

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mirjana BISTAN

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN MOŽNOSTI
ODSTRANJEVANJA ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN
V VODAH S KEMIJSKIMI IN BIOLOŠKIMI
METODAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mirjana BISTAN

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN MOŽNOSTI
ODSTRANJEVANJA ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN V VODAH S
KEMIJSKIMI IN BIOLOŠKIMI METODAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CHEMICAL AND BIOLOGICAL METHODS FOR
DETERMINATION THE PRESENCE OF ESTROGEN ACTIVE
SUBSTANCES IN WATER AND POSSIBILITIES FOR THEIR
REMOVAL**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 9. 9. 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja ter opravljanje doktorata znanosti. Za mentorja je bila imenovana doc. dr. Tatjana Tišler in za somentorja prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Kemijskem inštitutu Ljubljana, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Lucija ZUPANČIČ KRALJ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: doc. dr. Tatjana TIŠLER
Kemijski inštitut

Član: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Član: doc. dr. Andreja ŽGAJNAR GOTVAJN
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora: 18.3.2013

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

Mirjana BISTAN

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
UDK	UDK 628.161.2:577.175.6(043.3)=163.6=111
KG	estrogena aktivnost/estrogen/ksenoestrogen/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /test YES/ odpadne vode/ekstrakcija na trdnih nosilcih (SPE)/dekonjugacija/čiščenje na silikagelu/mikroekstrakcija (SPME)/plinska kromatografija z masno detekcijo (GC- MS)/visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)/ozonacija/Fentonova oksidacija/fotolitska oksidacija/fotokatalitska oksidacija/mokra oksidacija/katalitska mokra oksidacija
AV	BISTAN Mirjana, univ. dipl. mikrobiol.
SA	TIŠLER Tatjana (mentorica)/ MARINŠEK LOGAR, Romana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja
LI	2013
IN	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN MOŽNOSTI ODSTRANJEVANJA ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN V VODAH S KEMIJSKIMI IN BIOLOŠKIMI METODAMI
TD	Doktorska disertacija
OP	XIII, 122 str., 3 pregl., 19 sl., 7 pril., 194 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Že pred desetletji so znanstveniki začeli opozarjati na nepopolno odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin iz odpadnih vod v čistilnih napravah in na posledice le-tega. Tako so v mnogih državah ugotovili spremembe v spolnem razvoju in razmnoževanju rib, ki živijo v rekah za iztoki iz čistilnih naprav ter dokazali povezavo med škodljivimi učinki na ribah in prisotnostjo estrogeno aktivnih spojin v vodah. Današnji trendi monitoringa odpadnih voda težijo k celostnemu pristopu, kar vključuje tako kemijske analitske metode kot tudi biološke metode. Za monitoring estrogene aktivnosti okoljskih vzorcev se danes velikokrat uporablja test YES (Yeast Estrogen Screen). Z optimizacijo testa YES je bila dokazana njegova specifičnost in občutljivost za zaznavanje estrogeno aktivnih spojin sposobnih vezave na estrogeni receptor, kot so 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA), nonilfenol (NP), genistein (G) in metoksiklor (M). Določeni so bili optimalni parametri izvedbe testa YES. Z uvedenim testom YES je bila preverjena estrogeno aktivnost slovenskih odpadnih voda, pri čemer je bilo ugotovljeno, da so estrogeno aktivne spojine prisotne tako na vtokih odpadnih voda na čistilne naprave kot tudi na iztokih iz čistilnih naprav, kar pomeni, da čiščenje odpadnih vod na čistilnih napravah z obstoječimi procesi ni dovolj učinkovito za odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin. Z uporabo različnih oksidacijskih postopkov (ozonacija, Fentonova oksidacija, fotolitska/ fotokatalitska oksidacija, mokra oksidacija/ katalitska mokra oksidacija) je bila opravljena študija odstranjevanja estrogeno aktivnih spojin (E2, EE2 in BPA) iz vodnih vzorcev. Učinkovitost teh oksidacijskih postopkov je bila preverjena s kemijsko analizo (SPME/GC-MS in HPLC) in biološkim testom (test YES). Uporabljeni oksidacijski postopki so bili uspešni pri pretvorbi naravnega in sintetičnega estrogena E2 in EE2 ter ksenoestrogena BPA. Izmed uporabljenih oksidacijskih postopkov se je za najučinkovitejšega izkazal postopek katalitske mokre oksidacije ob uporabi katalizatorja TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$, kjer je bila zaznana tako popolna pretvorba E2 in BPA kot tudi popolna odstranitev njune estrogene aktivnosti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
UDC UDC 628.161.2:577.175.6(043.3)=163.6=111
CX estrogenic activity/estrogen/xenoestrogen/*Saccharomyces cerevisiae*/YES assay/wastewater/solid-phase extraction(SPE)/deconjugation/silica gel purification/solid-phase microextraction(SPME)/gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)/high pressure liquid chromatography(HPLC)/ozonation/Fenton oxidation/photolytic oxidation/photocatalytic oxidation/wet air oxidation/catalytic wet air oxidation
AU BISTAN Mirjana, BSc of Mirobiology
AA TIŠLER Tatjana (supervisor)/ MARINŠEK LOGAR, Romana (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Study Programme in Environmental Protection
PY 2013
TI CHEMICAL AND BIOLOGICAL METHODS FOR DETERMINATION THE PRESENCE OF ESTROGEN ACTIVE SUBSTANCES IN WATER AND POSSIBILITIES FOR THEIR REMOVAL
DT Doctoral Dissertation
NO XIII, 122 p., 3 tab., 19 fig., 7 ann., 194 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Water pollution with endocrine disrupting compounds (EDCs), which are daily released into aquatic environment, is gaining an increasing amount of attention from scientists worldwide. The presence of EDCs in effluents and surface waters has been shown to result in adverse effects on aquatic organisms. Therefore, an efficient control of EDCs in wastewater based on biological and analytical techniques is required. In our study, optimization of a yeast estrogen screen (YES) assay has been carried out. The optimized YES assay was sensitive and responded specifically to the selected estrogenic compounds in aqueous samples, such as 17 β -estradiol (E2), 17 α -ethinylestradiol (EE2), bisphenol A (BPA), nonylphenol (NP), genisteine (G) and metoxychlor (M). The introduced YES assay was used to investigate the estrogenic activity of influents and effluents from different wastewater treatment plants (WWTPs) in Slovenia. The presence of EDCs was determined in influents and effluents, which indicates that the present treatment processes are insufficient in removing all estrogens and xenoestrogens from wastewaters. Further, different advanced oxidation processes (AOPs), such as ozonation, Fenton oxidation, photolytic/ photocatalytic oxidation, wet air/ catalytic wet air oxidation, has been used for removal of different EDCs (E2, EE2 and BPA) from aqueous samples. Efficiency of latter processes has been studied by chemical analytical technique (SPME/GC-MS or HPLC) and biological technique (YES assay). AOPs mention above were successfull in removal of natural and synthetic estrogens E2 and EE2 and xenoestrogen BPA. The highest efficiency was determined for catalytic wet air oxidation by using TiO₂ or Ru(3%)/TiO₂ catalyst, since total removal of E2 and BPA as well as total removal of their's estrogenic activity was detected.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI (ABBREVIATIONS AND SYMBOLS)	XII

1	PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZE	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	ESTROGENO AKTIVNE SPOJINE	2
1.2.1	Endokrini (hormonski) sistem	2
1.2.2	Estrogeno aktivne spojine oz. spojine z estrogenim delovanjem	3
1.2.2.1	Naravni in sintetični estrogeni hormoni	4
1.2.2.2	Ksenoestrogeni	5
1.2.3	Estrogeno aktivne spojine v okolju	6
1.3	METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN	8
1.3.1	Biološke metode za dokazovanje prisotnosti estrogeno aktivnih spojin	9
1.3.1.1	Imunološke metode	9
1.3.1.2	<i>In vitro</i> testi	10
1.3.1.3	<i>In vivo</i> testi	12
1.3.2	Kemijske metode identifikacije in kvantifikacije estrogeno aktivnih spojin	13
1.3.2.1	Kromatografske metode	13
1.3.3	Detekcija estrogeno aktivnih spojin v okoljskih vodnih vzorcih	13
1.3.3.1	Koncentriranje vodnih vzorcev	13
1.3.3.2	Dodatno čiščenje vzorcev s silikagelom	15
1.3.3.3	Dekonjugacija vzorcev	16
1.3.3.4	Izgube estrogenov med analizo	16

1.4	METODE ZA ODSTRANJEVANJE ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN	17
1.4.1	Biorazgradnja in fotorazgradnja estrogeno aktivnih spojin	17
1.4.2	Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin s fizikalno - kemijskimi postopki	18
1.4.3	Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki (advanced oxidation processes-AOP)	19
1.4.3.1	Kavitacija	21
1.4.3.2	Elektrokemijska oksidacija	21
1.4.3.3	Oksidacija z vodikovim peroksidom (H_2O_2)	21
1.5	HIPOTEZE	23
2	ZNANSTVENA DELA	24
2.1	OBJAVLJENA ZNANSTVENA DELA	24
2.1.1	Uporaba testa YES (Yeast Estrogen Screen) za določanje estrogene aktivnosti vodnih vzorcev	24
2.1.2	Določanje estrogene aktivnosti v odpadnih vodah v Sloveniji z biološkim preizkusom	25
2.1.3	Odstranjevanje estrogenov iz vodnih vzorcev z Ru/TiO₂ katalizatorjem v procesu katalitske mokre oksidacije	26
2.1.4	Pretvorba in estrogenost 17β-estradiola med fotolitsko/ fotokatalitsko oksidacijo in katalitsko mokro oksidacijo	27
2.1.5	Katalitska in fotokatalitska oksidacija vodne raztopine bisfenola A: razgradnja, strupenost in estrogenost	28
2.2	OSTALO POVEZOVALNO ZNANSTVENO DELO	29
2.2.1	Uvod	29
2.2.1.1	<i>In vivo</i> test z ribami zebričami <i>D. rerio</i>	29
2.2.1.2	Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z ozonacijo	30
2.2.1.3	Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin s Fentonovo oksidacijo	31
2.2.2	Materiali in metode	32
2.2.2.1	Določanje vitelogenina (Vtg) pri ribah zebričah <i>D. rerio</i> z <i>in vivo</i> testom	32
2.2.2.2	Izpostavljanje rib zebrič <i>D. rerio</i> estrogeno aktivnim spojinam	32
2.2.2.3	Homogenizacija rib	33
2.2.2.4	Določanje proteinov	33
2.2.2.5	Postopek indirektnega testa Vtg-ELISA	34
2.2.2.6	Obstojnost E2 med <i>in vivo</i> testom	35
2.2.2.7	Ozonacija	36
2.2.2.8	Fentonova oksidacija	36
2.2.2.9	SPME/ GC-MS analiza	37
2.2.2.10	SPE koncentriranje	38

2.2.2.11	Test YES	38
2.2.3	REZULTATI IN DISKUSIJA	38
2.2.3.1	Obstojnost E2 med <i>in vivo</i> testom	38
2.2.3.2	Kratkotrajen <i>in vivo</i> test z ribami zebričami <i>D. rerio</i>	39
2.2.3.3	Dolgotrajen <i>in vivo</i> test z ribami zebričami <i>D. rerio</i>	39
2.2.3.4	Ozonacija	40
2.2.3.5	Fentonova oksidacija	40
2.2.3.6	Adsorpcija testnih spojin na blato železovih oksidov in hidroksidov tekom Fentonove oksidacije	48
3	RAZPRAVA IN SKLEPI	50
3.1	RAZPRAVA	50
3.1.1	Optimizacija testa YES za določanje estrogene aktivnosti in metode SPE za koncentriranje vodnih vzorcev	50
3.1.2	Določanje estrogene aktivnosti z <i>in vivo</i> testom Vtg-ELISA	52
3.1.3	Določanje estrogene aktivnosti okoljskih vzorcev s testom YES	53
3.1.4	Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki	57
3.1.4.1	Ozonacija	57
3.1.4.2	Fentonova oksidacija	58
3.1.4.3	Fotolitska in fotokatalitska oksidacija ter mokra in katalitska mokra oksidacija	59
3.2	SKLEPI	63
4	POVZETEK (SUMMARY)	65
4.1	POVZETEK	65
4.2	SUMMARY	67
5	VIRI	69
ZAHVALA		
PRILOGE (ANNEXES)		

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Oksidacijski potenciali nekaterih močnih oksidantov (Parson, 2004: 4)	20
Preglednica 2: Razmerja Fentonovih reagentov uporabljena v eksperimentnih oksidacij..	37
Preglednica 3: Delež adsorpcije in oksidacije tekom Fentonove oksidacije pri različnih razmerjih reagentov (Nakrst s sod., 2010).....	48

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Producija steroidnih hormonov (med njimi tudi estrogenov E1, E2 in E3) (Richfield in Häggström, 2009).....	2
Slika 2: Dva tipa estrogenih receptorjev, ER α (zgoraj) in ER β (spodaj); ter njune funkcijalne domene: AF 1 in 2 (A/B in E)- aktivni mesti, C- DNA vezavno mesto, E- vezavno mesto liganda (estrogena oz. ksenoestrogena), D- pregibno mesto (Leitman in sod., 2010: 630)	3
Slika 3: Struktura 17 β -estradiola (E2) (levo) in 17 α -etinilestradiola (EE2) (desno) (Wikipedia Common, 2007)	4
Slika 4: Fitoestrogena genistein (levo) in kumestrol (na sredini) ter mikroestrogen zeralenon (desno) (Wikipedia Common, 2007)	5
Slika 5: Ksenoestrogeni: nonilfenol (zgoraj levo), dioksin TCCD (zgoraj na sredini), bisfenol A (zgoraj desno), polikloriran bifenil (PCB, spodaj levo), antracen (PAH, spodaj na sredini) in atrazin (herbicid, spodaj desno) (Wikipedia Common, 2007).....	5
Slika 6: Postopek določanja estrogenov s testom ELISA (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003: 61).....	9
Slika 7: Shematski prikaz estrogeno aktiviranega ekspresijskega sistema v kvasovki <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Routledge in Sumpter, 1996: 242)	11
Slika 8: Postopek ekstrakcije in koncentriranja z metodo SPE (Sorbtech, 2011)	14
Slika 9: Postopek mikroekstrakcije: adsorpcija v viali (levo) in desorpcija v injektorju plinskega kromatografa (desno) (Supelco, 1998: 1).....	15
Slika 10: Učinkovitost naprednih oksidacijskih postopkov s H ₂ O ₂ , O ₃ , UV obsevanjem in njihovimi kombinacijami (Vogelpohl in Kim, 2004: 35).....	22
Slika 11: Indukcija proizvodnje vitelogenina (Vtg) pri samcih <i>D. rerio</i> (Cosmo Bio Co., 1997).....	29
Slika 12: Shematski prikaz <i>in vivo</i> Vtg-ELISA testa (Chakravarthy A., 2011)	30
Slika 13: Ozonacija v koloni z mehurčki (levo) in Ottovem aparatu (desno) (Gogate in sod., 2004: 533)	30
Slika 14: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) (%) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) v vzorcih po ozonaciji.....	41
Slika 15: Pretvorba EE2 ($c_0 = 0,29 \text{ mg/l}$) (%) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) v vzorcih po ozonaciji.....	42
Slika 16: Odstranjevanje E2 (Odstr., %) ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe ²⁺ in H ₂ O ₂ (glej Preglednico 2) in relativna estrogena aktivnost (REA, %)	44
Slika 17: Odstranjevanje EE2 (Odstr., %) ($c_0 = 0,296 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe ²⁺ in H ₂ O ₂ (glej Preglednico 2) in relativna estrogena aktivnost (REA, %)	45

Slika 18: Odstranjevanje BPA (Odstr., %) ($c_0 = 0,228 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe^{2+} in H_2O_2 (glej Preglednico 2)	46
Slika 19: Odstranjevanje E2, EE2 oz. BPA (Odstr., %) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) tekom Fentonove oksidacije pri uporabljenem razmerju reagentov $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 20$	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vitelogenin v ribah zebričah izpostavljenih testni spojini E2.

Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov (zgoraj) in vitelogenina - Vtg (spodaj).

Priloga C: Rastna krivulja *Saccharomyces cerevisiae*. Z oznako (■) je označeno območje, v katerem je rast kvasovk primerena za uporabo v testu YES.

Priloga D: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) in zmanjševanje REA tekom fotolitske oz. fotokatalitske oksidacije (VS- vidna svetloba; UV- UV svetloba (365 nm); kat.- katalizator TiO_2 Degussa P-25).

Priloga E: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) (■) v postopku mokre oksidacije (SiC) (a), in postopkih katalitske mokre oksidacije ob prisotnosti TiO_2 (b) in $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ (c) pri temperaturi 200 in 230 °C; ter relativna estrogena aktivnost (REA, %) (◆) v vzorcih po mokri in katalitski mokri oksidaciji.

Priloga F: Pretvorba BPA tekom fotolitske oz. fotokatalitske oksidacije ob uporabi TiO_2 Degussa P-25 katalizatorja.

Priloga G: Pretvorba BPA2 ($c_0 = 20 \text{ mg/l}$) (■) v postopku mokre oksidacije (SiC) (a), in postopkih katalitske mokre oksidacije ob prisotnosti TiO_2 (b) in $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ (c) pri temperaturi 200 in 230 °C; ter relativna estrogena aktivnost (REA, %) (◆) v vzorcih po mokri in katalitski mokri oksidaciji.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI (ABBREVIATIONS AND SYMBOLS)

BPA	Bisfenol A (Bisphenol A)
BSTFA/TMCS	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid (BSTFA)/trimetilkloro silan (TMCS) (<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)/trimethylchloro silane (TMCS))
CPRG	Klorofenol-rdeče-β-D-galaktopiranozid (Chlorophenol-red-β-D-galactopyranoside)
CWAO	Katalitska mokra oksidacija (Catalytic Wet Air Oxidation)
DDT	Dikloro-difenil-trikloro-etan (Dichlorodiphenyltrichloroethane)
E1	Estron (Estrone)
E2	17β-estradiol (17β-estradiol)
EE2	17α-etinilestradiol (17α-ethynilestradiol)
E3	Estriol (Estriol)
ELISA	Encimsko-imunski test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ERE	Zaporedje DNA, ki se odziva na estrogen (Estrogen Response Element)
EtAc	Etil acetat (Ethyl Acetate)
GC-MS	Plinska kromatografija sklopljena z masno detekcijo (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy)
hER	Človeški receptor za estrogen (Human Estrogen Receptor)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High Performance Liquid Chromatography; High Pressure Liquid Chromatography)
logK _{ow}	Logaritem koeficiente porazdelitve oktanol/voda (Log Octanol-Water Partitioning Coefficient)
MeOH	Metanol (Methanol)
P	Progesteron (Progesterone)
PAH	Policiklični aromatski ogljikovodiki (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PCB	Poliklorirani bifenili (Polychlorinated Biphenyls)
PFPA	Anhidrid pentaflouropipionske kisline (Pentafluoropropionic Anhydride)
RIA	Radio-imunski test (RadioImmunoAssay)
Ru/TiO ₂	Rutenij na titanovem dioksidu (Rhutenum on Titanium Dioxide)

SiC	Silicijev karbid, inerten material (Silica Carbide, Inert Material)
SPE	Ekstrakcija na trdni fazi (Solid Phase Extraction)
SPME	Mikroekstrakcija na trdni fazi (Solid Phase Microextraction)
T	Testosteron (Testosterone)
TiO ₂	Titanov dioksid (Titanium Dioxide)
TOC	Vsebnost celotnega organskega ogljika (Total Organic Carbon content)
UV	Ultravijolična svetloba (Ultraviolet Light)
Vtg	Vitelogenin (Vitellogenin)
WAO	Mokra oksidacija (Wet Air Oxidation)
YES	Test določanja estrogene aktivnosti s kvasovkami (Yeast Estrogen Screen Assay)
λ	Valovna dolžina (Wavelength) (nm)

1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZE

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Vsakodnevno v okolje izpustimo precej več kemikalij oz. onesnaževal kot jih okolje samo lahko sprejme, kar je nadalje povezano s problemom razgradnje, saj vemo, da so industrijsko proizvedene kemikalije v večini težko (bio)razgradljive. Kopičenje le-teh v okolju ima tako kratkoročne kot tudi in predvsem dolgoročne posledice na življenske združbe v ekosistemu.

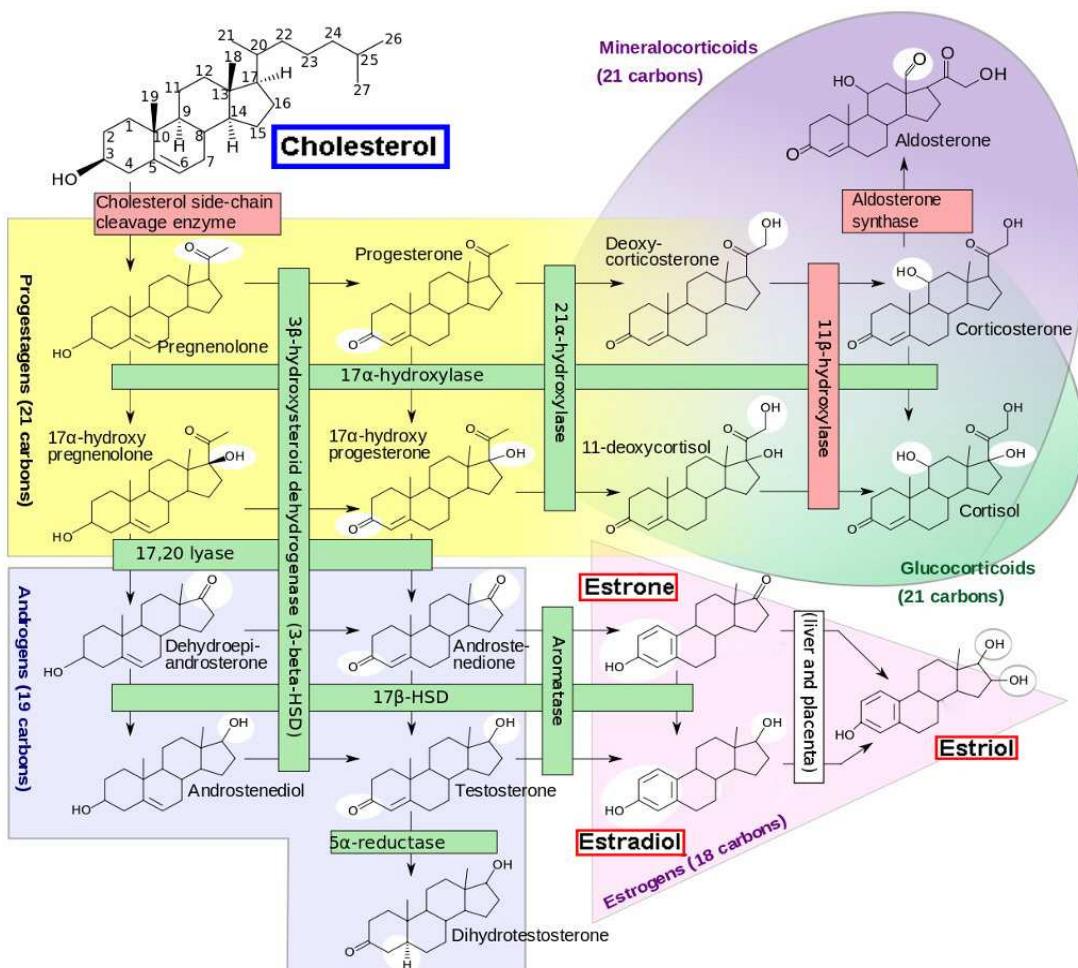
Ene izmed takšnih spojin z dolgoročnimi posledicami so spojine z estrogenim delovanjem. To so spojine, ki so sposobne z vezavo na estrogeni receptor in s tem z njegovo aktivacijo oz. deaktivacijo, ali pa z vplivom na proizvodnjo, transformacijo, aktivnost in/ali izločanje hormonov estrogenov, vplivati na ravnoesje hormonov v telesu. Posledično lahko porušitev hormonskega ravnoesa povzroči številne nepravilnosti v razvoju in razmnoževanju organizmov, posredno pa lahko tudi vpliva na nastanek, razvoj in potek določenih bolezenskih stanj.

Kot okoljski problem so se spojine z estrogenim delovanjem začele omenjati že v 90-tih letih 20. stoletja. Prva alarmna sporočila so prišla iz Velike Britanije že leta 1993, ko je za iztokom čistilne naprave prišlo do pojava hermafroditizma pri ribah (ENDS, 1993, cit. po De Mes, 2007). Sledile so prve znanstvene publikacije na to temo, tako je v letu 1996 Ameriška agencija za zaščito okolja objavila neželene zdravstvene vplive spojin z estrogenim delovanjem na organizme, ki so tem spojinam izpostavljeni (Barlow, 2001). Rezultat vseh teh raziskav je bila med drugim tudi identifikacija spojin z estrogenim delovanjem, kamor spadajo tako naravne spojine, kot tudi spojine, ki jih je proizvedel človek (ksenoestrogeni). Čeprav večina spojin z estrogenim delovanjem ni vključenih v seznam prednostnih snovi, ki ga je zasnovala Evropska unija v sklopu direktive o vodi (Directive 2008/105/EC), so številni raziskovalci prepričani, da potrebujejo posebno pozornost, saj predstavljajo potencialno tveganje za organizme, ki živijo v okolju onesnaženem z estrogeno aktivnimi spojinami (Bursch in sod., 2004; Nicolopoulou-Stamati in sod., 2000; Sumpter, 2005; Ternes in sod., 2004; idr.).

1.2 ESTROGENO AKTIVNE SPOJINE

1.2.1 Endokrini (hormonski) sistem

Endokrini (hormonski) sistem, ki skupaj z živčnim in imunskim sistemom predstavlja glavni regulatorni mehanizem za nadzorovanje ključnih funkcij v organizmu, s proizvodnjo hormonov vpliva na številne pomembne regulatorne, rastne in razvojne mehanizme organizma. Del endokrinega regulatornega sistema so tudi estrogeni hormoni, ki jih proizvajajo žleze z notranjim izločanjem (jajčniki in testisi) ter skorja nadledvične žleze, v manjši meri pa nastajajo tudi periferno pri pretvorbi androstenediona in testosterona v maščobnih celicah (Lintelmann in sod., 2003). Iz prekurzorja holesterola nastajajo tri oblike estrogenov (Slika 1), in sicer 17 β -estradiol (E2), estron (E1) in estriol (E3) (Ruggiero in Likis, 2002).

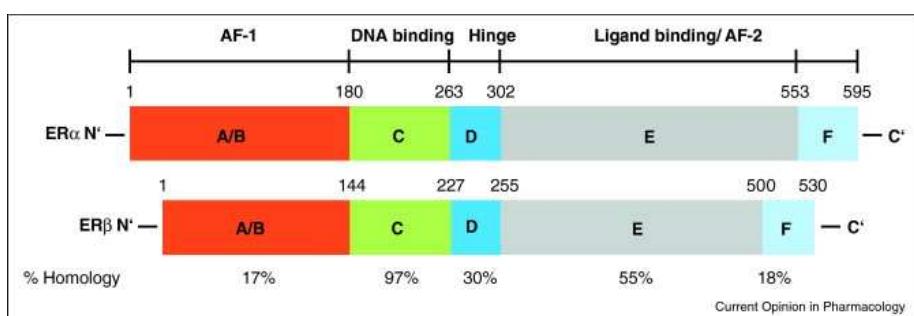


Slika 1: Producija steroidnih hormonov (med njimi tudi estrogenov E1, E2 in E3) (Richfield in Häggström, 2009)

Figure 1: Steroidogenesis (including production of estrogen hormones E1, E2 and E3) (Richfield and Häggström, 2009)

V krvi je le 2 % estrogenov v biološko aktivni obliki, ki se lahko veže na estrogeni receptor (ER) in tako sproži kaskado reakcij, kar v končni fazi vodi do fizioloških sprememb v organizmu. Vpliv estrogenov na fiziološke spremembe je odvisen od količine prostega estrogena in od afinitete vezave estrogena na receptor, pri čemer ima največjo afiniteto E2, manjšo pa E1 in E3. Odgovor, ki ga receptor da v primeru vezave estrogena na njegovo aktivacijsko mesto, je lahko agonističen (pospeši nadaljne dogodke) ali antagonističen (zavre potek nadaljnih dogodkov) (Lintelmann in sod., 2003; Ruggiero in Likis, 2002).

V različnih tkivih, tako moških kot žensk, se pojavljata dva tipa estrogenih receptorjev, ER α in ER β (Slika 2), ki imata le 58 % homologijo v vezavnem mestu za ligand, kar pomeni, da se nanju lahko vežejo strukturno različne spojine (Lintelmann in sod., 2003). ER α je izražen v maternici, jetrih, prsnem tkivu in ledvicah, ER β pa se poleg izražanja v razmnoževalnih tkivih, pojavlja še v možganih, kosteh, v tkivih sečil in celo mišicah. Tako biološki odgovor, ki ga estrogeni sprožijo z vezavo na receptor, ni omejen izključno na reprodukcijo (Gustafsson, 1999).



