

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Metka LOVŠIN

**VPLIV OKOLJU TUJIH PRESNOVKOV
NEKATERIH ZDRAVIL NA IZBRANE TESTNE
ORGANIZME**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Metka LOVŠIN

**VPLIV OKOLJU TUJIH PRESNOVKOV NEKATERIH ZDRAVIL NA
IZBRANE TESTNE ORGANIZME**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL RESIDUES AND THEIR
METABOLITES ON SELECTED TEST ORGANISMS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za gensko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja imenovan prof. dr. Tom Turk, za somentorja dr. Mihael Bricelj ter za recenzenko prof. dr. Damjana Drobne.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentor: dr. Mihael Bricelj

Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

Komisija za zagovor in oceno:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Član: dr. Mihael BRICELJ
Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Metka Lovšin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 615.9:615.2:579.24:591.044 (043) = 163.6
- KG ekologija/strupenost/bakterije/*Pseudomonas putida*/*Salmonella typhimurium*/zarodki/*Danio rerio*/zdravila/ostanki zdravil/farmakokinetika/akridin/akridon/karbamazepin/klofibrinska kislina/naproksen/ketoprofen/indolon/diklofenak/ibuprofen
- AV LOVŠIN, Metka
- SA TURK, Tom (mentor) / BRICELJ, Mihael (somentor) / DROBNE, Damjana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2009
- IN VPLIV OKOLJU TUJIH PRESNOVKOV NEKATERIH ZDRAVIL NA IZBRANE TESTNE ORGANIZME
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 94 str., 33 pregl. 16 sl., 121 vir.
- IJ Sl
- JI sl/en
- AI Pojav zdravil in njihovih metabolnih produktov v okolju se čedalje pogosteje preučuje. Vse te spojine se znajdejo v vodnih telesih in imajo vpliv na vodne organizme. V okviru diplomskega dela smo proučevali štiri predstavnike nesteroidnih protivnetnih zdravil: diklofenak, ibuprofen, ketoprofen in naproksen; antiepileptično zdravilo karbamazepin, metabolit lipidnega regulatorja klofibrinsko kislino in metabolne produkte indolon, akridin in akridon. Učinek izbranih spojin smo preverili na bakteriji *Pseudomonas putida* z rastnim inhibičijskim testom ISO 10712 in genotoksičnost na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Poleg vpliva na bakterije nas je zanimal vpliv na izbrane evkariotske organizme, zato smo testne spojine analizirali na zarodkih ribe *Danio rerio* (ISO 7346, 1998). Rezultati so pokazali, da je rastni inhibičijski test s *Pseudomonas putida* pregroba (neustrezna) metoda za tovrstne poskuse. Akutni testi na zarodkih *Danio rerio* so pokazali različne letalne, subletalne in teratogene učinke. Nobena od testiranih spojin se ni izkazala kot genotoksična ali citotoksična.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 615.9:615.2:579.24:591.044 (043) = 163.6
- CX ecology/toxicity/bacteria/*Pseudomonas putida/Salmonella typhimurium*/embryos/*Danio rerio*/pharmaceuticals/pharmaceutical residues/pharmacokinetics/acridine/acridone/carbamazepine/clofibrat acid/naproxen/ketoprofen/indolone/diclofenac/ibuprofen
- AU LOVŠIN, Metka
- AA TURK, Tom (supervisor) / BRICELJ, Mihael (co-advisor) / DROBNE, Damjana (reviewer)
- PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2009
- TI THE INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL RESIDUES AND THEIR METABOLITES ON SELECTED TEST ORGANISMS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 94 p., 33 tab. 16 fig., 121 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB The occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in the environment are more and more frequently studied. Eventually they all end up in water bodies and have their influence on the water organisms. In this diploma we studied four nonsteroidal antiinflammatory drugs: diclofenac, ibuprofen, ketoprofen and naproxen; antiepileptic drug carbamazepine; metabolite of lipid regulator clofibrat acid and metabolites indolone, acidine and acridone. To establish the influence of the test drugs we used *Pseudomonas putida* growth inhibition test (ISO 10712) and genotoxicity test on bacteria *Salmonella typhimurium*. In addition to the influence on bacteria we also checked the impact of test drugs on selected eucaryotic organism: the zebrafish embryo *Danio rerio* (ISO 7346, 1998). The results showed that growth inhibition test with *Pseudomonas putida* is not appropriate method for testing selected pharmaceuticals and metabolites. Acute test on zebrafish *Danio rerio* showed various lethal, sublethal and teratogenic effects. None of the tested drugs were genotoxic or cytotoxic.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
1.3 CILJI NALOGE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VODA IN EKOLOGIJA	3
2.2 ONESNAŽENOST VOD	3
2.2.1 Organska onesnažila	4
2.2.2 Anorganska onesnažila	4
2.3 ONESNAŽENOST Z ZDRAVILI	5
2.3.1 Odstranjevanje zdravilnih učinkovin v čistilnih napravah	7
2.3.2 Zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti v okolju	7
2.4 EKOTOKSIKOLOŠKI VPLIVI	11
2.5 SKUPINE ZDRAVILNIH UČINKOVIN	12
2.5.1 NSAIDs	12
2.5.2 Antiepileptiki	13
2.5.3 Lipidni regulatorji procesov krvnega obtoka	13
2.5.4 Druge spojine	13
2.5.4.1 Metabolni produkti	13
2.6 VPLIVI ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA TESTNE ŽIVALI	14
2.6.1 Biološki testi	15
2.6.1.1 Biološki testi na bakterijah	16
2.6.1.2 Biološki testi na rastlinah in algah	17
2.6.1.3 Biološki testi na nevretenčarjih	18
2.6.1.4 Biološki testi na ribah	18
Testi na zarodkih rib (ang. Fish Embryo Test - FET)	19
2.6.2 Testi za določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti	28
2.6.2.1 SOS/umu test	29
SOS sistem ali popravljanje z napakami	29
3 MATERIALI IN METODE	32

3.1	MATERIALI	32
3.1.1	Celične linije	32
3.1.1.1	Bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	32
3.1.1.2	Bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>	32
3.1.1.3	Zarodki cebrike <i>Danio rerio</i>	33
3.1.2	Testne spojine	33
3.1.3	Reagenti	33
3.1.3.1	<i>Pseudomonas putida</i> rastni inhibicijski test, ISO 10712	33
3.1.3.2	Test SOS/umu	34
3.1.3.3	Test na zarodkih rib	35
3.1.3.4	Test referenčne raztopine 3,4-dikloroanilina	36
3.2	METODE	37
3.2.1	<i>Pseudomonas putida</i> rastni inhibicijski test, ISO 10712	37
3.2.1.1	Priprava bakterij <i>Pseudomonas putida</i>	37
3.2.1.2	Test referenčne spojine 3,5-diklorofenol (DCP)	37
	Test referenčne spojine 3,5-diklorofenola v hranilni juhi	38
3.2.1.3	Rastni inhibicijski test s <i>Pseudomonas putida</i> za izbrane zdravilne učinkovine	39
3.2.1.4	Vpliv delovanja indikatorja 2,3,5-tetrazolijevega klorida v testni raztopini in v raztopini referenčne spojine 3,5-diklorofenolu s hranilno juho pri pogojih stresanja	43
3.2.1.5	<i>Pseudomonas putida</i> rastni inhibicijski test na mikrotitrskih ploščah	44
3.2.1.6	Vpliv preprihovanja testne raztopine (TR) na rast <i>Pseudomonas putida</i>	47
3.2.1.7	Analiza rezultatov poskusov na mikrotitrski ploščici z računalniškim programom MARA	48
3.2.2	Test SOS/umu	48
3.2.2.1	Priprava bakterij <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002	48
3.2.3	Test na zarodkih rib (ang. Fish Embryo Test - FET)	51
3.2.3.1	Gojenje cebrik	51
3.2.3.2	Priprava raztopin za FET	51
3.2.3.3	Priprava raztopin za testiranje	51
3.2.3.4	Opis postopka FET	52
3.2.3.5	Testiranje izbranih zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov	52
3.3	IZRAČUNI IN STATISTIČNA OBDELAVA	54
3.3.1	<i>Pseudomonas putida</i> rastni inhibicijski test, ISO 10712	54
3.3.2	Test SOS/umu	54
3.3.3	Testi na zarodkih rib	55
3.3.3.1	Statistični izračuni LC ₅₀ po 24 in 48 urah	55
4	REZULTATI	56
4.1	PSEUDOMONAS PUTIDA RASTNI INHIBICIJSKI TEST (ISO 10712)	56
4.1.1	Vpliv delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v testni raztopini in v raztopini referenčne spojine 3,5-diklorofenolu s hranilno juho na stresalniku	60
4.2	PSEUDOMONAS PUTIDA RASTNI INHIBICIJSKI TEST NA MIKROTITRŠKIH PLOŠČAH	61
4.2.1	Test za referenčno spojino 3,5-diklorofenol	61
4.2.2	Test za klofibrinsko kislino	63
4.2.3	Vpliv preprihovanja testne raztopine (TR) na rast <i>Pseudomonas putida</i>	65
4.3	TEST SOS/UMU	65
4.3.1	Test brez metabolne aktivacije na bakteriji <i>Salmonella typhimurium</i>	65
4.3.2	Test z metabolno aktivacijo na bakteriji <i>Salmonella typhimurium</i>	66
4.4	TEST NA ZARODKIH RIB (ANG. FISH EMBRYO TEST - FET)	67
4.4.1	Mikroskopiranje in določanje razvojnih znakov	67
4.4.2	Določanje odstotka smrtnosti pri zarodkih za izbrane spojine	70
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	76
5.1	RAZPRAVA	76

5.1.1	<i>Pseudomonas putida rastni inhibicijski test</i>	76
5.1.1.1	<i>Pseudomonas putida rastni inhibicijski test v stekleničkah (ISO 10712)</i>	76
5.1.1.2	<i>Pseudomonas putida rastni inhibicijski test na mikrotitrskih ploščah</i>	76
5.1.2	TEST SOS/UMU	78
5.1.2.1	Test brez metabolne aktivacije	78
5.1.2.2	Test z metabolno aktivacijo	78
5.1.3	TEST NA ZARODKIH RIB (ang. FISH EMBRYO TEST-FET)	79
5.2	SKLEPI	82
6	VIRI	84

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Topnost izbranih zdravilnih učinkovin (ChemID Plus) in njihovih metabolitov ter njihove okoljske koncentracije v vodnih telesih po Evropi in Ameriki.	9
Preglednica 2: Prisotnost ketoprofena, diklofenaka in naproksena v nekaterih slovenskih rekah za leto 2004 (Kosjek in sod., 2005).	11
Preglednica 3: Pregled objav testov na različnih vrstah zarodkov rib. Za izbrane spojine je navedena njihova topnost v vodi (ChemID Plus), efektivna koncentracija ter učinek, ki so ga testne spojine povzročile na zarodkih.	20
Preglednica 4: Zbrani podatki iz literature za učinke nesteroidnih protivnetnih učinkovin na različne testne organizme.	21
Preglednica 5: Zbrani podatki iz literature za antiepileptično zdravilo karbamazepin, njegova koncentracija ter učinek na različne testne organizme.	24
Preglednica 6: Podatki iz literature za metabolit lipidnega regulatorja klofibrinsko kislino, njena efektivna koncentracija ter učinek na različne testne organizme.	26
Preglednica 7: Podatki iz literature za indolon, akridin in akridon, njihova koncentracija ter učinek na različne testne organizme.	27
Preglednica 8: Pregled objav genotoksičnosti za izbrane učinkovine na različne testne organizme oziroma celice ter rezultati poskusov, ovrednoteni z znakom + ali -.	29
Preglednica 9: Seznam testiranih spojin - proizvajalec, ime, CAS (Chemical Abstract Service) in čistost izbranih spojin	33
Preglednica 10: Izhodne in končne koncentracije izbranih spojin v mg L ⁻¹ za pripravo ISO vode.	36
Preglednica 11: Koncentracije referenčne spojine 3,4-dikloroanilina v mg L ⁻¹ .	36
Preglednica 12: Priprava razredčin za referenčno spojino 3,5-diklorofenol.	38
Preglednica 13: Postopek priprave razredčin pri testu s 3,5-diklorofenolom v hranilni juhi.	39
Preglednica 14: Priprava kontrol pri testu s 3,5-diklorofenolom v hranilni juhi, kjer smo namesto hranilne juhe pri kontrolah uporabili testno raztopino (v mL).	39
Preglednica 15: Topnost v destilirani vodi v mg L ⁻¹ (vir je ChemID) za izbrane zdravilne učinkovine in njihove metabolite, njihova zatehtana masa.	40
Preglednica 16: Preliminarni test za diklofenak Na (A), ibuprofen (B), indolon (C), karbamazepin (D), ketoprofen (E), naproksen (F), akridin (G), akridon (H) in klofibrinsko kislino (I). V preglednici so koncentracije zdravilnih učinkovin in metabolitov v vsaki razredčini v mg L ⁻¹ ter volumski deleži zdravilnih učinkovin in metabolitov v mL.	41
Preglednica 17: Redčitvena vrsta za klofibrinsko kislino (I). V preglednici so koncentracije klofibrinske kisline v vsaki razredčini (v mg L ⁻¹), njeni volumski deleži za vsako razredčino, volumen testne raztopine v vsaki razredčini ter končni volumen v vsaki steklenički (v mL).	42

Preglednica 18: Redčitvena vrsta za akridin (G). V preglednici so koncentracije akridina v vsaki razredčini (v mg L ⁻¹), njegovi volumski deleži za vsako razredčino, volumen testne raztopine v vsaki razredčini ter končni volumen v vsaki steklenički (v mL).	42
Preglednica 19: Priprava redčin pri preučevanju vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom in hranilno juho.	43
Preglednica 20: Priprava kontrol pri preučevanju vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).	44
Preglednica 21: Razporeditev vzorcev na mikrotitrski plošči, po protokolu programa Microplate analyser software.	46
Preglednica 22: Priprava razredčin za test referenčne spojine 3,5-diklorofenola, kjer smo za medij uporabili hranilno juho, razredčinam v vsaki Ependorf epruveti pa dodali bakterijski inokulum in indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).	46
Preglednica 23: Priprava razredčin za test inhibicije rasti <i>Pseudomonas putida</i> s klofibrinsko kislino, kjer smo za medij uporabili hranilno juho, razredčinam v vsaki Ependorf epruveti pa dodali bakterijski inokulum in indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).	47
Preglednica 24: Priprava razredčin za preverjanje rasti bakterije <i>Pseudomonas putida</i> za testni vzorec (A) in kontrolo (K).	47
Preglednica 25: Opazovani znaki razvoja zarodkov glede na čas izpostavljenosti zarodkov testni raztopini (** letalni, ** subletalni, * teratogeni učinki).	53
Preglednica 26: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan procent inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa za 3,5-diklorofenol na bakteriji <i>Pseudomonas putida</i> .	57
Preglednica 27: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan odstotek inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa <i>P. putida</i> za klofibrinsko kislino.	58
Preglednica 28: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan odstotek inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa <i>P. putida</i> za akridin.	59
Preglednica 29: Rezultati (pet ponovitev poskusa rasti in obarvanost) vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v gojišču s hranilno juho oziroma s testno raztopino (samo pri zadnjih dveh vrsticah) pri pogojih stresanja. (+ ... pozitivna rast <i>P. putida</i> , - ... brez rasti bakterije <i>P. putida</i>).	60
Preglednica 30: Rezultati (absorbanca in koncentracija DCP za posamezne razredčine) vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v gojišču s hranilno juho oziroma s testno raztopino (samo pri zadnjih dveh vrsticah) pri pogojih stresanja bakterije <i>P. putida</i> .	61
Preglednica 31: Rezultati programa Microplate analyser software na podlagi obdelave mikrotitrskih ploščic (Slika 5) za preučevanje vpliva inhibicije rasti z referenčno spojino 3,5-diklorofenol na bakterijo <i>P. putida</i> .	62
Preglednica 32: Rezultati programa Microplate analyser software na podlagi obdelave mikrotitrskih ploščic (Slika 7) za preučevanje vpliva inhibicije rasti s klofibrinsko kislino na bakterijo <i>P. putida</i> .	64
Preglednica 33: Subletalni in teratogeni učinki zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov na zarodkih <i>Danio rerio</i> .	69

KAZALO SLIK

Slika 1: Nastanek indolona iz diklofenaka z intramolekularno ciklizacijo (Reddersen in Heberer, 2003).....	14
Slika 2: Odvisnost inhibicije rasti <i>Pseudomonas putida</i> od koncentracije za 3,5-diklorofenol (narisan je odčitek EC ₅₀)	57
Slika 3: Odvisnost inhibicije rasti <i>Pseudomonas putida</i> od koncentracije klofibrinske kisline, kjer smo določili preskok v koncentraciji klofibrinske kisline in s tem inhibicijo rasti <i>P. putida</i>	58
Slika 4: Odvisnost inhibicije rasti <i>Pseudomonas putida</i> od koncentracije akridina.	59
Slika 5: Rast <i>P. putida</i> na mikrotitrski plošči z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v mediju s hranilno juho, kjer rdeči peleti pomenijo pozitiven rezultat (rast <i>P. putida</i>).	62
Slika 6: Graf odvisnosti testnih koncentracij v našem poskusu v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program za referenčno spojino 3,5-diklorofenol na bakteriji <i>P. putida</i>	63
Slika 7: Rast <i>P. putida</i> na mikrotitrski plošči s klofibrinsko kislino v gojišču s hranilno juho (rdeči peleti pomenijo pozitiven rezultat - rast <i>P. putida</i>).	64
Slika 8: Graf odvisnosti koncentracij uporabljenih v našem poskusu v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program za klofibrinsko kislino na bakteriji <i>P. putida</i>	65
Slika 9: Indukcijsko razmerje (genotoksičnost) SOS testa brez metabolne aktivacije na bakteriji <i>S. typhimurium</i> (rezultat prikazuje povprečja treh paralelk v dveh poskusih).	66
Slika 10: Indukcijsko razmerje (genotoksičnost) SOS testa z metabolno aktivacijo na bakteriji <i>S. typhimurium</i> (rezultat prikazuje povprečja treh paralelk v treh poskusih).	67
Slika 11: Zarodki ribe cebrice: (a) 48 ur star normalno razvit zarodek, 24 ur stara, v razvoju zaostala zarodka (b) in (c), 48 ur star normalno razvit zarodek (d), 48 ur stara, v razvoju zaostala zarodka (e) in (f), 48 ur star zarodek, brez utripa srca, krvnega obtoka in z edemom zarodek (g), 48 ur star zarodek, brez krvnega obtoka in z edemom (h), mrtev (zakrnjen) zarodek (i).....	68
Slika 12: Krivulji poteka smrtnosti zarodkov <i>Danio rerio</i> po izpostavitvi referenčni spojni 3,4-dikloroanilinu.	72
Slika 13: Odstotek smrtnosti zarodkov <i>Danio rerio</i> v odvisnosti od koncentracije spojine za diklofenak (A), ibuprofen (B) in indolon (C), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).....	73
Slika 14: Odstotek smrtnosti zarodkov <i>Danio rerio</i> v odvisnosti od koncentracije spojine za karbamazepin (D), ketoprofen (E) in naproxen (F), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).....	74
Slika 15: Odstotek smrtnosti zarodkov <i>Danio rerio</i> v odvisnosti od koncentracije spojine za akridin (G), akridon (H) in klofibrinsko kislino (I), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).....	75
Slika 16: Tri tipične oblike krivulj, ki opisujejo odstotek smrtnosti zarodkov <i>Danio rerio</i> v odvisnosti od koncentracije. Krivulje posnemajo: (a) sigmoidno, (b) eksponentno in (c) linearno odvisnost.	79

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
BaP	benzo[a]piren
BHI	Brain Heart Infusion
c	koncentracija
CAS	karakteristična številka že odkritih snovi po mednarodnem sistemu CAS (ang. Chemical Abstract Service)
DCP	3,5-diklorofenol
DDT	dikloro-difenil-trikloroetan
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
FET	test na zarodkih rib (ang. Fish Embryo Test)
I	inhibicija (rasti)
Indolon	1-(2,6-diklorofenil)indolin-2-on
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International Standards Organization)
NQNO	4-nitrokinolin
NSAID	nesteriodne protivnetne učinkovine (ang. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodik (ang. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)
PCB	poliklorirani bifenili (ang. PolyChlorinated Biphenyl)
SDS	natrijev dodecilsulfat
TR	testna raztopina (ISO 10712)
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid
UV	ultra-vijoličen

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Naraščajoča onesnaženost okolja je posledica intenzivne vsakodnevne uporabe kemijskih spojin, ki so lahko tako organskega (poliklorirani bifenili, pesticidi,...) ali anorganskega izvora (kovine, anorganska gnojila, radioaktivni elementi...). V predloženem diplomskem delu se bomo osredotočili na ostanke zdravilnih učinkovin v okolju ter njihove učinke. Zdravilne učinkovine so kompleksne spojine z različnim farmakološkim delovanjem in fizikalno-kemijskimi lastnostmi. Ob vstopu v okolje zdravilne učinkovine postanejo onesnažila, njihovi učinki na okolje in okoljske organizme pa so večinoma še nepoznani. Izvirajo večinoma iz industrijskih obratov, bolnišnic in drugih javnih ustanov ter komunalnih čistilnih naprav in posameznih gospodinjstev. Iz človeškega telesa se lahko izločijo kot metabolni produkti, redke zdravilne učinkovine pa lahko izstopijo nespremenjene. Poleg farmakoloških učinkov na ljudi vplivajo tudi na živali in mikroorganizme. O ekotoksikoloških vplivih zdravilnih učinkovin na vodne in kopenske organizme v okolju je znanega le malo, zato smo žeeli preučiti kakšen je vpliv teh spojin na netarčne organizme, ki živijo v okolju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- preveriti ali je testiranje z zarodki vrste *Danio rerio* komplementarno testiranju na bakterijskih vrstah *Pseudomonas putida* in *Salmonella typhimurium*
- preveriti ali je klofibrinska kislina za testne organizme delovala najbolj kvarno, ker je dobro topna v vodi in s tem prisotna v vodnem okolju v največjih koncentracijah
- ugotoviti ali so metabolni produkti akridin, akridon, indolon in klofibrinska kislina bolj strupeni od izhodnih spojin
- preveriti ali nesteroidne protivnetne spojine na izbrane testne organizme delujejo najmanj kvarno, saj so nekatere med njimi (naproksen in ibuprofen) na voljo brez recepta

- ugotoviti ali so pri SOS/*umu C* testu testirane spojine z metabolno aktivacijo bolj cito- in genotoksične kakor brez metabolne aktivacije
- preveriti ali lahko metodo ISO 10712 izvedemo tudi na mikrotitrskih ploščicah in obdelamo z računalniškim programom (Microplate analyser software, PhPlate, licenčna številka 4244), pri katerem optični čitalec uporabimo kot nadomestilo spektrofotometrične metode

1.3 CILJI NALOGE

- preučiti učinke izbranih spojin (najvišja koncentracija izbrane raztopine je opredeljena z njeno topnostjo v vodi, razen pri natrijevi soli diklofenaka, kjer je delovna koncentracija manjša od topnosti v vodi):
 - 4 nesteroidne protivnetne spojine: ibuprofen, ketoprofen, diklofenak in naproksen; antiepileptično zdravilo karbamazepin,
 - 4 metabolni produkti: indolon, akridin, akridon in klofibrinska kislina
- s tremi različnimi metodami preveriti učinke izbranih spojin na organizme v okolju:
 - (1) testirati metodo rastnega inhibicijskega testa na bakteriji *Pseudomonas putida*,
 - (2) z bakterijskim sevom *Salmonella typhimurium* ugotoviti potencialno citotoksičnost in genotoksičnost izbranih spojin z metabolno aktivacijo in brez nje,
 - (3) ugotoviti akutno strupenost na zarodkih rib vrste *Danio rerio* in narediti primerjalni pregled območja kvarnega delovanja

2 PREGLED OBJAV

2.1 VODA IN EKOLOGIJA

Voda je osnovna kemijska spojina, ki je nujno potrebna za preživetje vseh poznanih oblik življenja. Zemeljsko površino pokriva približno 70 % vode. Večino te zaloge predstavljajo oceani in druga večja vodna telesa. Podtalnica predstavlja 1,6 % vodne zaloge, oblaki in para v zraku pa 0,001 %. Kot smo že omenili, so večinski delež vode oceani – slane vode je tako kar 97 % celotne zaloge vode. V obliki ledenikov je 2,4 % vode, 0,6 % pa je rek, jezer in ribnikov (Acreman, 2004).

Voda povezuje in ohranja zemeljske ekosisteme. Ustvari in porablja se v kemijskih procesih kot sta dihanje in fotosinteza. Voda predstavlja okolje, kjer potekajo vse kemijske reakcije. Voda kroži med ekosistemi. Dostopnost vode je pogosto ključni omejujoči dejavnik za biološko raznolikost. Ker se število prebivalcev planeta od dvajsetega stoletja naglo povečuje, narašča tudi potreba po vodi in s tem tudi njena obremenjenost. K uspešnosti ohranitve človeške vrste so pri pomogli tudi sposobnost nadzora vodnega cikla, skladiščenje pitne vode, vzgajanje živeža in nadzor industrije. Kljub vsemu pa imajo posegi v naravo svoje slabosti. Človek je s svojim poseganjem v okolje uničil ali poškodoval številne ekosisteme (Acreman, 2004).

Skrb za ohranitev in izboljšanje kakovosti vode predstavlja enega temeljnih okoljskih ciljev. V Republiki Sloveniji področje voda urejajo sledeči zakoni: Zakon o vodah, Zakon o varstvu okolja in Zakon o ohranjanju narave. Ti zakoni urejajo najpomembnejše vsebine glede stanja voda in vodnega okolja: varstvo in rabo voda ter vodnega in obvodnega okolja, urejanje voda in varstvo od voda odvisnih ekosistemov (Zakon o varstvu okolja, 2004; Zakon vodah, 2002; Zakon o ohranjanju narave, 2004).

2.2 ONESNAŽENOST VOD

V naravi vsaka voda vsebuje nečistoče. Na svoji poti skozi struge, jezera in skozi plasti tal, voda raztplavlja in absorbira spojine, s katerimi pride v stik. Spojine, kot so nekateri minerali, so neškodljive. Poleg le-teh pa lahko, največkrat zaradi antropogenih dejavnikov,

kot so na primer izpusti tovarn, gnojenje v kmetijstvu ali komunalnih odpak (Černoša, 2005), v vodo pridejo tudi številna onesnažila.

Med onesnažila prištevamo različne kemijske snovi, ki se razlikujejo po izvoru (organske, anorganske), molski masi (enostavne in kompleksne molekule), načinu vstopa v okolje, njihovem obnašanju v okolju ter tveganju, ki ga predstavljajo za človeka in okoljske organizme (Černoša, 2005).

2.2.1 Organska onesnažila

Organske spojine so spojine ogljika in vodika. Narava organskih spojin je odvisna od njihove molekulske strukture, velikosti, oblike in funkcionalne skupine, ki ima pomembno vlogo pri strupenosti. Če poznamo strukturo organskih spojin, lahko predvidimo njihovo usodo v živih organizmih in v okolju. Okolju nevarne organske snovi so večinoma produkt človekove aktivnosti. Primeri organskih onesnažil so:

- Ogljikovodiki. Razdelimo jih na alifatske (alkani, alkeni in alkini) in aromatske ogljikovodike (policiklični aromatski ogljikovodiki, PAH).
- Poliklorirani bifenili (PCB) so stabilne in nereaktivne spojine, ki so jih v preteklosti uporabljali za hidravlične tekočine, ohlajevalno/izolacijske tekočine v transformatorjih ter kot mehčalna sredstva v barvah. Poznamo 209 različnih strukturnih izomer polikloriranih bifenilov in večinoma so slabo vodotopni.
- Insekticidi, kot je DDT, so zelo nevarni, ker se nalagajo v maščobnih tkivih nižjih živali ter vstopajo v prehranjevalno verigo. DDT je že nekaj desetletij prepovedan (Černoša, 2005).
- Detergenti so vodotopne površinsko aktivne spojine, ki vsebujejo hidrofobni del, navadno dolgo alkilno verigo, ki je pripeta na hidrofilne funkcionalne skupine. Raztopljujo biološke membrane (Sigma – Aldrich Co., 2008).

2.2.2 Anorganska onesnažila

- Gnojila

Nekatera anorganska onesnažila predstavljajo nevarnost za okolje zato, ker se prekomerno uporabljajo. Med tovrstna onesnažila štejemo nitrate in fosfate. Nitrati in fosfati v površinskih vodah izzovejo cvetenje alg, kar povzroči padec koncentracije kisika v vodnem stolpcu. Proces imenujemo eutrofikacija, ki lahko povsem poruši dinamično ravnotežje v ekosistemu.

- Kovine

Kovine so kemijski elementi, ki večinoma tvorijo katione in imajo kovinske vezi (Wikipedija, 2008). Kovine so dobri električni prevodniki in načeloma vstopajo v kemijske reakcije kot kationi. Kovine so naravni elementi, vendar lahko njihova povečana prisotnost v okolju povzroči ekološko škodo. Primeri kovin so: svinec, cink, mangan in krom. V površinskih vodah jih najdemo v stabilni ionski obliki.

