprave D, ki smo ga eluirali z metanolom.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je test YES primeren za določevanje hormonskih motilcev v vodah. Predlagamo dodatno čiščenje vzorca, s katerim bi iz vzorcev odstranili strupene snovi, ki zavirajo rast kvasovk. Zaključimo lahko še, da so hormonski motilci prisotni tudi v naših odpadnih vodah in lahko po izpustih v površinske vode vplivajo na vodne organizme in onesnažujejo vodne ekosisteme.

7 VIRI

- Adami H., Bergstrom R., Mohner M., Zatonski W., Storm H., Ekbom A., Tretli S., Teppo L., Ziegler H., Rahu M., Gurevicius R., Stengrevics A. 1994. Testicular cancer in nine northern European countries. *International Journal of Cancer*, 59: 33–38
- Auger J., Kunstmann J.M., Gzyglik F., Jovannet P. 1995. Decline in semen quality among fertile men in Paris during past 20 years. *The New England Journal of Medicine*, 332: 281–285
- Ballesteros O., Zafra A., Navalon A., Vilchez J.L.J. 2006. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivates in wastewater samples. *Journal of chromatography A*, 112: 154–162
- Barlow D.H. 2001. Environmental effects on reproductive health: Introduction. *Human Reproduction*, 16, 5: 971
- Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di-Corcio A., Gentili A., Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science Technology*, 34, 24: 5059–5066
- Belfroid A.C., Van-Der-Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Rijs G.B.J. Wegener J., Cofino W.P. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucoronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*, 225, 1-2: 101–108
- Benijts T., Lambert W., Leenheer A.D. 2004. Analysis of Multiple Endocrine Disruptors in Environmental Waters via Wide-Spectrum Solid-Phase Extraction and Dual-Polarity Ionization LC-Ion Trap-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 76: 704
- Brossa L., Marce R.M., Borrull F., Pocurull E. 2005. Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2: 261–267
- Bulletin 910. 1998. Guide to Solid phase Extraction. Bellefonte, USA, Sigma-Aldrich: 11 str.

Bulletin 923B. 2004. Solid phase microextraction: Theory and optimization of conditions.

Bellefonte, USA, Sigma-Aldrich: 7 str.

Bursch W., Fuerhacker M., Gemeiner M., Grillitsch B., Jungbauer A., Kreuzinger N., Moesti E., Scharf S., Schmid E., Skutan S., Walter I. 2004. Endocrine disrupters in the aquatic environment: the Austrian approach-ARCEM. Water Science Technology, 50, 5: 293–300

Dean J.R. 1998. Extraction Methods for Environmental Analysis. Newcastle, UK, John Wiley & Sons: 225 str.

De Mes T. 2007. Fate of estrogens in biological treatment of concentrated black water. PhD-Thesis. The Netherlands, Wageningen University: 154 str.

Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldoch M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. Environmental Science Technology, 32, 11: 1549–1558

Dray J., Dray F., Tiller F., Ulman A. 1972. Hydrolysis of urine metabolites of different steroid hormones by β -glucuronidase from *E. coli*. Annales de l'Institut Pasteur, 123: 853–857

Eggen R.I.L., Bengtsson B.E., Bowmer C.T., Gerritsen A.A.M., Gibert M., Hylland K., Johnson A.C., Leonards P., Nakari T., Norrgrn L., Sumpter J.P., Suter M.J.F., Svenson A., Pickering A.D. 2003. Search for the evidence of endocrine disruption in the aquatic environment: Lessons to be learned from joint biological and chemical monitoring in the European Project COMPREHEND. Pure Applied Chemistry, 75, 11-12: 2445–2450

EU (2001). Decission No 2455/2001/EC of the European paliament and the council og 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC

Grob R.L. 1985. Modern practice of gas chromatography. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 897 str.