Slika 2: Dva tipa estrogenih receptorjev, ER α (zgoraj) in ER β (spodaj); ter njune funkcijске domene: AF-1 in 2 (A/B in E)- aktivni mesti, C- DNA vezavno mesto, E- vezavno mesto liganda (estrogena oz. ksenoestrogena), D- pregibno mesto (Leitman in sod., 2010: 630)

Figure 2: Two types of estrogen receptors, ER α and ER β and their functional domains: AF 1 and 2- Activation function; C- DNA-binding domain; D- Hinge; E- Ligand binding domain (Leitman et al., 2010: 630)

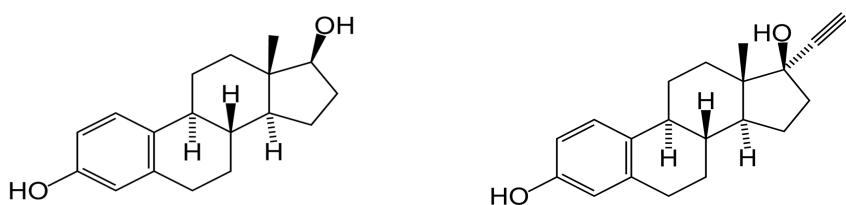
1.2.2 Estrogeno aktivne spojine oz. spojine z estrogenim delovanjem

Estrogeno aktivne spojine oz. spojine z estrogenim delovanjem (tudi t.i. hormonski motilci) so organizmu načeloma tuje snovi, ki vplivajo na sintezo, transport, vezavo, delovanje in izločanje naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za vzdrževanje ravnnovesja v organizmu (U.S.EPA, 1997). Mednje prištevamo tako naravne in sintetične

estrogene hormone, vključno s fitoestrogeni in mikroestrogeni, kot tudi umetno proizvedene spojine, ki posnemajo delovanje estrogenov (Lintelmann in sod., 2003). Koncept estrogeno aktivnih spojin in njihove aktivnosti na organizme je postavila Colborn s sodelavci leta 1993, v naslednjih letih pa je sledilo vse več objav na to temo, tako s stališča njihove detekcije, kot tudi možnosti njihovega odstranjevanja iz okolja (Sumpter, 2005).

1.2.2.1 Naravni in sintetični estrogeni hormoni

Naravni estrogeni hormoni (E1, E2 in E3) se proizvajajo tako v ženskem kot v moškem telesu ter igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju optimalnega stanja organizma (Shimada in sod., 2001). Iz človeškega telesa se izločijo s sečem in blatom, in sicer ženske 10 - 100 µg/dan, oz. ženske v menopavzi 5 - 10 µg/dan, in moški 2 - 25 µg/dan (Williams in Stancel, 1996, cit. po De Mes, 2007). Sintetični estrogen 17α -ethinilestradiol (EE2), ki je glavni estrogen v oralnih kontraceptikih, je strukturno zelo podoben naravnemu estrogenu E2 (Slika 3).



Slika 3: Struktura 17β -estradiola (E2) (levo) in 17α -ethynodola (EE2) (desno) (Wikipedia Common, 2007)

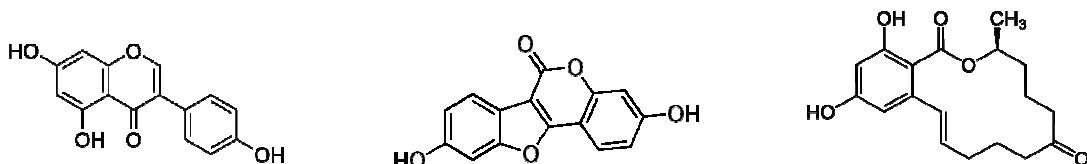
Figure 3: Structure of 17β -estradiol (E2) (left) and 17α -ethynodiol (EE2) (right) (Wikipedia Common, 2007)

Metabolizem estrogenov (tako naravnih kot sintetičnih) v jetrih vključuje proces konjugacije z glukoridno ali sulfatno skupino. S tem se poveča njihova topnost in posledično mobilnost v vodi, kar jim olajša izločanje iz telesa. Vendar pa so konjugirani estrogeni hormoni biološko neaktivni in niso estrogeno aktivni (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2003). Estrogeno aktivnost lahko spet pridobijo s procesom dekonjugacije, pri katerem glavno vlogo odigrajo mikroorganizmi, ki s svojimi encimi odstranijo glukuronsko oz. sulfatno skupino iz molekule estrogenih hormonov (Dray in sod., 1972). Estrogeni hormoni izločeni iz telesa s sečem so v neaktivni (konjugirani) obliki, izločeni z blatom pa so po večini v aktivni (nekonjugirani) obliki.

1.2.2.2 Ksenoestrogeni

V skupino ksenoestrogenov spadajo spojine, ki so si različne tako po kemijski strukturi kot tudi po izvoru, skupno jim je le to, da so človeku tuje snovi in da lahko vplivajo na ravnowesje hormonov v telesu. Tako v skupino ksenoestrogenov spadajo fitoestrogeni, mikoestrogeni, površinsko aktivne snovi, organske kisikove spojine, poliaromatski ogljikovodiki (PAH), poliklorirani bifenili (PCB), pesticidi, itd.

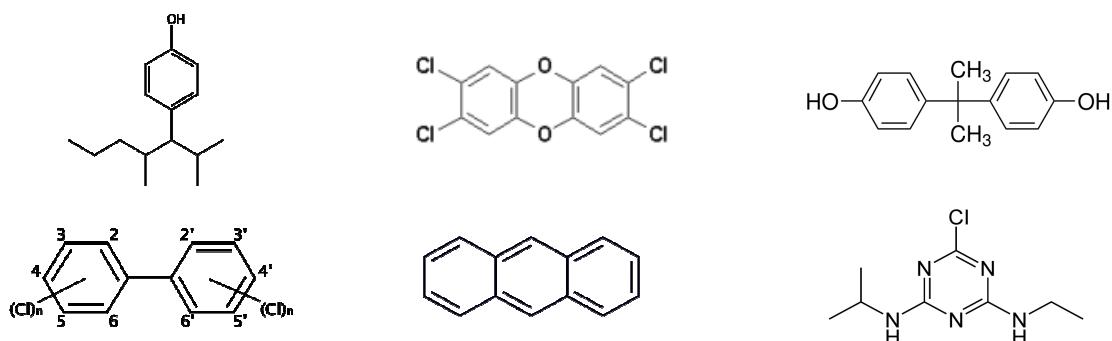
Med dokazano estrogeno aktivne fitoestrogene in mikoestrogene (naravne spojine, ki jih proizvajajo rastline oz. glice) štejemo genistein, kumestrol, zeralenon, ekvol, resveratrol, deoksimiroestrol itd. (Slika 4) (Collins in sod., 1997; IEH, 2005; Mueller, 2002).



Slika 4: Fitoestrogena genistein (levo) in kumestrol (na sredini) ter mikoestrogen zeralenon (desno) (Wikipedia Common, 2007)

Figure 4: Fitoestrogena genistein (levo) in kumestrol (na sredini) ter mikoestrogen zeralenon (desno) (Wikipedia Common, 2007)

Med površinsko aktivne snovi spadajo alkilfenolni etoksilati, nonilfenolne in oktilfenolne spojine, ki se uporabljajo za mila in detergente. V skupino organskih kisikovih spojin spadajo dioksini, ftalati in bisfenoli, ki se uporabljajo predvsem kot aditivi za mehčanje plastike. Estrogeno aktivnost pa kažejo tudi različni pesticidi, herbicidi, insekticidi in fitofarmacevtska sredstva, katerih seznam se iz dneva v dan veča (Slika 5) (IEH, 2005).



Slika 5: Ksenoestrogeni: nonilfenol (zgoraj levo), dioksin TCCD (zgoraj na sredini), bisfenol A (zgoraj desno), polikloriran bifenil (PCB, spodaj levo), antracen (PAH, spodaj na sredini) in atrazin (herbicid, spodaj desno) (Wikipedia Common, 2007)

Figure 5: Xenoestogens: nonylphenol (upper left), dioxin TCCD (upper in the middle), bisphenol A (upper right), PCB (down left), anthracene (down in the middle) and atrazine (down right) (Wikipedia Common, 2007)

1.2.3 Estrogeno aktivne spojine v okolju

Vodno okolje je še posebej dovzetno za onesnaževanje, tako zaradi direktnih izpustov onesnaževal v okolje preko odpadnih voda iz gospodinjstev in različnih industrij, kot tudi posredno zaradi spiranja onesnaževal iz zemlje in ozračja (Sumpter, 2005). Zaradi večanja svetovnega prebivalstva in posledično zaradi večje rabe pitne vode, se iz leta v leto veča količina odpadnih vod. Prav tako se iz leta v leto povečuje število na novo proizvedenih kemikalij. Oboje ima za posledico vedno večje onesnaževanje okolja, tudi z estrogeno aktivnimi spojinami, ki predstavljajo pereč problem v mnogih državah. Čeprav večina teh spojin ni vključenih v seznam prednostnih snovi, ki ga je zasnovala Evropska unija v sklopu direktive o vodi (Directive 2008/105/EC), potrebujejo posebno pozornost, kar so potrdili številni raziskovalci, ki so v njih prepoznali potencialno tveganje za vodno okolje (Körner in sod., 2001; Nilsson, 2000; Sumpter, 2005; Ternes in sod., 1999).

Pomemben vir spojin z estrogenim delovanjem so predvsem iztoki iz čistilnih naprav, ki onesnažujejo površinske vode in lahko prehajajo v tla in podtalnico, izjeme pa niso niti netočkovni viri onesnaževanja, kot so npr. kmetijske površine. Zaradi lastnosti, kot so slaba topnost v vodi in slaba biorazgradljivost, so estrogeno aktivne spojine v okolju dolgo obstojne. Njihovo nepopolno odstranjevanje iz odpadnih vod dokazano vpliva na hormonska ravnovesja ter posledično na razvoj, razmnoževanje in obnašanje organizmov, ki živijo v vodotokih za iztoki teh odpadnih voda (Guillette in sod., 2000; Jobling in sod., 1998; Keiter in sod., 2006; Stahlschmidt-Allner in sod., 1997; Sumpter, 2005).

V projektu COMPREHEND, v katerem so izvedli 3-letni (1999–2001) monitoring iztokov iz komunalnih čistilnih naprav v sedmih evropskih državah (Švica, Anglija, Francija, Nizozemska, Norveška, Švedska in Finska), so ugotovili, da so spojine z estrogenim delovanjem splošno razširjene v odpadnih vodah. Pri približno tretjini preiskovanih komunalnih odpadnih vod in tudi pri nekaterih industrijskih odpadnih vodah (predvsem pri odpadnih vodah iz kemične oz. farmacevtske industrije) so določili prisotnost snovi z estrogenim delovanjem, tako z *in vivo* in z *in vitro* testi, kot tudi s kemijskimi metodami. Vpliv estrogeno aktivnih spojin so zaznali tudi na ribah v rekah za iztokih odpadnih voda, in sicer kot povišano vsebnost proteina vitelogenina (Vtg) (prekurzor jajčnega proteina, ki

se načeloma izraža le pri ženskih osebkih) pri vrstah kot so ploščič (*Aramis brama*), krap (*Cyprinus carpio*) in rdečeoka (*Rutilus rutilus*), ki vse spadajo v družino krapovcev. Nadalje so ugotovili, da se estrogena aktivnost odpadnih vod na čistilnih napravah po sekundarnem biološkem čiščenju zmanjša, najverjetneje zaradi adsorpcije na aktivno blato in/ali razgradnje ter da se lahko estrogena aktivnost po samo primarnem čiščenju (ki vključuje le sedimentacijo grobih delcev) celo poveča, najverjetneje zaradi dekonjugacije naravnih in sintetičnih estrogenov s strani mikroorganizmov v odpadni vodi (kot npr. *Escherichia coli*) (Eggen in sod., 2003). Vpliv dekonjugacije na estrogeno aktivnost so opisali tudi Baronti in sod. (2000), Belfroid in sod. (1999), D'Ascenzo in sod. (2003), Körner in sod. (2000), Pickering in Sumpter (2003) in Ternes in sod. (1999). In sicer, konjugirani estrogeni hormoni se dekonjugirajo deloma že na poti do čistilne naprave (estrogeni hormoni konjugirani z glukoridno skupino), preostanek pa tekom procesov na čistilni napravi (estrogeni hormoni konjugirani s sulfatno skupino). Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin in njihove estrogene aktivnosti tekom procesa čiščenja odpadnih vod na čistilnih napravah oz. njihovo zmanjšanje, je opisalo več avtorjev, kot npr. Baronti in sod. (2000), Behnisch in sod. (2001), Clara in sod. (2004), Körner in sod. (2000), Ternes in sod. (1999), Ying in sod. (2008), idr. Velik del tega odstranjevanja je predvsem posledica adsorpcije spojin na aktivno blato (Clara in sod., 2004; Liu in sod., 2009; Marttinen in sod., 2003), kar pa nadalje predstavlja problem z odlaganjem odpadnega aktivnega blata. Neodstranjene estrogeno aktivne spojine lahko tako zaznamo v iztokih iz čistilnih naprav (Gómez in sod., 2007; Sumpter, 2005) in v površinskih vodah, kljub temu, da se ob stiku z vodnim okoljem odpadne vode precej razredčijo (Baronti in sod., 2000; Larsson in sod., 1999).

Čeprav se estrogeni hormoni v naravi pojavljajo v mnogo nižjih koncentracijah kot ksenoestrogeni, npr. Larsson s sodelavci (1999) poroča o naslednjih izmerjenih koncentracijah estrogenov in ksenoestrogenov: 4,5 ng/l (EE2), 1,1 ng/l (E2), 5,8 ng/l (E1) ter 840 ng/l (4-nonilfenol) in 490 ng/l (bisfenol A), pa so estrogeni hormoni zaradi večje afinitete do vezave z estrogenim receptorjem bolj estrogeno aktivni kot ksenoestrogeni in zato prispevajo večinski delež k estrogeni aktivnosti v odpadnih vodah (Desbrow in sod., 1998; Onda in sod., 2002). Zato je tudi večja pozornost usmerjena prav na estrogene hormone. Tako so bile izmerjene povprečne celokupne koncentracije estrogenih hormonov

E2, EE2, E1 in E3 na vtokih na čistilne naprave okoli 150 ng/l v Italiji (Baronti in sod., 2000), 67 ng/l v Braziliji (Ternes in sod., 1999) in do 200 ng/l na Nizozemskem (Johnson in sod., 2000). Na iztokih iz čistilnih naprav so bile povprečne celokupne koncentracije estrogenih hormonov nižje, in sicer do 105 ng/l v Italiji (Baronti in sod., 2000), do 60 ng/l na Nizozemskem (Johnson in sod., 2000), do 154 ng/l v Kanadi (Ternes in sod., 1999), do 88 ng/l v Nemčiji (Ternes in sod., 1999) in do 130 ng/l v Angliji (Desbrow in sod., 1998).