Kovine lahko z organskimi spojinami tvorijo lipofilne spojine, ki se pogosto nalagajo v maščobnih tkivih živali in ljudi. Kovine se lahko vežejo tudi s celičnimi makromolekulami v človeškem telesu. Kovin se ne da razgraditi na manj škodljive delce, saj niso biorazgradljive (Černoša, 2005).

2.3 ONESNAŽENOST Z ZDRAVILI

Zdravilne učinkovine postanejo okoljska onesnažila, ko vstopijo v okolje. Uporabljajo se v humani in živalski medicini (Fent in sod., 2006) ter so biološko in farmakološko aktivne spojine, njihova funkcija je biološki učinek v terapevtskih koncentracijah (Seiler, 2002; Andreozzi in sod., 2002).

Glavne skupine zdravilnih učinkovin, ki so potencialno nevarne za okolje, so:

- Antibiotiki
- Hormoni
- Protirakave učinkovine
- Analgetiki in protivnetna zdravila (Kot-Wasik in sod., 2007).

Mnogo zdravilnih učinkovin se v telesu spremeni v procesu biotransformacije, kar lahko povzroči kemijsko spremembo strukture aktivne komponente oziroma njene fizikalno

kemijske lastnosti. V večini primerov se spojine ne metabolizirajo popolnoma in metaboliti se izločijo iz telesa (Kuemmerer, 2004).

Metabolizem pri ljudeh poteka na dva načina. Pri metabolni fazi I se aktivna komponenta spremeni s hidrolizo, oksidacijo ali redukcijo. Produkti so lahko bolj reaktivni in bolj strupeni od osnovne spojine. Metaboliti faze II so tisti metaboliti faze I, ki so se spremenili z glikozidno konjugacijo oz. glukuronidacijo (konjugacija z glukuronsko kislino) ali s sulfatno konjugacijo (tvorba sulfatnih estrov) (Kuemmerer, 2004). Med metabolno fazo II glukuronidacijske poti encimi v jetrih preko metabolnih poti pretvorijo metabolite, da so bolj polarni od izhodne spojine, kar poveča izločanje iz telesa. Kemijsko gledano se v procesu glukuronizacije glukuronska kislina poveže s katerim koli od hetero atomov izhodne spojine zdravilne učinkovine (npr. O – glukuronidacija, N – glukuronidacija). Tip spojine tudi vpliva na postopek čiščenja v čistilni napravi. O – glukuronidacijske spojine se v čistilnih napravah pogosto pretvorijo nazaj v izhodno spojino, medtem ko se bolj stabilne N – glukuronidacijske spojine ne (Ternes, 1998; Kozak in sod., 2001).

Pri metabolni fazi I in II so nastale spojine bolj topne v vodi kot izhodna spojina. Metaboliti faze I imajo lahko tudi farmakološko aktivnost, ki je včasih višja od aktivnosti izhodne spojine. Metaboliti faze II pogosto niso farmakološko aktivni (Caccia, 1998).

Ekotoksikološki vplivi zdravilnih učinkovin na vodne in kopenske organizme v okolju so še slabo poznani. Še posebno pomembne tarče so vodni organizmi, saj so le-ti večinoma celo življenje izpostavljeni ostankom slabo prečiščenih odpadnih vod. V literaturi obstajajo nekateri podatki za akutno strupenost številnih zdravilnih učinkovin na vodne organizme, vendar zgolj ti podatki niso dovolj za oceno vplivov tveganja zdravilnih učinkovin na okolje (Fent, 2003). Še posebej so pomembni podatki o kronični izpostavljenosti nizkim koncentracijam ostankov zdravilnih učinkovin, ki večinoma še niso na voljo. Na osnovi objavljenih raziskav (Fent in sod., 2006) lahko sklepamo, da so ostanki zdravilnih učinkovin v sledeh razširjeni v vodnih sistemih. Na osnovi dosedanjih raziskav (Fent in sod., 2006) sklepamo, da predstavljajo akutna izpostavljenost zdravilnim učinkovinam v okolju majhno tveganje za človeka in okoljske organizme, predvidevamo pa, da je stanje pri kronični izpostavljenosti drugačno. Zato se je pri raziskavah pomembno osredotočiti na dolgotrajno izpostavljenost zdravilom in njihovim različnim učinkom (Fent in sod., 2006).

2.3.1 Odstranjevanje zdravilnih učinkovin v čistilnih napravah

Pri čiščenju odpadnih vod sta pomembna dva procesa: adsorpcija in (bio)razgradnja. Adsorpcija je odvisna od hidrofobnih in elektrostatskih interakcij zdravilne učinkovine z delci in mikroorganizmi. Kisle zdravilne učinkovine, kot so ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak, acetilsalicilna kislina, klofibrinska kislina, bezafibrat in gemfibrozil, so pri nevtralnem pH v ionski obliki in se slabo vežejo na aktivno blato (Kuemmerer in sod., 1997). Na splošno sorpcija kislih zdravilnih učinkovin na aktivno blato ni pomemben proces za odstranjevanje zdravil iz odpadnih in površinskih voda. Zato je količina zdravilnih učinkovin v blatu in sedimentih relativno nizka (Ternes in sod., 2004).

Večina zdravilnih učinkovin je topnih v vodi in (bio)razgradnja je najpomembnejši proces odstranitve ostankov zdravilnih učinkovin v postopku čiščenja odpadnih voda. (Bio)razgradnja zajema vse procese razgradnje, to je tudi kemijska, foto in biološka razgradnja. Lahko poteka v aerobnih in anaerobnih razmerah čiščenja z aktivnim blatom. Na splošno velja, da (bio)razgradnja mikro-onesnažil, vključno z zdravilnimi učinkovinami, narašča z večanjem hidravličnega zadrževalnega časa in s starostjo aktivnega blata. Raziskave kažejo, da se je na primer diklofenak opazno razgradil samo, ko je bil zadrževalni čas blata vsaj 8 dni (Kreuzinger in sod., 2004). Po drugi strani pa pri nevtralni spojni karbamazepinu, ki je po podatkih iz literaturе slabo biorazgradljiv (manj kakor 10 %), hidravlični zadrževalni čas nima nobenega vpliva (Metcalfe in sod., 2003a). Odstranitev karbamazepina v čistilni napravi je samo 7 do 8 %, za acetilsalicilno kislino kar 81 % in 96 % za propanolol (Ternes, 1998). Diklofenaka se odstrani 26 %, naproksena pa kar 81 % (Lindqvist in sod., 2005).

2.3.2 Zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti v okolju

Nove analizne tehnike omogočajo identifikacijo in kvantifikacijo številnih onesnažil iz okoljskih vzorcev (Kot-Wasik in sod., 2007). Pri tej nalogi igrajo ključno vlogo novi spektrometrični detektorji v povezavi s tehnikami ločbe (plinska in tekočinska kromatografija) (Sun in sod., 2003; Santos in sod., 2005). Te metode zaznajo prisotnost

onesnažil v koncentracijskem razmaku ng L⁻¹ in nižje (Kot-Wasik in sod., 2007). Nekoliko zahtevnejše je delo z odpadnimi vodami, saj vzorci iz čistilnih naprav vsebujejo spojine, ki motijo selektivno detekcijo in tako omejujejo uporabnost teh metod (Metcalf in sod., 2003b). Problem je tudi v ceni opreme in kompleksnosti metod (Togola in Budzinski, 2007). Vsekakor se pri delu moramo zavedati, da so okolske koncentracije zdravilnih učinkovin v sledovih (ng L⁻¹ - µg L⁻¹), vendar pa je že to dovolj, da povzročijo škodljive učinke (Hernando in sod., 2006).

V površinskih vodah poteka poleg biorazgradnje (biotransformacije), ki je odvisna od narave zdravilne učinkovine (Ternes in sod., 2002), tudi proces abiotske transformacije. Eden izmed postopkov je hidroliza, ki je za zdravilne učinkovine skoraj zanemarljiv proces. Na vodni površini pogosto igra pomembno vlogo fotorazgradnja. Tako je npr. za razgradnjo diklofenaka ključna fotoliza (Buser in sod., 1998b). Karbamazepin in klofibrinska kislina, ki se slabo odstranita v čistilnih napravah, se v površinskih slojih sladkih in oligotrofnih voda počasi razgradita s pomočjo svetlobe (razpolovni čas je 100 dni) (Andreozzi in sod., 2003b). Učinkovitost fotorazgradnje je odvisna od tipa spojine ter sončnega sevanja oz. zemljepisne širine ter letnega časa v primeru naravne izpostavljenosti. Uspešnost fotorazgradnje je odvisna tudi od spojin v vodi, ki delujejo kot fotosenzibilizatorji, to so posredniki, ki se aktivirajo z vidno ali infrardečo svetlobo in energijo fotona preko lastnih vzbujenih stanj prenesejo na molekulo tripletnega kisika, pri tem pa nastaja singletni kisik (Fent in sod., 2006; Japelj in Pečar, 2006).

O prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin poročajo tudi v pitni vodi in podtalnici (Heberrer in Stan, 1996). Tako so npr. diklofenak uspešno odstranili z uporabo ozonacije, aktivnega oglja in povečane oksidacije. V pitni vodi so v labolatorijskem poskusu za odstranitev klofibrinske kisline in ibuprofena uporabili oksidacijo: ozon/vodikov peroksid (Zwiener in Frimmel, 2000).

O prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin so prvič poročali v Združenih državah Amerike, ko so v čistilni napravi zaznali prisotnost klofibrinske kisline v koncentraciji 0,8-2 µg L⁻¹ (Garrison in sod., 1976). Kasneje so o prisotnosti zdravilnih učinkovin poročali tudi v Veliki Britaniji (leta 1981), ko so v rekah našli mikogramske koncentracije teh kemikalij (Richardson in Bowron, 1985). Raziskave (Preglednica 1) v nekaterih državah

prikazujejo pojav 80-100 zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov iz različnih razredov zdravil (protivnetna, beta-zaviralci, antiepileptiki, lipidni regulatorji, antibiotiki..) ter nekaterih njihovih metabolitov, katerih prisotnost so zaznali v čistilnih napravah, rekah, morju, podtalnici in celo v pitni vodi (Fent in sod., 2006). Podatke o topnostih izbranih zdravilnih učinkovin smo dobili na internetni strani ChemID Plus.

V zvezi s topnostjo je treba poudariti, da je le-ta odvisna od tehnologije izdelave – torej se topnost iste spojine razlikuje od proizvajalca do proizvajalca. Odvisna je tudi od oblike kristalov in njihove velikosti; od tega ali je spojina amorfna ali kristalna; in od specifične površine. V literaturi lahko zato najdemo različne podatke za topnost, saj so na tržišču različni proizvodi, kljub temu, da gre za isto spojino.

Preglednica 1: Topnost izbranih zdravilnih učinkovin (ChemID Plus) in njihovih metabolitov ter njihove okoljske koncentracije v vodnih telesih po Evropi in Ameriki.

spojina	topnost v dH ₂ O (mg L ⁻¹)	okoljske koncentracije iz člankov (ng L ⁻¹)		viri
ibuprofen	21	do 1000	reke, ZDA	Kolpin in sod., 2002
		do 930	estuarji, Anglija	Thomas in Hilton, 2004
		55-170	površinske vode, Poljska	Debska in sod., 2005
		176	površinske vode, Francija	Togola in Budzinski, 2007
		do 15	jezero, Švica	Ollers in sod., 2000
		do 80	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
		60-152	reke: Španija, Belgija, Nemčija, Slovenija	Hernando in sod., 2006
ketoprofen	51	9,9	površinske vode, Francija	Togola in Budzinski, 2007
		do 5	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
diklofenak	2,37	1200	Švica	Ternes, 2001
		50	površinske vode, Nemčija	Ternes, 2001
		30-200	površinske vode, Nemčija	Ternes in sod., 2002
		400-900	podtalnica in pitna voda, Nemčija	Kot-Wasik in sod., 2006
		300-500	površinske vode, Poljska	Debska in sod., 2005
		63,2	površinske vode, Francija	Togola in Budzinski, 2007
		do 10	jezero, Švica	Ollers in sod., 2000
		20-150	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
		26-72	reke: Španija, Belgija, Nemčija, Slovenija	Hernando in sod., 2006

spojina	topnost v dH ₂ O (mg L ⁻¹)	okoljske koncentracije iz člankov (ng L ⁻¹)		viri
naproksen	15,9	do 390	površinske vode, Nemčija	Eriksson in sod., 2003
		500	površinske vode, Nemčija	Heberer, 2002
		103,5	površinske vode, Francija	Togola in Budzinski, 2007
		do 10	jezero, Švica	Ollers in sod., 2000
		10-400	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
		70	reke: Španija, Belgija, Nemčija, Slovenija	Hernando in sod., 2006
karbamazepin	17,7	1200	reka Elba, Nemčija	Wiegel in sod., 2004
		60	reke, ZDA	Thaker, 2005
		5	površinske vode, Nemčija	Sacher, 2002
		1600	površinske vode, Nemčija	Sacher, 2002
		29,6	površinske vode, Francija	Togola in Budzinski, 2007
		35-60	jezero, Švica	Ollers in sod., 2000
		30-250	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
klofibrinska kislina	583	200	reke, Nemčija	Stan in sod., 1994
		70 - 270	pitna voda, Nemčija	Heberer in Stan, 1997
		550	jezera, Nemčija	Ternes, 1998
		4000	podtalnica, Nemčija	Heberer in Stan, 1997
		103	reka, ZDA	Boyd in sod., 2003
		18	estuar reke Elbe	Wiegel in sod., 2002
		0,28-1,35	Severno morje	Wiegel in sod., 2002
		49	površinske vode, Nemčija	Diaz in sod., 2002
		1100	površinske vode, Nemčija	Sacher, 2002
		do 10	jezero, Švica	Ollers in sod., 2000
		do 25	reka, Švica	Ollers in sod., 2000
		24-35	reke: Španija, Belgija, Nemčija, Slovenija	Hernando in sod., 2006
indolon	/	/	/	/
akridin	38,4	/	/	/
akridon	/	/	/	/

Običajno so vsebnosti izbranih učinkovin v vodnem okolju nižje od njihove topnosti v vodi, saj le-ta pogojuje njihovo prisotnost v vodi. Podatki iz literature kažejo prisotnost ostankov zdravilnih učinkovin v območju ng L⁻¹ do µg L⁻¹. Podatkov za okoljske koncentracije metabolnih produktov zdravilnih učinkovin kot so indolon, akridin in akridon, po naših podatkih še ni objavljenih.

Podatki o koncentracijah izbranih zdravilnih učinkovin v Sloveniji so v primerjavi s svetovnim merilom bolj skopi (Preglednica 2). Zaenkrat so v literaturi (Kosjek in sod., 2005) od izbranih zdravilnih učinkovin podatki za ketoprofen, ibuprofen, naproksen in diklofenak. Koncentracija ibuprofena je bila pod mejo detekcije (meja detekcije je 1,96 ng L⁻¹).

Preglednica 2: Prisotnost ketoprofena, diklofenaka in naproksena v nekaterih slovenskih rekah za leto 2004 (Kosjek in sod., 2005).

spojina	podatki za Slovenijo koncentracija (ng L ⁻¹)	
ketoprofen	v sledeh	
diklofenak	49 - 282	Krka
	9	Sava
	41	Mura
	26 - 32	Drava
naproksen	60 - 313	Krka
	73	Ljubljanica
	80	Sava
	49	Mura
	24 - 49	Drava
	17	Pšata

2.4 EKOTOKSIKOLOŠKI VPLIVI

Zdravilne učinkovine s svojim delovanjem vplivajo na specifično metabolno pot na molekularnem nivoju, zanemariti pa ne smemo njihovih stranskih učinkov. Ko pridejo v okolje, lahko vplivajo na iste metabolne poti pri živalih, ki imajo identične ali podobne tarčne organe, tkiva, celice ali biomolekule. Problem je tudi kompleksnost njihovega delovanja, saj tarča delovanja določenega zdravila ni samo en receptor, temveč jih je lahko več (Fent in sod., 2006).

Poleg eksperimentalnih podatkov lahko ocenimo in predvidimo ekotoksikološki vpliv tudi z matematičnimi modeli. Najpogosteje uporabljen kvantitativni program z razmerjem strukture - aktivnosti (ang. QSAR - Quantitative Structure-Activity Relationship ali Modeliranje relacij med kemijsko strukturo in lastnostjo snovi) je ECOSAR (ang. Ecological Structure Activity Relationships) (Sanderson in sod., 2004b). Metoda je uporabna pri oceni potencialne strupenosti oziroma usode spojin v okolju, vendar pa ne more nadomestiti *in vivo* ter *in vitro* poskusov (Fent in sod., 2006).

Trenutno poteka največ raziskav na področju akutnih ekotoksikoliških vplivov zdravilnih učinkovin na vodne organizme. Le redko pa se raziskuje metabolite zdravilnih učinkovin. Temu najverjetneje botruje kompleksnost teh raziskav. Med objavami razgradnih metabolitov prednjačijo produkti fototransformacij. Pogosto raziskave kažejo, da so produkti fotorazgradnje bolj strupeni od izhodnih spojin (Isidori in sod., 2005).

2.5 SKUPINE ZDRAVILNIH UČINKOVIN

2.5.1 NSAIDs

Na tržišču je veliko komercialnih produktov zdravil, ki lajšajo bolečino in zavirajo vnetja. Imenujemo jih nesteroidna protivnetra zdravila (NSAID). Uporabljajo se za zdravljenje simptomov artritisa, protina, zatekanja, bolečin v sklepih, menstrualnih bolečin, bolečin po operacijah in rojstvu. Delujejo tako, da zavrejo sintezo prostaglandinov, leukotrienov in drugih spojin, ki sodelujejo pri imunskega odgovora. Mnoga od teh zdravil delujejo tudi kot antipiretiki (nižajo previsoko telesno temperaturo). Take spojine so npr. ibuprofen, diklofenak, ketoprofen, naproksen in drugi (Hirsch in Messenger, 1978).

Eden najpogosteje določanih zdravilnih učinkovin v okolju je NSAID, diklofenak (Jux in sod., 2002; Wiegel in sod., 2002; Koutsouba in sod., 2003). Po terapevtski uporabi se zdravilo sprosti v okolje ter pride do čistilne naprave, kjer se ne odstrani popolnoma in se ponovno sprosti v vodni sistem (Hallare in sod., 2004). Po podatkih Ternesa (1998) se 69 % diklofena odstrani v čistilnih napravah. Hallare in sod. (2004) navajajo, da naj bi bila predvidena koncentracija (PEC – Predicted Environmental Concentration) za Evropske reke $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$. Vendar je po navajanju Ternesa (2001) koncentracija diklofena v okolju višja in sicer do $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Vzrok je verjetno njegova slaba biorazgradljivost

(Zuccato in sod., 2000). Naproksen je poleg diklofenaka najpogostejši predstavnik NSAIDs v okolju, vendar je v okolju prisoten v nižjih koncentracijah zaradi hitre demetilacije, *in vivo* konjugacije, fototransformacije in biorazgradnje (Isidori in sod., 2005), kjer glavno vlogo igra fototransformacija (Tixier in sod., 2003). Ibuprofen, predstavnik NSAIDs, pa se večinoma v procesu čiščenja v čistilni napravi odstrani (Fent in sod., 2006), kar se odraža v nižjih okoljskih koncentracijah (Preglednici 1 in 2).

2.5.2 Antiepileptiki

Antiepileptiki in njihov predstavnik karbamazepin so zdravila za zdravljenje epilepsije, ki je za kapjo druga najpogostejša bolezen centralnega živčnega sistema. Karbamazepin se poleg zdravljenje epilepsije uporablja tudi za lajšanje bolečin nevrološkega izvora, shizofrenije, alkoholizma, bipolarne motnje in akutne manije (Kuemmerer, 2004). Karbamazepin je okoljsko izredno stabilna spojina, zato se s pomočjo čistilnih naprav odstrani le 7 % karbamazepina (Ternes, 1998).

2.5.3 Lipedni regulatorji procesov krvnega obtoka

Derivati fibrinske kisline (fibrati) spadajo v razred zdravil, ki znižajo raven trigliceridov v krvi. Fibrati delujejo tako, da v jetrih zmanjšajo nastajanje VLDL (nosilec trigliceridov po krvi) ter pospešijo odstranjevanje trigliceridov iz krvi. Večina fibratov se iz telesa izloči nespremenjenih. Najpogostejši fibrati so gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat in klofibrinska kislina (Isidori in sod., 2007).

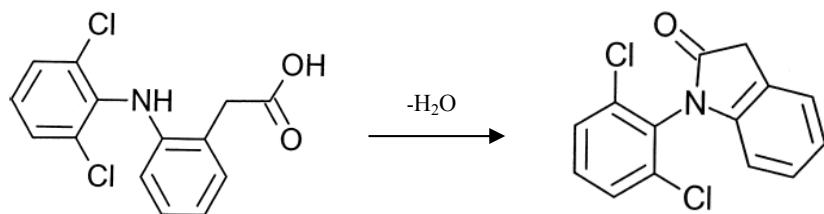
Po podatkih iz literature je klofibrinska kislina, metabolit lipidnega regulatorja klofibrata, najpogostejša zdravilna učinkovina, ki jo najdemo v okoljskih vzorcih (Fent in sod., 2006). Je relativno stabilna in se v okolju zadržuje 21 let (Buser in sod., 1998), v čistilni napravi pa se odstrani le 51 % začetne vrednosti (Ternes, 1998). Ker ovira sintezo holesterola, jo štejemo med motilce endokrinega sistema (Pfluger in Dietrich, 2001).

2.5.4 Druge spojine

2.5.4.1 Metabolni produkti

Tako (9-)akridon kot akridin dobimo pri UV razgradnji karbamazepina. Na splošno lahko rečemo, da nastaneta pri vseh radikalnih oksidacijah (UV, fotokatalitska razgradnja, ozonizacija, H_2O_2 ...). Po podatkih iz literature nastane akridin tudi kot produkt oksidacije UV/H_2O_2 , kjer karbamazepin raztopijo v vodikovem peroksidu različnih koncentracij in obsevajo z UV lučjo (Vogna in sod., 2004).

Roy (2002) poroča o nastanku indolona kot stranskega produkta sinteze diklofenaka ali njegove natrijeve soli. Dobimo ga z intramolekularno ciklizacijo (Roy, 2002) ob hkratni odcepitvi vode (kondenzaciji) (Slika 1) in sicer kot posledica povišane temperature ali hidroksidnih radikalov.



Slika 1: Nastanek indolona iz diklofenaka z intramolekularno ciklizacijo (Reddersen in Heberer, 2003).

Poleg tega lahko indolon nastane kot posledica toplotne razgradnje diklofenaka (Tudja in sod., 2001). Reddersen in Heberer (2003) poročata, da indolon nastane pri kisli ekstrakciji iz diklofenaka, pri čemer moramo omeniti, da v tej raziskavi niso preverili možnosti toplotne razgradnje diklofenaka v plinskem kromatografu. Palomo in sod. (1999) so dokazali, da pri IR spektroskopiji ne pride do intramolekularne ciklizacije diklofenaka v kislih razmerah. Raziskava, ki jo je izvedel Gaudiano in sod. (2003) pa je pokazala, da je indolon produkt direktnje neencimske oksidacije v prisotnosti hidroksidnih radikalov in kislega okolja.

2.6 VPLIVI ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA TESTNE ŽIVALI

Iz podatkov v literaturi je razvidno, da nekateri avtorji za interpretacijo toksikoloških podatkov razvrščajo spojine glede na izmerjeno efektivno koncentracijo (vrednost EC_{50}) v

sheme z različnimi razredi tveganja. Če je EC₅₀ manjši od 1 mg L⁻¹, spada v skupino "zelo strupenih spojin za vodne organizme". V območju od 1 do 10 mg L⁻¹ so spojine strupene in od 10 do 100 mg L⁻¹ so spojine "škodljive za vodne organizme". Spojine z EC₅₀ nad 100 mg L⁻¹ pa niso uvrščene v noben razred.

2.6.1 Biološki testi

V nasprotju s kemijskimi analizami, ki v splošnem omogočajo določanje omejenega števila predhodno identificiranih spojin, biološki testi zagotavljajo vrednotenje strupenosti kompleksnih mešanic, brez predhodnih podatkov o kemijski sestavi mešanice (Farre in sod., 2005; Houk, 1992). Naraščajoče število znanih in neznanih onesnažil ter težavno napovedovanje njihovih skupnih učinkov na ekosisteme je privedlo do potrebe po učinkovitih metodah za presejanje okoljskih vzorcev. Te metode omogočajo napovedovanje možnih škodljivih učinkov na okolje. Najprimernejše biološke tehnike ali biodetektorje, ki se uporabljajo v okoljskih analizah, lahko razdelimo glede na njihove tehnične principe (biotesti, biosenzorji in imunotesti) ali glede na vrsto merjenja (presejalne metode ali specifične meritve) (Farre in sod., 2005).

V ekologiji so se biotestiranja najprej izvajala na sesalcih, ptičih ali ribah kot testnih organizmih za določanje akutne strupenosti (Farre in Barcelo, 2003). Te metode porajajo etična vprašanja, poleg tega so drage in dolgotrajne. Kot odgovor nanje so raziskovalci razvili metode z nevretenčarji, rastlinami, algami in bakterijami kot testnimi organizmi. Na osnovi mikroorganizmov so razvili že vrsto bioloških poskusov, ki so hitri, ekonomični in dovoljujejo istočasno analizo velikega števila vzorcev. Biološki testi v okoljskih analizah omogočajo merjenje bioloških učinkov, kot so strupenost, genotoksičnost in ocenjevanje splošnih parametrov, kot so biološke poškodbe s kisikovimi radikali (Farre in sod., 2005). Večino bioloških testov so razvili za vrednotenje vpliva ksenobiotikov na življenje organizmov. Zagotavljajo strnjeno sliko celotnega vpliva na okolje, ki ga povzročajo onesnaženi iztoki, sedimenti in onesnažena tla.

Biološki odgovori različnih živih organizmov na strupene spojine ali strupene mešanice so različne in odvisne od občutljivosti organizmov. Za določanje strupenosti spojin ali

mešanic je priporočen nabor različnih testnih vrst iz različnih prehranjevalnih nivojev. Bioteste strupenosti lahko razdelimo glede na testirane vzorce v:

- individualne bioteste,
- bioteste, ki vključujejo različne vrste organizmov in
- bioteste, ki temeljijo na celicah, tkivih in biokemijskem odgovoru.

Glede na čas izpostavljenosti lahko strupenost opredelimo kot: akutno (kratki čas izpostavljenosti, do 96 ur), subakutno (merjenje preživelosti izpostavljenih organizmov temelji na njihovi rasti in razmnoževaju), kronično (preiskava podaljšane izpostavljenosti in zato subakutnih učinkov) in teste reprodukcije (lahko so usmerjeni na posamezno generacijo ali pa, predvsem pri ribah, na celoten življenjski cikel (Farre in sod., 2005).

2.6.1.1 Biološki testi na bakterijah

Za preverjanje kvarnega delovanja zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov je razvitih vrsta metod, kjer preučujemo učinek delovanja zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov na mikrobnou aktivnost. Preučevanje kemijskega stresa je neposredno, hitro, občutljivo in poceni. S temi tehnikami lahko preučujemo strupenost številnih vzorcev (Farre in Barcelo, 2003).

Standardiziranih je že veliko število različnih metod, ki uporabljajo mikroorganizme (Preglednica 4). Razvrstimo jih lahko glede na merjene parametre. Testi temeljijo na inhibiciji rasti, primer za tak test je rastni inhibicijski test z bakterijo *Pseudomonas putida* (ISO 10712, 1995) ali test zaviranja rasti mikroorganizmov, ki sestavljajo aktivno blato (ISO 15522, 1999). Najbolj splošen test strupenosti temelji na inhibiciji bioluminiscence. Bioluminiscenco povzročata luminiscenčni morski bakteriji *Vibrio fischeri* ali *Photobacterium phosphoreum*, kjer ob prisotnosti škodljive spojine ta inhibira pojav bioluminiscence. Razvili so tudi različne komercialne pripomočke, ki temeljijo na istem principu. Takšni so Microtox (Azur Environmental), LUMIStox (Beckman instruments) in ToxAlert (Merck). Prednost teh metod je dobra ponovljivost in enostavno rokovanie (Farre in Barcelo, 2003).

Omenjeni morski bakteriji naravno oddajata svetlobo s pomočjo encima luciferaze, ki katalizira reakcijo:



Količina proizvedene svetlobe je premosorazmerna metabolnemu statusu v celici. Če pride do inhibicije celične aktivnosti, to opazimo kot zmanjšanje bioluminiscence. Odstotek inhibicije (% I) dobimo s primerjavo odgovora glede na slano kontrolno raztopino in testno raztopino. Inhibicija bioluminiscence je definirana:

$$\% I = [1 - (\text{svetloba vzorca} / \text{svetloba kontrole})] \times 100$$

Kakršnakoli metabolna motnja zaradi kemijske inhibicije spremeni količino oddane svetlobe. Strupenost izražamo z EC₅₀, to je efektivna koncentracija strupene spojine, ki povzroči zmanjšanje oddane svetlobe za 50 %. Prednost luminiscenčnega testa je v tem, da je hiter, občutljiv in ponovljiv.