- Huang C.-H., Sedlak D.L. 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology Chemistry*, 20, 1: 133–139
- IEH. 1995. Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife. Leicester, UK, Institute for Environment and Health: 112 str.
- Ingerslev F., Halling-Sorensen B. 2003. Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. Environmental Protection Agency Denmark, Working Report No. 44, 69 str.
- Jobling, S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science Technology*, 32: 2498–2506
- Kitson F.G. 1996. Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide. San Diego, Academic Press: 381 str.
- Kuch H.M. and Ballschmiter K. 2001. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter rang. *Environmental Science Technology*, 35: 3201–3206
- Körner W., Spengler P., Bolz U., Schuller W., Hanf V., Metzger J.W. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 10: 2142–2151
- Larsson D.G.J., Adolfsson E.M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., Forlin L. 1999. Ethinylestradiol - An undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology*, 45, 2–3: 91–97
- Legler J. 2002. Determination of the estrogenic potency of phyto- and synthetic estrogens using in vitro bioassays. V: Natural and Synthetic Estrogens Aspects of the Cellular and Molecular Activity. Dopp E., Stopper H., Alink G. (eds.). Trivandrum, India, Transworld Research Network: 1-11
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A. 2003. Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry*, 75: 631–681

- Liu R., Zhou J.L., Wilding A. 2004. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022: 179–189
- McArdell C.S., Alder A.C., Göbel A., Löffler D., Suter M.J.-F., Ternes T.A. 2006. Analytical methods. V: Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management. Ternes T.A., Joss A. (eds.). London, IWA Publishing: 55-105
- Murk A.J., Legler J., van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkelink A., van der Burg B., Rijs G.B.J., Vethaak D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1: 16–23.
- OASIS® HLB Extraction Cartridges. 2000. Instruction Sheet for the Large Volume Cartridges. Milford, USA, Waters Corporation: 2 str.
- Onda K., Nakamura Y., Takatoh C., Miya A., Katsu Y. 2003. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage. *Water Science and Technology* 47, 9: 109–116
- Routledge E.J., Sumpter JP. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 3: 241–248
- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science Technology*, 32, 11: 1559–1565
- Rutishauser B.V., Pesonen M., Escher B.I., Ackermann G.E., Aerni H.R., Suter M.J.F., Eggen R.I.L. 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology Chemistry*, 23, 857–864
- Shimada K., Mitamura K., Higashi T. 2001. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *Journal of Chromatography A*, 935, 1-2: 141–72

- Spengler P., Körner W., Metzger J.W. 2001. Substance with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 10: 2133–2141
- Sumpter J.P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamintion of the aquatic environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 103: 173–178
- Ternes T.A., Kreckel P., Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment*, 225, 1–2: 91–99
- Ternes T.A., Andersen H., Gilberg D., Bonerz M. 2002. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 74, 14: 3498–3504
- Ternes T.A., Janex-Habibi M.-L., Knacker T., Kreuzinger N., Siegrist H. 2004. Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse, EU-Project Poseidon; Periodic reports. <http://www.eu-poseidon.com> (16. sept. 2009).
- U.S. EPA, 1997. Special Report on Endocrine Disruption. Fact Sheet. Washington, EPA D.C.: 4. str.
- Voulvouli N., Scrimshaw M.D. 2003. Methods for the determination of endocrine disrupters. V: *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Birkett J.W., Lester J.N. (eds.). London, Lewis Publishers: 61-90.
- Wells M.J.M. 2000. Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. V: *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. Simpson N. J. K (ed.). New York, Marcel Dekker: 97–123
- Wells M.J.M. 2003. Principles of extraction and the extractions of semivolatile organics from liquids. V: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Somenath M. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons: 37–131
- Wharfe J. 2004. Hazardous Chemicals in Complex Mixtures – A Role for Direct Toxicity Assessment. *Ecotoxicology*, 13: 413–421

Wylie P.L. 2006. Screening for 926 pesticides and endocrine disruptors by GC/MS with deconvolution reporting software and a new pesticide library. Application Note. Wilmington, USA, Agilent Technologies: 18 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar, somentorici doc. dr. Tatjani Tišler in Mirjani Bistan za pomoč in vodenje pri opravljanju diplomskega dela.

Posebna zahvala velja mojim staršem, ki so mi omogočili študij.

Hvala tudi Marku za podporo.