Zaenkrat v slovenski zakonodaji na področju monitoringa kakovosti površinskih in odpadnih voda, ki sledi evropski zakonodaji, področje estrogeno aktivnih spojin ni docela opredeljeno in urejeno (Ur.l. RS št. 40-2315/2001; Ur.l. RS št. 74-3983/2007; Directive 2008/105/EC). Zato tudi ni zakonsko predpisanih postopkov ugotavljanja prisotnosti estrogeno aktivnih spojin v odpadnih vodah in postopkov njihovega odstranjevanja iz odpadnih voda, preden le-te vstopijo v vodno okolje. V slovenskem programu monitoringa odpadnih vod (Ur.l. RS št. 74-3983/2007) je predpisano le, da se izvaja monitoring nekaterih ksenoestrogenov, kot so nonilfenoli, oktilfenoli, ftalati, ne pa tudi naravnih in sintetičnih estrogenih hormonov, kot so E2, E1 in EE2. Kljub temu obstajajo podatki o izmerjenih koncentracijah E1, E2 in E3 v slovenskih odpadnih vodah, in sicer do 66,3 ng/l E1, 12,6 ng/l E2 in 115,9 ng/l E3 v vtokih ter do 6,1 ng/l E1, 2,1 ng/l E2 in 98,4 ng/l E3 na iztokih čistilnih naprav (Avberšek in sod., 2009).

1.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI IN AKTIVNOSTI ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN

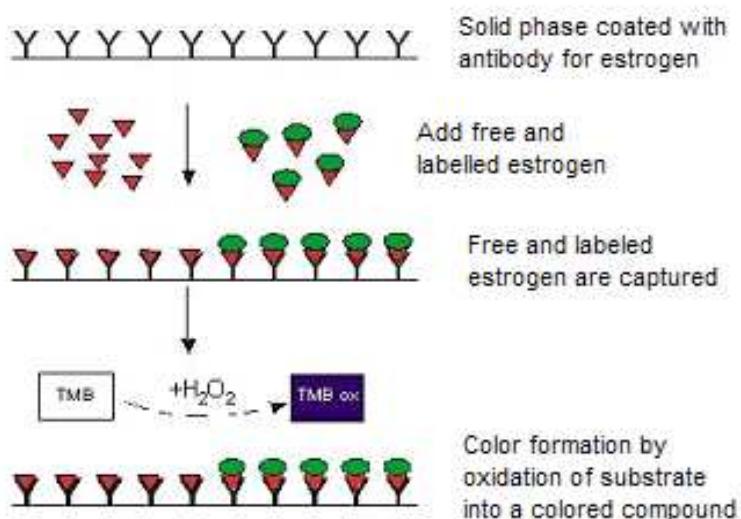
Sodobni trendi monitoringa odpadnih vod težijo k celostnemu pristopu, ki vključuje kemijske analitske in biološke metode. Temu sledijo tudi trendi za ugotavljanje prisotnosti in aktivnosti estrogeno aktivnih spojin v odpadnih vodah. Tako z ustreznimi biološkimi metodami ugotovimo morebitno estrogeno aktivnost vzorcev, nato pa s kemijskimi analitskimi metodami identificiramo in kvantificiramo spojine, ki povzročajo učinke estrogenosti. Zaradi kompleksnosti okoljskih vzorcev namreč s kemijskimi analizami ne moremo izmeriti vseh prisotnih snovi v vodi, saj večinoma ne poznamo natančne sestave vzorcev. Z biološkimi metodami pa dobimo neposreden odgovor organizmov o delovanju prisotnih estrogenih snovi v vzorcu (Kinnberg, 2003; Stuer-Lauridsen in sod., 2005; Sun in sod., 2008; Viganó in sod., 2008; Wharfe, 2004).

1.3.1 Biološke metode za dokazovanje prisotnosti estrogeno aktivnih spojin

Z ustreznimi biološkimi *in vitro* in *in vivo* metodami (Andersen in sod., 1999; Campbell in sod., 2006; Eertmans in sod., 2003) ugotavljamo morebitno estrogeno aktivnost vzorcev, s čimer dobimo neposreden odgovor organizmov o delovanju vseh prisotnih estrogenih snovi in njihovih interakcijah (aditivizem, antagonizem, sinergizem) v vzorcu.

1.3.1.1 Imunološke metode

Imunološke metode, ki vključujejo teste ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) in teste RIA (Radioimmunoassay), temeljijo na reakcijah estrogenov s protitelesi. Estrogen iz vzorca se veže na ustreznega protitelesa, z dodatkom encimske ali radioaktivne označenega estrogena pa zapolnimo preostala prosta mesta na protitelesih (Slika 6) (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003). S temi metodami je možna tudi kvantifikacija estrogeno aktivnih spojin (predvsem estrogenih hormonov in pesticidov) v okoljskih vzorcih (Fukuhara in sod., 2006; Meulenbergh in sod., 1995; Van Emon in Lopez-Avila, 1992; Van Emon in Gerlach, 1998).



Slika 6: Postopek določanja estrogenov s testom ELISA (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003: 61)

Figure 6: ELISA procedure (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003: 61)

1.3.1.2 *In vitro* testi

V skupino *in vitro* testov spadajo testi, ki vključujejo pomnoževanje celic ("cell proliferation assays"), testi s kompetitivno vezavo ligandov ("competitive ligand binding assays") in testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov ("*in vitro* gene expression assays") (Snyder in sod., 2000; Voulvoulis in Scrimshaw, 2003). Pri teh testih se estrogeni in ksenoestrogeni (sposobni vezave na estrogeni receptor) vežejo na receptorje za estrogene (ER) in s tem vplivajo na različne biološke aktivnosti (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

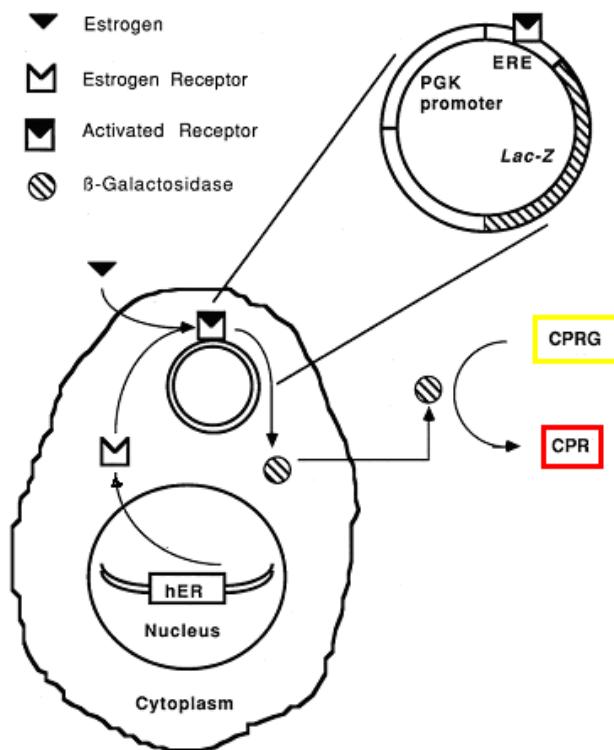
Metode pomnoževanja celic temeljijo na pomnoževanju celic zaradi indukcije s strani estrogenov oz. ksenoestrogenov. Največkrat uporabljene celične linije, ki se odzivajo na estrogene so linije človeških celic MCF-7 (test E-screen). Spojine, ki so se s tem testom izkazale za estrogeno aktivne so različni alkilfenoli (nonilfenol, butilfenol), bisfenol A, različni klorofenoli, organoklorove spojine (DDT, dieldrin, metoksiklor), PCB in ftalati (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

Pri testih s kompetitivno vezavo gre za tekmovanje za vezavo na estrogene receptorje med (kseno)estrogeni v vzorcu in radioaktivno označenimi estrogeni (ponavadi [^3H]17 β -estradiol). Tako so potrdili estrogeno aktivnost različnih PAH, alkilfenolov, ftalatov, itd. (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

Testi *in vitro*, ki temeljijo na ekspresiji genov, uporabljajo gensko spremenjene celice sesalcev (npr. test ER-Calux) ali gensko spremenjene kvasovke (test YES), ki so bile transformirane z rekombinantno DNA, zaradi česar ob izpostavitvi estrogenom oz. ksenoestrogenom proizvajajo določene proteine in encime. Test ER-Calux uporablja gensko spremenjene človeške celice raka dojke, ki v prisotnosti estrogeno aktivnih spojin proizvajajo encim luciferazo. Ob dodatku substrata luciferina poteče reakcija z luciferazo, kar zaznamo kot spremembo intenzitete luminiscenčne svetlobe (Legler, 2002; Murk in sod., 2002).

Pri testu YES (Yeast Estrogen Screen) uporabljamо gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki imajo v svoj genom vstavljen gen za humani receptor za estrogen (hER) ter ekspresijski plazmid, ki nosi zapis za reporterski gen lac-Z. Ob

prisotnosti in vezavi estrogena oz. ksenoestrogena na hER, se dimer (kseno)estrogen-hER veže na del zaporedja DNA imenovan ERE (Estrogen Responsive Element). Le-to je pod močnim promotorjem v ekspresijskem plazmidu, pod kontrolo katerega je tudi gen za lac-Z, ki kodira zapis za encim β -galaktozidaza. Tako pride ob vezavi dimera (kseno)estrogen-hER na zaporedje ERE do izražanja β -galaktozidaze. Ob dodatku substrata klorofenol-rdeče- β -D-galaktopiranozid (CPRG), ga omenjeni encim razgradi do razgradnega produkta klorfenol rdeče (CPR), kar zaznamo kot barvno spremembo iz rumene v rdeče-vijolično, hkrati pa odziv merimo tudi spektrofotometrično pri valovni dolžini 540 nm (Routledge in Sumpter, 1996) oz. 575 nm (Bistan s sod., 2012) (Slika 7). Tako je torej preko merjenja aktivnosti encima β -galaktozidaza omogočeno merjenje aktivnosti estrogenega receptorja. S testom YES in njegovimi različicami (Beck in sod., 2005; Li in sod., 2008; Sanseverino in sod., 2005; Schultiz in Metzger, 2004) zaznamo estrogene in ksenoestrogene v vodi, ki so se sposobni vezati na aktivacijsko mesto receptorja za estrogen (Collins in sod., 1997; Fent in sod., 2006; Jungbauer in Beck, 2002).



Slika 7: Shematski prikaz estrogeno aktiviranega ekspresijskega sistema v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (Routledge in Sumpter, 1996: 242)

Figure 7: Schematic of the estrogen-inducible expression system in yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Routledge and Sumpter, 1996: 242)

Izmed *in vitro* testov se za določanje estrogenosti okoljskih vzorcev največkrat uporablja test YES, kar so potrdili mnogi raziskovalci (Beck in sod., 2006; Campbell in sod., 2006; Denier in sod., 2008; Jürgens in sod., 2002; Kinnberg, 2003; Ma in sod., 2007; Miège in sod., 2009; Murk in sod., 2002; Nelson in sod., 2007; Streck, 2009; Yang in Cicek, 2008).

V obsežni raziskavi so Andersen in sodelavci (1999) primerjali različne *in vitro* teste in njihovo občutljivost za različne estrogene in ksenoestrogene in ugotovili, da prihaja med njimi do manjših odstopanj. Testi s kompetitivno vezavo ligandov v nasprotju z "E-Screen" testom ne ločijo med agonističnimi in antagonističnimi vplivi preiskovanih spojin, kvasne celice in celice iz celične linije MCF-7 pa lahko pretvorijo nekatere spojine, ki v osnovi nimajo estrogeno aktivnosti, v estrogeno aktivne spojine (npr. metoksiklor in bisfenol A dimetakrilat). Te pomanjkljivosti so glavni razlog, zakaj je težko izbrati in standardizirati določen test za dokazovanje estrogenosti (Voulvouliis in Scrimshaw, 2003).

Čeprav so *in vitro* testi zelo uporabni predvsem za monitoring estrogenosti odpadnih voda, ker so hitri, ponovljivi in cenovno ugodni, njihove rezultate ne moremo ekstrapolirati na *in vivo* teste, saj *in vitro* testi določamo samo estrogeno aktivne spojine, ki se vežejo z estrogenim receptorjem, ne pa tudi spojine, ki vplivajo na ravnotesje hormonskega sistema preko drugih mehanizmov, npr. preko vpliva na sintezo ali metabolizem hormonov. Prav tako z *in vitro* testi ne določimo estrogenega učinka spojin, ki šele s pretvorbo v organizmu postanejo estrogeno aktivne. Zato je potrebno za določanje estrogenega učinka na okolje uporabiti še *in vivo* teste (Kinnberg, 2003).

1.3.1.3 *In vivo* testi

In vivo testi temeljijo na določanju odgovora celotnega organizma, ki je bil izpostavljen vzorcu estrogeno aktivne spojine. Največkrat uporabljeni testni organizmi so ribe *Danio rerio*, *Cyprinodon variegatus*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, idr., pri katerih opazujemo vpliv izpostavljenosti na razmnoževanje v različnih stopnjah razvoja organizma: proizvodnja jajčec, preživetje in razvoj zarodkov do larve, določanje sekundarnih spolnih značilnosti in določanje vitelogenina (Brion in sod., 2004; Folmar in sod., 2002; Nash in sod., 2004; Papoulias in sod., 1999; Sumpter in Jobling, 1995; Hill in

Janz, 2003; Weber in sod., 2003). Najpogosteje se uporablja določanje vitelogenina s testom Vtg-ELISA (Vitellogenin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), ki temelji na določanju vitelogenina (Vtg) v krvi samcev in mladic rib *D. rerio*, *P. promelas* in *O. latipes* (Brion in sod., 2002; Ebrahimi, 2005; Nilsen in sod., 2004; Rose in sod., 2002). Več o *in vivo* testu z ribami zebričami najdemo v podpoglavlju 2.2.1.1.