Vendar pa ima test tudi nekaj slabosti. Ker je *V. fischeri* morska bakterija, lahko testiramo spojine le v slani raztopini. Poleg tega je raztopino potrebno pred vsakim testom prefiltrirati. Slanost povzroči, da postanejo nekatere organske spojine netopne, kar povzroči kalnost raztopine in spremembo koncentracij raztopljenih spojin. V izogib temu lahko za pripravo raztopin uporabimo največ 10 % koncentracijo metanola, da ne zmanjšamo viabilnosti bakterij (Farre in Barcelo, 2003).

2.6.1.2 Biološki testi na rastlinah in algah

Poznamo več različnih bioloških testov z rastlinami. Rastlinski biomarkerji imajo različne prednosti, kot je različna vrsta končnih točk (stopnja germinacije, teža biomase, encimska aktivnost..), nizki vzdrževalni stroški in hitra aktivacija testa, kjer lahko vrednotimo tudi ekotoksikološke učinke trdnih (netopnih) spojin (Ferrari in sod., 1999). Uporablja se npr. oves (*Avena sativa*) ali kitajsko zelje (*Brassica campestris*). Vendar pa testi, ki spremljajo rastni odgovor rastlin, potrebujejo dolge inkubacijske čase; normalno 4-6 dni preden se izmeri dolžina korenin (Farre in Barcelo, 2003). Predlagali so tudi hitrejši test strupenosti,

ki uporablja korenine zelene solate. Elongacija v tem primeru traja 96 ur, germinacijska brazda pa 21 dni (Farre in Barcelo, 2003).

Za teste strupenosti na algah se kot indikatorski vrsti veliko uporablja enocelični algi *Skeletonema costatum* in *Phaeodactylum tricornutum* (ISO 10253, 1995; Farre in Barcelo, 2003). Alge izpostavijo testni raztopini za 72-96 ur. Po koncu inkubacije preštejejo preživele alge s pomočjo avtomatskega štetja delcev. Indikator kvarnega delovanja je inhibicija rasti alg. Glavna slabost metode z algami je težko gojenje in slaba ponovljivost med zaporednimi testi (Farre in Barcelo, 2003).

2.6.1.3 Biološki testi na nevretenčarjih

Kronični testi na makro nevretenčarjih se veliko uporabljajo v raziskavah tveganja v vodnih okoljih (Lewis, 1991; Assmuth in Penttila, 1995; Tarkpea in sod., 1998). Pri ugotavljanju strupenosti se najpogosteje uporablja vodni bolhi *Daphnia* sp. in *Ceriodaphnia* sp. Obe pripadata redu Cladocera. Uporaba *Daphnie* ima mnogo prednosti, med drugim visoko občutljivost in kratek razmnoževalni cikel. Merjena parametra sta smrtnost ali reprodukcija (Biesinger in sod., 1987). V poskusu testne organizme izpostavimo strupenim spojinam v nadzorovanih razmerah. Akutni letalni testi z *Daphnia magno* so pri inkubacijskem času 21 dni že uveljavljeni in standardizirani (ISO 6341, 1996). Drugi testi, ki kot indikatorske organizme uporabljajo sladkovodne nevretenčarje, temeljijo na preživetju in/ali rasti muh enodnevnic, rakov (amphipoda), kamenjark (stoneflies) ali morskih vrst kot so sorodniki rakcev: Mysidacea (mysids), rakci ali ostrige (Suter in Rosen, 1988; Sarakinos in sod., 2000; Price in sod., 1990).

2.6.1.4 Biološki testi na ribah

Pri ugotavljanju smrtnosti na ribah, se le-te izpostavi spojini za največ 96 ur. Rezultat podamo v volumskih odstotkih, ki so smrtni za 50 % organizmov v določenem časovnem obdobju (LC_{50}) (Farre in Barcelo, 2003). Poznamo dva tipa akutnih testov: statične in pretočne. Izbira testa je odvisna od testne živali, razpoložljivih sredstev, potreb testnega

organizma in lastnosti testne raztopine. Vrste rib, kot sta postrv šarenka (ISO 10229, 1994) in tolstogлавi pisanec, se tradicionalno uporabljajo za teste, ki vrednotijo rast, kakor tudi za akutno letalne teste (Couture in sod., 1989). Drugi biološki testi na ribah temeljijo na rasti zarodkov, njihovemu preživetju ter na merjenju ATP, ki je biokemijski indikator za energijski stres v belem mišičnem tkivu (Farre in Barcelo, 2003). V zadnjem času alternativne metode vse pogosteje nadomeščajo test akutne strupenosti. Nadomestili naj bi jih *in vitro* testi, ki temeljijo na uporabi celičnih kultur rib (Babich in Borenfreund, 1991) in biosenzorjih, ki so vključeni v gojene ribje celice ter merijo njihov redoks potencial (Polak in sod., 1996). Na splošno so biološki testi na ribah občutljivi in omogočajo analizo v realnem času. Problem je le v standardizaciji, zato so ti testi dolgotrajni, zahtevajo posebno opremo in izučeno osebje (Farre in Barcelo, 2003).

Testi na zarodkih rib (ang. Fish Embryo Test - FET)

FET je metoda določanja akutne strupenosti spojin na zarodkih rib *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae). Testirane spojine morajo biti stabilne, nehlapne in topne v vodi. S to metodo se določa kategorije akutne letalne, subletalne in teratogene strupenosti za zarodke *Danio rerio* v določenih razmerah testiranja. Rezultati testa ne zadostujejo za določitev standardov kvalitete vode, ki so povezani z zaščito okolja, vendar se kljub temu uporabljajo kot ekotoksikološko orodje (OECD guideline, 2006; ISO 5667 - 16, 2000).

Glede na dosedanje objave so na zarodkih rib testirali le diklofenak, karbamazepin in klofibrinska kislina. Pri diklofenaku sta NOEC in LOEC vrednosti večji kot je njegova topnost v vodi, saj so uporabili natrijevo sol diklofenaka, kot podatek za topnost navajajo 2425 mg L^{-1} (Ferrari in sod., 2003). Hallare in sod. (2004) so diklofenak raztopili v mešanici vode in DMSO (do 0,04 %) in s tem povečali njegovo topnost. Velja poudariti, da je skoraj nična verjetnost, da bomo tako visoke koncentracije diklofenaka našli v okolju. Pri karbamazepinu so Ferrari in sod. (2003) pri poskusih uporabili karbamazepin drugega proizvajalca (Sigma-Aldrich Chemical Co.) s topnostjo 112 mg L^{-1} , ki je večja od topnosti karbamazepina, ki smo ga uporabili mi (Preglednica 9). Pri klofibrinski kislini so podatki bolj zaskrbljujoči, še posebej zato, ker klofibrinsko kislino v okolju najdemo v relativno visokih koncentracijah pod njeno topnostjo v vodi (Preglednica 3).

Preglednica 3: Pregled objav testov na različnih vrstah zarodkov rib. Za izbrane spojine je navedena njihova topnost v vodi (ChemID Plus), efektivna koncentracija ter učinek, ki so ga testne spojine povzročile na zarodkih.

spojina	testni organizem	učinek	topnost v H ₂ O (mg L ⁻¹)	koncentracija zdravilne učinkovine (mg L ⁻¹)	vir
ibuprofen	/	/	21	/	/
ketoprofen	/	/	51	/	/
diklofenak	zarodek <i>Danio rerio</i>	kasnejša izvalitev	2,37	EC50 = 1-2	Fent in sod., 2006
	zarodek <i>Danio rerio</i>	smrtnost		LC100 > 100	Hallare in sod., 2004
	zarodek <i>Danio rerio</i>	smrtnost		NOEC (10 dni) = 4	Ferrari in sod., 2003
	zarodek	smrtnost		LOEC (10 dni) = 8	Ferrari in sod., 2003
naproksen	/	/	15,9	/	/
karbamazepin	zarodek <i>Danio rerio</i>	smrtnost	112	NOEC (10 dni) = 25	Ferrari in sod., 2003
		smrtnost		LOEC (10 dni) = 50	Ferrari in sod., 2003
klofibrinska kislina	zarodek <i>Danio rerio</i>	smrtnost	583	EC ₅₀ (48 h) = 86	Hallare in sod., 2004; Ferrari in sod., 2003
	zarodek <i>Brachydanio rerio</i>	smrtnost		LC ₅₀ (48 h) = 8,6	Enick in Moore, 2007
	zarodek <i>Danio rerio</i>	smrtnost		NOEC (10 dni) = 70	Ferrari in sod., 2003
		smrtnost		LOEC (10 dni) = 140	Ferrari in sod., 2003
indolon	/	/	/	/	/
akridin	/	/	38,4	/	/
akridon	/	/	/	/	/

Podatki za različne zdravilne učinkovine in njihovi učinki se nahajajo v Preglednicah 4, 5, 6, in 7. Večina podatkov v teh preglednicah se nanaša na akutno strupenost, kronično strupenost se zaradi dolgih inkubacijskih časov le redko preizkuša. Poleg tega so testirane spojine v območju mg L⁻¹, tako visoke koncentracije pa v okolju najdemo le redko. Kljub temu jih ne smemo zanemariti zaradi dolgodobnega delovanja.

Preglednica 4: Zbrani podatki iz literature za učinke nesteroidnih protivnetnih učinkovin: ibuprofen, ketoprofen, diklofenak in naproksen na različne testne organizme.

spojina	testni organizem	učinek	konz. spojine (mg L^{-1})	vir
ibuprofen	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscanca	EC_{50} (15 min) = 12,1	Carlsson in sod., 2006
	alga <i>Skeletonema costatum</i>	inhibicija rasti	EC_{50} (96 h) = 7,1	Carlsson in sod., 2006
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC_{50} (3 dni) = 315	Cleuvers, 2003
	vodna bolha <i>Daphnia magna</i>	mobilnost	EC_{50} (48 h) = 108	Cleuvers, 2003
		smrtnost	LC_{50} (48 h) = 9,06	Carlsson in sod., 2006
		?	NOEC (48 h) = 3,37	Carlsson in sod., 2006
	rak <i>Gammarus pulex</i>	obnašanje	LOEC (1,5 h) = 0,000001	Enick in Moore, 2007
	riba <i>Lepomis macrochirus</i>	?	NOEC (96 h) = 10	Carlsson in sod., 2006
	?		LC_{50} (96 h) = 7,1	Enick in Moore, 2007
ketoprofen	ožigalkar <i>Hydra vulgaris</i>	ni učinkov	NOEC < 1	Hallare in sod., 2004
	rastlina <i>Lemna minor</i>	inhibicija rasti	EC_{50} (7 dni) = 22	Cleuvers, 2003
diklofenak	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscanca	EC_{50} (15 min) = 15,6	Carlsson in sod., 2006
	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscanca	EC_{50} = 0,0156	Farre in Barcelo, 2003
		bioluminiscanca	EC_{50} (30 min) = 11,45	Ferrari in sod., 2003
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC_{50} (3 dni) = 72	Cleuvers, 2003
	alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	inhibicija rasti	NOEC (96 h) = 10	Ferrari in sod., 2003
		inhibicija rasti	LOEC (96 h) = 20	Ferrari in sod., 2003

spojina	testni organizem	učinek	konc. spojine (mg L ⁻¹)	vir
diklofenak	rak <i>Brachionus calyciflorus</i>	reprodukcia	NOEC (48 h) = 12,5	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Daphnia magna</i>	reprodukcia	LOEC (48 h) = 25	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 68	Cleuvers, 2003
		mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 224,3	Ferrari in sod., 2003
		mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 22,7	Ferrari in sod., 2003
		reprodukcia	NOEC (7 dni) = 1,0	Carlsson in sod., 2006; Ferrari in sod., 2003
		reprodukcia	LOEC (7 dni) = 2,0	Carlsson in sod., 2006; Ferrari in sod., 2003
naproksen	riba <i>Danio rerio</i> (mladice)	smrtnost	NOEC (10 dni) = 4	Ferrari in sod., 2003
		smrtnost	LOEC (10 dni) = 8	Ferrari in sod., 2003
	rastlina <i>Lemna minor</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (7 dni) = 7,5	Cleuvers, 2003
	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscanca	EC ₅₀ = 0,0212	Farre in Barcelo, 2003
	alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 31,82	Cleuvers, 2003
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (3 dni) > 320	Cleuvers, 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 66,37	Isidori in sod., 2005
	rak <i>Brachionus calyciflorus</i>	reprodukcia	EC ₅₀ (7 dni) = 0,33	Isidori in sod., 2005
		reprodukcia	EC ₅₀ (48 h) = 0,56	Isidori in sod., 2005
		akutna toxičnost	EC ₅₀ (24 h) = 62,5	Isidori in sod., 2005
	rak <i>Thamnocephalus platyurus</i>	akutna toxičnost	LC ₅₀ (24 h) = 84,1	Isidori in sod., 2005
	vodna bolha <i>Daphnia magna</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 174	Cleuvers, 2003
	rastlina <i>Lemna minor</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (7 dni) = 24,2	Cleuvers, 2003

V Preglednici 4 so iz literature zbrani učinki NSAIDs na različne testne organizme. Med izbranimi spojinami iz skupine NSAID je najmanj podatkov v literaturi o učinku na testne organizme za ketoprofen.

Pri ibuprofenu so EC₅₀ in ostali parametri dokaj visoki, to je blizu meje topnosti. Tриje podatki, ki jih navaja Cleuvers (2003), so višji od topnosti ibuprofena v vodi, saj so za testiranje strupenosti uporabili natrijevo sol ibuprofena, ki ima večjo topnost (prosto topen v vodi) od izhodne spojine (topnost je 21 mg L⁻¹). Pri ibuprofenu izstopa podatek za LOEC = 1 ng L⁻¹ pri raku *Gammarus pulex*, ki je desettisočkrat manjši od drugih efektivnih koncentracij za ibuprofen.

Diklofenak ima nizko topnost v vodi, večina podatkov, ki poročajo o učinku, je višjih od podatka o topnosti, ki je naveden na internetni strani ChemID Plus (topnost je 2,37 mg L⁻¹). Ferrari in sod. (2003) ter Cleuvers (2003) so v raziskavah uporabili natrijevo sol diklofenaka, katere topnost je kar tisočkrat večja od diklofenaka (2425 mg L⁻¹). Izstopajoča vrednost učinka pri nizki koncentraciji najdemo pri vodni bolhi *Ceriodaphnia dubia*, o katerem poročata Ferrari in sod. (2003) ter Carlsson in sod. (2006). V teh raziskavah so po 7 dneh določili LOEC 2,0 mg L⁻¹.

Tudi pri naproksenu je kar nekaj koncentracij, ki povzročijo stranski učinek v višji koncentraciji od njihove topnosti v vodi. Cleuvers (2003) je v raziskavah uporabil natrijevo sol naproksena, katere topnost je večja od naproksena, vendar podatka o topnosti ne najdemo na strani ChemID Plus. Isidori in sod. (2005) pa v raziskavah navajajo, da so topnost naproksena povečali z uporabo 0,01 % mešanice DMSO. Vrednosti, ki izstopata sta prav tako pri raku in vodni bolhi, kjer je EC₅₀ manjša od 1 mg L⁻¹. Na splošno je strupenost različna za vsako zdravilno učinkovino posebej. Kljub vsemu pa ima diklofenak iz skupine NSAID zdravil največjo akutno strupenost, saj so efektivne testne koncentracije, razen v enem primeru, manjše od 100 mg L⁻¹ (Fent in sod., 2006).

Preglednica 5: Zbrani podatki iz literature za antiepileptično zdravilo karbamazepin, njegova koncentracija ter učinek na različne testne organizme.

spojina	testni organizem	učinek	konz. spojine (mg L ⁻¹)	vir
karbamazepin	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscenca	EC ₅₀ (30 min) > 81	Ferrari in sod., 2003
		inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 0,0336	Enick in Moore, 2007
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (3 dni) = 74	Cleuvers, 2003
		inhibicija rasti	LOEC (96 h) > 100	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	reprodukacija	NOEC (7 dni) = 0,025	Fent in sod., 2006; Ferrari in sod., 2003
		reprodukacija	LOEC (7 dni) = 0,10	Ferrari in sod., 2003
		mobilnost	EC ₅₀ (48) = 77,7	Ferrari in sod., 2003
		inhibicija rasti	EC ₅₀ = 12,7	Fent in sod., 2006
		inhibicija rasti	LC ₅₀ = 17,2	Fent in sod., 2006
		subletalni učinki	0,092	Fent in sod., 2006
		mobilnost	EC ₅₀ (48 h) > 100	Cleuvers, 2003
		smrtnost	LC ₅₀ (48 h) > 1,38	Enick in Moore, 2007
		mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 13,8	Ferrari in sod., 2003
		reprodukcia	NOEC (48 h) = 0,377	Fent in sod., 2006; Ferarri in sod., 2003
		reprodukcia	LOEC (48 h) = 0,754	Ferrari in sod., 2003
	mladice ribe <i>Danio rerio</i>	razvoj	NOEC (10 dni) = 25	Ferarri in sod., 2003
		smrtnost	LOEC (10 dni) = 50	Ferrari in sod., 2003
		celične funkcije	EC ₅₀ (48 h) = 0,112	Enick in Moore, 2007
	sladkovodna školjka <i>Elliptio complanata</i>	esterazna aktivnost	(24 h) 0,7	Enick in Moore, 2007
	rastlina <i>Lemna minor</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (7 dni) = 25,5	Cleuvers, 2003

Za karbamazepin je v literaturi veliko objav. Največ učinek karbamazepina raziskujejo na rakih in vodnih bolhah. Ferrari in sod. (2003) in Cleuvers (2003) so pri testiranju uporabili karbamazepin drugega proizvajalca, ki ima večjo topnost (112 mg L^{-1}) od karbamazepina v naših poskusih (Preglednica 9). Tako so vidni učinki pri večjih koncentracijah, kakor pri drugih raziskavah v Preglednici 5. Iz skupine antiepileptikov lahko karbamazepin štejemo za potencialno škodljivega za vodne organizme, saj je večina podatkov za akutno strupenost pod 100 mg L^{-1} (Fent in sod., 2006).

Preglednica 6: Podatki iz literature za metabolit lipidnega regulatorja klofibrinsko kislino, njena efektivna koncentracija ter učinek na različne testne organizme.

spojina	testni organizem	učinek	konz. spojine (mg L ⁻¹)	vir
klofibrinska kislina	bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	bioluminiscanca	EC ₅₀ (30 min) = 91,827	Ferrari in sod., 2003
	alga <i>Tetraselmis chuii</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 ur) = 318,2	Nunes in sod., 2005
	alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	inhibicija rasti	NOEC (96 h) = 75	Ferrari in sod., 2003
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	LOEC (96 h) = 150	Ferrari in sod., 2003
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 89	Ferrari in sod., 2003
	alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (3 dni) = 115	Cleuvers, 2003
	protozoj <i>Tetrahymena pyriformis</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (48 h) = 175	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Daphnia magna</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 72	Cleuvers, 2003
	rak <i>Artemia parthenogenetica</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) = 106	Ferrari in sod., 2003
	rak <i>Brachionus calyciflorus</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) > 200	Ferrari in sod., 2003
	rak <i>Brachionus calyciflorus</i>	smrtnost	LC ₅₀ (48 h) = 87,22	Nunes in sod., 2005
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	reprodukacija	NOEC (24 ur) = 0,246	Fent in sod., 2006; Ferarri in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	reprodukacija	LOEC (48 h) = 0,740	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	reprodukacija	NOEC (7 dni) = 0,640	Fent in sod., 2006; Ferarri in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	reprodukacija	LOEC (7 dni) = 2,560	Ferrari in sod., 2003
	vodna bolha <i>Cerodaphnia dubia</i>	mobilnost	EC ₅₀ (48 h) > 0,20	Ferrari in sod., 2003
	mladice ribe <i>Danio rerio</i>	smrtnost	NOEC (10 dni) = 70	Fent in sod., 2006, Ferarri in sod., 2003
	riba <i>Gambusia holbrooki</i>	smrtnost	LOEC (10 dni) = 140	Ferrari in sod., 2003
	riba <i>Gambusia holbrooki</i>	smrtnost	LC ₅₀ (96 h) = 526,5	Nunes in sod., 2005
	ribje BF-2 celice (in vitro)	citolotsičnost/proliferacija	EC ₅₀ (48 h) = 14	Ferrari in sod., 2003

Klofibrinska kislina ima visoko topnost, ki je ne doseže noben EC₅₀ ali drug merjen parameter. V literaturi je na voljo veliko podatkov o njenem kvarnem delovanju na različne testne organizme. K njeni strupenosti prispeva kisla narava spojine. Preglednica 6

predstavlja vodne organizme in učinke, ki jih je nanje naredila klofibrinska kislina v različnih koncentracijah. Poskuse so večinoma izvedli na rakah in vodnih bolhah.

Preglednica 7: Podatki iz literature za indolon, akridin in akridon, njihova koncentracija ter učinek na različne testne organizme.

spojina	testni organizem	učinek	konc. spojine (mg L ⁻¹)	vir
indolon	miš	/	LD ₅₀ = 1200 mg/kg	Predvoditeleva in sod., 1987
akridin	alga <i>Nitzschia sigma</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 0,08	Dijkman in sod., 1997
	alga <i>Chlamidomonas eugametos</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 0,78	Dijkman in sod., 1997
	alga <i>Navicula salinarum</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (96 h) = 0,78	Dijkman in sod., 1997
	diatomeja <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	inhibicija rasti	EC ₅₀ (72 h) = 0,079	Wiegman in sod., 2002
	nematod <i>Caenorhabditis elegans</i>	smrtnost	LC ₅₀ (24 h) = 11,1	Sochova in sod., 2007
			LC ₁₀ (24 h) = 6,3	Sochova in sod., 2007
			LC ₅₀ (48 h) = 5,9	Sochova in sod., 2007
			LC ₁₀ (48 h) = 3,7	Sochova in sod., 2007
	zebrasta školjka <i>Dreissena polymorpha</i>	učinkovitost filtracije	EC ₅₀ (48 h) = 0,96	Kraak in sod., 1997
	ličinka mušice <i>Chironomus riparius</i>	smrtnost	LC ₅₀ (96 h) = 0,0714	Bleeker in sod., 1999
akridon	ličinka mušice <i>Chironomus riparius</i>	smrtnost	LC ₅₀ > 0,937	Bleeker in sod., 1999

V Preglednici 7 so podatki za učinke indolona, akridina in akridona na testne organizme pri določenih koncentracijah. V literaturi je zaenkrat na voljo le po en test za indolon in akridon na testni organizem ter njun učinek. Po podatkih iz literature je topnost akridona v destilirani vodi 0,937 mg L⁻¹ (Bleeker in sod., 1999). Z našimi meritvami z uporabo plinskega kromatografa z masno spektrometrično detekcijo pa smo določili topnost akridona 4,0 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich) in 1,3 mg L⁻¹ (Fluka).

2.6.2 Testi za določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti

V okolje vstopajo številne genotoksične spojine; lahko pa nastajajo tudi v postemisijskih kemijskih ali bioloških pretvorbah (Claxton in sod., 1998). Biološki testi omogočajo določanje nevarnosti mutagenih površinskih vod in lahko učinkovito ocenijo genotoksičnost kompleksnih vodnih materialov brez predhodne identifikacije fizikalno kemijskih lastnosti domnevnih toksikantov (Houk, 1992; Claxton in sod., 1998).

Za vrednotenje genotoksičnega delovanja vodnih vzorcev uporabljajo številne biološke teste. Razdeljeni so v dve glavni skupini. Prva skupina vključuje bakterijske teste kot so test povratnih mutacij s *Salmonella typhimurium*, SOS kromotest in *Salmonella typhimurium umu*-test. Druga skupina vključuje teste vodnih organizmov in rastlin kot so test mikronukleusov, ³²P-označevalni test, kometni test in alkalni test odvijanja. Testi druge skupine so pomembni, saj jih lahko uporabljam v laboratoriju, ali pa jih izvedemo na terenu v *in situ* monitoringu z uporabo rib in rastlin, ki naseljujejo onesnaženo področje (Ohe in sod., 2004).

Za vse zdravilne učinkovine (razen rakotvornih) mora proizvajalec dokazati negativno genotoksičnost, sicer zdravilo ne sme na tržišče. Iz preglednice objav genotoksičnosti za izbrane spojine (Pregledinica 8) pa je razvidno, da je relativno malo podatkov objavljenih v člankih. Na splošno lahko rečemo, da se podatki za posamezno spojino precej razlikujejo. Večina teh spojin ni mutagena za bakterije. Pri spojinah iz skupine NSAID v literaturi najdemo šibko genotoksičnost le za celice kostnega mozga miši. Pri klofibrinski kislini je v literaturi en sam podatek, ki je bil pridobljen na bakteriji (Sallustio in sod., 1997). Akridin, razen ene izjeme, kaže genotoksičnost le za evkariontske celice (Matsuoka in sod., 1984; Rank in sod., 2002; Bleeker in sod., 1999), medtem ko imamo za akridon le en podatek o genotoksičnosti (Bleeker in sod., 1999).

Preglednica 8: Pregled objav genotoksičnosti za izbrane učinkovine na različne testne organizme oziroma celice ter rezultati poskusov, ovrednoteni z znakom + ali -.

spojina	testni organizem ali celica	rezultat	vir
ibuprofen	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Oldham in sod., 1986
	celice kostnega mozga miši	šibek +	Philipose in sod., 1997
	<i>Salmonella typhimurium</i> človeški limfociti	-	Philipose in sod., 1997; Černoša, 2005
ketoprofen	celice kostnega mozga miši	šibek +	Philipose in sod., 1997
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Philipose in sod., 1997; Černoša, 2005
	človeški limfociti	-	Kullich in Klein, 1986
diklofenak	človeški limfociti	-	Kullich in Klein, 1986
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Černoša, 2005
naproksen	človeški limfociti	-	Ozturk in sod., 2004
	celice kostnega mozga miši	šibek +	Philipose in sod., 1997
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Philipose in sod., 1997; Černoša, 2005
karbamazepin	človeški limfociti	+	Awara in sod., 1998; Celik, 2006
klofibrinska kislina	<i>Escherichia coli</i>	+	Sallustio in sod., 1997
indolon	/	/	/
akridin	celice kitajskega hrčka	+	Matsuoka in sod., 1984
	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	Seixas in sod., 1982
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Brams in sod., 1987
	SOS kromotest (kit)	-	Brams in sod., 1987
	čebula Allium cepa	+	Rank in sod., 2002
	ličinka mušice <i>Chironomus riparius</i>	+	Bleeeker in sod., 1999
akridon	ličinka mušice <i>Chironomus riparius</i>	+	Bleeeker in sod., 1999

2.6.2.1 SOS/umu test

SOS sistem ali popravljanje z napakami

Celice so razvile številne mehanizme, ki jim omogočajo preživetje v težkih pogojih. Ko pride do poškodb bakterijskih ali evkariontskih celic zaradi mutagenih kemikalij,

ultravijoličnega sevanja ali sevanja X-žarkov, se aktivira SOS odziv, ki poveča raven DNK popravljalnih encimov. Pri *Escherichii coli* z odzivom pričneta dva proteina, ki ju kodirata gena *lexA* in *recA*. Protein LexA je represor, ki z vezavo na *recA* operon prepreči prepis skupine SOS proteinov. Domnevajo, da nekateri produkti poškodovane DNK (presežek enovijačne DNK, trinukleotidi, oligonukleotidi) aktivirajo RecA proteazno aktivnost. Aktiviran RecA protein nato cepi LexA represor in tako omogoči transkripcijo več kot 15 SOS genov. SOS odgovor je začasen, toda precej kompleksen. Vključuje povečano rekombinantno aktivnost, spremembe na začetku replikacije, inhibicijo nukleaz in indukcijo "napakam nagnjene sinteze DNK". Celica tako podvaja DNK kljub napakam, ki bi sicer podvajanje ustavile. Celica na primer preide timinski dimer (ali kako drugo napako) in nadaljuje sintezo DNK kljub nepravilnim bazam, ki so se vgradile v verigo nasproti timinskega dimera. Kasneje se lahko napaka popravi z rekombinantnim popravljanjem ali fotoreaktivacijo. Pri *E. coli* je tako popravljanje poškodb odvisno od DNK polimeraze III, RecA proteina ter dveh proteinov, ki ju kodirata gena *umuC* (*umuC* je akronim za UV mutagenesis and chemical repair gene) in *umuD*. Ta dva gena sta nosilca rezistence za mutacije, povzročene z UV sevanjem. Preučevanje mutiranih bakterij s pomanjkljivostmi zapisa v različnih delih SOS odziva so pokazale, da imajo na novo sintetizirani proteini dva učinka. Kot prvo, indukcija teh dodatnih DNK popravljalnih encimov poveča preživetje celic po poškodbi DNK. Kot drugo pa nekateri od induciranih proteinov povečajo raven mutacij z zvišanjem števila napak, narejenih v kopiji zaporedja DNK. Napake nastanejo zaradi poškodovane DNK verige, ki jo DNK polimeraza uporablja kot model za sintezo komplementarne verige.

Tako popravljanje DNK z napakami je lahko škodljivo za posamezne celice, dolgoročno pa privede do številnih genetskih variabilnosti, ki mutiranim celicam povečajo možnost preživetja v spremenjenem okolju (Alberts in sod., 2002; Metzler, 2001).

SOS/umu test je široko uporabljen test za rutinsko presejanje vodnih vzorcev. Različico testa, ki jo izvajamo na mikrotitrskih ploščah, so razvili kot hitro in občutljivo metodo za določanje genotoksičnosti površinskih in odpadnih vod. Zaradi tega so *umu*-test standardizirali in validirali po mednarodnem ISO standardu (ISO 13829, 2000). Pri *umu*-testu uporabljamo genetsko spremenjeno bakterijo *Salmonella typhimurium* sev TA1535

pSK1002. Testni sev izhaja iz starševske verige *Salmonella typhimurium* TA1535 (*his*-, *rfa*-, *uvrB*- in *lacZ* mutanta). Na plazmidu pSK1002 je gen *umuC*, ki je vezan z genom *lacZ* ter vsebuje tudi gen z rezistenco na ampicilin. Gen *lacZ* kodira sintezo encima β -galaktozidaze, gen za rezistenco na ampicilin pa služi kot selekcijski marker. Gen *umuC* so izbrali, ker so domnevali, da je *umuC* vključen v mutagenezi bolj neposredno od katerega koli drugega SOS gena. Genotoksičen učinek vzorcev povzroči aktivacijo celičnega SOS odziva. Najprej pride do aktivacije *recA* gena in s tem do sinteze proteina RecA, ki cepi represor LexA. To omogoči transkripcijo več SOS genov, med njimi tudi *umuC* gena, ki je sklopljen z *lacZ* genom. Tako se aktivacija SOS odziva odraža tudi v aktivaciji β -galaktozidazne aktivnosti. Encim β -galaktozidaza cepi substrat o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) v rumenoobarvan produkt, katerega količino določimo z merjenjem absorbance pri 420 nm. β -galaktozidazna aktivnost je merilo za genotoksično aktivnost vzorcev.

Pri SOS/*umu* testu genski konstrukt *umuC-lacZ* omogoča detekcijo genotoksičnih učinkov: primarne DNK poškodbe, ki povzroči naraščanje jedrne količine enojnih DNK verig in oligonukleotidov: O- in N- alkiliranje, adukti, depurinacija, depirimidacija, deaminacija, oksidativne poškodbe DNA in dimeri DNA (Černoša, 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Celične linije

3.1.1.1 Bakterije *Pseudomonas putida*

Za preverjanje strupenosti spojin po ISO standardu (ISO 10712:1995) smo uporabljali bakterijo *Pseudomonas putida*, (Trevisan 1889) Migula 1895. (DSM N. 50026). Bakterijski sev smo dobili iz nemške zbirke mikroorganizmov DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (www.dsmz.de, november 2007). *Pseudomonas putida* je aerobna, gram negativna, paličasto oblikovana bakterija, ki ne tvori spor. Je prilagodljiv okoljski izolat, ki lahko raste na različnih aromatskih ogljikovodikih. Je aerob, premika se z enim ali več polarnimi bički. Spada v družino Pseudomonaceae, red Pseudomonales, razred Gamaproteobakterije, deblo Proteobacteria.

3.1.1.2 Bakterije *Salmonella typhimurium*

Za izvedbo SOS / umu testa smo uporabili sev *Salmonella typhimurium* TA 1535 pSK 1002. *Salmonella typhimurium* je gram negativna, fakultativno anaerobna bakterija iz družine Enterobacteriaceae, red Enterobacteriales, razred Gamaproteobakterije, deblo Proteobacteria. Na plazmidu pSK 1002 nosi zapis za SOS gen *umuC*, ki je povezan z genom *lacZ*. Slednji s tvorbo encima β -galaktozidaze omogoča merjenje aktivacije SOS odziva. SOS / umu test smo izvajali z metabolno aktivacijo in brez nje. Metabolna aktivacija je namreč proces, ki poteka predvsem v jetrih, kjer se organizmu tuje snovi pretvorijo v tako obliko, da se čim lažje in s čim manj škodljivimi učinki izločijo iz organizma. V procesu metabolne razgradnje večkrat nastajajo snovi, ki so bolj genotoksične kot izhodna snov. Iz tega razloga je potrebno testiranje genotoksičnosti izvesti v prisotnosti in brez metabolnega aktivatorja. Ker bakterijske celice nimajo metabolnega oksidacijskega sistema s citokromom P450, kot ga imajo živali, moramo v testu dodati eksogen sesalski metabolni aktivacijski sistem S9. To je mikrosomalna frakcija pridobljena iz podganjih jeter, ki vsebuje encime metabolne aktivacije.

3.1.1.3 Zarodki cebrice *Danio rerio*

Test smo izvajali na zarodkih rib *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae). *Danio rerio* je tropска riba, za katero je optimalna temperatura 26 °C. Spada v družino krapovcev (Cyprinidae), red Cypriniformes, razred Actinopterygii, deblo Chordata. Samci imajo obliko torpeda in črte, ki spominjajo na zebasti vzorec. Samice so ponavadi večje in jih od samcev ločimo po večjih belo-rumenih trebuhih. Cebrice dosežejo v dolžino do 6,4 cm in živijo približno 5 let.

3.1.2 Testne spojine

Preglednica 9 prikazuje seznam testiranih spojin, proizvajalca, CAS številko in čistost. Podana je tudi topnost v vodi pri 25 °C, ki je objavljena na internetni strani ChemID Plus Advanced, ter dejanske topnosti, ki so jih izmerili pri sobni temperaturi s plinskim kromatografom z masno spektrometrično detekcijo na Institutu Jožefa Stefana, Odsek za znanosti o okolju. Priprava raztopin je opisana v Preglednici 15.

Preglednica 9: Seznam testiranih spojin - proizvajalec, ime, CAS (Chemical Abstract Service) in čistost izbranih spojin

proizvajalec	ime	CAS številka	čistost spojin (%)	ChemID (mg L ⁻¹)	Izmerjeno (mg L ⁻¹)
Sigma Aldrich	Diklofenak Na	15307-79-6	98	2430	13,2
Sigma Aldrich	ibuprofen	15687-27-1	98	21	33,9
Chemosyntha NV	indolon	060518-1	≥ 98	/	4,9
Acros Organics	karbamazepin	298-46-4	99	17,7	83,2
Sigma Aldrich	ketoprofen	22071-15-4	≥ 98	51	92,5
Sigma Aldrich	naproksen	22204-53-1	≥ 98	15,9	13,6
Sigma Aldrich	akridin	260-94-6	97	38,4	56,1
Sigma Aldrich	9(10H) akridon	578-95-0	99	/	4,0
Sigma Aldrich	klofibrinska kislina	882-09-7	97	583	514,8

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 *Pseudomonas putida* rastni inhibičijski test, ISO 10712

Priprava testne raztopine (TR):

Raztopino TR 1 smo pripravili tako, da smo zatehtali 10,0 g NaNO₃; 2,40 g K₂HPO₄; 1,20 g KH₂PO₄ in 1,0 g kvasnega ekstrakta. Vse skupaj smo dopolnili z destilirano vodo do oznake 500 mL.

Raztopino TR 3 smo pripravili tako, da smo zatehtali 40,0 g D(+) -glukoze monohidrata in dopolnili z destilirano vodo do oznake 500 mL.

Raztopino TR 4 smo pripravili tako, da smo zatehtali 4,0 g MgSO₄ × 7H₂O, 0,01 g zrnatega železovega(III) citrata in dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL.

Vse štiri raztopine smo avtoklavirali 10 minut pri 121 °C. Za pripravo enega litra testne raztopine smo zmešali 25 mL raztopine TR 1, 25 mL raztopine TR 3 in 50 mL raztopine TR 4 in vse skupaj dopolnili do oznake 1000 mL. Pripravljene raztopine in testne raztopine smo hranili v hladilniku do 4 tedne.

3.1.3.2 Test SOS/umu

Za test SOS/umu smo pripravili TGA medij, B – pufer, fosfatni pufer, stop reagent in raztopino ONPG.

1x TGA medij

Za pripravo 1000 mL 1x TGA medija smo zatehtali 10 g Tryptona, 5 g NaCl in dolili bidestilirano vodo do 1000 mL. Sestavine smo zmešali in raztopili v bidestilirani vodi ter umerili pH na 7,0 ± 0,2. Raztopino smo avtoklavirali (121° C, 20 minut). Posebej smo pripravili 2,0 g D(+) -glukoze (brezvodne) in dodali 20 mL destilirane vode. Raztopino glukoze smo sterilno dodali 1x TGA po avtoklaviranju. Na koncu smo dodali še 20 mg ampicilina. Tako pripravljen 1x TGA smo shranili na -20° C.

B - pufer

Za pripravo B – pufra smo zatehtali 10,09 g Na₂HPO₄ × 2H₂O; 2,75 g NaH₂PO₄ × H₂O; 0,375 g KCl; 0,125 g MgSO₄ × 7H₂O ter dodali 500 mL bidestilirane vode. Sestavine smo zmešali in raztopili v bidestilirani vodi ter umerili pH na 7,0 ± 0,2. Nato smo dodali 0,5 g

natrijevega dodecil sulfata (SDS) v 500 mL pripravljenega B-pufra ter pred uporabo še 0,27 mL 2-merkaptoetanola na 100 mL B-pufra. B-pufer smo do uporabe shranili na 4° C.

Fosfatni pufer (PBS)

Za pripravo fosfatnega pufra smo zatehtali 10,09 g Na₂HPO₄ x 2H₂O; 2,75 g NaH₂PO₄ x H₂O ter dopolnili bidestilirano vodo do oznake 100 mL. Sestavine smo zmešali in raztopili v bidestilirani vodi ter umerili pH na 7,0 ± 0,2. Raztopino smo avtoklavirali (121° C, 20 minut). Fosfatni pufer smo do uporabe shranili na 4° C.

Stop reagent

Stop reagent smo pripravili tako, da smo zatehtali 10,599 g Na₂CO₃ in dodali bidestilirano vodo do 100 mL. Raztopino smo do uporabe shranili na 4° C.

Raztopina ONPG (2-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid)

Za pripravo raztopine ONPG, smo namerili 180 mg ONPG in dodali 40 mL fosfatnega pufra. ONPG smo raztopili v fosfatnem pufru. Ker je raztopitev ONPG v fosfatnem pufru zaradi slabe topnosti dolgotrajno, smo si pripravili večje količine raztopine in jo shranili v temi pri 4° C.

3.1.3.3 Test na zarodkih rib

Za 1 L raztopine, potrebne za izvedbo ISO testa (»ISO voda«) smo zmešali po 250 mL vseh 4 izhodnih raztopin. »ISO vodo« pripravimo vedno en dan pred poskusom in 24 ur prepihujemo s kisikom, da pripravimo nasičeno raztopino. Preglednica 10 prikazuje 4 izhodne raztopine in njihove koncentracije, iz katerih pripravimo »ISO vodo«.

Preglednica 10: Izhodne in končne koncentracije izbranih spojin v mg L⁻¹ za pripravo ISO vode.

raztopina	izhodne koncentracije (mg L ⁻¹)	končne koncentracija (mg L ⁻¹)
(1) CaCl ₂ *2H ₂ O	1176	294
(2) MgSO ₄ *7H ₂ O	493	123,3
(3) NaHCO ₃	252	63
(4) KCl	22	5,5

3.1.3.4 Test referenčne raztopine 3,4-dikloroanilina

Standardi oz. referenčni FET test temelji na testiranju referenčne spojine 3,4-dikloroanilina, ki ima že znano vrednost EC₅₀ 3,3 mg L⁻¹ ± 0,1 mg L⁻¹. Testne koncentracije so: 14; 7; 3,5; 1,75; 0,875; 0,438 mg L⁻¹. Najvišjima koncentracijama smo izmerili % kisika (> 50 %) in pH (7,8 ± 0,2). Izhodna raztopina 3,4-dikloroanilina v »ISO vodi« ima koncentracijo 153,2 mg L⁻¹ (15,32 mg/100 mL). Primer redčenja referenčne spojine glede na izhodno raztopino se nahaja v Preglednici 11. Preglednica 11 predstavlja redčine, ki smo jih naredili za FET test, ko smo testirali referenčno spojino.

Preglednica 11: Koncentracije referenčne spojine 3,4-dikloroanilina v mg L⁻¹.

raztopina	iz izhodne	končna testna koncentracija (mg L ⁻¹)
1	4,57 mL / 50 mL	14
2	2,28 mL / 50 mL	7
3	1,14 mL / 50 mL	3,5
4	0,571 mL / 50 mL	1,75
5	0,286 mL / 50 mL	0,875
6	0,143 mL / 50 mL	0,438

3.2 METODE

3.2.1 *Pseudomonas putida* rastni inhibičijski test, ISO 10712

Test pokaže inhibitorni učinek testirane spojine na testno bakterijo *Pseudomonas putida*. Inhibitorni učinek smo določali z merjenjem celične rasti bakterijske populacije, ki smo jo izpostavili različnim redčitvam spojin. Rast oz. motnost raztopine smo po približno 16 urah ovrednotili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 436 nm. Za negativno kontrolo smo uporabili vzorec bakterijske kulture brez dodnih testnih spojin. Na koncu smo iz rezultatov absorbance izračunali EC₅₀ (50 % inhibicijo rasti).

3.2.1.1 Priprava bakterij *Pseudomonas putida*

Revitalizacija:

Bakterije smo shranili v hladilniku v zamrznjenih kroglicah (mikrobangih, microbang cryo prolab). Pripravili smo hrnilno juho po sledečem postopku: zatehtali smo 18,5 g BHI in dolili destilirano vodo do oznake 500 mL. Raztopino smo razdelili v 10 serumskih stekleničk po 50 mL. Hrnilno juho smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Naslednji dan smo zmrznjeno mikrokroglico prenesli v stekleničko s hrnilno juho in jo inkubirali na stresalniku 16 ur pri 23 °C. Vsak teden smo pripravili novo kulturo na zgoraj opisan način.

Priprava inokuluma:

Odpipetiramo po 5 mL kulture, ki smo jo gojili preko noči, v 2 centrifugirki in centrifugiramo 15 minut na 4000 obratih/minuto. Odlijemo supernatant in oborino resuspendiramo v 5 mL TR. Postopek dvakrat ponovimo. Na koncu pelet (usedlino) spet resuspendiramo v 5 mL TR.

TESTI

3.2.1.2 Test referenčne spojine 3,5-diklorofenol (DCP)

Da bi preverili delovanje sistema, smo najprej bakterije testirali z referenčno spojino: 3,5-diklorofenol (Preglednica 9). Po protokolu ISO 10712:1995 mora biti EC₅₀ med 10 mg L⁻¹ in 30 mg L⁻¹. Če so dobljene vrednosti v tem intervalu, lahko bakterijo *Pseudomonas putida* uporabimo kot testni organizem za ekotoksikološke raziskave.

Dan pred testom smo zatehtali 0,04055 g DCP. Spojino smo raztopili v 100 mL TR in jo mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo raztopino prefiltrirali. Ker smo potrebovali koncentracijo 40 mg L^{-1} , smo pripravljeno raztopino 10 x razredčili. V merilnem valju smo pripravili serijo razredčin s končimi koncentracijami 40, 32, 24, 16, 8, 4 mg L^{-1} . Preglednica 12 prikazuje pripravo serije razredčin raztopin 3,5-diklorofenola. Kot »razredčina 100« smo označili raztopino z maksimalno vsebnostjo izbrane spojine raztopljene v vodi. Za vsako razredčitev smo pripravili 5 ponovitev.

Preglednica 12: Priprava razredčin za referenčno spojino 3,5-diklorofenol.

razredčina	koncentracija (mg L^{-1})	volumen testne spojine (mL)	volumen TR (mL)	končni volumen (mL)
100	40	20	0	20
80	32	16	4	20
60	24	12	8	20
40	16	8	12	20
20	8	4	16	20
10	4	2	18	20
0	0	0	20	20

V posamezno razredčino smo dodali bakterijski inokulum 0,05 mL (približno 10^8 celic) in stekleničke inkubirali na stresalniku 16 ur pri 23 °C. Zaradi strupenosti 3,5-diklorofenola smo poskuse s to spojino izvajali v digestoriju. Po končani inkubaciji smo izmerili absorbanco pri 436 nm.

Test referenčne spojine 3,5-diklorofenola v hrnilni juhi

Za preverjanje delovanja referenčne spojine 3,5-diklorofenola v hrnilni juhi z dodatkom indikatorja, smo pripravili raztopine, kakor je prikazano v Preglednici 13. Pripravili smo raztopino 3,5-diklorofenola s koncentracijo 40 mg L^{-1} . Istočasno smo pripravili 0,01 % raztopino indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijevega klorida (TTC). Razredčine smo pripravili po postopku, opisanem v Preglednici 13. Končne razredčine smo razdelili v 5 paralelk. Vzporedno z razredčinami smo pripravili tudi 2 kontroli (Preglednica 14), kjer smo v vsak vzorec dodali 50 μL indikatorja TTC in 50 μL bakterijske kulture. Vse vzorce smo 24 ur inkubirali na stresalniku pri 23 °C. Po končani inkubaciji smo izmerili absorbanco pri 436 nm.

Preglednica 13: Postopek priprave razredčin pri testu s 3,5-diklorofenolom v hranični juhi.

razredčina	koncentracija (mg L ⁻¹)	volumen testne spojine (mL)	volumen hranične juhe (mL)	volumen TTC (µL)	končni volumen (mL)
100	40	20	0	50	20,1
80	32	16	4	50	20,1
60	24	12	8	50	20,1
40	16	8	12	50	20,1
20	8	4	16	50	20,1
10	4	2	18	50	20,1
0	0	0	20	50	20,1

**Preglednica 14: Priprava kontrol pri testu s 3,5-diklorofenolom v hranični juhi, kjer smo namesto
hranične juhe pri kontrolah uporabili testno raztopino (v mL).**

oznaka	TR (mL)	bakterijska raztopina (µL)	indikator TTC (µL)	skupni volumen (mL)
K2	20	50	50	20,1
K3	20	50	50	20,1

3.2.1.3 Rastni inhibicijski test s *Pseudomonas putida* za izbrane zdravilne učinkovine

Po enakem postopku kakor pri 3,5-diklorofenolu, smo testirali tudi ostale zdravilne učinkovine in njihove metabolite: ketoprofen, ibuprofen, naproksen, diklofenak, karbamazepin, indolon, klofibrinsko kislino, akridin in akridon.

Teste smo izvedli v dveh korakih:

1) preliminarni test:

Za vsako spojino smo naredili redčitveno vrsto. Za prvo raztopino smo vzeli največjo količino zdravilne učinkovine oz. metabolita, ki je topna v vodi. Nato smo naredili še dve

desetiški redčitvi, do 10^{-2} (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}). S tem smo ocenili območje inhibicije rasti testne bakterije zaradi strupenosti zdravilne učinkovine oz. njenega metabolita.

2) končni test:

Na podlagi preliminarnega testa smo izbrali specifične testne koncentracije za vsako zdravilno učinkovino oz. metabolit posebej. Testirane spojine z oznakami so prikazane v Preglednici 15. Vsak interval, kjer smo zaznali inhibicijo rasti, smo razširili in znotraj letega naredili redčitveno vrsto.

Za pripravo nasičenih raztopin smo zatehtali maso, ki je približno dvakrat večja od topnostiv spojine. Spojine smo 24 ur mešali na sobni temperaturi. Naslednji dan smo raztopine prefiltrirali čez $0,22 \mu\text{m}$ filter in tako odstranili neraztopljeni ostanek.

Preglednica 15: Topnost v destilirani vodi v mg L^{-1} (vir je ChemID) za izbrane zdravilne učinkovine in njihove metabolite, njihova zatehtana masa.

oznaka spojin	spojina	topnost v dH_2O (mg L^{-1})	zatehtana masa (mg)
A	Na sol diklofenaka	13,2	50
B	ibuprofen	33,9	50
C	indolon	4,9	5
D	karbamazepin	83,2	50
E	ketoprofen	92,5	100
F	naproksen	13,6	50
G	akridin	56,1	80
H	akridon	4,0	80
I	klofibrinska kislina	514,8	1000

Najprej smo izvedli preliminarni test za vse izbrane spojine (Preglednica 16), kjer so navedene dejanske koncentracije spojin, ki smo jih izmerili s plinskim kromatografom z masno spektrometrično detekcijo. Poskuse smo izvedli tako, da smo h končnemu volumnu (20 mL) v posamezni steklenički dodali 0,05 mL baterijskega inokuluma (približno 10^8 celic). Stekleničke smo inkubirali na stresalniku pri temperaturi 23° C 16 ur. Za negativno kontrolo smo uporabili testno raztopino z dodatkom bakterijske kulture brez testne zdravilne učinkovine oz. njenega metabolita.

V naslednjem koraku smo izvedli končne teste za spojine G (Preglednica 18) ter I (Preglednica 17). V primeru pozitivnih rezultatov smo na določenem koncentracijskem območju zgostili redčitveno vrsto in ob koncu poskusa izbranim stekleničkam izmerili absorbanco pri 436 nm na spektrofotometru.

Preglednica 16: Preliminarni test za diklofenak Na (A), ibuprofen (B), indolon (C), karbamazepin (D), ketoprofen (E), naproksen (F), akridin (G), akridon (H) in klofibrinsko kislino (I). V preglednici so koncentracije zdravilnih učinkovin in metabolitov v vsaki razredčini v mg L⁻¹ ter volumski deleži zdravilnih učinkovin in metabolitov v mL.

Preglednica 17: Redčitvena vrsta za klofibrinsko kislino (I). V preglednici so koncentracije klofibrinske kisline v vsaki razredčini ($v \text{ mg L}^{-1}$), njeni volumski deleži za vsako razredčino, volumen testne raztopine v vsaki razredčini ter končni volumen v vsaki steklenički ($v \text{ mL}$).

razredčitve	konc. redčitev (mg L^{-1})	volumen testne spojine (mL)	volumen TR (mL)	končni volumen (mL)
22,5	115,8	4,5	15,5	20
20	103,0	4	16	20
17,5	90,1	3,5	16,5	20
15	77,2	3	17	20
12,5	63,4	2,5	17,5	20
10	51,5	2	18	20
0	0	0	20	20

Preglednica 18: Redčitvena vrsta za akridin (G). V preglednici so koncentracije akridina v vsaki razredčini ($v \text{ mg L}^{-1}$), njegovi volumski deleži za vsako razredčino, volumen testne raztopine v vsaki razredčini ter končni volumen v vsaki steklenički ($v \text{ mL}$).

razredčitve	konc. redčitev (mg L^{-1})	volumen testne spojine (mL)	volumen TR (mL)	končni volumen (mL)
100	56,1	20	0	20
97,5	54,7	19,5	0,5	20
95	53,3	19	1	20
92,5	51,9	18,5	1,5	20
90	50,5	18	2	20
87,5	49,1	17,5	2,5	20
85	47,7	17	3	20
82,5	46,3	16,5	3,5	20
80	44,9	16	4	20
0	0	0	20	20

3.2.1.4 Vpliv delovanja indikatorja 2,3,5-tetrazolijevega klorida v testni raztopini in v raztopini referenčne spojine 3,5-diklorofenolu s hranilno juho pri pogojih stresanja

V tej fazi poskusov smo ugotavljali vpliv razmer med potekom inkubacije stekleničk na stresalniku na delovanje indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC). Če bi indikator TTC v gojišču s testno raztopino deloval, bi pomenilo, da je pri inkubaciji brez stresalnika premajhna izmenjava plinov oziroma hranil za rast bakterije *P. putida*. Poleg tega smo želeli ugotoviti tudi vpliv hkratne inkubacije referenčne spojine 3,5-diklorofenol (DCP) v hranilni juhi z indikatorjem TTC (Preglednica 19). V ta namen smo pripravili razredčine (Preglednica 19) v 100 mL merilnem valju ter vsebino razdelili na 5 stekleničk. Dodali smo še dve kontrolni steklenički (K2 in K3, Preglednica 20). V vsako stekleničko smo dodali 50 µL bakterijskega inokuluma, tako da je bil končni volumen 20,1 mL. Stekleničke smo inkubirali na stresalniku 24 ur pri 23 °C. Po tem času smo izmerili absorbanco vzorcev pri 436 nm.

Preglednica 19: Priprava redčin pri preučevanju vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom in hranilno juho.

razredčina	koncentracija DCP (mg L ⁻¹)	volumen DCP (mL)	volumen hranilne juhe (mL)	volumen TTC in bakt. inokul. (µL)	končni volumen (mL)
100	40	20	0	100	20, 1
80	32	16	4	100	20, 1
60	24	12	8	100	20, 1
40	16	8	12	100	20, 1
20	8	4	16	100	20, 1
10	4	2	18	100	20, 1
0	0	0	20	100	20, 1

Preglednica 20: Priprava kontrol pri preučevanju vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).

razredčina	TR (mL)	bakterijska raztopina (μ L)	volumen indikatorja TTC in bakt. Inokul. (μ L)	skupni volumen (mL)
K2	20	50	100	20,1
K3	20	50	100	20,1

3.2.1.5 *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test na mikrotitrskih ploščah

Za poenostavitev dela smo želeli preveriti, če je metoda po standardu ISO 10712 izvedljiva tudi z uporabo mikrotitrskih ploščic, kjer bi rezultate lahko obdelali z uporabo računalniškega programa (Microplate analyser software, PhPlate, licenčna številka 4244), ne le s spektrofotometrom.

Priprava inokuluma

Priprava inokuluma je potekala po standardnem postopku ISO 10712, Revitalizacija in priprava inokuluma.

Najprej smo preverili rast bakterije *Pseudomonas putida* na mikrotitrski plošči. Za medij smo uporabili hranilno juho, ki smo jo redčili z destilirano vodo. Rast bakterije smo spremljali z indikatorjem 2,3,5-trifeniltetrazolijevim kloridom (TTC), ki smo ga predhodno raztopili v destilirani vodi. Indikator omogoča poenostavljeni merjenje dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic. TTC je lahko prejemnik elektronov za mnoge dehidrogenaze kot tudi za flavin vsebujoče encime, ki ga reducirajo v netopni 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan (TTF). Pri redukciji TTC v TTF pride do spremembe barve iz rumene v vijolično-rdečo. Količina nastalega formazana je merilo za celokupno respiratorno oziroma metabolno aktivnost mikroorganizmov (Hatzinger in sod., 2003).

Vsako razredčino smo pripravili v 1,5 mL Eppendorf epruveti. K vsem razredčinam, razen v kontrolo, smo dodali bakterijski inokulum. Po 100 μ L vsake razredčine smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo (96 jamic) v petih ponovitvah. Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 24 ur pri 23° C.

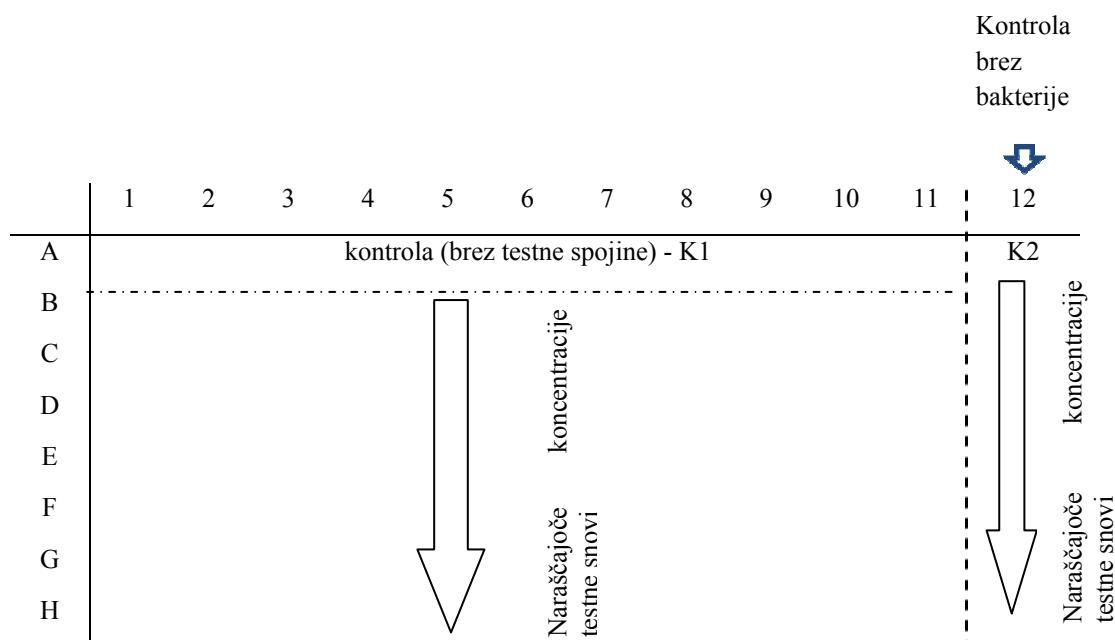
V nadaljnih poskusih smo preizkušali referenčno spojino 3,5-diklorofenol in izbrane zdravilne učinkovine ter njihove metabolite in vzorce razporedili na mikrotitrski plošči po zahtevah programa Microplate analyser software (Preglednica 21). Preglednica 21 prikazuje, da je v vsaki vrstici ena razredčina testirane spojine, kjer koncentracije naraščajo od vrstice B do vrstice H, kar pomeni 11 ponovitev za vsako razredčino. Vrsta A je kontrolna (K1) – brez testne spojine. Druga kontrola pa je stolpec 12, kjer ni dodanega bakterijskega inokuluma (K2).