1.3.2 Kemijske metode identifikacije in kvantifikacije estrogeno aktivnih spojin

1.3.2.1 Kromatografske metode

Najpogosteje uporabljene metode za identifikacijo in kvantifikacijo estrogeno aktivnih spojin so predvsem različne kromatografske metode, kot so plinska kromatografija (GC), visoko tlačna tekočinska kromatografija (HPLC) in njihove izpeljanke z masnim detektorjem (MS ali MS-MS), s čimer se poveča specifičnost in občutljivost metode (Gabet in sod., 2007; Miège in sod., 2009b; Voulvoulis in Scrimshaw, 2003). Meje detekcije estrogeno aktivnih spojin se pri teh metodah gibljejo v rangu ng/l (Ballesteros in sod., 2006; Gabet in sod., 2007; Hernando in sod., 2004; Miège in sod., 2009b; Soliman in sod., 2004; Streck, 2009). Izbera kromatografske kolone, stacionarne in mobilne faze, detektorja ter kromatografskega programa je odvisna od spojin, ki jih želimo zaznati ter njihovih lastnosti (Voulvoulis in Scrimshaw, 2003).

Nekateri avtorji (Ballesteros in sod., 2006; Mouatassim-Souali in sod., 2003; Stuer-Lauridsen in sod., 2005) opisujejo predhodno derivatizacijo estrogeno aktivnih spojin z različnimi derivatizacijskimi spojinami, kot npr. PFPA (anhidrid pentaflouropipionske kisline) ali mešanica BSTFA/TMCS, kar bi naj povečalo njihovo hlapnost in lažje določanje s plinsko kromatografijo.

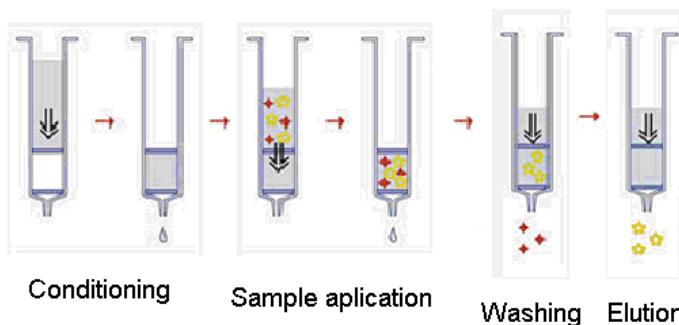
1.3.3 Detekcija estrogeno aktivnih spojin v okoljskih vodnih vzorcih

1.3.3.1 Koncentriranje estrogenov in ksenoestrogenov iz vodnih vzorcev

Ker se estrogeni in ksenoestrogeni pojavljajo v okolju v sledovih (t.j. v ng/l oz. µg/l koncentracijah), je za kemijsko analizo in biološke preizkuse potrebno predhodno koncentriranje spojin iz vodnih vzorcev. Le-to opravimo z različnimi postopki ekstrakcije

(Ballesteros in sod., 2006; Gabet in sod., 2007; Soliman in sod., 2004; idr.), med katerimi je največkrat uporabljen postopek ekstrakcije na trdni fazi v kolonski izvedbi (SPE postopek) (Ballesteros in sod., 2006; Brossa in sod., 2005; Gabet in sod., 2007; Hernando in sod., 2004; Janex-Habibi in sod., 2009; Li in sod., 2007; Lopez de Alda in Barceló, 2001; Nakada in sod., 2004; Poole, 2003).

Osnovni princip ekstrakcije na trdni fazi je porazdelitev komponent iz vzorca med trdno fazo, ki jo predstavlja kolona z ustreznim polnilom, in tekočo fazo, ki jo predstavlja vzorec. Postopek sestoji iz petih faz: kondicioniranje kolone (s čimer aktiviramo nosilce v koloni) in odstranitev aktivacijskega topila (s tekočino, ki ima podobno sestavo kot preiskovani vzorec), nanos vzorca (največkrat ob ustvarjenem nadtlaku), spiranje motečih sestavin (z vodo ali ustreznim pufrom) in spiranje (elucija) iskanih spojin s primernim organskim topilom (Slika 8). Za učinkovito izvedeno ekstrakcijo je ključnega pomena izbira kolone s primernim polnilom in primernega topila za spiranje iskanih spojin (Poole, 2003; Wells, 2000; Wells, 2003).

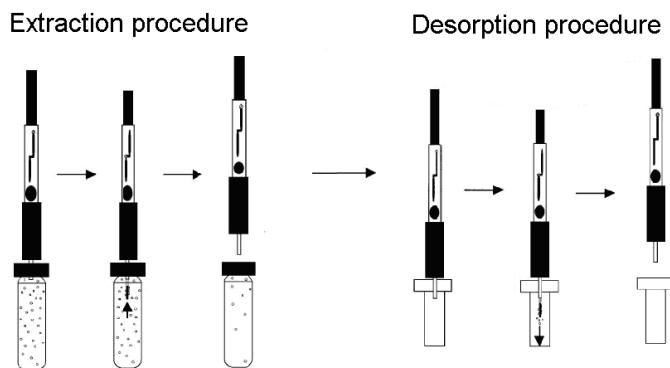


Slika 8: Postopek ekstrakcije in koncentriranja z metodo SPE (Sorbtech, 2011)

Figure 8: Solid-phase extraction procedure (Sorbtech, 2011)

Za ekstrakcijo in koncentriranje estrogeno aktivnih spojin se uporablja SPE kolone z različnimi polnili, največkrat silikagel z vezanimi oktilnimi skupinami (C-18) v kolonah LiChrolut RP-18 (Merck (Darmstadt, Germany) (Ballesteros in sod., 2006; Lopez de Alda in Barceló, 2001) ali polimere v kolonah Oasis® HLB (Waters Oasis Corporation, MA, ZDA) (Ballesteros in sod., 2006; Gabet in sod., 2007; Hernando in sod., 2004) in Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (Ballesteros in sod., 2006; Gabet in sod., 2007).

Lahko pa za ekstrakcijo estrogeno aktivnih spojin uporabimo tudi t.i. mikroekstrakcijo na trdno fazo (Solid-Phase Micro Extraction oz. SPME) (Gabet in sod., 2007; Eisert in Levsen, 1996; King in sod., 2003; Yang in sod., 2006; Zafra in sod., 2003). Ekstrakcija spojin v tem primeru poteka na vlakno igle, ki ga potopimo v vzorec, termalna desorpcija pa nato v injektorju plinskega kromatografa (Slika 9) (Eisert in Levsen, 1996).



Slika 9: Postopek mikroekstrakcije: adsorpcija v viali (levo) in desorpcija v injektorju plinskega kromatografa (desno) (Supelco, 1998: 1)

Figure 9: Solid-phase microextraction (SPME) procedure: adsorption on the SPME needle in the vial (left) and desorption in GC injector (right) (Supelco, 1998: 1)

1.3.3.2 Dodatno čiščenje ekstraktov vzorcev s silikagelom

Pri določanju estrogeno aktivnih spojin v okoljskih vodnih vzorcih z visoko vsebnostjo organskih spojin je včasih potrebno tudi dodatno čiščenje ekstraktov, npr. pri vzorcih vtokov na čistilne naprave, saj bi v nasprotnem primeru druge (predvsem organske) spojine motile tako zaznavo estrogene aktivnosti kot tudi samo identifikacijo in kvantifikacijo estrogeno aktivnih spojin. V ta namen se uporabljajo kolone s silikagelskim polnilom, spiranje pa poteka z organskimi topili kot so etil acetat, heksan, mešanica cikloheksana in acetona, idr. (Gabet in sod., 2007; Streck, 2009). Ta postopek je predvsem uporaben npr. pri detekciji estrogeno aktivnih spojin s testom YES (Beck in sod., 2006; Ma in sod., 2007; Sun in sod., 2008).

1.3.3.3 Dekonjugacija vzorcev

Za določanje vseh estrogenov (tako nekonjugiranih kot konjugiranih) v vodnih vzorcih je potrebna še hidroliza oz. dekonjugacija konjugiranih naravnih in sintetičnih estrogenov, ki jo lahko izvajamo pred ali po ekstrakciji vzorca s SPE. Postopek dekonjugacije poteka z encimom β -glukuronidaza (HP-2 izolirana iz velikega vrtnega polža *Helix pomatia*), ki ima tako glukoronidazno kot tudi sulfatazno aktivnost (Belfroid in sod., 1999; Mouatassim-Souali in sod., 2003).

1.3.3.4 Izgube estrogenov med analizo

Pri postopkih priprave vzorcev za kemijske in biološke analize prihaja tudi do izgub, kar je pomembno predvsem pri analizi vzorcev, kjer so prisotne majhne količine estrogenov oz. ksenoestrogenov. Walker in Watson (2010), ki sta preučevala adsorpcijo estrogenov na laboratorijski material, sta ugotovila, da se estrogeni najbolje vežejo na plastiko ali nerjaveče jeklo, do najmanjših izgub (tako prostih kot konjugiranih estrogenov) pa prihaja ob shranjevanju vzorcev v steklenih posodah. Do izgub prav tako prihaja pri filtriranju vzorcev (kadar imamo v vzorcu večje delce, je priporočljivo vzorec najprej prefiltrirati, s tem se izognemo mašenju SPE kolon) (Wells, 2000), pri postopku SPE koncentriranja (od 2 do 27 % izgub; Stuer- Lauridsen in sod., 2005) in pri čiščenju vzorca na silikagelu (od 7 do 24 % (Stuer-Lauridsen in sod., 2005) oz. okoli 8 % po poročanju Aerni in sod. (2004) in Hajkova in sod. (2007)).

Ker se včasih postopkov obdelave vzorcev ne moremo lotiti takoj, je potrebno vzorce za določen čas shraniti. Baronti s sodelavci (2000) je ugotovil, da je najboljši način shranjevanja vzorcev z estrogeno aktivnimi spojinami na SPE kolonah (po nanosu vzorca in spiranju nečistoč kolone posušimo z majhnim pretokom dušika N₂), ki jih shranimo na -20°C. S tem postopkom shranjevanja se po 60 dneh ohrani 93 % E1, 89 % E2, 92 % E3 in 92 % EE2.

1.4 METODE ZA ODSTRANJEVANJE ESTROGENO AKTIVNIH SPOJIN

Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin iz vodnih vzorcev je možno z različnimi biološkimi in fizikalno-kemijskimi ter naprednimi oksidacijskimi postopki.

1.4.1 Biorazgradnja in fotorazgradnja estrogeno aktivnih spojin

Nekateri estrogeni (E1, E2, E3) in ksenoestrogeni (bisfenol A, 4-nonilfenol) so lahko deloma biorazgradljivi, vendar je proces biorazgradnje v primerjavi s kemijskimi procesi dolgotrajnejši in manj učinkovit.

Jürgens in sodelavci (2002), ki so študirali razgradnjo E2 in EE2 v rekah v Angliji so ugotovili, da se E2 razgradi tako v aerobnih kot anaerobnih pogojih ter da je razgradnja EE2 slabša kot razgradnja E2, oba pa sta razgradljiva tudi na svetlobi.

Gaulke s sodelavci (2008) in Khunjar s sodelavci (2011) trdijo, da so za razgradnjo estrogenih hormonov v aktivnem blatu zaslužni specifični mikroorganizmi, ki rastejo in se razmnožujejo počasi in rabijo za svoje delovanje prisoten amonij (amonij oksidirajoče bakterije), kot npr. *Nitrosomonas europaea*. Na drugi strani čedalje več raziskovalcev meni, da biorazgradnja estrogenih hormonov poteka s heterotrofnimi mikroorganizmi, ki so prisotni v aktivnem blatu (Shi in sod., 2004; Bagnall in sod., 2012; Larcher in Yargeau, 2012), kot so npr. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* in *Rhodococcus zopfii* (Larcher in Yargeau, 2012). Shi s sodelavci (2004) ugotavlja, da razgradnja E2 poteče do intermediatov (npr. E1, nitro-estrogeni) z nitrifikatorji kot je *N. europaea*, le-te pa nato dokončno razgradijo heterotrofni mikroorganizmi. Na čistilih napravah sočasno z biorazgradnjo poteka tudi proces adsorpcije na aktivno blato, predvsem zaradi hidrofobnosti estrogenov in ksenoestrogenov (Urase in Kikuta, 2004). Biorazgradnja naravnih estrogenov E1, E2 in E3, ne pa tudi sintetičnega estrogena EE2, se lahko vrši tudi v anaerobnih pogojih z železo (Fe(III)) reducirajočimi bakterijami (Ivanov in sod., 2009) oz. metanogenimi ter nitrat ali sulfat reducirajočimi bakterijami (Czajka in Londry, 2006), pri čemer pa se E2 razgradi do E1 in 17 α -estradiola, ki sta še vedno estrogeno aktivna. Nadalje se je izkazalo, da je tudi ksenoestrogen bisfenol A biorazgradljiv v aerobnih in v

anaerobnih pogojih, in sicer z mikroorganizmi rodu *Bacillus sp.* GZB (Li in sod., 2012) do končnih produktov, ki niso več estrogeno aktivni.

Tudi lignocelulozne glice (*Irpeus lacteus* 617/93, *Bjerkandera adusta* 606/93, *Phanerochaete chrysosporium* ME 446, *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/I, *Pleurotus ostreatus* 3004 CCBAS 278, *Trametes versicolor* 167/93, *Pycnoporus cinnabarinus* CCBAS 595 in *Dichomitus squalens* CCBAS 750) so sposobne razgraditi nekatere estrogeno aktivne spojine, kot so 4-n-nonilfenol, 4-nonilfenol, bisfenol A, EE2 in triklosan (Cajthaml in sod., 2009). Načeloma pa za ksenoestrogene velja, da so po večini slabo biorazgradljivi in zato v okolju dobro obstojni.

V vodnem okolju lahko pride tudi do fotorazgradnje nekaterih estrogenov in ksenoestrogenov (Barbieri in sod., 2008; Burrows in sod., 2002; Chowdhury in sod., 2011; Peng in sod., 2006; Zou in sod., 2004), pri čemer igrajo pomembno vlogo huminske kisline oz. raztopljene organske spojine in/ali ioni (kot npr. Fe^{3+} in NO_3^-). Ti omogočijo oz. pospešijo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti, ki nato omogočijo razgradnjo estrogenov oz. ksenoestrogenov (Barbieri in sod., 2008; Chowdhury in sod., 2011; Peng in sod., 2006).