Pred dodatkom bakterijskega inokuluma smo posamezno razredčino nanesli v stolpec 12. Nato smo dodali raztopini v Eppendorf epruveti še bakterijski inokulum in nanesli 11 ponovitev vsake razredčine v stolpce od 1 do 11. Mikrotitrsko ploščo z vzorci referenčne spojine 3,5-diklorofenol smo pripravili v testni raztopini (TR). Naredili smo 3 identične mikrotitrskie plošče. Eno smo inkubirali v rastnih komorah 24 ur pri 23 °C, drugo pri 28 °C in tretjo pri 37 °C.

Test z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom smo ponovili tako, da smo za rastno gojišče uporabili hranilno juho. Priprava vzorcev je prikazana v Preglednici 22. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 24 ur pri 28 °C.

Test na mikrotitrski plošči smo izvedli še s klofibrinsko kislino. Priprava razredčin je opisana v Preglednici 23. Pripravljeno ploščo smo preko noči inkubirali na 28 °C.

Preglednica 21: Razporeditev vzorcev na mikrotitrski plošči, po protokolu programa Microplate analyser software.



Preglednica 22: Priprava razredčin za test referenčne spojine 3,5-diklorofenola, kjer smo za medij uporabili hranilno juho, razredčinam v vsaki Eppendorf epruveti pa dodali bakterijski inokulum in indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).

razredčine	testna spojina (μ L)	hranilna juha (μ L)	bakterijska raztopina (μ L)	indikator TTC (μ L)	skupni volumen (mL)
40	120	1080	11	110	1,321
35	180	1020	11	110	1,321
30	240	960	11	110	1,321
25	300	900	11	110	1,321
20	360	840	11	110	1,321
15	420	780	11	110	1,321
10	480	720	11	110	1,321
0	0	1200	11	110	1,321

Preglednica 23: Priprava razredčin za test inhibicije rasti *Pseudomonas putida* s klofibrinsko kislino, kjer smo za medij uporabili hranilno juho, razredčinam v vsaki Ependorf epruveti pa dodali bakterijski inokulum in indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC).

razredčine	testna spojina (μL)	hranilna juha (μL)	bakterijska raztopina (μL)	indikator TTC (μL)	skupni volumen (mL)
35	420	780	10	100	1,31
30	360	840	10	100	1,31
25	300	900	10	100	1,31
20	240	960	10	100	1,31
15	180	1020	10	100	1,31
10	120	1080	10	100	1,31
5	60	1140	10	100	1,31
0	0	1200	10	100	1,31

3.2.1.6 Vpliv prepohovanja testne raztopine (TR) na rast *Pseudomonas putida*

Da bi preučili vpliv kisika na rast *P. putida*, smo pred poskusom TR za 4 ure prepohovali. Za izvedbo poskusa smo pripravili testno razredčino (A) ter kontrolo (K) (Preglednica 24). V preglednici 24 so podani volumni v Ependorf epruveti za testno raztopino, bakterijski inokulum in za indikator 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC). Pripravili smo 3 plošče, od katerih smo eno inkubirali v komori pri 23°C , drugo v komori pri 28°C in tretjo na grelni plošči pri 28°C .

Preglednica 24: Priprava razredčin za preverjanje rasti bakterije *Pseudomonas putida* za testni vzorec (A) in kontrolo (K).

razredčina	TR (mL)	bakterijska raztopina (μL)	indikator TTC (μL)	skupni volumen (mL)
A	1,2	10	100	1,31
K	1,2	0	100	1,31

3.2.1.7 Analiza rezultatov poskusov na mikrotitrski ploščici z računalniškim programom MARA

Rezultate na mikrotitrski ploščici smo posneli z optičnim čitalcem HP ter jih obdelali z računalniškim programom Microplate analyser, tako da smo sledili navodilom omenjenega programa. Po obdelavi rezultatov nam je program izpisal preglednico, kjer so bili prikazani podatki za inhibicijo v posamezni luknjici, povprečne vrednosti in komentar vrednosti, če so le-te ustrezne. Prav tako smo dobili vrednosti za relativno rast v primerjavi z vrstico A, vrednost za relativno rast ter 50 % in 100 % inhibicijo rasti (navodila PhPlate, 2007).

3.2.2 Test SOS/umu

S testom SOS/umu smo določili citotoksično in genotoksično aktivnost vzorcev. Citotoksičnost vzorcev smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance celične suspenzije pri 600 nm. Genotoksičnost smo določili z merjenjem aktivacije SOS celičnega odgovora in preko njega povezano β -galaktozidazno aktivnostjo. SOS odziv se aktivira specifično s poškodbami DNK v celici (Černoša, 2005). Za ocenitev citotoksičnosti vzorcev merimo preživetje bakterij po tretiranju. Preživetje v negativni kontroli označimo za 100 %. Gostoto celic po izpostavitvi vzorcem primerjamo z gostoto celic v kontrolni raztopini (Hamer in sod., 2001; Wittekindt in sod., 2000).

Test smo izvedli po klasični metodi na mikrotitrskih ploščah po ISO standardu (ISO 13829, 2000).

3.2.2.1 Priprava bakterij *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

Dan pred poskusom smo pripravili bakterijsko kulturo. 20 mL 1x TGA medija smo dodali 70 μ L bakterijskega inokuluma in 20 μ L antibiotika ampicilina (založna koncentracija je bila 50 mg mL⁻¹), da so bakterije obdržale plazmid. Medij z bakterijskim inokulumom smo 20 ur inkubirali na 37 °C.

Bakterijsko kulturo smo naslednji dan redčili 1:10 s svežim 1x TGA medijem (2 mL bakterijske kulture in 18 mL 1x TGA medija). Nato smo jo približno 1,5 ure stresali v inkubatorju pri 37° C s hitrostjo 600 obratov / minuto. Po 1,5 ure smo izmerili gostoto

bakterij pri 600 nm (ang. Optical Density, OD 600). Ko smo dosegli OD vrednost približno 0,2, smo nadaljevali s poskusom, drugače pa smo bakterijsko raztopino reinkubirali, da je dosegla želeno optično gostoto. Bakterije so namreč morale biti v eksponencialni fazi rasti in pripravljeni za testiranje. Za slepo kontrolo smo uporabili 1x TGA medij.

TEST

Na mikrotitrsko ploščico smo nanesli slepo kontrolo, negativno kontrolo, pozitivno kontrolo in vzorce. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 4-nitrokinolin. Razpored razredčin je prikazan v prilogi. Spojine smo na mikrotitrski plošči testirali v enakih koncentracijah z metabolno aktivacijo ali brez nje. Za pozitivno kontrolo smo pri testu brez metabolne aktivacije uporabili 4-nitrokinolin (NQNO). Koncentracije na mikrotitrski plošči so bile 0,1; 0,2 in 0,3 mg L⁻¹. V testu z metabolno aktivacijo smo za pozitivno kontrolo uporabili benzo[a]piren (BaP), v koncentracijah 1 in 10 mg L⁻¹.

Slepa kontrola

Slepo kontrolo smo pripravili tako, da smo v Eppendorf epruveto odpipetirali 10 µL bidestilirane vode in ji dodali 90 µL 1x TGA medija.

Negativna kontrola

Za pripravo negativne kontrole smo v Eppendorf epruveti zmešali 10 µL bidestilirane vode in 90 µL suspenzije bakterij.

Pozitivna kontrola (4-nitrokinolin)

Za pripravo pozitivne kontrole smo 10 µL 4-nitrokinolina dodali 90 µL suspenzije bakterij.

Vzorec

Za pripravo vzorcev smo 10 µL razredčine posamezne spojine dodali 90 µl suspenzije bakterij.

Pri testu z metabolno aktivacijo (S9 mikrosomalna mešanica iz podganjih jeter) smo pripravili bakterijsko kulturo tako, da smo kulturo, gojeno preko noči, redčili 1:5 (4 mL bakterijske kulture in 16 mL 1x TGA gojišča), da smo z dodatkov svežega gojišča

omogočili namnožitev bakterij. Za poskus z metabolno aktivacijo smo mešanico S9 pripravili tako, da smo zmešali 200 µL MgCl₂-KCl, 150 µL glukoza-6-fosfata, 1 mL NADP in 5 mL PBS ter jo hranili na ledu. Ko je bakterijska kultura dosegla optično gostoto 0,2, smo S9 mešanici dodali še 3 mL bakterijske kulture in 1 mL S9 frakcije podganjih jeter. 90 mL tako pripravljene mešanice S9 smo nanesli v vsako luknjico na plošči A.

Slepa kontrola

Slepo kontrolo smo pripravili iz 10 µL bidestilirane vode in 90 µL 1x TGA medija.

Negativna kontrola

Negativno kontrolo smo pripravili tako, da smo 10 µL bidestilirane vode dodali 90 µL suspenzije bakterij z mešanico S9.

Pozitivna kontrola (benzo[a]piren - BaP)

Za pripravo pozitivne kontrole smo zmešali 10 µL BaP in 90 µL suspenzije bakterij z mešanico S9.

Vzorec

Za pripravo vzorcev smo zmešali 10 µL razredčine vsake spojine in ji dodali 90 µL suspenzije bakterij z mešanico S9.

Mikrotitrsko ploščo A smo po nanosu vzorcev pokrili s pokrovom, da smo preprečili izhlapevanje. Ploščo smo 2 uri inkubirali na 37° C na stresalniku pod kotom 45°, s čimer smo preprečili sedimentacijo. Proti koncu inkubacije smo pripravili drugo mikrotitrsko ploščo B. V posamezne luknjice na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali 270 µL svežega 1x TGA medija. Iz mikrotitrsko ploščo A smo prepipetirali po 30 µL vzorcev iz ustreznih luknjic v pripadajoče luknjice na mikrotitrski plošči B.

Mikrotitrsko ploščo B smo pokrili s pokrovom, da smo preprečili izhlapevanje in jo 2 uri inkubirali na 37° C na stresalniku s hitrostjo stresanja 150 obratov/minuto pod kotom 45°. Med inkubacijo smo si pripravili mikrotitrsko ploščo C ter v vsako jamico dali 120 µL B-pufra.

Iz mikrotitrsko ploščo B smo prenesli po $30 \mu\text{L}$ vzorca v ustrezone luknjice na plošči C. Nato smo v vsako luknjico dodali po $30 \mu\text{L}$ raztopine ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) in inkubirali mikrotitrsko ploščo na stresniku 20 minut na sobni temperaturi. Po 20 minutah smo v vsako luknjico dodali $120 \mu\text{L} \text{Na}_2\text{CO}_3$ in na ta način ustavili reakcijo. Na koncu smo izmerili absorbanco plošče B pri 600 nm in plošče C pri 420 nm .

3.2.3 Test na zarodkih rib (ang. Fish Embryo Test - FET)

3.2.3.1 Gojenje cebric

Cebrice (*Danio rerio*) gojimo v 80 L akvarijih in sicer v razmerju 2:1 samice:samci. Okvirna vrednost gostote rib je 1 cm ribe/1 L vode v akvariju (po nemškem standardu je okvirna vrednost 1 riba/1 L vode). Za pridobitev zadostne količine zdravih zarodkov so najbolj primerne ribe velikosti $\sim 3 \text{ cm}$ in starosti do dveh let. Temperatura prostora, kjer izvajamo poskuse, je $26 \pm 1^\circ\text{C}$, ribe so izpostavljene svetlobi od 8.00 do 20.00, torej 12:12 h. Ribe hranimo 2x na dan s suho hrano in 1x na dan z živimi rakci *Artemia salina*.

3.2.3.2 Priprava raztopin za FET

Za izvedbo FET moramo pripraviti »ISO vodo« (ISO 7346-3:1996), v kateri raztopimo testirane spojine. Sveže pripravljena »ISO voda« ima $\text{pH } 7,8 \pm 0,2$ in vsebnost CaCO_3 $150 - 175 \text{ mg L}^{-1}$. »ISO vodo« čez noč prepipujemo tako, da je količina raztopljenega kisika vsaj 90 % pri stalni pH vrednosti. Če je potrebno, popravimo pH vrednosti z dodatkom NaOH ali HCl .

3.2.3.3 Priprava raztopin za testiranje

Testne raztopine izbranih spojin in koncentracij pripravimo z redčenjem raztopine izhodne koncentracije. Izhodno raztopino izbrane raztopine smo pripravili s 24 urnim mešanjem z magnetnim mešalom. Za pregled kvarnega delovanja smo testirali nasičene raztopine (z izjemo soli diklofenaka), koncentracije katerih so podane v Preglednici 9, in decimalne razredčine do 10^{-4} . Za bolj natančno določitev parametrov, kot npr. LC_{50} , bi bilo potrebno narediti redčitvene korake s faktorjem 2,2.

3.2.3.4 Opis postopka FET

Zarodki cebric so na mikrotitrskih ploščah (24 jamic) posamično izpostavljeni različnim koncentracijam testirane spojine. Test se prične takoj po oploditvi jajčec in se nadaljuje 48 ur. Določanje letalnih, subletalnih in teratogenih učinkov poteka v točno določenih razmerah in se izvaja 24 in 48 ur po izpostavitvi zarodkov strupenim spojinam, ki so raztopljene v »ISO vodi«. Metoda sloni na najmanj petih različnih koncentracijah in njihovih kontrolah in z desetimi posameznimi zarodki na testirano koncentracijo. Vsaka spojina je testirana v desetih paralelkah v najmanj treh neodvisnih poskusih. Določa se odstotek letalnih, subletalnih in teratogenih učinkov. Poleg tega se na podlagi štirih letalnih učinkov v primerjavi s kontrolami izračuna letalne koncentracije LC₅₀, pri kateri preživi 50 % testiranih zarodkov, in sicer 24h – LC₅₀ in 48 – LC₅₀. Po potrebi izračunamo tudi NOEC (ang. No Observed Effect Concentration) in LOEC (ang. Lowest Observed Effect Concentration) vrednosti. Test se izvaja v dveh delih. Najprej naredimo preliminarni test in nato končnega.

Meritve kisika in pH

Na začetku in na koncu poskusa moramo pri kontroli in pri najvišji testni koncentraciji izmeriti koncentracijo kisika in pH. Vrednost pH naj bi bila med 6,8 in 8,4. Koncentracija kisika naj bi bila:

- Pred začetkom poskusa > 90 % ($\sim 7,4 \text{ mg L}^{-1}$)
- Med testom > 80 %
- Na koncu poskusa > 50 %

3.2.3.5 Testiranje izbranih zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov

Dan pred začetkom poskusa pričnemo s kisikom prepričevati »ISO vodo« in si pripravimo vse potrebno za poskus (steklovina, pipete, plošče, folije, vrečke...). Naslednji dan pripravimo razredčine testiranih spojin. Prižgemo termostatirano ploščo ob mikroskopu in lupi ter označimo plošče (4×6 luknjic) za poskus.

Uro pred začetkom poskusa oz. preden se prižgejo luči damo v akvarij past za lovjenje ribjih zarodkov (posoda in zelenje). Ob 9.00 poberemo past iz akvarija, zarodke pazljivo

prenesemo s pipeto na cedilo za ikre in jih nežno speremo z »ISO vodo« v srednje veliko kristalno posodo. Pod lupo izberemo zarodke, ki so oplojeni in primerni za poskus. Zdrave oplojene zarodke s pipeto nežno prenesemo v luknjice na mikrotitrskih ploščah, katere smo že prej napolnili s testno raztopino (2 mL / luknjico). Preostale zarodke vrnemo v akvarij.

Napolnjene mikrotitrske plošče prelepimo s folijo in jih damo v vrečke, nato jih shranimo v inkubatorju s primerno svetlogo in temperaturo. Po 24 in 48 urah pod mikroskopom opazujemo razvojne značajke (Preglednica 25).

Preglednica 25: Opazovani znaki razvoja zarodkov glede na čas izpostavljenosti zarodkov testni raztopini (letalni, ** subletalni, * teratogeni učinki).**

učinki	znaki	čas izpostavljenosti (h)				
		4	8	24	32	48
	N	normalno razvit zarodek				
***	Z	zakrknjenost (koagulacija)	+	+	+	+
**	E	epibolija (ni še delitev)		+	+	
**	O	ni oči			+	+
***	S	ni somit			+	+
*	P	ni spontanih premikov (normalno 2/60 s)			+	+
***	R	rep ni pritrjen na rumenjak			+	+
***	U	ni utripanja srca (normalno 45/20 s)			+	+
**	Kr	ni krvnega obtoka			+	+
**	B	ni barvanja (pigmentacija)				+
**	Ed	edem				+
*	Zr	zaostalost v razvoju (dopiši h)	+	+	+	+
*	Dr	deformiranost repa			+	+

Na koncu vsakega testa za vsako testirano koncentracijo spojine po 24 in 48 h izračunamo ter grafično prikažemo sledeče parametre:

- Število in odstotek letalnih, subletalnih in teratogenih učinkov
- Število udarcev srca na minuto (po 48 h)
- LC₅₀ po 24 in 48 urah.

3.3 IZRAČUNI IN STATISTIČNA OBDELAVA

3.3.1 *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test, ISO 10712

Inhibicijo celične rasti smo izračunali po enačbi (1). Iz dobljenih vrednosti smo narisali graf inhibicije rasti (%) v odvisnosti od koncentracije testirane spojine (mg L^{-1}), iz katere smo odčitali EC_{50} .

$$I = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_0} \times 100 \quad \dots(1)$$

I: inhibicija celične rasti, izražena v %

B_n : izmerjena absorbanca za posamezno razredčino na koncu inkubacije

B_c : izmerjena absorbanca kontrolne raztopine na koncu inkubacije

B_0 : izmerjena absorbanca ob času t_0

3.3.2 Test SOS/umu

Izmerjenim vrednostim pri 600 in 420 nm smo odšteli vrednosti za slepo kontrolo in nato po spodaj navedenih enačbah 2, 3 in 4 izračunali induksijsko razmerje za posamezne vzorce.

Biomasni faktor (Bf, določitev citotoksičnosti):

$$G = \frac{OD_{600}(\text{vzorec})}{OD_{600}(\text{kontrola})} \quad \dots(2)$$

Aktivnost β-galaktozidaze (U) v relativnih enotah:

$$U = \frac{OD_{420}(\text{vzorec})}{OD_{600}(\text{vzorec})} \quad \dots(3)$$

Indukcijsko razmerje (IR, določitev genotoksičnosti):

$$IR = \frac{1}{G} \times \frac{OD_{420}(vzorec)}{OD_{420}(kontrola)} \quad \dots(4)$$

3.3.3 Testi na zarodkih rib

3.3.3.1 Statistični izračuni LC₅₀ po 24 in 48 urah

Za računanje LC₅₀ smo uporabili program GraphPad Prism, Prism 5 for Windows. Najprej smo vrednosti x-osi (koncentracije testirane zdravilne učinkovine oz. metabolita) transformirali v logaritemske. Iz transformacije podatkov naredimo x-y analizo in sicer nelinearno regresijo (ang. curve fit). Dobimo graf odgovora (smrtnosti) v odvisnosti od koncentracije testirane spojine – variabilna krivulja (ang. variable slope). Pri večjih koncentracijah testne spojine dobimo manjši odgovor (smrtnost). Če krivulja ni logaritemska, moramo spremeniti nastavitev programa (npr. določimo zgornjo limito – smrtnost je lahko največ 100 %). Rezultate podamo v obliki grafov, kjer ločeno grafično obdelamo podatke za dobo 24 in 48 ur.

4 REZULTATI

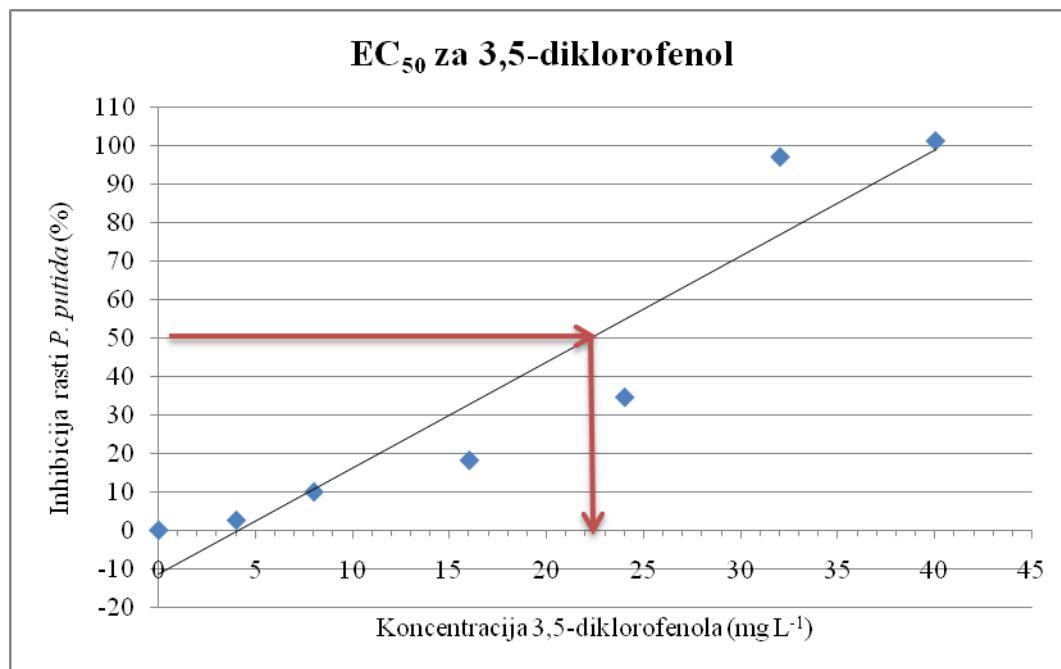
4.1 *PSEUDOMONAS PUTIDA* RASTNI INHIBICIJSKI TEST (ISO 10712)

Preiskovanje smo začeli s preverjanjem delovanja sistema z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom. Vsaki razredčini smo izmerili absorbanco pri 436 nm in glede na koncentracijo vsake razredčine izračunali procent inhibicije rasti. Rezultati so zbrani v Preglednici 26. Pri vseh 4 ponovitvah pozitivne kontrole je vidna rast. Slika 2 prikazuje graf s procentnim deležem inhibicije rasti *P. putida* v odvisnosti od koncentracije spojine. Iz grafa smo pri vrednosti EC₅₀ na x-osi odčitali koncentracijo 22 mg L⁻¹, kjer je referenčna spojina inhibirala rast 50 % populacije bakterij.

Od drugih testiranih zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov smo zaznali inhibicijo rasti le pri klofibrinski kislini in akridinu. Absorbanco in procent inhibicije rasti smo določili na enak način kot pri referenčni spojini. Podatki za klofibrinsko kislino so zbrani v Preglednici 27, za akridin pa v Preglednici 28. Iz grafa, ki smo ga narisali za klofibrinsko kislino (Slika 3), smo določili, da je EC₅₀ med koncentracijama 72,9 in 87,5 mg L⁻¹. Iz grafa za akridin (Slika 4) je razvidno, da tudi pri nasičeni raztopini (koncentracija je 56,1 mg L⁻¹) nismo dosegli 100 % inhibicije rasti, zato EC₅₀ nismo mogli določiti in tudi točk na grafu nismo povezali med sabo, da bi prikazovale odvisnost odstotka inhibicije od koncentracije raztopine.

Preglednica 26: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan procent inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa za 3,5-diklorofenol na bakteriji *Pseudomonas putida*.

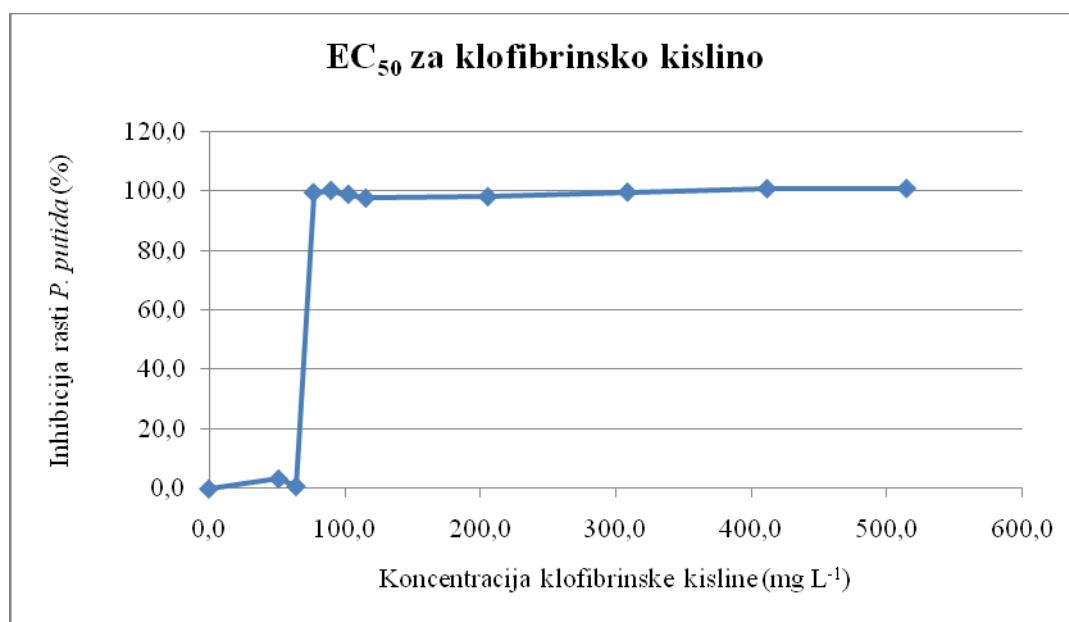
x-kratna raztopina	A (436 nm)	c (mg L^{-1})	I (%)
100	0,0016174	40	101,0
80	0,073746	32	96,9
60	1,1694	24	34,5
40	1,4567	16	18,1
20	1,6008	8	9,9
10	1,7299	4	2,6
0	1,7752	0	0



Slika 2: Odvisnost inhibicije rasti *Pseudomonas putida* od koncentracije za 3,5-diklorofenol (narisan je odčitek EC₅₀).

Preglednica 27: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan odstotek inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa *P. putida* za klofibrinsko kislino.

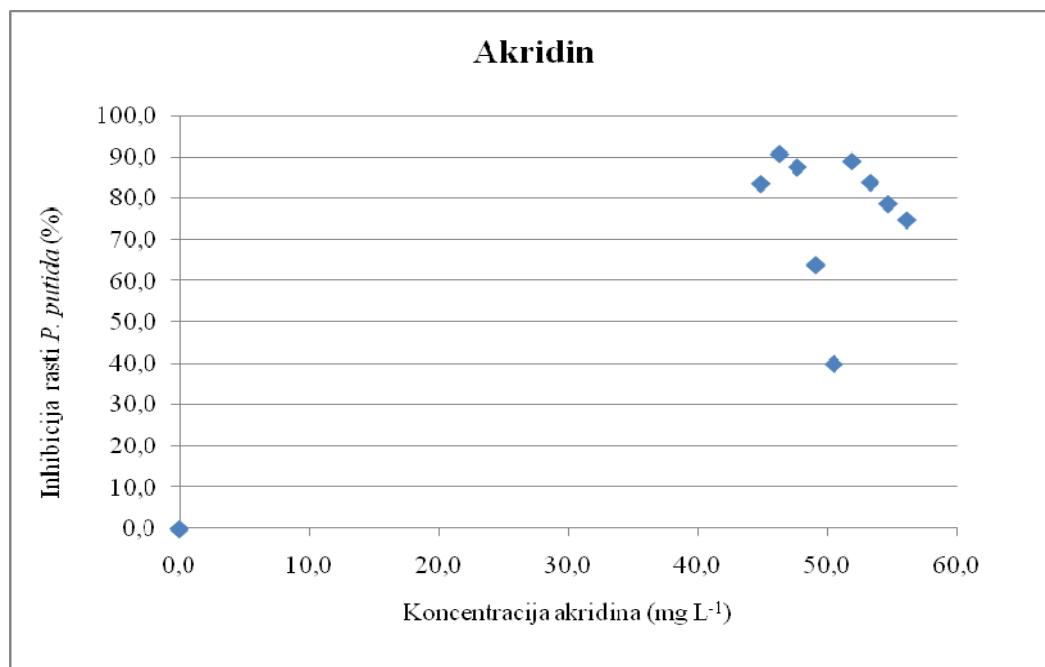
x-kratna raztopina	A (436 nm)	c (mg L ⁻¹)	I (%)
100	0,0062408	514,8	100,9
80	0,0074921	411,8	100,8
60	0,025513	308,9	99,7
40	0,049515	205,9	98,1
22,5	0,057281	115,8	97,6
20	0,036972	103,0	98,9
17,5	0,016525	90,1	100,2
15	0,028091	77,2	99,5
12,5	1,6168	64,4	0,8
10	1,5506	51,5	3,3
0	1,6035	0,0	0,0



Slika 3: Odvisnost inhibicije rasti *Pseudomonas putida* od koncentracije klofibrinske kisline, kjer smo določili preskok v koncentraciji klofibrinske kisline in s tem inhibicijo rasti *P. putida*.

Preglednica 28: Rezultati (absorbanca, koncentracija in izračunan odstotek inhibicije rasti) rastnega inhibicijskega testa *P. putida* za akridin.

x-kratna raztopina	A (436 nm)	c (mg L^{-1})	I (%)
100	0,68776	56,1	74,9
97,5	0,58377	54,7	78,8
95	0,44615	53,3	84,0
92,5	0,31042	51,9	89,1
90	1,61575	50,5	40,0
87,5	0,97804	49,1	64,0
85	0,34802	47,7	87,7
82,5	0,26283	46,3	90,9
80	0,45395	44,9	83,7
0	2,6797	0,0	0



Slika 4: Odvisnost inhibicije rasti *Pseudomonas putida* od koncentracije akridina.

4.1.1 Vpliv delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v testni raztopini in v raztopini referenčne spojine 3,5-diklorofenolu s hrnilno juho na stresalniku

Rezultati za redčitve 3,5-diklorofenola v dveh različnih gojiščih so zbrani v Preglednici 29. Vsaka redčitev je bila zaradi indikatorja različno obarvana, kot prikazuje Preglednica 29. Izmerili smo tudi absorbance pri 436 nm (Preglednica 30). Vrednosti absorbance, kjer smo za gojišče uporabili hrnilno juho, so previsoke, zato EC₅₀ nismo mogli izračunati. Tudi obarvanost raztopin v prisotnosti indikatorja ni bila ustrezna (Preglednica 29), saj raztopine niso bile rdeče. Pri kontrolah, kjer smo za gojišče uporabili testno raztopino, raztopini po koncu poskusa nista bili rdeče obarvani, kar pomeni, da indikator v razmerah stresanja ni deloval.

Preglednica 29: Rezultati (pet ponovitev poskusa rasti in obarvanost) vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v gojišču s hrnilno juho oziroma s testno raztopino (samo pri zadnjih dveh vrsticah) pri pogojih stresanja. (+ ... pozitivna rast *P. putida*, - ... brez rasti bakterije *P. putida*).

	DCP					obarvanost
Redčitve	1	2	3	4	5	
100-krat	-	-	-	-	-	/
80-krat	+	+	+	+	+	rumena
60-krat	+	+	+	+	+	rumeno-oranžna
40-krat	+	+	+	+	+	oranžna
20-krat	+	+	+	+	+	oranžna
10-krat	+	+	+	+	+	oranžna
K _{BHI} + bakterija + TTC	+	+	+			oranžna
K _{TR +TTC +} bakterija	+	+	+	/	/	/
K _{TR +TTC}	-	-	-	/	/	/

Preglednica 30: Rezultati (absorbanca in koncentracija DCP za posamezne razredčine) vpliva delovanja indikatorja 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorida (TTC) v mediju z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v gojišču s hrnilno juho oziroma s testno raztopino (samo pri zadnjih dveh vrsticah) pri pogojih stresanja bakterije *P. putida*.

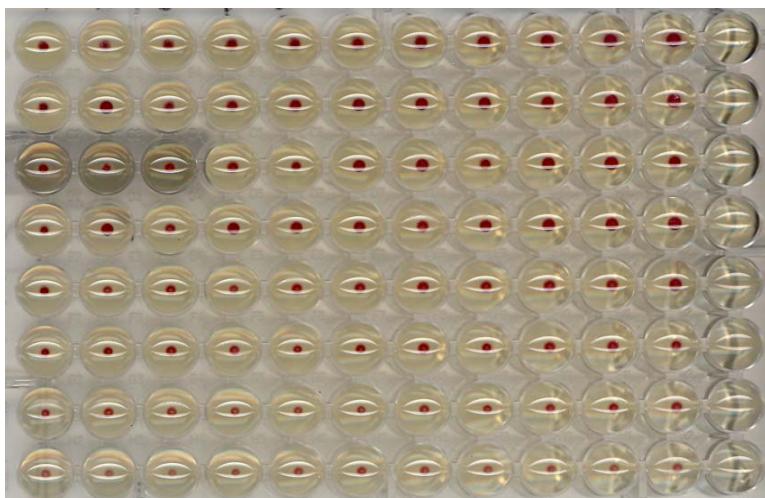
x-kratna raztopina	A (436 nm)	c DCP (mg L ⁻¹)
100x	0,031281	40
80x	2,588	32
60x	2,734	24
40x	2,9632	16
20x	3,3292	8
10x	3,6507	4
K _{BHI} + bakterija + TTC	3,3529	0
K _{TR} +TTC + bakterija	1,6063	0
K _{TR} +TTC	0,002564	0

4.2 *PSEUDOMONAS PUTIDA* RASTNI INHIBICIJSKI TEST NA MIKROTITRSKIH PLOŠČAH

4.2.1 Test za referenčno spojino 3,5-diklorofenol

Pri ploščah z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v mediju s testno raztopino ni bilo rasti *P. putida*. Le na mikrotitrski plošči, ki smo jo inkubirali pri 28 °C, smo opazili majhne bele pelete, kar pa vseeno ne moremo šteti kot pozitiven rezultat. Rast *P. putida* je bila na plošči, kjer smo referenčno spojino 3,5-diklorofenol testirali v mediju s hrnilno juho (Slika 5). V stolpcu 12 ni rdečih peletov, kar pomeni negativen rezultat (ni rasti). Sliko 5 smo obdelali z računalniškim programom Microplate analyser software, rezultat prikazuje Preglednica 31. V Preglednici za izračun EC₅₀ upoštevamo vrstico 50 % in sicer samo vrednosti, kjer je komentar »v redu«. Povprečje »v redu« vrednosti je bilo 0,6705. Narisali smo graf v poskusu uporabljenih koncentracij 3,5-diklorofenola v mg L⁻¹ v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program Microplate analyser

software (Slika 6). V enačbo na Sliki 6 smo namesto vrednosti x vstavili vrednost 0,6705 in dobili EC₅₀ vrednost: 14,85 mg L⁻¹.

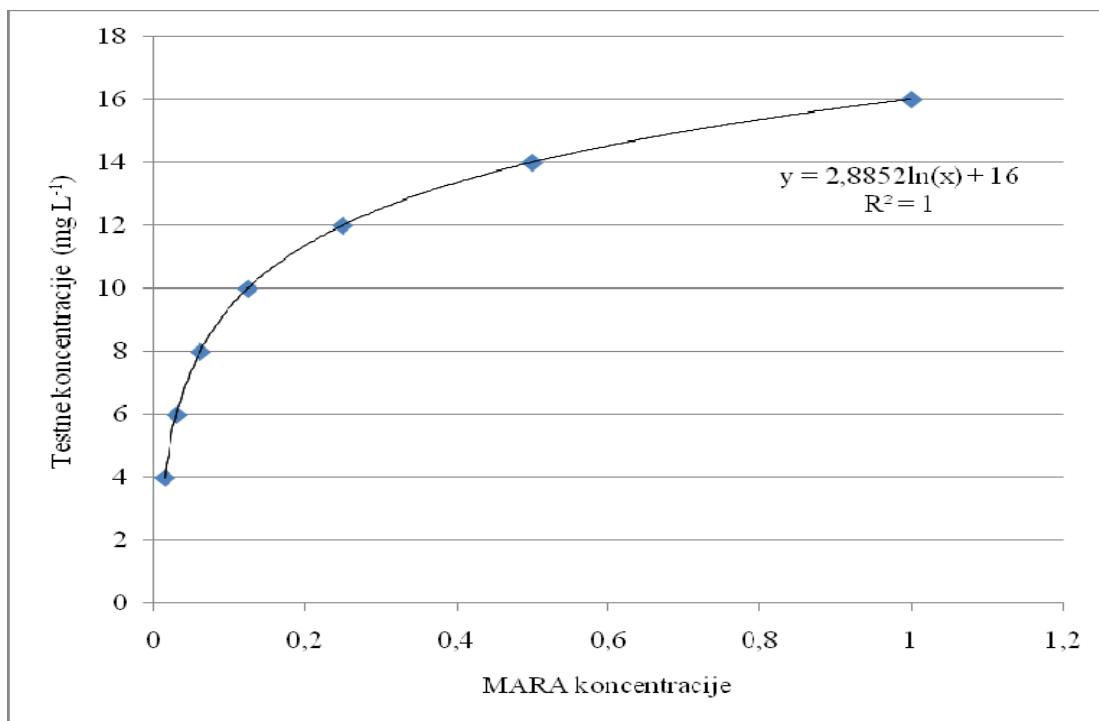


Slika 5: Rast *P. putida* na mikrotitrski plošči z referenčno spojino 3,5-diklorofenolom v mediju s hrnilno juho, kjer rdeči peleti pomenijo pozitiven rezultat (rast *P. putida*).

Preglednica 31: Rezultati programa Microplate analyser software na podlagi obdelave mikrotitrskih ploščic (Slika 5) za preučevanje vpliva inhibicije rasti z referenčno spojino 3,5-diklorofenol na bakterijo *P. putida*.

Komentar	visoka	visoka	v redu	v redu	v redu	v redu	visoka						
RelP	94	88	86	84	84	85	87	89	87	90	89	97	88
MTC	0,7474	0,5625	0,4965	0,4569	0,4633	0,4796	0,5396	0,5743	0,5434	0,6156	0,5987	0,8526	0,5625
50%	1,057	0,7955	0,7022	0,6462	0,6552	0,6783	0,7631	0,8123	0,7684	0,8706	0,8467	1,206	0,7955
MIC	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>

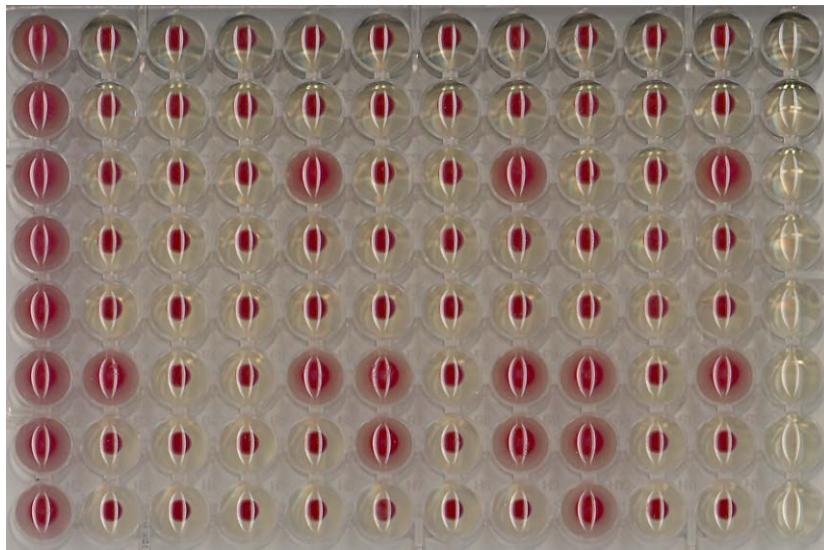
V Preglednici 31 v prvi vrstici program komentira rezultate (komentar), RelP je relativna rast v primerjavi z vrstico A, MTC vrednost predstavlja relativno rast, 50 % pomeni 50 % inhibicija rasti in MIC je koncentracija 100 % inhibicije rasti.



Slika 6: Graf odvisnosti testnih koncentracij v našem poskusu v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program za referenčno spojino 3,5-diklorofenol na bakteriji *P. putida*.

4.2.2 Test za klofibrinsko kislino

Slika 7 prikazuje rast *P. putida* na mikrotitrski plošči, kjer smo testirali inhibicijo s klofibrinsko kislino v gojišču s hranilno juho. Stolpec 12 je negativna kontrola, zato tam ni rdečih peletov. Sliko 7 smo obdelali z računalniškim programom Microplate analyser software in dobili Preglednico 32. V Preglednici 32 smo uporabili edino ustrezno vrednost 50 % inhibicije rasti: 0,4931. Narisali smo graf v poskusu uporabljenih koncentracij klofibrinske kisline v mg L⁻¹ v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program Microplate analyser software (Slika 8). V enačbo na Sliki 8 smo namesto vrednosti x vstavili vrednost 0,4931 in dobili EC₅₀ vrednost: 174,33 mg L⁻¹.

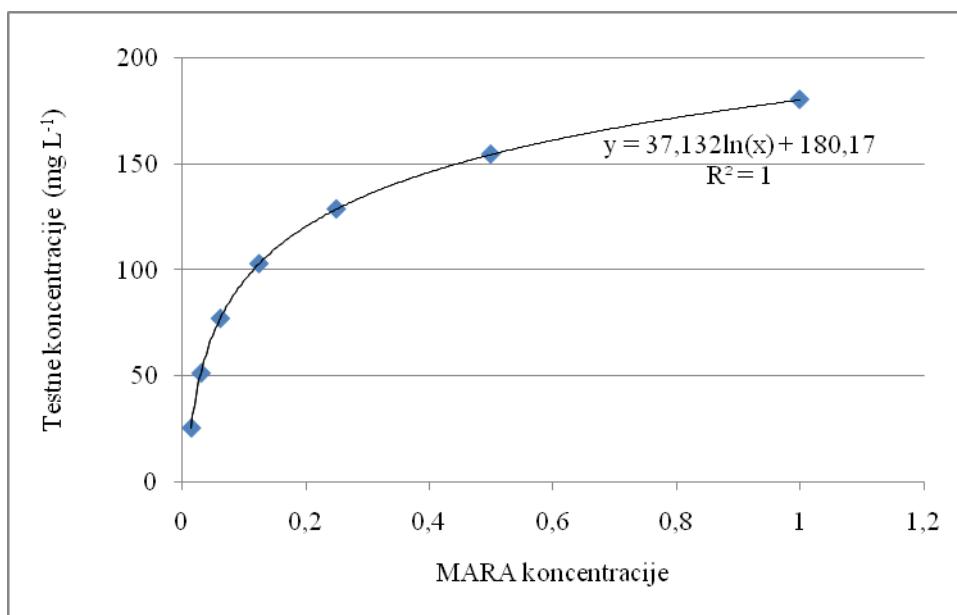


Slika 7: Rast *P. putida* na mikrotitrski plošči s klofibrinsko kislino v gojišču s hranilno juho (rdeči peleti pomenijo pozitiven rezultat - rast *P. putida*).

Preglednica 32: Rezultati programa Microplate analyser software na podlagi obdelave mikrotitrskih ploščic (Slika 7) za preučevanje vpliva inhibicije rasti s klofibrinsko kislino na bakterijo *P. putida*.

komentar	visoka	previsoka	visoka	visoka	v redu	visoka							
RelP	100	97	98	98	99	98	98	99	100	99	100	78	97
MTC	0,9862	0,8586	0,8888	0,9138	0,9659	0,895	0,9266	0,9593	2	0,9659	0,9931	0,3487	0,8706
50%	1,395	1,214	1,257	1,292	1,366	1,266	1,31	1,357	2	1,366	1,404	0,4931	1,231
MIC	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>	>>

V Preglednici 32 v prvi vrstici program komentira rezultate (komentar), RelP je relativna rast v primerjavi z vrstico A, MTC vrednost predstavlja relativno rast, 50 % pomeni 50 % inhibicija rasti in MIC je koncentracija 100 % inhibicije rasti.



Slika 8: Graf odvisnosti koncentracij uporabljenih v našem poskusu v odvisnosti od koncentracij, ki jih uporablja računalniški program za klofibrinsko kislino na bakteriji *P. putida*.

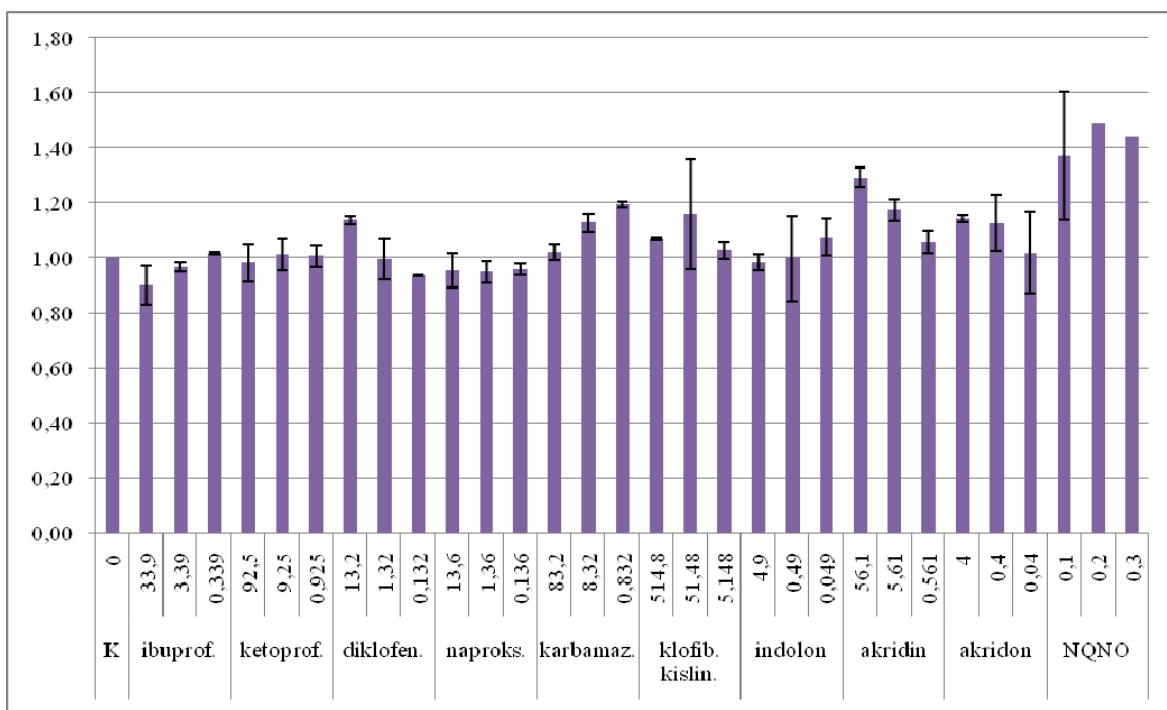
4.2.3 Vpliv prepihovanja testne raztopine (TR) na rast *Pseudomonas putida*

S prepihovanjem TR smo ugotovili, da kisik ni bil omejujoči dejavnik za rast *P. putida*. To se je pokazalo na vseh treh mikrotitrskih ploščah, to je v obeh komorah pri 23 °C in 28 °C ter na mikrotitrski plošči, ki smo jo postavili na grelno ploščo z 28 °C.

4.3 TEST SOS/UMU

4.3.1 Test brez metabolne aktivacije na bakteriji *Salmonella typhimurium*

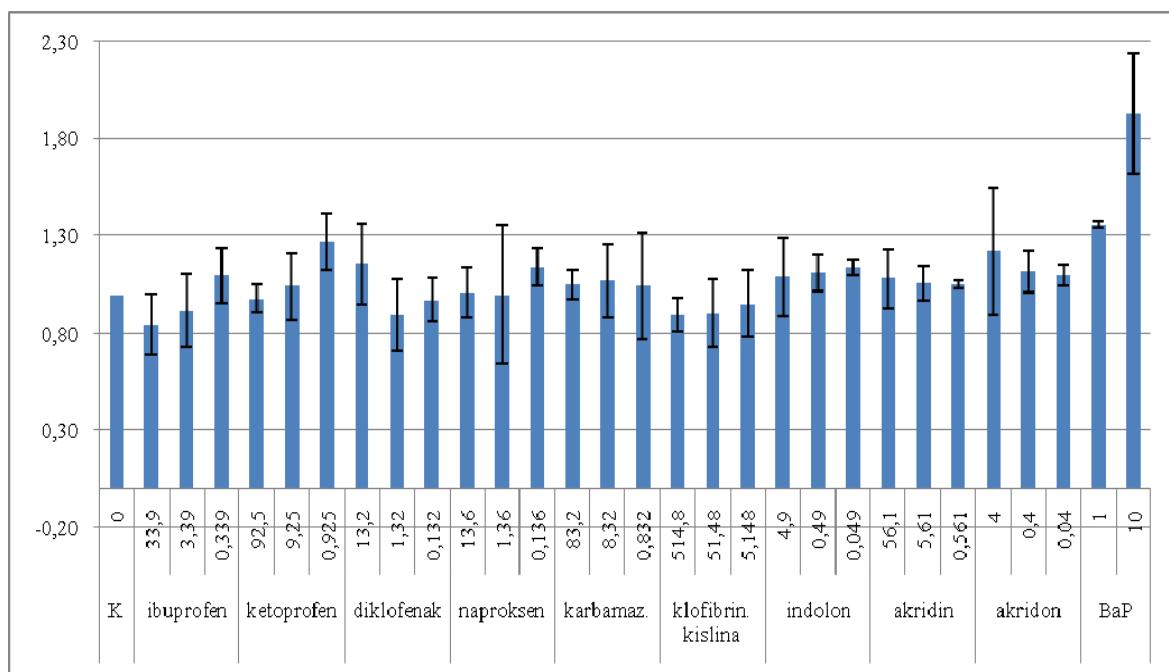
Rezultati testa genotoksičnosti so pokazali, da nobena izmed testiranih spojin ni bila genotoksična. Aktivnost β-galaktozidaze vzorcev ni bila nikjer dvakrat višja od aktivnosti β-galaktozidaze kontrole. Tudi pozitivna kontrola ni dala pozitivnega rezultata. Prav tako noben vzorec ni bil citotoksičen, saj so bile vrednosti biomasnega faktorja prenizke (glej priloge). Indukcijsko razmerje (Slika 9) kaže, da nobena zdravilna učinkovina oz. metabolit niso bili genotoksični, tudi pozitivna kontrola ne, kjer bi morali dobiti pozitiven rezultat.



Slika 9: Indukcijsko razmerje (genotoksičnost) SOS testa brez metabolne aktivacije na bakteriji *S. typhimurium* (rezultat prikazuje povprečja treh paralelki v dveh poskusih).

4.3.2 Test z metabolno aktivacijo na bakteriji *Salmonella typhimurium*

Pri metabolni aktivaciji se citotoksičnost, aktivnost β -galaktozidaze in genotoksičnost vzorcev niso bistveno razlikovali od istovrstnih parametrov kontrole (glej prilogo). Le pri pozitivni kontroli pri koncentraciji 10 mg L^{-1} smo dobili pozitiven rezultat za inducijsko razmerje - genotoksičnost, kot je prikazano na Sliki 10.

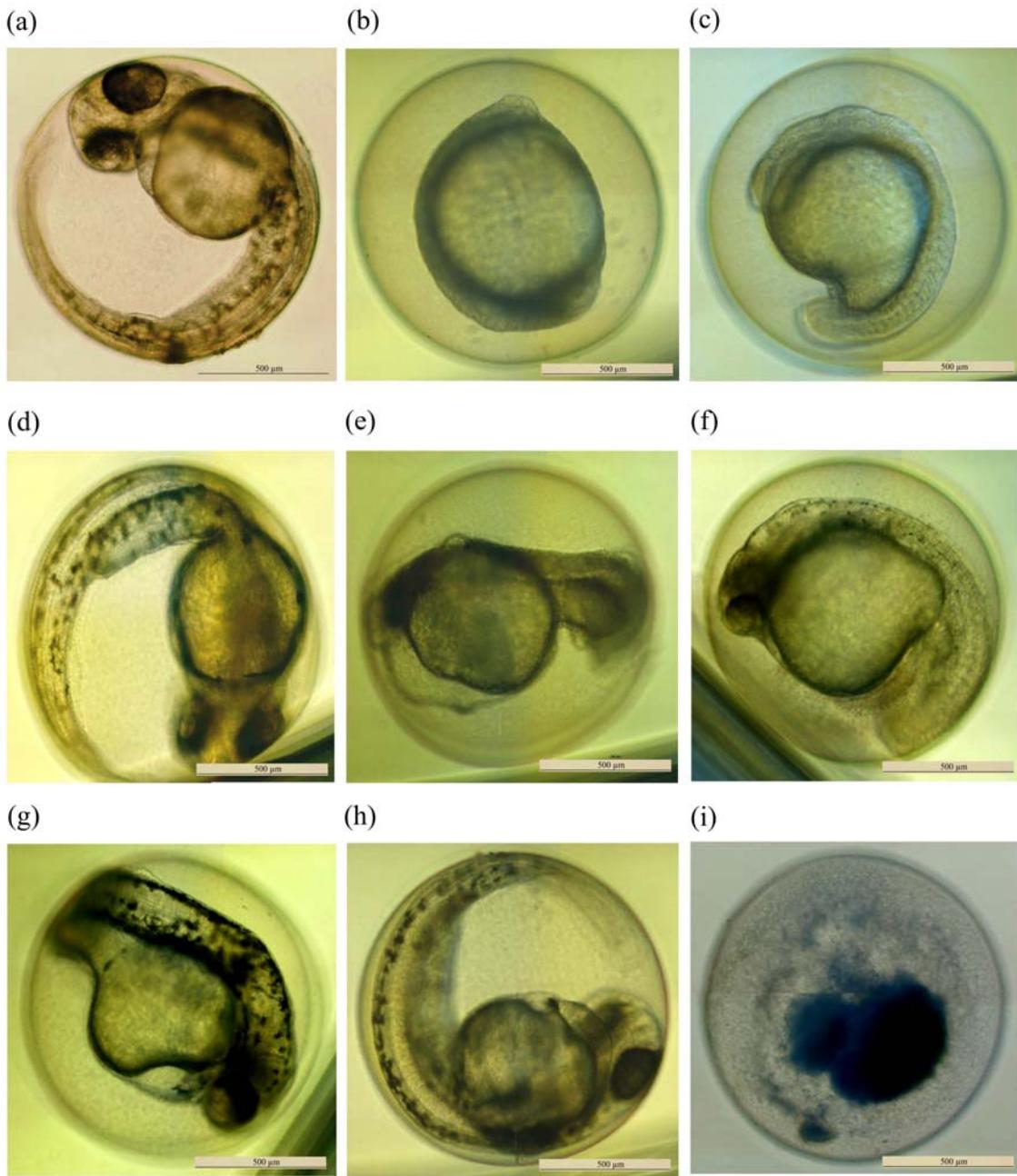


Slika 10: Indukcijsko razmerje (genotoksičnost) SOS testa z metabolno aktivacijo na bakteriji *S. typhimurium* (rezultat prikazuje povprečja treh paralelk v treh poskusih).

4.4 TEST NA ZARODKIH RIB (ANG. FISH EMBRYO TEST - FET)

4.4.1 Mikroskopiranje in določanje razvojnih znakov

Zarodkom cebrič smo po 24 in 48 urah določili razvojne znake, kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Na Sliki 11 vidimo normalen zarodek in zarodke s tipičnimi nenormalnimi razvojnimi znaki. Vsaka posamezna podoba zarodka ima v desnem spodnjem kotu 500 µm merilo, ki služi za primerjavo dejanske velikosti zarodkov.



Slika 11: Zarodki ribe cebrice: (a) 48 ur star normalno razvit zarodek, 24 ur stara, v razvoju zaostala zarodka (b) in (c), 48 ur star normalno razvit zarodek (d), 48 ur stara, v razvoju zaostala zarodka (e) in (f), 48 ur star zarodek, brez utripa srca, krvnega obtoka in z edemom zarodek (g), 48 ur star zarodek, brez krvnega obtoka in z edemom (h), mrtev (zakrknjen) zarodek (i).

Preglednica 33: Subletalni in teratogeni učinki zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov na zarodkih *Danio rerio*.

oznaka	spojina	subletalni učinki			teratogeni učinki			
		24 h	48 h	c (mg L ⁻¹)	24 h	c (mg L ⁻¹)	48 h	c (mg L ⁻¹)
A	diklofenak	-	+	13,2	+	13,2	+	13,2
B	ibuprofen	-	-		+++	33,9	+++	33,9
C	indolon	-	+	4,9	++	4,9; 0,49	-	
D	karbamazepin	-	+	0,832	-		-	
E	ketoprofen	-	-		++	92,5	+	92,5
F	naproksen	-	-		-		-	
G	akridin	-	-		-		-	
H	akridon	-	++	4,0	++	4,0	+++	4,0
I	klofibrinska kislina	-	-		-		-	

Legenda: rezultati predstavljajo povprečje 3 oz. 4 poskusov:

+ opazili učinke v enem poskusu,

++ opazili učinek v vsaj dveh poskusih,

+++ opazili učinek vsaj v treh poskusih, - brez učinka

Določanje odstotka smrtnosti pri zarodkih za izbrane spojine

Vpliv referenčne spojine (3,4-dikloroanilin) na zarodke je prikazan na Sliki 12 in je podan kot odstotek smrtnosti v odvisnosti od koncentracije v mg L^{-1} . Rezultati poskusov za izbrane spojine so na Slikah 13, 14, 15. Na Sliki 13 so rezultati za diklofenak, ibuprofen in indolon. Na Sliki 14 so rezultati za karbamezepin, ketoprofen in naproksen, ter na Sliki 15 za akridin, akridon in klofibrinsko kislino.

Diklofenak (spojina A) je pri najvišji koncentraciji povzročil približno 40 % smrtnost zarodkov. Če upoštevamo še subletalne in teratogene učinke (Preglednica 33), lahko za diklofenak rečemo, da se redko pojavijo minimalni subletalni učinki po 48 urah, minimalni teratogeni učinki pa se pojavijo že po 24 urah. Pri subletalnih učinkih je šlo za edem, pri teratogenih učinkih po 24 urah so imeli zarodki deformiran rep, po 48 urah pa smo jih označili kot zarodke zaostale v razvoju (Slika 11).

Ibuprofen (spojina B) pri visokih koncentracijah povzroča znatne teratogene učinke po 24 in 48 urah, čeprav po 24 urah še ni bilo opaziti visokih letalnih učinkov (Preglednica 33). Pri teratogenih učinkih smo po 24 urah opazili zaostalost v razvoju. Po 48 urah je večina teh zarodkov pomrla, drugi pa so bili zaostali. Smrtnost je bila po 24 urah le približno 40 %, po 48 urah pa približno 80 %.