1.4.2 Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin s fizikalno - kemijskimi postopki

Med fizikalno-kemijske postopke, ki se uporablajo za čiščenje odpadnih voda, spadajo procesi sedimentacije, koagulacije, različni membranski procesi (nanofiltracija, ultrafiltracija, reverzna osmoza) ter uporaba aktivnega oglja. Carballa in sod. (2004) trdijo, da sta za 65 % odstranitev E2 tekom čiščenja na čistilni napravi kriva tako razgradnja E2 (do E1, saj se je koncentracija slednjega na iztoku povečala) kot adsorpcija na aktivno blato. Farmacevtski ostanki (kot npr. diklofenak, karbamazepin, bezafibrat in primidon) se s flokulacijo z FeCl_3 ne odstranijo, se pa skoraj popolnoma odstranijo z adsorbcijo oz. absorpcijo na aktivno oglje. Prav tako je neuspešen proces koagulacije, kar je na primeru estrona (E1) dokazal Chang s sodelavci (2004). Van der Bruggen in Vandecasteele (2003) opisujeta uporabo nanofiltracije za odstranjevanje različnih onesnaževal, kot so različni pesticidi, organske spojine, nitrati in celo za odstranjevanje virusov in bakterij pri pripravi

pitne vode. Prav tako Nghiem in sodelavci (2004) opisujejo do 95 % odstranjevanje estrona (E1) in 17 β -estradiola (E2) z uporabo nanofiltracije ali reverzne osmoze, Fukuhsara in sod. (2006) pa opisujejo odstranjevanje istih spojin z adsorpcijo na aktivno oglje (z različnimi karakteristikami), pri čemer se E1 boljše adsorbira na aktivno blato kot E2 (za 8 % večja adsorpcija E1). Yoon in sodelavci (2003) so z aktivnim ogljem odstranjevali E2, EE2 in BPA in ugotovili, da je metoda učinkovita v 31 do 99 %, odvisno od tipa in koncentracije aktivnega oglja ter od prisotnih raztopljenih organskih spojin, ki so motile adsorpcijo E2, EE2 oz. BPA. Ugotovili so tudi, da je adsorpcija teh spojin potekala po naslednjem vrstnem redu E2 > EE2 > BPA, kar je tudi v skladu z logK_{ow} vrednostmi teh spojin.

Čeprav so nekateri fizikalno-kemijski postopki (predvsem različne membranske tehnike in uporaba aktivnega oglja) učinkoviti (Fukuhsara in sod., 2006; Nghiem in sod., 2004; Snyder in sod., 2007; Yoon in sod., 2003), pa imamo po končanem procesu problem ostanka skoncentriranih onesnaževal npr. na aktivnem oglju ali na membrani. Zato so danes največkrat omenjeni postopki čiščenja odpadnih voda predvsem različni napredni oksidacijski procesi, ki onesnaževala dejansko razgradijo.

1.4.3 Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki (advanced oxidation processes-AOP)

Napredni oksidacijski postopki so postopki, pri katerih nastajajo zelo reaktivni in neselektivni prosti hidroksilni radikali (OH $^{\cdot}$), ki so sposobni kompleksne organske spojine pretvoriti v manj kompleksne organske spojine ali pa celo do ogljikovega dioksida in vode. Namreč prosti hidroksilni radikali (OH $^{\cdot}$) imajo višji oksidacijski potencial v primerjavi z ostalimi oksidanti kot so kisik, vodikov peroksid in ozon (Preglednica 1) ter izredno kratko življenjsko dobo, zato so reakcije hitre. Učinkovitost oksidacije je odvisna od koncentracije OH $^{\cdot}$ radikalov, kisika in onesnaževal. Na koncentracijo OH $^{\cdot}$ radikalov vplivajo temperatura in pH, pri katerih teče oksidacija (sobna temperatura, razen v primerih mokre oksidacije, kjer je temperatura v reaktorju do 350°C), ter fizikalno-kemijske lastnosti onesnaževala in prisotnost ionov, kot npr. bikarbonatni ioni, ki motijo tvorbo OH $^{\cdot}$ radikalov (Munter, 2001; Parson, 2004).

Preglednica 1: Oksidacijski potenciali nekaterih močnih oksidantov (Parson, 2004: 4)**Table 1: Oxidation potential of common species (Parson, 2004: 4)**

Oksidant	Oksidacijski potencial (V)
Flor	3,03
Hidroksilni radikal	2,80
Kisik	2,42
Ozon	2,07
Vodikov peroksid	1,78
Perhidroksilni radikal	1,70
Permanganat	1,68
Hipobromova kislina	1,59
Klorov dioksid	1,57
Hipoklorova kislina	1,49
Klor	1,36

Med napredne oksidacijski postopke spadajo kavitacija, ozonacija in kombinacija ozonacije z drugimi postopki (O_3/UV ali O_3/H_2O_2), oksidacija z vodikovim peroksidom (H_2O_2) in njene različice (H_2O_2/UV ali $H_2O_2/ultrazvočna\ oksidacija$), Fentonova oksidacija (H_2O_2/Fe^{2+}) in njene različice ($H_2O_2/Fe^{2+}/UV$), fotoliza in fotokataliza ter katalitska mokra oksidacija (Parson, 2004). Pri postopkih kot so kavitacija, fotoliza, fotokataliza, (katalitska) mokra oksidacija in Fentonova oksidacija gre za indirektno oksidacijo, saj ti postopki temeljijo na produkciji OH^- radikalov, ki nato reagirajo z onesnaževalom, medtem ko ozonacija in oksidacija s H_2O_2 temeljita na direktni oksidaciji onesnaževal ali indirektni s tvorbo OH^- s pomočjo UV svetlobe ali ultrazvoka.

Vsi zgoraj omenjeni postopki so bili uspešno uporabljeni za razgradnjo različnih skupin spojin (antibiotiki, različne fenolne in aromatske spojine, farmacevtski ostanki, pesticidi, estrogeno aktivne spojine, itd.) iz različnih virov odpadnih voda, kot npr. bolnišnične odpadne vode, izcedne vode iz deponij, odpadne vode onesnažene z barvili itd., kar je opisano v podpoglavljih pri vsakem postopku.

1.4.3.1 Kavitacija

Kavitacija je proces, pri katerem gre za oblikovanje, rast in kolaps zelo majhnih mehurčkov (t.i. mikromehurčkov) v zelo kratkih časovnih intervalih (10 ns), pri čemer se sprosti velika količina energije, ki nato omogoči tvorbo OH⁻ radikalov iz vode (Gogate and Pandit, 2004; Kalumuck in Chanine, 1998). V praksi sta največkrat uporabljeni akustična oz. ultrazvočna kavitacija (tvorba mikromehurčkov poteka z uporabo visokih frekvenc zvoka) in hidrodinamična kavitacija (tvorba mehurčkov povzroča potovanje raztopine pod visokimi tlaki skozi ventil ali Venturijevo cev) (Gogate in sod. 2001; Gogate in Pandit, 2004); obe sta bili uporabljeni v praksi na realnih okoljskih vzorcih (Braeutigam in sod., 2012; Gogate, 2008; Kalumuck in Chanine, 1998; Peters, 2001).

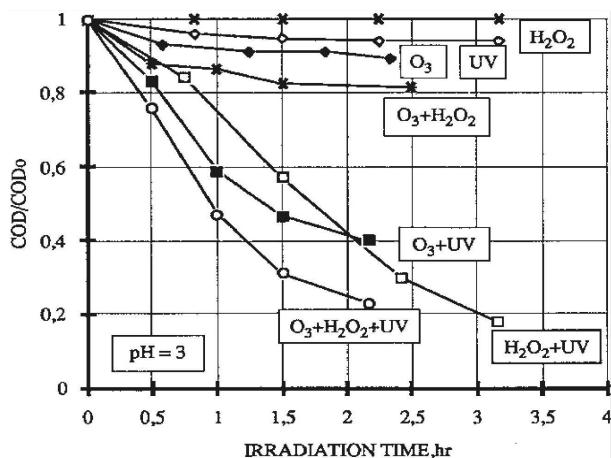
1.4.3.2 Elektrokemijska oksidacija

Poteka na anodah iz grafita, platine (Pt), titana (TiO₂), iridijskega (IrO₂), bor-diamantnih elektrodat itd., v prisotnosti primernega elektrolita (največkrat NaCl). Razgradnja organske spojine poteka po enem izmed dveh mehanizmov, in sicer kot direktna oksidacija na anodi, kjer se onesnaževalo adsorbira na površino anode in se razgradi zaradi prenosa elektronov s kovine na onesnaževalo, ali indirektna oksidacija v tekoči fazi, kjer poteče oksidacija onesnaževala indirektno preko elektrokemijske tvorbe oksidantov kot so Cl₂, HCl⁻, OH⁻, O₃ ali H₂O₂ (Klavarioti, 2009). Elektrokemijska oksidacija je sicer redkeje uporabljena kot ostali napredni oksidacijski postopki, vendar pa je prav tako zelo učinkovita kot samostojna metoda (Murunganathan in sod., 2007; Pauwels in sod., 2006; Rodrigo in sod., 2010) ali v kombinaciji z drugimi postopki (Ding in sod., 2012; Kim in sod., 2002).

1.4.3.3 Oksidacija z vodikovim peroksidom (H₂O₂)

Vodikov peroksid je močan oksidant, vendar je zelo nestabilen. V preteklosti se je uspešno izkazal za razgradnjo manj kompleksnih organskih spojin v milejših oksidacijskih pogojih (Ayling in Castrantas, 1981 cit. po Gogate in sod., 2004), danes pa se večinoma uporablja v kombinaciji z drugimi metodami kot UV obsevanje, ozonacija, ultrazvočna oksidacija (Andreozzi in sod., 1999; Ijeplaar, 2000; Vogelpohl in Kim, 2004) in seveda v prisotnosti

Fe^{2+} soli (Fentonova oksidacija), ki pospešijo tvorbo reaktivnih hidroksilnih radikalov in tako pospešijo samo reakcijo oksidacije (Slika 10) (Gogate in sod., 2004).



Slika 10: Učinkovitost naprednih oksidacijskih postopkov s H_2O_2 , O_3 , UV obsevanjem in njihovimi kombinacijami (Vogelpohl in Kim, 2004: 35)

Figure 10: Efficiency of AOPs including H_2O_2 , O_3 , UV irradiation and their combinations (Vogelpohl and Kim, 2004: 35)

Ostali napredni oksidacijski procesi (ozonacija, Fentonova oksidacija, fotolitska in fotokatalitska oksidacija ter mokra in katalitska mokra oksidacija) so predstavljeni v podpoglavljih 2.1.3, 2.1.4 in 2.1.5 ter 2.2.1.2.

Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki kot so ultrazvočna kavitacija, elektrokemijska oksidacija, ozonacija, fotolitska in fotokatalitska oksidacija, idr., se je izkazalo za zelo učinkovito (Araña in sod., 2002; Belgiorno in sod.. 2007; Chiang in sod., 2004; Jiang in sod., 2006). Estrogeno aktivne spojine E1, E2, EE2 in BPA so se bolj ali manj uspešno odstranile s procesi UV/ H_2O_2 oksidacije (Rosenfeldt in Linden, 2004), ozonacije in kombinacije ozonacije z UV oksidacijo (Chen in sod., 2007, Irmak in sod., 2005), elektrokemijske oksidacije (Murunganathan in sod., 2007; Pauwels in sod., 2006) ter fotokatalitske oksidacije (Karpova in sod., 2007).

1.5 HIPOTEZE

Naše delovne hipoteze in cilji raziskovanja so:

- a) Optimizacija *in vitro* testa z gensko spremenjenimi kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* (test YES) ter *in vivo* testa z ribami zebričami *Danio rerio* za določanje prisotnosti estrogeno aktivnih spojin v vodnih vzorcih.
- b) Uvedba kemijske analize (GC-MS, HPLC) za identifikacijo in kvantifikacijo spojin z estrogenim delovanjem.
- c) Ugotavljanje potencialne estrogene aktivnosti slovenskih odpadnih voda z optimiziranim testom YES.
- d) Preizkus različnih postopkov za odstranjevanje spojin z estrogenim delovanjem iz vodnih vzorcev (ozonacija, Fentonova oksidacija, fotolitska/fotokatalitska oksidacija, mokra oksidacija, katalitska mokra oksidacija). Njihovo učinkovitost odstranjevanja teh spojin bomo preverili s testom YES in s kemijsko analizo.

2 ZNANSTVENA DELA

2.1 OBJAVLJENA ZNANSTVENA DELA

2.1.1 Uporaba testa YES (Yeast Estrogen Screen) za določanje estrogene aktivnosti vodnih vzorcev

Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies
BISTAN Mirjana, PODGORELEC Mojca, MARINŠEK LOGAR Romana in TIŠLER Tatjana

Food Technology and Biotechnology, 2012, 50, 3: 427- 433

Prisotnost estrogeno aktivnih spojin v odpadnih vodah, površinskih vodah, podtalnici in celo v pitnih vodah, je skrb zbujoča povsod po svetu, saj le-te negativno vplivajo tako na živali kot tudi na ljudi. Zato je potrebno estrogeno aktivne spojine odstraniti iz voda, preden le-te dosežejo podtalnico, ki je lahko vir pitne vode. Prav tako je potrebna učinkovita kontrola estrogeno aktivnih spojin v odpadnih vodah, tako s kemijskimi kot tudi z biološkimi testi. V našem delu je predstavljen in optimiziran t.i. test YES (yeast estrogen screen) z namenom dokazovanja potencialne estrogene aktivnosti v vodah. Najprej smo optimizirali trajanje testa, koncentracijo dodanega substrata v testni medij ter določili optimalno valovno dolžino za merjenje absorbance razgrajenega substrata. Specifičnost in občutljivost testa YES smo preverjali z naslednjimi spojinami: 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, bisfenol A, nonilfenol, genistein, hidrokortizon, dieldrin, atrazin, metoksiklor, testosteron in progesteron. Optimiziran test YES se je specifično odzval na izbrane estrogeno aktivne spojine in spojine, ki nimajo estrogene aktivnosti. Potencialno estrogenost dotokov na in iztokov iz dveh čistilnih naprav smo določali po predhodni ekstrakciji vodnih vzorcev na trdni fazi (SPE ekstrakcija), in sicer z uporabo kolon Oasis® HLB in metanola kot elucijskega topila. V vzorcih dotokov na čistilne naprave smo določili do 90 % relativne estrogene aktivnosti. Prav tako smo estrogeno aktivnost določili tudi v vzorcih iztokov iz čistilnih naprav. Iz pridobljenih rezultatov sklepamo, da je test YES primerna metoda za preverjanje morebitne estrogenosti v vodah, ki se izteka v površinske vode.

Ključne besede: motilci endokrinega sistema, estrogena aktivnost, monitoring, ekstrakcija na trdni fazi, preizkus estrogene aktivnosti, vode

2.1.2 Določanje estrogene aktivnosti v odpadnih vodah v Sloveniji z biološkim preizkusom

Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay

BISTAN Mirjana, MARINŠEK LOGAR Romana in TIŠLER Tatjana

Central European Journal of Biology, 2011, 6 (5): 829-837

V različnih državah sveta poročajo tako o prisotnosti estrogeno aktivnih spojin v vodnih okoljih, kot tudi o posledicah njihovega delovanja na organizme, ki v tem okolju živijo. V Sloveniji teh podatkov ni zaslediti, saj v programu monitoringa kakovosti površinskih in odpadnih voda ni predpisanih mejnih vrednosti za kontrolo naravnih in sintetičnih estrogenov. Zato smo se v našem delu osredotočili na detekcijo estrogene aktivnosti v odpadnih vodah treh čistilnih naprav s testom YES (Yeast Estrogen Screen). V prvem vzorčenju zaradi visokega zaviranja rasti kvasovk, kot posledico prisotnosti strupenih organskih in/ali anorganskih snovi, nismo mogli zaznati estrogene aktivnosti. Zato smo se v drugem vzorčenju poslužili dodatnega čiščenja vzorcev na silikagelu, s čimer smo odstranili strupene snovi, ki so zavirale rast kvasovk in motile zaznavanje estrogene aktivnosti. V odpadnih vodah smo določili do 95 % relativne estrogene aktivnosti. Postopek dekonjugacije ni bistveno vplival na detekcijo same estrogene aktivnosti, iz česar sklepamo, da so bili naravni in sintetični estrogeni hormoni v preiskovanih odpadnih vodah v dekonjugirani obliki. Estrogeno aktivnost smo s testom YES tako zaznali v večini vzorcev odpadnih vod, tako vtokov kot iztokov, iz česar lahko sklepamo, da obstoječi postopki čiščenja odpadnih vod na čistilnih napravah niso dovolj učinkoviti v odstranjevanju estrogenov in/ali ksanoestrogenov iz odpadnih vod. Test YES se je sicer izkazal za primerno metodo za monitoring estrogenosti voda, vendar pa za določanje vpliva na okolje in v njem živeče organizme sam test YES ni dovolj, v tem primeru se moramo poslužiti še drugih *in vitro* kot tudi, in predvsem, *in vivo* biotestov.

Ključne besede: estrogena aktivnost, dekonjugacija, čiščenje s silikagelom, ekstrakcija na trdni fazni, odpadne vode, test YES (Yeast Estrogen Screen)

2.1.3 Odstranjevanje estrogenov iz vodnih vzorcev z Ru/TiO₂ katalizatorjem v procesu katalitske mokre oksidacije

Ru/TiO₂ catalyst for efficient removal of estrogens from aqueous samples by means of wet-air oxidation

BISTAN Mirjana, TIŠLER Tatjana in PINTAR Albin

Catalysis Communications, 2012, 22: 74-78

Splošna razširjenost estrogeno aktivnih spojin v vodnem okolju je predvsem posledica njihovega nepopolnega odstranjevanja v postopkih čiščenja na čistilnih napravah. Eden izmed obetavnih postopkov odstranjevanja estrogeno aktivnih spojin je katalitska mokra oksidacija, kjer pride do oksidacije onesnaževal z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi v prisotnosti katalizatorja. V naših eksperimentih smo izvedli oksidacijo 17 β -estradiola (E2) v trifaznem reaktorju pri temperaturi do 230 °C in v prisotnosti katalizatorja TiO₂ ali Ru/TiO₂. Ugotovili smo, da je potekala tako katalitska kot tudi nekatalitska pot oksidacije E2. S katalitsko mokro oksidacijo v prisotnosti katalizatorja Ru/TiO₂ smo dosegli popolno razgradnjo E2 kot tudi popolno odstranitev estrogene aktivnosti.

Ključne besede: katalitska mokra oksidacija, estrogen, 17 β -estradiol, estrogena aktivnost, test YES (Yeast Estrogen Screen), čiščenje voda

2.1.4 Pretvorba in estrogenost 17β -estradiola med fotolitsko/ fotokatalitsko oksidacijo in katalitsko mokro oksidacijo

Conversion and Estrogenicity of 17β -estradiol During Photolytic/Photocatalytic Oxidation and Catalytic Wet-air Oxidation

BISTAN Mirjana, TIŠLER Tatjana in PINTAR Albin

Acta Chimica Slovenica, 2012, 59: 389-397

Estrogen 17β -estradiol (E2), ki ga proizvaja človeško telo, z izločanjem iz telesa prehaja v komunalne odpadne vode. E2 uvrščamo v skupino motilcev endokrinega sistema, ki so slabo biorazgradljivi. Cilj raziskave je bil ugotoviti učinkovitost odstranjevanja E2 iz vodnih vzorcev s heterogenima procesoma katalitske mokre oksidacije in fotolitske/fotokatalitske oksidacije. Katalitsko mokro oksidacijo smo izvedli v trifaznem kapalnem reaktorju pri temperaturah do $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ in parcialnem tlaku kisika 10 bar z uporabo katalizatorjev TiO_2 in Ru/TiO_2 , fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo pa v reaktorju z goščo v prisotnosti katalizatorja TiO_2 P-25 (Degussa), obsevanega bodisi z vidno bodisi UV svetlobo. Odstranjevanje E2 in njegove estrogene aktivnosti smo spremljali z analizo HPLC in s testom YES. Popolno odstranitev estrogene aktivnosti smo zaznali v vzorcih, obdelanih s fotolitsko/fotokatalitsko oksidacijo z UV svetlobo ($\lambda = 365\text{ nm}$) in v vzorcih tretiranih s fotokatalitsko oksidacijo z vidno svetlobo. Prav tako smo popolno odstranitev E2 in njegove estrogene aktivnosti zaznali v vzorcih, obdelanih s katalitsko mokro oksidacijo v prisotnosti katalizatorja TiO_2 in Ru/TiO_2 .

Ključne besede: katalitska mokra oksidacija, estrogeno aktivne spojine, 17β -estradiol, estrogena aktivnost, fotolitska/fotokatalitska oksidacija, test YES (Yeast Estrogen Screen)

2.1.5 Katalitska in fotokatalitska oksidacija vodne raztopine bisfenola A: razgradnja, strupenost in estrogenost

Catalytic and Photocatalytic Oxidation of Aqueous Bisphenol A Solutions: Removal, Toxicity, and Estrogenicity

BISTAN Mirjana, TIŠLER Tatjana in PINTAR Albin

Industrial & Engineering Chemistry Research, 2012, 51: 8826-8834

Katalitska mokra oksidacija vodne raztopine bisfenola A (BPA) je potekala v trifaznem reaktorju pri temperaturi do 230 °C in parcialnem tlaku kisika 10 bar v prisotnosti katalizatorjev TiO₂ in Ru/TiO₂. V prisotnosti katalizatorja Ru(3%)/TiO₂ smo dosegli popolno razgradnjo BPA in več kot 96 % odstranjevanje organskih snovi (TOC). Učinkovitost odstranjevanja BPA iz vodnih vzorcev smo preverjali s strupenostnimi testi, ki so vključevali organizme iz različnih taksonomskih skupin, ter z gensko spremenjenimi kvasovkami, s katerimi smo preverjali estrogenost. Ugotovili smo, da je bila oksidacija, pri kateri smo uporabili katalizator Ru(3%)/TiO₂, najuspešnejša, saj se je v vzorcih po oksidaciji zmanjšala tako akutna strupenost kot tudi estrogenost. Za primerjavo smo izvedli tudi fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo (s katalizatorjem TiO₂ Degussa P-25). Ugotovili smo, da je v primeru fotokatalitske oksidacije prišlo do popolne pretvorbe BPA, kljub temu pa smo še vedno zaznali tako akutno strupenost kot tudi estrogenost, kar kaže na nastanek strupenih in estrogenih intermediatov v procesu fotokatalitske oksidacije.

Ključne besede: bisfenol A, katalitska mokra oksidacija, fotokatalitska oksidacija, HPLC, estrogena aktivnost, test YES, strupenost, bakterije *Vibrio fischeri*, alge *Desmodesmus subspicatus*, vodni raki *Daphnia magna*, ribe zebrice *Danio rerio*

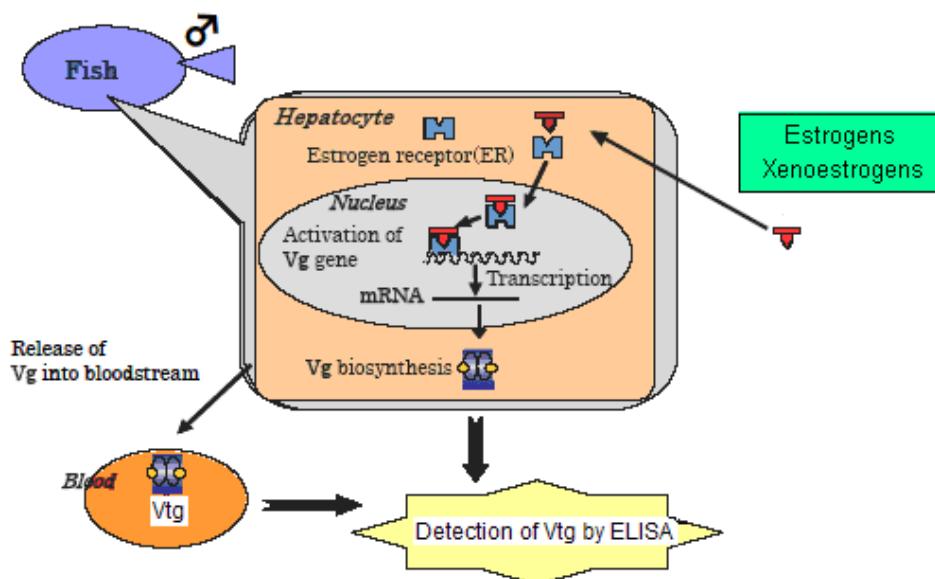
2.2 OSTALO POVEZOVALNO ZNANSTVENO DELO

V tem poglavju so predstavljeni rezultati izpostavljenosti rib zebrič *D. rerio* v *in vivo* testu, kjer smo določali vitelogenin (Vtg) z indirektno ELISA metodo. Prav tako so predstavljeni rezultati odstranjevanja estrogeno aktivnih spojin (17 β -estradiola (E2), 17 α -etinilestradiola (EE2) in bisfenola A (BPA)) iz vodnih vzorcev z ozonacijo oz. Fentonovo oksidacijo, ki so bili pridobljeni v sodelovanju z Jano Nakrst in doc. dr. Andrejo Žgajnar Gotvajn iz Katedre za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani.

2.2.1 Uvod

2.2.1.1 *In vivo* test z ribami zebričami *D. rerio*

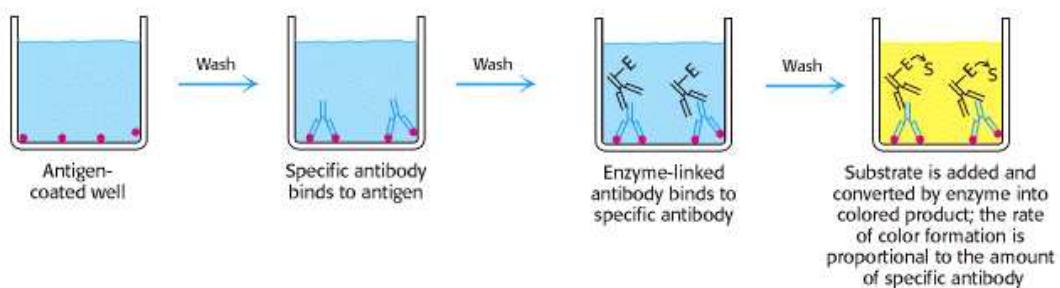
Ribe zebriče *D. rerio*, predhodno imenovane *Brachydanio rerio*, spadajo v družino krapovcev *Cyprinidae*. Zebriče so tropске ribice, ki živijo v pritokih reke Ganges v jugovzhodni Aziji, zato jih gojimo na temperaturi 26 °C. Odrasle rive merijo 3-5 cm, zrelost pa dosežejo v treh mesecih (Nagel, 2002). Vitelogenin, ki ga določamo pri zebričah, je prekurzor jajčnega rumenjaka, ki se praviloma izraža le pri samicah. V primeru prisotnosti estrogeno aktivnih spojin v vodi, pa se vitelogenin izraža tudi pri samcih in mladicah zaradi interakcije estrogeno aktivnih spojin z estrogenimi receptorji (Slika 11) (OECD, 2009; Sumpter in Jobling, 1995).



Slika 11: Indukcija proizvodnje vitelogenina (Vtg) pri samcih *D. rerio* (Cosmo Bio Co., 1997)

Figure 11: Production of vitellogenin (Vtg) in male zebrafish *D. rerio* (Cosmo Bio Co., 1997)

Test Vtg-ELISA deluje po principu indirektne ELISA metode in je osnovan na specifični vezavi vitelogenina s protitelesi označenimi z markerji. Encimska aktivnost markerja na protitelesu je proporcionalna koncentraciji vitelogenina in jo določamo spektrofotometrično (Slika 12) (Sumpter in Jobling, 1995).



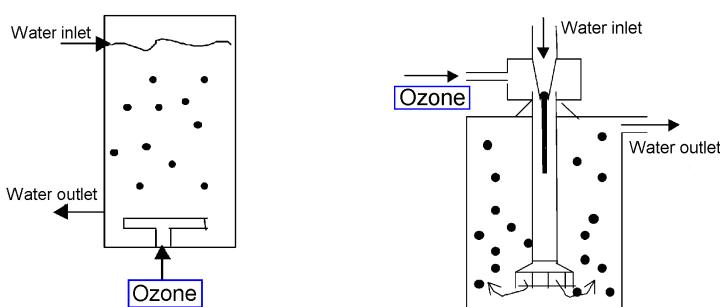
Slika 12: Shematski prikaz *in vivo* Vtg-ELISA testa (Chakravarthy A., 2011)

Figure 12: *In vivo* bioassay Vtg- ELISA (Chakravarthy A., 2011)

Prisotnost Vtg pri ribjih samcih in mladicah je zelo dober in uporaben biomarker za določanje estrogene aktivnosti okoljskih vzorcev, npr. v površinskih vodah (reke), v katere se izlivajo odpadne vode iz čistilnih naprav (Jobling in sod., 1998; Hansen in sod., 1998).

2.2.1.2 Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z ozonacijo

Mehanizmi kemijskih reakcij ozona in organskih onesnaževal so zelo kompleksni in lahko potekajo preko direktnih reakcij (kot so npr. oksidacijsko-redukcijске reakcije) ali preko mehanizmov verižnih reakcij, pri katerih se tvorijo OH⁻ radikali. Ozon je nestabilen, zato ga tvorimo na mestu uporabe, in sicer iz čistega kisika, zmesi kisik/zrak ali le iz zraka ter ga sproti dovajamo v reaktor (Slika 13).