Indolon (spojina C) je metabolit diklofenaka. Pri največji topnosti (koncentracija $4,9 \text{ mg L}^{-1}$) je po 24 urah povzročil približno 70 % smrtnost (Slika 13), po 48 urah pa približno 80 % smrtnost. Po 48 urah smo zaznali majhne subletalne učinke na zarodkih (Preglednica 33), kjer je šlo za zmanjšanje krvnega obtoka in v enem primeru za edem (Slika 11). Po 24 urah smo opazili tudi nekaj teratogenih učinkov, ki jih po 48 urah ni bilo več, saj so bili zarodki zaostali v razvoju in so po 48 urah poginili.

Karbamazepin (spojina D) je zdravilo proti epilepsiji. Pri najvišji koncentraciji je povzročil približno 40 % smrtnost pri zarodkih. Teratogenih učinkov ni imel, subletalne pa smo opazili po 48 urah pri drugi decimalni razredčini (Preglednica 33). V enem primeru je šlo za odsotnost krvnega obtoka, v drugem pa še za edem.

Naproksen (spojina F) je povzročil pri nasičeni raztopini približno 30 % smrtnost. Subletalnih in teratogenih učinkov nismo opazili (Preglednica 33).

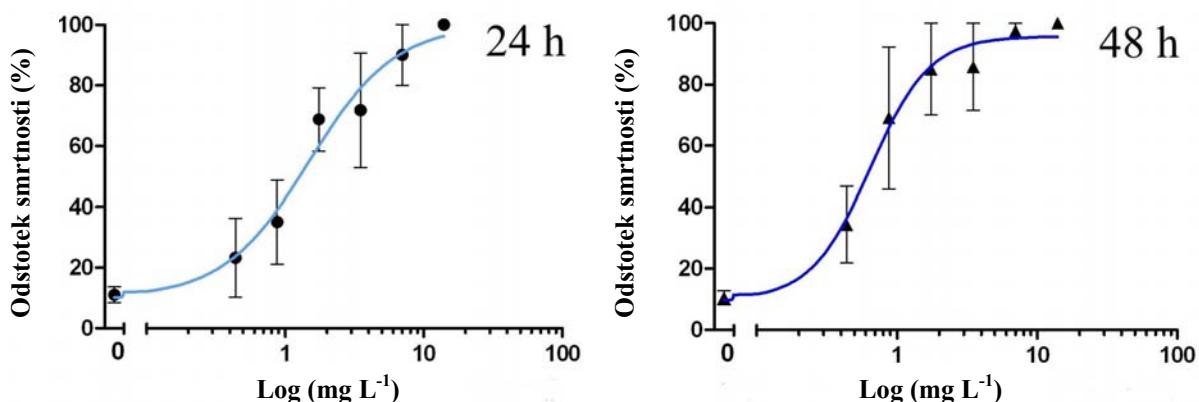
Ketoprofen (spojina E) ni povzročil subletalnih učinkov, je pa povzročil teratogene po 24 in 48 urah (Preglednica 33). Zarodki so zaostali v razvoju, po 48 urah jih je polovica pomrla, druga polovica pa je še vedno zaostajala v razvoju.

Naproksen (spojina F) v testiranih koncentracijah ni kazal statistično značilno povečane smrtnosti zarodkov rib (Slika 14).

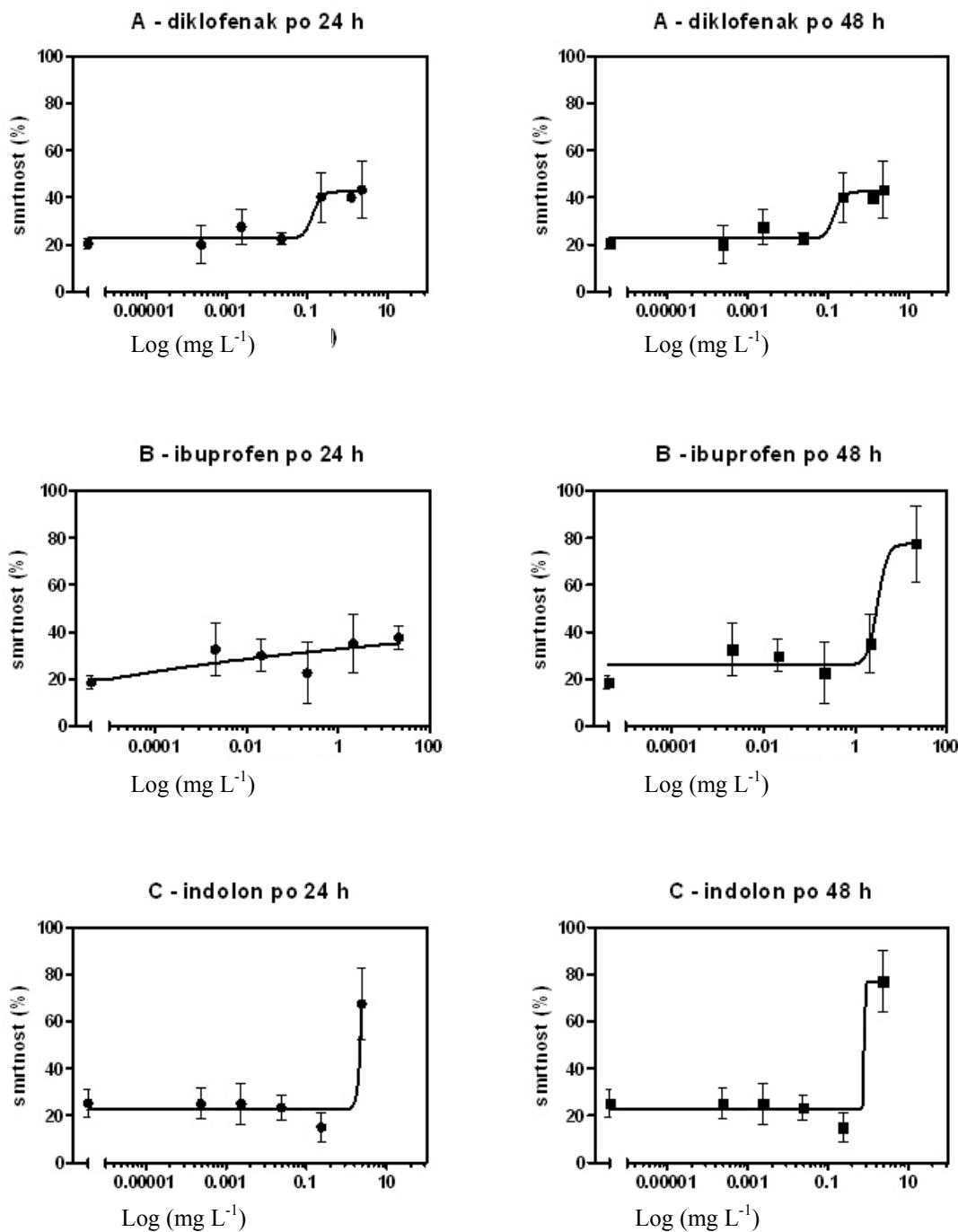
Akridin (spojina G) je v koncentraciji nasičene raztopine povzročil smrt 100 % zarodkov, vendar subletalnih in teratogenih učinkov ni imel (Preglednica 33).

Akridon (spojina H) je metabolit akridina. Pri akridonu je zanimivo to, da je kljub nizki smrtnosti, ki jo je povzročil (pod 30 %), kazal visoke odstotke subletalnih in teratogenih učinkov. Po 24 urah smo zaznali približno 20 % smrtnost zarodkov. Po 24 urah ni povzročil subletalnih učinkov, teratogeni učinki pa so bili kar znatni. Podobne rezultate je kazal ibuprofen (spojina B). Akridon je v visokih koncentracijah po 48 urah povzročil znatne subletalne učinke ter tudi teratogene po 24 in 48 urah (Preglednica 33). Pri subletalnih učinkih smo opazili odsotnost krvnega obtoka, barvanja in edem (Slika 11). Omenjene subletalne učinke smo po 48 urah opazili tako pri nekaterih zarodkih, ki so bili po 24 urah zaostali v razvoju, kot pri drugih zarodkih, ki so bili po 24 urah normalno razviti. Pri teratogenih učinkih so bili zarodki zaostali v razvoju, nekaj pa jih je imelo deformiran rep. Teratogeni učinki so v času od 24 do 48 ur skokovito narasli (od 30-60 %).

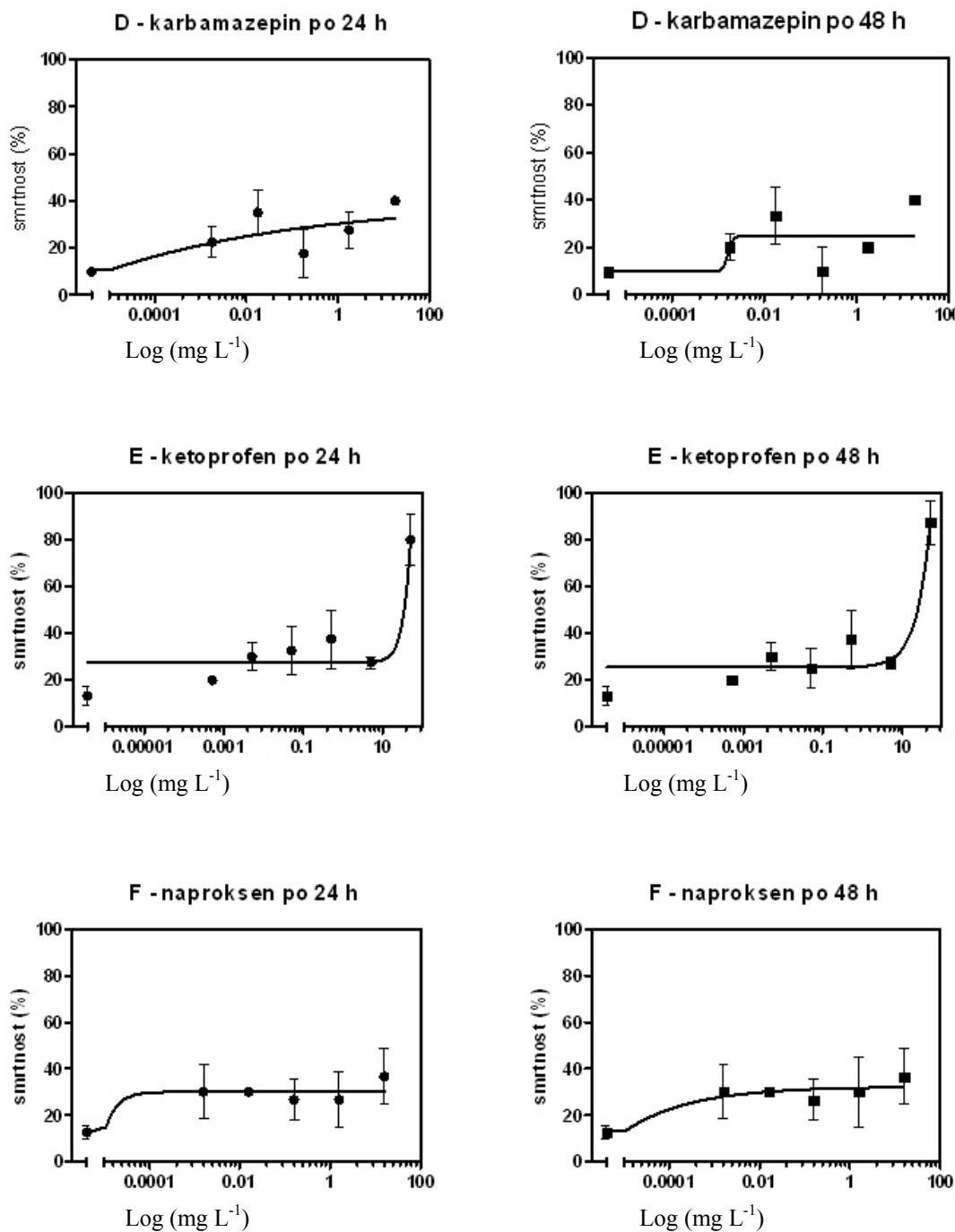
Klofibrinska kislina (spojina I) je metabolit lipidnega regulatorja in na zarodkih ni povzročala subletalnih in teratogenih učinkov (Preglednica 33).



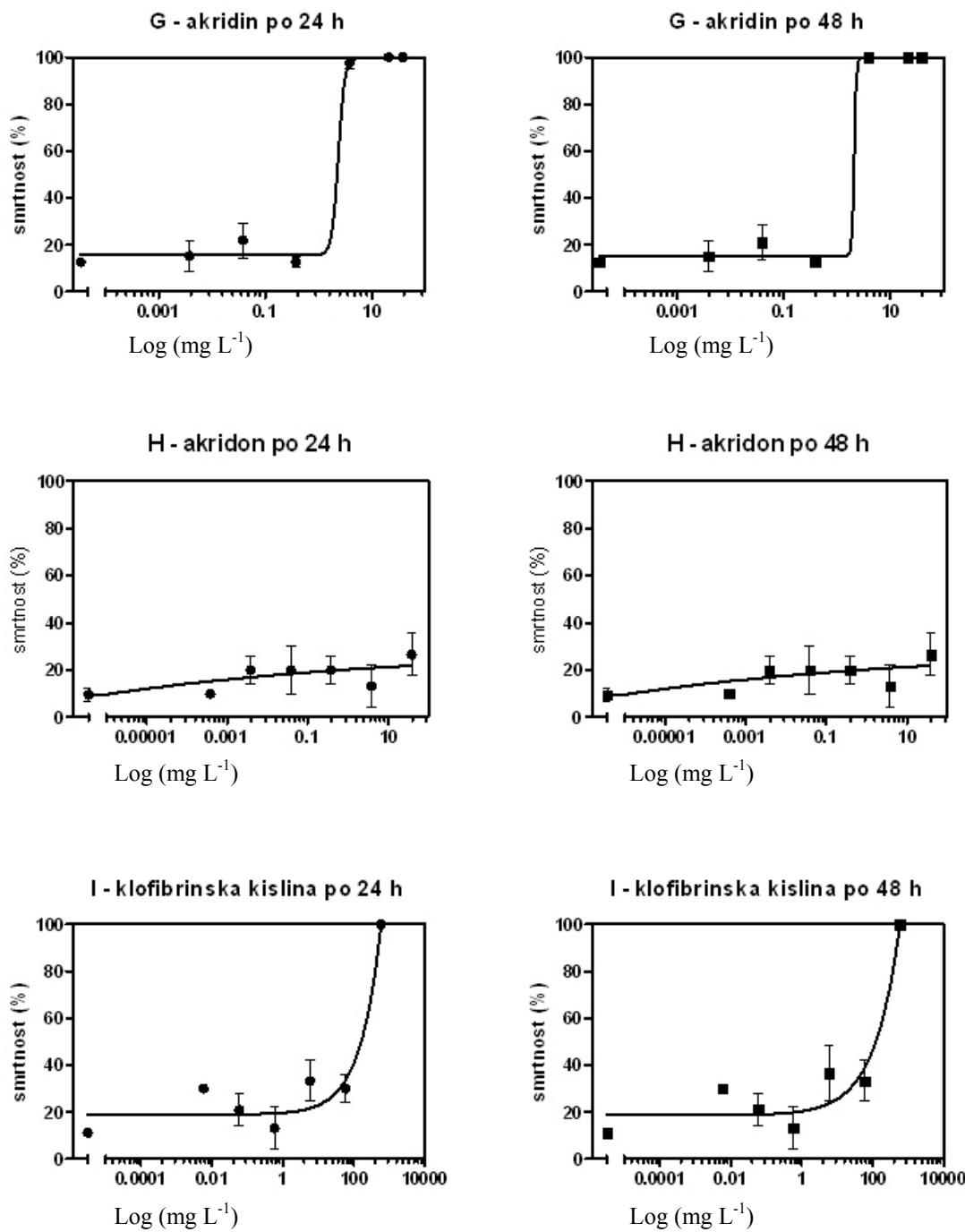
Slika 12: Krivulji poteka smrtnosti zarodkov *Danio rerio* po izpostavitvi referenčni spojni 3,4-dikloroanilinu.



Slika 13: Odstotek smrtnosti zarodkov *Danio rerio* v odvisnosti od koncentracije spojine za diklofenak (A), ibuprofen (B) in indolon (C), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).



Slika 14: Odstotek smrtnosti zarodkov *Danio rerio* v odvisnosti od koncentracije spojine za karbamazepin (D), ketoprofen (E) in naproksen (F), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).



Slika 15: Odstotek smrtnosti zarodkov *Danio rerio* v odvisnosti od koncentracije spojine za akridin (G), akridon (H) in klofibrinsko kislino (I), (levo: smrtnost po 24 h, desno: smrtnost po 48 h).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test

5.1.1.1 *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test v stekleničkah (ISO 10712)

Po protokolu (ISO 10712) smo z referenčno spojino 3,5-diklorofenol najprej preverili delovanje bakterije. Protokol predvideva EC₅₀ med 10 in 30 mg L⁻¹. V našem testu smo dobili EC₅₀ 22 mg L⁻¹ (Slika 2), kar ustreza ISO standardu. S tem poskusom smo potrdili, da je izbrana bakterija primerna za to vrsto poskusa in da so rezultati za druge testirane spojine sprejemljivi.

Inhibicija rasti *Pseudomonas putida* je bila vidna le v primeru klofibrinske kislina (Preglednica 27) in akridina (Preglednica 28). Iz tega sklepamo, da klofibrinska kislina inhibitorno vpliva na rast *P. putida*. Do preskoka rasti pride med koncentracijama 72,9 in 87,5 mg L⁻¹ (Slika 3). Med tem vrednostma je tudi EC₅₀, vendar ga ne moremo bolj natančno določiti, ker je preskok hipen in ne gradienten. Inhibicija s klofibrinsko kislino je razumljiva, saj je njena topnost v destilirani vodi 514,8 mg L⁻¹, medtem ko so druge zdravilne učinkovine omejene s topnostjo 90 mg L⁻¹ ali manj. Akridin je v nasičeni raztopini inhibiral rast (Slika 4), vendar ne dovolj, da bi določili EC₅₀. Zato lahko samo sklepamo, da je EC₅₀ večji topnosti akridina v vodi.

Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da od preiskovanih zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov samo klofibrinska kislina in deloma akridin vplivata na rast bakterije *Pseudomonas putida*. To lahko razložimo z dejstvom, da je rod *Pseudomonas* odporen in trdoživ. Inhibicijo rasti smo poleg tega opazili le pri koncentracijah razreda mg L⁻¹, kar pa v naravnem okolju redko dosežemo (Preglednici 1 in 2), zato zaključujemo, da je test s *Pseudomonas putida* pregroba oz. premalo občutljiva metoda za določanje ekotoksičnosti izbranih spojin.

5.1.1.2 *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test na mikrotitrskih ploščah

Pri poskusih rastnega inhibicijskega testa na mikrotitrskih ploščah smo ovrgli predpostavko, da bila metoda primerljiva z ISO 10712. Že pri referenčni spojni 3,5-

diklorofenolu rasti ni bilo, niti pri povišanih temperaturah (28°C in 37°C). Rast bakterije je bila vidna samov gojišču s hranilno juho (Slika 5). Tudi vrednosti EC_{50} (Slika 6) so se razlikovale od vrednosti EC_{50} na minimalnem gojišču (Slika 2). V gojišču s hranilno juho so bili peleti večji, kar je razumljivo, saj je imela bakterija za rast na voljo več hrani. Primerjavo metode na mikrotitrski plošči in v stekleničkah po ISO 10712 smo izvedli tudi s klofibrinsko kislino (Slika 7). Izračun EC_{50} iz Preglednice 32 in Slike 8, je večji od EC_{50} po ISO standardu izvedeni metodi (Slika 3). Glede na rezultate za referenčno spojino 3,5-diklorofenol in klofibrinsko kislino lahko zaključimo, da metode ISO 10712 in spektrofotometra ne moremo nadomestiti z mikrotitrskimi ploščicami in z uporabo programa »Mycroplate analyser software«.

Pri preučevanju nadomestitve stresanja s prepihovanjem TR smo ugotovili, da prepihovanje ni zadostovalo za rast *P. putida*, saj je bil rezultat negativen ne glede na temperaturo inkubacije. Iz tega lahko zaključimo, da je za rast *P. putida* na minimalnem gojišču potrebno stresanje, ki zagotovi enakomerno porazdelitev hrani. Mogoče pa je, da je bila viabilnost uporabljenega bakterijskega seva zaradi večkratnega zamrzovanja in odmrzovanja v »krio-ependorf« epruveti zmanjšana. Za potrditev te hipoteze bi morali poskus ponoviti na mikrotitrskih ploščah s stresanjem oz. bi morali uporabiti nov bakterijski sev.

Zadnji sklop vključuje analizo vpliva delovanja indikatorja v testni raztopini in v raztopini referenčne spojine 3,5-diklorofenol s hranilno juho pri konstantnem stresanju vzorčnih stekleničk (Preglednica 29). Opazili smo rast v gojiščih z referenčno spojino in hranilno juho, vendar raztopine niso bile obarvane rdeče, temveč oranžno. Po inkubaciji smo stresalnik ustavili in odčitali rezultate. Med merjenjem absorbance (čez 15 min) so se vse raztopine, kjer je bila vidna rast, obarvale rdeče, testna raztopina z indikatorjem pa ni bila obarvana. To je dokaz, da indikator TTC v razmerah stresanja v minimalnem gojišču ne deluje, torej ISO 10712 testa z uporabo mikrotitrskih plošč in z uporabo stekleničk nista primerljivi metodi.

5.1.2 TEST SOS/UMU

5.1.2.1 Test brez metabolne aktivacije

Po protokolu SOS/*umu* testa so rezultati pozitivni, če je aktivnost β -galaktozidaze (stolpec β -gala) vzorcev povišana vsaj dvakratno v primerjavi z aktivnostjo β -galaktozidaze v kontrolnem poskusu. Preglednica v dodatku kaže, da pri nobenem vzorcu aktivnost β -galaktozidaze ni bila dvakrat povišana. Po protokolu spojino določimo za genotoksično, če dobimo ponovljive pozitivne rezultate, ki so odvisni od koncentracije spojine. Glede na preglednico v dodatku in Sliko 9, ni nobena od testiranih spojin genotoksična, saj indukcijsko razmerje vzorcev ni bilo dvakrat večje od indukcijskega razmerja kontrole. Glede na to, da smo tudi pri pozitivni kontroli dobili negativne rezultate, smo očitno uporabili premajhne koncentracije 4-nitrokinolina.

5.1.2.2 Test z metabolno aktivacijo

Tudi pri testu z metabolno aktivacijo ni bila genotoksična nobena spojina (Slika 10), glej priloge. Rezultati so bili presenetljivi, saj smo pričakovali, da bo metoda z metabolno aktivacijo vsaj delno pokazala genotoksičnost nekaterih spojin. Glede na podatke iz literature smo pozitivne rezultate pričakovali pri akridinu, akridonu, klofibrinski kislini, karbamazepinu in delno pri indolonu (Preglednica 8). V literaturi večinoma ni podano topilo, v katerem so testne spojine raztopili. Bleeker et al. (1999) navajajo, da so akridin in akridon raztopili v mešanici acetona in vode, kar je gotovo povečalo njuno topnost v mešanici, zato pozitiven rezultat ni presenetljiv (Preglednica 8). Černoša (2005) je zdravilne učinkovine iz skupine NSAID raztopil v mešanici etanola in vode, vendar je bil rezultat kljub temu negativen.

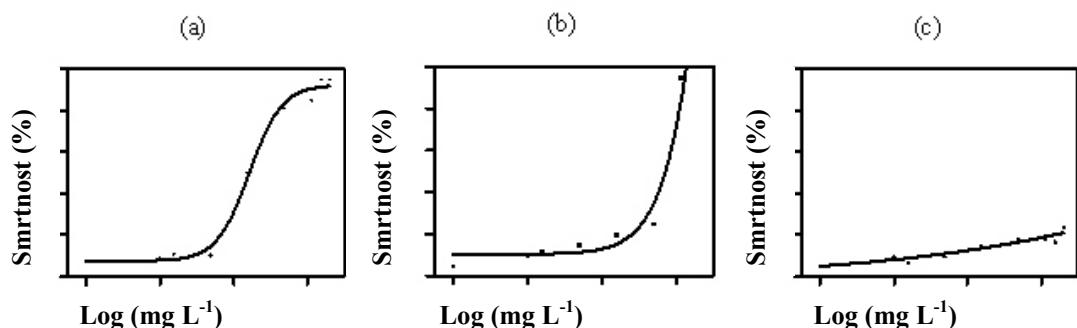
Pri naši raziskavi smo, v izogib povečani topnosti izbranih spojin v vodi zaradi dodatka organskih topil, topnost eksperimentalno določili s plinsko kromatografijo v povezavi z masno spektrometrično detekcijo. Raztopine izbranih spojin, katerih koncentracije smo določili v te namene, so bile raztopljene zgolj v vodi. Če bi za topilo uporabili organsko topilo kot npr. DMSO, bi dodatek tega topila povečal topnost izbranih spojin v vodi, kar bi lahko vplivalo na rezultate. Negativni rezultati za spojine NSAID, dobljeni v okviru tega

diplomskega dela, so potrdili rezultate diplomske naloge Černoša Andreja (2005), čeprav jih je raztpljal v mešanici etanola in vode.

5.1.3 TEST NA ZARODKIH RIB (ang. FISH EMBRYO TEST-FET)

Test na zarodkih rib smo zasnovali kot primerjalni pregled območja kvarnega delovanja pri uporabi decimalnih razredčin. Preverjali smo strupenost spojin, ob upoštevanju najvišje topnosti v vodi.

Za potrditev delovanja sistema smo najprej po protokolu naredili test z referenčno spojino 3,4-dikloroanilinom (Slika 12). Na osnovi letalnih učinkov spojin (Slike 13, 14, 15), smo za vsako opazovano spojino narisali krivuljo odstotka smrtnosti glede na koncentracijo. Po oblikah smo krivulje razdelili na 3 skupne: a, b in c. Predpostavili smo, da imajo nekatere skupine zdravilnih učinkov podobno dinamiko delovanja.



Slika 16: Tri tipične oblike krivulj, ki opisujejo odstotek smrtnosti zarodkov *Danio rerio* v odvisnosti od koncentracije. Krivulje posnemajo: (a) sigmoidno, (b) eksponentno in (c) linearno odvisnost.

SKUPINA a

Skupina oblike krivulj a posnema sigmoidno obliko krivulje. Po 48 urah opazovanja v to skupino uvrščamo spojine A (diklofenak), B (ibuprofen), G (akridin) in H (akridon). Pri akridonu je zanimivo to, da kljub nizki smrtnosti, ki jo povzroča (pod 30 %), kaže visoke odstotke subletalnih in teratogenih učinkov. Spojini B in H sta še posebno zanimivi, saj po 24 urah spremenita oblike krivulj (Sliki 13 in 15). Poudariti velja, da je B ibuprofen splošen analgetik, ki ima zelo široko uporabo. Ibuprofen in akridon sta torej zelo pomembna v okolju zaradi možnega dolgotrajnega delovanja. Ker smo po 24 in 48 urah

opazili tako hitre spremembe v smrtnosti (Sliki 13 in 15), subletalnih in teratogenih učinkih (Preglednica 33), bi bilo smiselno spremljati delovanje teh spojin tudi v daljšem časovnem obdobju.

SKUPINA b

Skupina oblike krivulj b ima eksponentno obliko krivulje. Kvarno delovanje v tej skupini je bilo zagotovo omejeno s topnostjo teh spojin v vodi. Če bi vse tri spojine imele višjo topnost v vodi, bi povzročali večje letalne učinke (posnemale bi krivuljo a), vendar test na zarodkih rib ne bi bil več primeren. V skupino b smo uvrstili spojine C (indolon, metabolit diklofenaka), E (ketoprofen) in I (klofibrinska kislina), Sliki 14 in 15. Te spojine zelo različno vplivajo na subletalne in teratogene učinke (Preglednica 33). Klofibrinska kislina, metabolit lipidnega regulatorja, ni povzročala subletalnih in teratogenih učinkov na zarodkih. Nasprotna situacija je bila pri ketoprofenu, ki sicer ni povzročil subletalnih učinkov, je pa povzročil teratogene po 24 in 48 urah (Preglednica 33). Zarodki so zaostali v razvoju, po 48 urah jih je polovica poginila, druga polovica pa je bila še vedno zaostala v razvoju. Ketoprofen je poleg ibuprofena splošno razširjen analgetik, za katerega nismo pričakovali takšnih rezultatov.

SKUPINA c

Skupina oblike krivulje c opisuje linearno odvisnost. Sem smo uvrstili spojine B (ibuprofen) po 24 urah, D (karbamazepin), F (naproksen) in H (akridon) po 24 urah (Sliki 14 in 15). Pri naštetih spojinah opazimo majhen odstotek smrtnosti. Glede na rezultate akutnega testa, sta naproksen in karbamazepin še najmanj kvarno delovala za zarodke rib (Slika 14 in Preglednica 33).

Zanimiva je tudi primerjava akridona in akridina. Akridon je metabolit akridina. Če ju primerjamo glede na rezultate smrtnosti pri zarodkih (Slika 15), je akridin v koncentraciji nasičene raztopine povzročal 100 % smrtnost. Glede na tip krivulje spada v skupino a. Akridon pa je povzročil v koncentraciji nasičene raztopine le približno 30 % smrtnost zarodkov. Ravno obratna sta subletalna in teratogena učinka, ki jih akridin ni povzročal, medtem ko jih akridon je (Preglednica 33). Iz tega sklepamo da, četudi gre za strukturno podobni spojini, imata popolnoma različne učinke.

Zaključimo lahko, da glede na obliko krivulje delovanja določene zdravilne učinkovine in njenega metabolita, ni mogoče sklepati na dinamiko delovanja in na subletalne in teratogene učinke. Test FET je primeren ekotoksikološki test, saj nam poleg letalnih strupenih učinkov nudi indikacijo dolgodobnega delovanja testiranih spojin (subletalni in teratogeni učinki).

5.2 SKLEPI

- Od izbranih preučevanih zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov (ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak, karbamazepin, indolon, akridin, akridon, klofibrinska kislina) samo klofibrinska kislina in deloma akridin vplivata na rast bakterije *Pseudomonas putida*.
- Rastni inhibicijski test z bakterijo *Pseudomonas putida* je pregrada metoda za določanje ekotoksičnosti izbranih spojin.
- Pri inkubaciji mikrotitrskih plošč brez uporabe stresalnika kisik in temperatura nista omejujoča dejavnika za rast *Pseudomonas putida* na minimalnem gojišču.
- *Pseudomonas putida* rastni inhibicijski test in test na mikrotitrskih ploščah nista primerljivi metodi.
- Indikator TTC pri stresanju v minimalnem gojišču s *Pseudomonas putida* ne deluje
- Izbrane učinkovine v območju vodotopnosti niso niti genotoksične, niti citotoksične.
- Glede na učinke izbranih spojin na zarodke cebric *Danio rerio* lahko sklepamo, da sta ibuprofen in akridon lahko nevarna zaradi svojega dolgotrajnega delovanja.
- Oblika krivulje letalnih učinkov na zarodkih rib v odvisnosti od koncentracije ni vedno povezana z načinom delovanja teh zdravilnih učinkov in njihovih metabolitov.
- Oblika krivulje letalnih učinkov na zarodkih rib v odvisnosti od koncentracije testirane spojine ni neposredno povezana z subletalnimi in teratogenimi učinki, ki jih ta spojina povzroča.
- Metaboliti zdravilnih učinkov kažejo večjo nevarnost dolgodobnega delovanja kot izhodne spojine (npr. akridon, ki je metabolit akridina, povzroča subletalne in teratogene učinke).

- Primerjava učinkov akridina in akridona kaže, da četudi gre za podobni spojini, imata le-ti različne učinke na testne organizme.
- Za nadaljne raziskave bi bilo zanimivo preveriti test na mikrotitrskih ploščah z bakterijo *Pseudomonas putida* z novim sevom iz zbirke.

6 VIRI

Acreman M. 2004. Water and ethic, water and ecology. Paris, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization

<http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001363/136355e.pdf> (januar 2008): 36 str.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts P., Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York, Garland Science: 274-275

Andreozzi R., Raffaele M., Pinto G., Pollio A. 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, 36, 11: 2869-2877

Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P. 2003b. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50, 10: 1319-1330

Assmuth T., Penttila S. 1995. Characteristics, determinants and interpretations of acute lethality in daphnids exposed to complex waste leachates. *Aquatic Toxicology*, 31, 2: 125-141

Awara W.M., El-Gohary M., El-Nabi S.H., Fadel W.A. 1998. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the mutagenic potential of carbamazepine: Does melatonin have anti-mutagenic activity. *Toxicology*, 125,1: 45-52

Babich H., Borenfreund E. 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells. *Toxicology in Vitro*, 5, 1: 91-100

Biesinger K.E., Williams L.R., Van der Schalie W.H. 1987. Procedures for conducting *Daphnia magna* toxicity bioassays. *Aquarium Toxicology*, 41: 51-62

Bleeker E.A.J., Van der Geest H.G., Klamer H.J.C., De Voogt P., Wind E., Kraak H.S. 1999. Toxic and genotoxic effects of azaarenes: isomers and metabolites. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 13: 191-203

Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Total Environment*, 311, 135–149

Brams A., Buchet J.P., Crutzen-Fayt M.C., DeMeester C., Lauwerys R., Leonard A. 1987. A comparative study with 40 chemicals of the efficiency of the *Salmonella* assay and the SOS chromotest (kit procedure). *Toxicology Letters*, 38: 123–133

Buser H.-R., Mueser M.D., Theobald N. 1998. Occurrence of the pharmaceutical drug clofibric acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North sea. Environmental Science and Technology, 32: 188-192

Buser H.R., Poiger T., Mueller M.D. 1998b. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. Environmental Science & Technology, 32, 22: 3449-3456

Caccia S. 1998. Metabolism of the newer antidepressants – An overview of the pharmacological and pharmacokinetic implications. Clinical Pharmacokinetics, 34:281-544

Carlsson C., Johansson A.-K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T. 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Science of the Total Environment, 364: 67-87

Celik A. 2006. The assessment of genotoxicity of carbamazepine using cytokinesis-block (CB) micronucleus assay in cultured human blood lymphocytes. Drug and Chemical Toxicology, 29, 2: 227-236

Claxton L.D., Houk V.S., Hughes T.J. 1998. Genotoxicity of industrial waste and effluents. Mutation Research, 410: 237-243

Cleuvers M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicology Letters, 142: 185-194

Couture P., Blaise C., Cluis D., Bastien C. 1989. Zirconium toxicity assessment using bacteria, algae and fish assays. Water, Air & Soil Pollution, 47, 1-2: 87-100

Černoša A. 2005. Toksičnost in genotoksičnost vzorcev odpadnih in površinskih vod. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 69 str.

Debska J., Kot-Wasik A., Namiesnik J. 2005. Determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry. Journal of Separation Science, 28, 17: 2419-2426

Diaz A., Ventura F., Galceran M.T. 2002. Simultaneous determination of estrogenic short ethoxy chain nonylphenols and their acidic metabolites in water by an in-sample derivatization/solid-phase microextraction method. Analytical Chemistry, 74, 15: 3869-3876

Dijkman N.A., Vlaardingen P.L.A., Admiraal W.A. 1997. Biological variation in sensitivity to N-heterocyclic PAHs; effects of acridine on seven species of microalgae. Environmental Pollution, 95, 1: 121-126

Enick O.V., Moore M.M. 2007. Assessing the assessment: Pharmaceuticals in the environment. *Environmental Impact Assessment Review*, 27: 707-729

Eriksson E., Auffarth K., Eilersen A.-M., Henze M., Ledin A. 2003. Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. *Water S.A.*, 29: 135-146

Farre M., Barcelo D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosenzors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 5: 299-310

Farre M., Brix R., Barcelo D. 2005. Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *Trends in Analytical Chemistry*, 24: 532-545

Fent K., Weston A.A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 122-159

Ferrari B., Radetski C.M., Veber A.-M., Ferard J.-F. 1999. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 6: 1195-1202

Ferrari B., Paxeus N., Giudice R.L., Pollio A., Garric J. 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrate acid and diclofenac. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, 55: 359-370

Garrison A.W., Pope J.D., Allen F.R. 1976. Analysis of organic compounds in domestic wastewater. V: Identification and analysis of organic pollutants in water. Keith C.H. (ed.). Athens, Ann Arbor Science: 517-566

Gaudiano M.C., Valvo L., Bertocchi P., Manna L. 2003. RP-HPLC study of the degradation of diclofenac and piroxicam in the presence of hydroxyl radicals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32: 151-158

Hallare A.V., Koehler H.-R., Triebskorn R. 2004. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere*, 56: 659-666

Hamer B., Bihari N., Reifferscheid G., Zahn R.K., Mueller W.E.G., Batel R. 2001. Evaluation of the SOS/umu test environmental mixtures. *Mutation Research*, 466: 166-171

Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Penarrieta C.T., Yoshinari T. 2003. Aplicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Bacterial Methods*, 52: 47-58

Heberer T., Stan H.J. 1996. Occurrence of polar organic contaminants in Berlin drinking water. *Vom Wasser*, 86: 19-31

Heberer T., Stan H.J. 1997. Determination of clofibrate acid and *N*-(phenylsulfonyl)-sarcosine in sewage, river and drinking water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 67, 1–4: 113–123

Heberer T. 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*, 266, 3-4: 175-189

Hernando M.D., Heath E., Petrovič M., Bercelo D. 2006. Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated wastewaters, a pilot survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 985-991

Hernando M.D., Mezcua M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D. 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69: 334-342

Hirsch C.A., Messenger R.J. 1978. Fenoprofen: drug form selection and preformulation stability studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67, 2: 231-236

Houk V.S. 1992. The gonotoxicity of industrial wastes and effluents-a review. *Mutation Research* 277: 91-138

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A., Previtera L., Rubino M. 2005. Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the Total Environment*, 348,1-3: 93-101

Isidori M., Nardelli A., Pascarella L., Rubino M., Parrella A. 2007. Toxic and genotoxic impact of fibrates and their photoproducts on non-target organisms. *Environmental International*, 33: 635-641

ISO 5667-16. Water quality: Sampling. Part 16: Guidance on biotesting of samples. 1998: 32 str.

ISO 6341. Water quality: Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). 1996: 1 str.

ISO 7346-3. Water quality: Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)). Part 3: Flow-through method. 1996: 11 str.

ISO 10229. Water quality: Determination of the prolonged toxicity of substances to fresh fish – method for evaluating the effect of substances on the growth rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae). 1994: 12 str.

ISO 10253. Water quality: Marine algal growth inhibition tests with *Skeletonema costratum* and *Phacodactylum tricornutum*. 1995: 12 str.

ISO 10712. Water quality: *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test). 1995: 9 str.

ISO 13829. Water quality: Draft international standard. Water quality – determination of genotoxicity of water and waste water using the umu-test. 2000: 18 str.

ISO 15522. Water quality: Determination on the inhibitory effect of the water constituents on the growth of activated sludge micro-organisms. 1999: 12 str.

Japelj B., Pečar S. 2006. Osnove in možnosti fotodinamičnega zdravljenja. Farmacevtski vestnik, 57, 2: 131-139

Jux U., Bainski R.M., Arnold H.G., Kronke M., Seng P.N. 2002. Detection of pharmaceutical contaminations of river, pond, and tap water from Cologne (Germany) and surroundings. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 205: 393-398

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other wastewater contaminants in U.S. streams 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science & Technology, 36, 6: 1202-1211

Kosjek T., Heath E., Krbavčič A. 2005. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. Environmental International, 31: 679-685

Kot-Wasik A., Debska J., Wasik A., Namiesnik J. 2006. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in natural waters using off-line and on-line SPE followed by LC coupled with DAD-MS. Chromatographia, 64, 1-2: 13-21

Kot-Wasik A., Debska J., Namiesnik J. 2007. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. Trends in Analytical Chemistry, 26, 6: 557-568

Koutsouba V., Heberer T., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler K., Tsipi D., Hiskia A. 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. Chemosphere, 51, 69-75

Kozak R. G., D'Haese I., Verstraete W. 2001. Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 α -ethinylestradiol. V: Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks. Kuemmerer K. (ed.). 1st ed. Heidelberg, Springer-Verlag: 49– 65.

Kraak M.H., Ainscough C., Fernandez A., Vlarding P.L.A., De Voogt P., Admiraal W.A. 1997. Short-term and chronic exposure of zebra mussel *Dreissena polymorpha* to acridine: the effects and metabolism. Aquatic Toxicology, 37, 1: 9-20

Kreuzinger N., Clara M., Strenn B., Kroiss H. 2004. Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disrupters and pharmaceuticals from wastewater. Water Science and Technology, 50, 5: 149-156

Kuemmerer K., Steger-Hartmann T., Meyer M. 1997. Biodegradability of the anti-tumor agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Research, 31, 11: 2705-2710

Kuemmerer K. 2004. Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risk. 2nd ed. Heidelberg, Springer-Verlag: 527 str.

Kullich W., Klein G. 1986. Investigations of the influence of non-steroidal antirheumatic drugs on the rates of sister-chromatid exchange. Mutation Research, 174, 2: 131-134

Lewis M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: A review and risk assessment. Water Research, 25, 1: 101-113

Lindqvist N., Tuhkanen T., Kronberg L. 2005. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. Water Research, 39, 2219-2228

Matsuoka A., Shudo K., Saito Y., Ishidate Jr M. 1984. Clastogenic potential of heavy oil extracts and some aza-arenes in Chinese hamster cells in culture. Mutation Research, 140: 7–11

Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servor M., Ternes T.A., Hirsch R. 2003a. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of canadian sewage treatment plants. Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 12: 2872-2880

Metcalfe C.D., Miao X.S., Koenig B.G., Struger J. 2003b. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 12: 2881-2889

Metzler D.E. 2001. Biochemistry: The chemical reaction of living cells. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 1700 str.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L. 2005. Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in the aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 61: 413-419

Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutation Research, 567: 109-149

Ollers S., Singer H.P., Fassler P., Mueller S.R. 2000. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low- μ g/l level in surface and waste water. Journal of Chromatography A, 911: 225-234

Oldham J.W., Preston R.F., Paulson J.D. 1986. Mutagenicity testing of selected analgesics in Ames *Salmonella* strains. Journal of Applied Toxicology, 6,4: 237-243

Ozturk S., Koseoglu B.G., Kocak H., Palanduz S., Cefle K., Erkal H. 2004. *In Vitro* effects of selective and non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the frequency of sister chromatid exchanges. Drugs R D, 5, 6: 327-330

Palomo M.E., Ballesteros M.P., Frutos P. 1999. Analysis of diclofenac sodium and derivates. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 21: 83-94

Pfluger P., Dietrich D.R. 2001. Pharmaceuticals in the environment-an overview and principal considerations. V: Pharmaceuticals in the environment. Kuemmerer K. (ed.). Heidelberg, Springer Verlag: 11-17

Philipose B., Singh R., Khan K.A. 1997. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three propionic acid derivatives ibuprofen, ketoprofen and naproxen. Mutation Research, 393, 1-2: 123-31

PhPlate. 2007. Microplate Analyser. Stockholm, PhPlate Microplate Techniques
<http://www.phplate.se/downloads.html> (februar 2008): 15 str.

Polak M.E., Rawson D.M., Haggett B.G.D. 1996. Redox mediated biosensors incorporating cultured fish cells for toxicity assessment. Biosensors and Bioelectronics, 11, 12: 1253-1257

Predvoditeleva G.S., Kartseva T.V., Oleshko O. N., Shvedov V.I., Syubaev R.D., Shvarts G.Ya., Alekseeva L.M., Anisimova O.S., Chistyakov V.V., Sheinker Yu.N. 1987. Synthesis and antiinflammatory activity of 1-[2,6-D-dichlorophenyl]indolin-2-ones. Pharmaceutical Chemistry Journal, 21: 441-445

Price E.E., Donahue M.J., Dickson K.L., Rodgers J.H.Jr. 1990. Effects of elevated calcium concentration on Na-K-ATP-ase activity of two euryhaline species *Cyprinodon variegatus* and *Mysidopsis bahia*. Earth and Environmental Science, 44, 1: 121-128

Rank J, Lopez C., Nielsen M.H., Moretton J. 2002. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, 136: 13–18

Reddersen K., Heberer T. 2003. Formation of an artifact of diclofenac during acidic extraction of environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1011: 221-226

Richardson M.L., Bowron J.M. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37, 1: 1-12

Roy J. 2002. Pharmaceutical impurities – a mini-review. *AAPS PharmSciTech*, 3, 2: 1-7

Sacher F. 2002. Vorkommen von Arzneimittelrückstaenden in grund- und Oberflächenwassern in Baden-Württemberg. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, 168: 59–69

Sallustio B.C., Harkin L.A., Mann M.C., Krivickas S.J., Burcham P.C. 1997. Genotoxicity of acyl glucuronide metabolites formed from clofibrate acid and gemfibrozil: A novel role for phase-II-mediated bioactivation in the hepatocarcinogenicity of the parent aglycones. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 147, 2: 459-464

Sanderson H., Johnson D.J., Reitsma T., Brain R.A., Solomon K.R. 2004b. Ranking and prioritisation of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 2: 158-183

Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejon M. 2005. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Analytica Chimica Acta*, 550, 1-2: 116-122

Sarakinos H.C., Bermingham N., White P.A., Rasmussen J.B. 2000. Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1: 63-71

Seiler J.P. 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology – can the two be connected? *Toxicology Letters*, 131, 1-2: 105-115

Seixas G.M., Andon B.M., Hollingshead P.G., Thilly W.G. 1982. The aza-arenes as mutagens for *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*: 102: 201–212

Sigma – Aldrich Co. 2001. Detergents & surfactants. St. Louis, Sigma – Life Science
http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/BioUltra/Detergents_Surfactants.html (marec 2008): 5 str.

Sochova I., Hofman J., Holoubek I. 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Environmental International, 33: 798-804

Stan H.-J., Heberer T., Linkerhaegner M. 1994. Occurrence of clofibric acid in the aquatic system - is the use in human medical care the source of the contamination of surface, ground and drinking water. Vom Wasser, 83: 57-68

Sun Y., Takaba K., Kido H., Nakashima M.N., Nakashima K. 2003. Simultaneous determination of arypropionic acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations and human plasma by HPLC with UV detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 5: 1611-1619

Suter G.W., Rosen A.E. 1988. Comparative toxicology for risk assessment of marine fishes and crustaceans. Environmental Science and Technology, 22, 5: 548-551

Tarkpea M., Andren C., Eklund B., Gravenfors E., Kukuluska Z. 1998. A biological and chemical characterization strategy for small and medium-sized industries connected to municipal sewage treatment plants. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 2: 234-250

Ternes T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Research, 32, 11: 3245-3260

Ternes T.A. 2001. Vorkommen von Pharmaka in Gewässern. Wasser & Boden, 53, 9-14

Ternes T., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.J., Haist-Glude B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N. 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. Environmental Science and Technology, 36, 3855-3863

Ternes T.A., Stuber J., Herrmen N., McDowell D., Ried A., Kapmann M., Teiser B. 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? Water Research, 37, 8: 1976-1982

Ternes T., Jos A., Siegrist H. 2004. Scrutinizing pharmaceutical and personal care products in wastewater treatment. Environmental Science and Technology, 38, 20: 393-399

Thaker C.K. 2005. Pharmaceutical data elude researchers. Environmental Science & Technology, 139, 9: 193A–194A

Thomas K.V., Hilton, M.J. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. Marine Pollution Bulletin, 49, 5/6: 436–444

Tixier C., Singer H.P., Oellers S., Mueller S.R. 2003. Occurrence and fate of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and naproxen in surfacewaters. Environmental Science & Technology, 37, 6: 1061-1068

Togola A., Budzinski H. 2007. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 288: 627-635

Tudja P., Khan M.Z.I., Meštrović E., Horvat M., Golja P. 2001. Thermal behaviour of diclofenac sodium: Decomposition and melting characteristics. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49, 10: 1245-1250

U.S. National Library of Medicine. 1993. ChemID Plus Advanced. Bethesda, National Institutes of Health

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> (november 2007): 2 strani

Vogna D., Marotta R., Andreozzi R., Napolitano A., d'Ischia M. 2004. Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of the antiepileptic drug carbamazepine. Chemosphere, 54: 497-505

Wiegel S., Kuhlmann J., Huhnerfuss H. 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine, and DEET in the North Sea. Science of the Total Environment, 295, 131-141

Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Loffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., Von Tumpling W., Wanke A. 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. Chemosphere, 57, 2: 107-126

Wiegman S., Termeer J.A., Verheul T., Kraak M.H., De Voogt P., Laane R.W., Admiraal W. 2002. UV absorbance dependent toxicity of acridine to the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Environmental Science & Technology, 36, 5: 908-913

Wikipedija. 2005. Kovina. San Francisco, Wikimedia foundation

<http://sl.wikipedia.org/wiki/Kovina> (maj 2008): 1 str.

Zakon o ohranjanju narave. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 96: 11541-11575

Zakon o varstvu okolja. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 41: 4818-4861

Zakon o vodah. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 67: 3237-3357

Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. 2000. Lancet, 355, 9217: 1789-1790

Zwiener C., Frimmel F.H. 2000. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. Water Research, 34, 6: 1881-1885

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju dr. Mihaelu Briclju za izkazano zaupanje in dano priložnost.

Iskrena hvala tudi dr. Tini Eleršek, dr. Metki Filipič in Jani Petkovič za izvedbo eksperimentalnega dela, za vse nasvete ter predvsem za potrežljivost. Za pomoč v laboratoriju bi se rada zahvalila tudi Karmen Stanič.

Mentorju prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Damjani Drobne.

Najlepša hvala dr. Ester Heath in mag. Tini Kosjek iz Instituta Jožef Stefan za kemikalije, opravljene meritve ter pomoč pri diplomski nalogi.

Nazadnje hvala tudi mojim najdražjim, ki so me ves čas izobraževanja podpirali in mi omogočili doseganje zastavljenih ciljev.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati za SOS/umu test, prvi in drugi poskus brez metabolne aktivacije na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Morebitno citotoksičnost oz. genotoksičnost smo preverjali pri različnih koncentracijah testnih spojin ter pozitivne in negativne kontrole.

spojina / konc. (mg L ⁻¹)	prvi poskus				drugi poskus				
	Bf G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf G	β-galak.	genotoks.	T test	
kontrola	1,00	0,15	1,00	1,000	1,00	0,16	1,00	1,000	
ibuprofen	33,9	1,00	0,12	0,85	0,563	0,98	0,15	0,95	0,584
	3,39	0,90	0,14	0,98	0,654	1,00	0,15	0,96	0,737
	0,339	0,97	0,15	1,01	0,480	0,99	0,16	1,02	0,350
ketoprofen	92,5	0,98	0,15	1,03	0,435	1,01	0,15	0,93	0,329
	9,25	1,03	0,15	1,05	0,318	1,00	0,16	0,97	0,969
	0,925	1,04	0,15	1,04	0,569	1,00	0,16	0,98	0,842
diklofenak	13,2	0,86	0,16	1,13	0,122	0,88	0,18	1,15	0,003
	1,32	0,92	0,15	1,05	0,588	0,96	0,15	0,94	0,319
	0,132	0,88	0,14	0,93	0,307	0,94	0,15	0,94	0,310
naproksen	13,6	0,86	0,13	0,91	0,198	0,95	0,16	1,00	0,780
	1,36	0,87	0,13	0,92	0,305	0,95	0,16	0,98	0,873
	0,136	0,83	0,14	0,94	0,506	0,97	0,16	0,97	0,786
karbamazepin	83,2	0,88	0,15	1,04	0,413	0,96	0,16	1,00	0,687
	8,32	0,94	0,17	1,15	0,068	0,93	0,18	1,11	0,019
	0,832	0,88	0,17	1,19	0,032	0,84	0,19	1,20	0,001
klofibrinska kislina	514,8	0,87	0,16	1,07	0,497	0,97	0,17	1,07	0,291
	51,48	0,89	0,15	1,02	0,988	0,88	0,21	1,30	0,003
	5,148	0,86	0,15	1,05	0,663	0,93	0,16	1,01	0,791

Nadaljevanje Priloga A: Rezultati za SOS/umu test, prvi in drugi poskus brez metabolne aktivacije na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Morebitno citotoksičnost oz. genotoksičnost smo preverjali pri različnih koncentracijah testnih spojin ter pozitivne in negativne kontrole.

spojina / konc. (mg L ⁻¹)	prvi poskus					drugi poskus				
	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test
indolon	4,9	0,96	0,14	0,96	0,476	0,92	0,16	1,01	0,805	
	0,49	0,87	0,16	1,11	0,252	0,97	0,14	0,89	0,128	
	0,049	0,91	0,16	1,12	0,167	0,97	0,17	1,03	0,910	
akridin	56,1	0,89	0,18	1,27	0,003	0,90	0,21	1,32	0,001	
	5,61	0,96	0,17	1,15	0,164	0,90	0,19	1,20	0,055	
	0,561	0,99	0,16	1,09	0,519	0,90	0,17	1,03	0,918	
akridon	4,0	0,97	0,17	1,15	0,146	0,91	0,18	1,13	0,260	
	0,40	1,03	0,17	1,20	0,054	0,91	0,17	1,05	0,896	
	0,040	1,00	0,16	1,12	0,377	0,89	0,15	0,91	0,141	
4-nitrokinolin	0,05	1,14	0,21	1,45	0,000					
	0,1	1,00	0,22	1,54	0,000	0,97	0,19	1,21	0,053	
	0,2					0,95	0,24	1,49	0,000	
	0,3					0,94	0,25	1,54	0,001	

Priloga B: Rezultati za SOS/umu test, prvi, drugi in tretji poskus z metabolno aktivacijo na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Morebitno citotoksičnost oz. genotoksičnost smo preverjali pri različnih koncentracijah testnih spojin ter pozitivne in dveh negativnih kontrol.

		prvi poskus				drugi poskus				tretji poskus						
	(mg spojina / konc. L ⁻¹)	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test
kontrola		1,00	0,09	1,00	1,000		1,00	0,12	1,00	1,000		1,00	0,10	1,00	1,000	
ibuprofen	33,9	1,01	0,06	0,70	0,501		1,06	0,10	0,82	0,348		1,00	0,10	1,01	0,948	
	3,39	0,98	0,06	0,70	0,633		0,98	0,12	1,00	0,590		1,04	0,11	1,04	0,784	
	0,339	1,00	0,11	1,24	0,124		1,01	0,12	1,07	0,367		1,02	0,10	0,97	0,765	
ketoprofen	92,5	0,97	0,08	0,90	0,969		0,97	0,12	1,00	0,825		1,00	0,11	1,03	0,832	
	9,25	0,96	0,11	1,20	0,207		1,03	0,10	0,87	0,365		1,01	0,11	1,05	0,701	
	0,925	0,99	0,12	1,35	0,115		0,98	0,13	1,10	0,229		0,99	0,14	1,36	0,030	
diklofenak	13,2	0,93	0,12	1,36	0,146		0,99	0,11	0,94	0,724		0,98	0,12	1,16	0,520	
	1,32	0,98	0,07	0,76	0,200		0,96	0,13	1,10	0,219		1,10	0,08	0,83	0,087	
	0,132	1,00	0,09	0,98	0,836		1,02	0,10	0,86	0,268		1,00	0,11	1,08	0,840	
naproksen	13,6	0,99	0,09	1,04	0,934		0,96	0,13	1,12	0,189		1,07	0,09	0,87	0,179	
	1,36	0,91	0,12	1,40	0,122		1,04	0,09	0,79	0,077		1,04	0,08	0,80	0,094	
	0,136	0,98	0,11	1,20	0,530		0,94	0,14	1,18	0,065		1,01	0,11	1,02	0,948	
karbamazepin	83,2	1,01	0,09	0,98	0,692		0,97	0,13	1,12	0,216		1,02	0,11	1,05	0,810	
	8,32	1,00	0,08	0,87	0,381		0,94	0,13	1,11	0,287		1,01	0,13	1,23	0,105	
	0,832	0,98	0,07	0,76	0,187		0,91	0,15	1,30	0,010		1,03	0,11	1,06	0,836	
klofibrinska kislina	514,8	1,01	0,08	0,86	0,414		1,00	0,12	1,00	0,863		1,08	0,08	0,84	0,133	
	51,48	0,99	0,06	0,74	0,194		1,03	0,10	0,89	0,249		0,99	0,11	1,08	0,638	
	5,148	0,98	0,07	0,77	0,267		0,98	0,13	1,10	0,435		1,02	0,10	0,99	0,768	
indolon	4,9	0,97	0,08	0,90	0,675		0,92	0,15	1,29	0,019		0,99	0,11	1,07	0,696	
	0,49	0,98	0,09	1,05	0,732		0,97	0,12	1,06	0,763		1,00	0,13	1,22	0,117	
	0,049	0,98	0,10	1,18	0,361		0,97	0,13	1,12	0,446		0,99	0,11	1,11	0,539	

Nadaljevanje Priloga B: Rezultati za SOS/umu test, prvi, drugi in tretji poskus z metabolno aktivacijo na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Morebitno citotoksičnost oz. genotoksičnost smo preverjali pri različnih koncentracijah testnih spojin ter pozitivne in dveh negativnih kontrol.

		prvi poskus				drugi poskus				tretji poskus						
		Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test	Bf	G	β-galak.	genotoks.	T test
akridin	56,1	0,96	0,08	0,92	0,682		0,98	0,13	1,11	0,489		0,97	0,12	1,21	0,147	
	5,61	0,99	0,10	1,11	0,536		1,03	0,11	0,96	0,562		1,00	0,11	1,10	0,670	
	0,561	0,97	0,09	1,03	0,860		1,02	0,12	1,07	0,754		1,06	0,11	1,05	0,996	
akridon	4,0	0,97	0,14	1,58	0,007		0,99	0,13	1,12	0,441		1,08	0,10	0,95	0,413	
	0,40	0,98	0,10	1,11	0,677		1,00	0,12	1,01	0,790		1,05	0,13	1,23	0,124	
	0,040	1,00	0,10	1,11	0,716		1,03	0,12	1,04	0,957		1,01	0,12	1,14	0,439	
benz(a)piren	1						1,00	0,16	1,37	0,011		1,05	0,14	1,35	0,016	
	10						0,91	0,20	1,71	0,000		0,99	0,21	2,15	0,000	
4-nitrokinolin	0,1	0,995	0,129	1,4617	0,046											
	0,2	0,995	0,093	1,0596	0,281											
	0,3	0,979	0,1	1,1323	0,628											