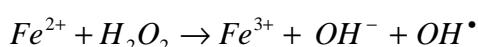
Slika 13: Ozonacija v koloni z mehurčki (levo) in Ottovem aparatu (desno) (Gogate in sod., 2004: 533)

Figure 13: Ozonation in bubble coloumn (left) and in Otto aparatus (right) (Gogate et al., 2004: 533)

Ozonacija se je v preteklosti uporabljala predvsem za dezinfekcijo pitne vode, danes pa se v kombinaciji z drugimi oksidacijskimi postopki uporablja za odstranjevanje biološko slabo razgradljivih mikroonesnaževal (tudi estrogeno aktivnih spojin) v površinskih in izcednih deponijskih vodah, odpadnih vodah v farmacevtski, kozmetični in tiskarski industriji ter v industriji papirja, tekstila in umetnih materialov (Altmann in sod., 2012; Arslan in Balcioğlu, 2001; Gogate in sod., 2004; Gulyas in sod., 1995; Reungoat in sod., 2012; Schaar in sod., 2010). Alum in sodelavci (2004) so dokazali, da je ozonacija 100 % učinkovita pri odstranjevanju tako E2 in EE2 kot tudi BPA, medtem ko se njihova estrogena aktivnost le delno zmanjša. Najverjetnejše estrogena aktivnost vzorcev E2 in EE2 po ozonaciji ostaja zaradi tvorbe intermediarov, ki jih v svojem delu opisujeta Huber s sodelavci (2004) in Irmak s sodelavci (2005).

2.2.1.3 Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin s Fentonovo oksidacijo

Fentonova oksidacija, ki je bila prvič predstavljena že leta 1894, sodi skupaj s svojimi izpeljankami (foto-Fenton, elektro-Fenton) med najpogosteje uporabljene oksidacijske procese. Fentonov proces je sestavljen iz 4 delov: oksidacija, nevtralizacija, flokulacija in separacija trdno-tekoče, in temelji na tvorbi OH⁻ radikalov po dodatku Fe²⁺ in H₂O₂ v kislem mediju, kar povzroči oksidacijo organskih snovi (Deng in Englehardt, 2006). Celotno reakcijo Fentonove oksidacije lahko povzamemo z naslednjo enačbo (Andreozzi, 1999):



V primeru obsevanja z UV-VIS svetlobo ($\lambda \geq 300$ nm) tekom procesa Fentonove oksidacije (Foto- Fenton) je celokupna reakcija oksidacije hitrejša, saj v tem primeru poteka redukcija Fe³⁺ ionov istočasno z oksidacijo Fe²⁺ ionov (Andreozzi in sod., 1999).

Fentonova oksidacija se uporablja za razgradnjo tako organskih kot anorganskih spojin v bolnišničnih odpadnih vodah (Kajitvichyanukul in Suntronvipart, 2006), odpadnih vodah tekstilne industrije (Karthikeyan in sod., 2011), usnjarske industrije (Mandal in sod., 2010), farmacevtskih odpadnih vodah (Tekin in sod., 2006), idr.

Čeprav ima Fentonova oksidacija veliko prednosti, kot so nizka cena in dostopnost reagentov Fe^{2+} in H_2O_2 , homogenost reakcije in izvedba pri sobni temperaturi, pa ima tudi pomanjkljivosti. In sicer, med procesom Fentonove oksidacije se tvori odpadno blato, ki vsebuje različne železove soli in hidrokside, in na katero se adsorbirajo organske snovi, kar onemogoči zanesljivo oceno razgradnje in dodatno povzroča problem nevarnosti vnosa nevarnih snovi v okolje (Deng in Engelhardt, 2006; Parson, 2004; Zhang in sod., 2005).

2.2.2 Materiali in metode

2.2.2.1 Določanje vitelogenina (Vtg) pri ribah zebriah *D. rerio* z *in vivo* testom

Pri uvajanju in optimizaciji testa Vtg-ELISA smo uporabili mladice oz. samce rib zebri *D. rerio* Hamilton Buchanan, ki smo jih kupili v trgovini z akvarističnim materialom (Tukano d.o.o.). Najmanj 7 dni pred začetkom testa smo ribe prilagajali na laboratorijske razmere (aklimatizacija) v termostatiranem prostoru, ogrevanem na 26 ± 2 °C, z umetno osvetlitvijo z režimom 12 h svetlobe (fluorescentna žarnica) in 12 h teme (ISO 7346-1, 1996). Ribe smo hranili trikrat dnevno s hrano Nutrafin max complete flake food (Hagen, Francija).

2.2.2.2 Izpostavljanje rib zebriah *D. rerio* estrogeno aktivnim spojinam

Mladice oz. samce rib zebri smo izpostavili naravnemu estrogenemu hormonu 17β -estradiolu (E2) (Sigma- Aldrich) v koncentracijah 0,272; 2,72 in 27,2 µg/l. Založne osnovne raztopine E2 so bile pripravljene v etanolu, delovne raztopine E2 pa v postani vodovodni vodi (in so vsebovale 0,01 v/v % etanola). V vsakem testu smo izvedli tudi 2 kontroli, in sicer kontrolo K (ribe v postani vodovodni vodi brez dodane testne spojine ali etanola) in kontrolo K+EtOH, v katero smo dodali etanol (100 µl), tako da je bila končna koncentracija etanola v vodi 0,01 v/v %. Akvariji so bili nameščeni v termostatiranem prostoru s temperaturo 20 °C, zato smo akvarije z grelčki ogrevali na temperaturo 26 ± 2 °C, kar smo dnevno preverjali s termometri. Za zagotavljanje zadostne količine kisika v vodi (60 % nasičenje s kisikom) smo akvarije preprihovali z zrakom ter dnevno merili količino raztopljenega kisika z oksimetrom (WTW Oximeter, OXI 96). Po potrebi smo iz akvarijev tudi odstranjevali ostanke hrane in izločke.

Kratkotrajen test z ribami zebričami je trajal 4 dni (ISO 7346-3:1998). V akvarij smo nalili 1 l postane, termostatirane vodovodne vode (26 ± 2 °C), ter dodali ustrezeno količino E2. V času trajanja testa rib nismo hranili.

Dolgotrajen test z ribami zebričami je trajal 21 dni in je v majhnih odstopanjih potekal v skladu z navodili standarda OECD (2009). V 5 l postane vodovodne vode z dodano ustrezeno količino E2 smo dali 9 samcev ribic zebrič. Ribe smo hranili dvakrat dnevno s hrano Nutrafin max complete flake food (Hagen, Francija). Pretočni sistem (0,2 l/h) je omogočal konstanten pritok in odtok vodne raztopine iz akvarija, ki smo jo pripravljali dnevno. Vsebina akvarija se je zamenjala v enem dnevu.

Ribe smo po končanem testu evtanazirali z anestetikom MS-222 (Sigma-Aldrich) in jih do nadaljne uporabe shranili na -20 °C. Pred izvedbo testa ELISA smo ribice odmrznili, jim odstranili glave in repe, ter jih homogenizirali.

Pred izvedbo testa smo preverili vsebnost vitelogenina v 5-ih ribah po aklimatizaciji. Ribe smo evtanazirali, homogenizirali, določili količino proteinov ter z metodo ELISA določili količino vitelogenina.

2.2.2.3 Homogenizacija rib

Homogenizacija rib zebrič je potekala v pufru ELISA (1 % BSA v PBS in 1 mM PMSF (pH 7,3) v razmerju 1 : 2). Homogenizirane ribice smo centrifugirali s centrifugo Universal 32 R (Hettich, Boston, MA, ZDA) na 4 °C pri 3000 obratih 15 min, da smo ločili tekoči del od preostanka. Tekoči del smo do nadaljne analize shranili v Eppendorfovih epruvetah na -20 °C (Brion in sod., 2002). Sledilo je določanje količine proteinov in izvedba testa ELISA za določanje prisotnosti in količine vitelogenina (Vtg).

2.2.2.4 Določanje proteinov

Za izvedbo testa ELISA smo morali najprej določiti količino proteinov v vzorcih. To smo naredili s komercialno dostopnim kitom BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit) po navodilih proizvajalca (Thermo Fisher Scientific Inc., IL, ZDA). Iz umeritvene krivulje

(Priloga A) smo določili količino vzorca, ki smo ga nadalje uporabili za določanje prisotnosti vitellogenina s testom ELISA. Koncentracijo proteinov v vzorcu, ki smo ga uporabili za test ELISA (10-100 µg vseh proteinov/ml), smo dobili z redčenjem osnovnega vzorca s pufrom C (ki je opisan v poglavju 2.2.2.5).

2.2.2.5 Postopek indirektnega testa Vtg-ELISA

Priprava raztopin za izvedbo Vtg-ELISA

Pufer C; pH 9,6: V destilirani vodi (1 l) smo raztopili 1,59 g Na₂CO₃ in 2,93 g NaHCO₃ in shranili na 4 °C.

Pufer PBS; pH 7,3: Raztopili smo 1,15 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄; 8,0 g NaCl in 0,2 g KCl v 800 ml destilirane vode, uravnali pH na 7,3 in dodali destilirano vodo do 1 litra ter shranili na 4 °C.

Raztopina za spiranje TPBS: Raztopili smo 1 ml Tween 20 v 2000 ml pufra PBS ter shranili na 4 °C.

Raztopina B (»blocking solution«): 2 % BSA (goveji serumski albumin, »bovine serum albumin«) smo raztopili v pufru PBS. Shranili smo na 4 °C (uporabno le za nekaj dni!).

Raztopina primarnih protiteles (Ab): Primarna Ab (»Mouse Anti-Zebrafish Vitellogenin Monoclonal Antibody«; Biosense Laboratories AS, Bergen, Norveška) smo raztopili v 1 % BSA v pufru PBS in sicer v razmerju 1: 1000. Pripravili smo svežo raztopino in jo takoj uporabili.

Raztopina sekundarnih protiteles (Ab): Sekundarna Ab (»ImmunoPure® Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated«; Thermo Fisher Scientific Inc., IL, ZDA) smo raztopili v 1 % BSA v pufru PBS in sicer v razmerju 1: 3000. Pripravili smo svežo raztopino in jo takoj uporabili.

Raztopina D (»developing solution): 0,04 % OPD (*o*-phenylenediamin dihydrochloride) in 0,012 % H₂O₂; 15 mg OPD smo raztopili v 37,5 ml destilirane vode in dodali 15 µl 30 % H₂O₂. Pripravili smo svežo raztopino in jo takoj uporabili.

Raztopina S (»stop solution«): 4 N H₂SO₄; 53 ml H₂SO₄ (95-97 %) smo raztopili v 500 ml destilirane vode.

Za določanje vitelogenina smo izvedli indirekten test ELISA, po postopku opisanem spodaj (Brion in sod., 2002).

1. Na mikrotitrsko plošče (Nunc Maxisorp, eBioscience, CA, ZDA) smo nanesli 100 µl vzorca (10-100 µg vseh proteinov/ml). Ploščo smo inkubirali čez noč (16 h) na 4 °C.
2. Ploščo smo sprali z raztopino za spiranje TPBS (200 µl) 3-krat in dodali raztopino B (100 µl). Inkubirali smo 45 - 60 min na sobni T (20 °C).
3. Ploščo smo sprali z raztopino za spiranje TPBS (200 µl) 3-krat in dodali raztopino primarnih protiteles (100 µl). Inkubirali smo 60 min na 37 °C.
4. Ploščo smo sprali z raztopino za spiranje TPBS (200 µl) 5-krat in dodali raztopino sekundarnih protiteles (100 µl). Inkubirali smo 60 min na sobni T (20 °C).
5. Ploščo smo sprali z raztopino za spiranje TPBS (200 µl) 5-krat in dodali raztopino D (100 µl). Inkubirali smo 5 -30 min v temi.
6. Dodali smo 50 µl 4 N H₂SO₄ in izmerili absorbanco na spektrofotometru pri $\lambda = 492$ nm.

S pomočjo standardne raztopine vitelogenina smo določili umeritveno krivuljo (Priloga A), iz katere smo nato po končanem testu ELISA izračunali koncentracijo Vtg v naših vzorcih.

2.2.2.6 Obstojnost E2 med *in vivo* testom

S kemijsko analizo smo preverili obstojnost testne spojine E2 tekom trajanja testa. Analizirali smo sveže pripravljeno vodno raztopino E2, vodo iz akvarija in vodo, ki je iztekala iz akvarija. E2 smo najprej koncentrirali s SPE (glej poglavje 2.2.2.10) ter nato analizirali s HPLC opisano v Bistan in sod. (2012b-d).

2.2.2.7 Ozonacija

Pri eksperimentalnem delu ozonacije smo uporabili testni spojini 17β -estradiol (E2) in 17α -etinilestradiol (EE2) (Sigma-Aldrich), katerih osnovne raztopine so bile pripravljene v 96 v/v % etanolu, delovne raztopine pa v ultračisti vodi (Purelab Option, Elga, Veolia Waters Solution and Technology, Velika Britanija) (vsebnost etanola je bila 0,04 v/v %). Delovne koncentracije E2 so bile 27,2 mg/l in 0,272 mg/l ter EE2 2,9 mg/l in 0,29 mg/l. Eksperimenti ozonacije so potekali v koloni z mehurčki. Višina kolone z mehurčki je bila 20 cm, notranji premer reaktorja 9 cm in volumen reakcijske zmesi 250 ml. Za proizvodnjo ozona smo uporabili generator ozona Lifetech (Lifetech, Češka) z maksimalno količino proizvedenega ozona 5 l/h. Za proizvodnjo ozona smo uporabili konstantni pretok kisika 20 l/h. V mešanici zraka in ozona, ki smo jo vpihovali v reaktor, je bilo 30 % ozona. Reakcijski časi izpostavitve testne spojine ozonaciji so bili 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 60 in 120 min. Za merjenje koncentracije ozona v plinski fazi smo uporabili UV detektor ozona Life ODU 100 (Lifetech) (Nakrst in sod., 2011).

2.2.2.8 Fentonova oksidacija

Pri eksperimentih Fentonove oksidacije smo uporabljali testne spojine 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2) in bisfenol A (BPA) (Sigma-Aldrich), ki so bile pripravljene v ultračisti vodi (Purelab Option, Elga, Veolia Waters Solution and Technology, Velika Britanija); ter kemikalije: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka Analytical), 30 % m/v H_2O_2 (Belinka), HCl (Merck) in NaOH (Merck). Delovne koncentracije E2 so bile 27,2 mg/l in 0,272 mg/l; EE2 29,6 mg/l in 0,296 mg/l ter BPA 20 in 0,228 mg/l. Fentonova oksidacija je potekala pri sobni temperaturi (22 ± 2 °C) in ob enakomernem mešanju na mešalu (200 rpm). Razmerja in količine Fentonovih reagentov ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in H_2O_2) so zapisane v Preglednici 2. Pred dodatkom reagentov smo uravnali pH (2,5 - 3,0), nato pa vzorce za analizo odvzemali pri različnih časih (0, 5, 10, 30, 45/50, 60/70 in 90 minutah). Reakcijo smo ustavili z zvišanjem pH vrednosti nad 12. Za odstranitev preostalega peroksida smo vzorce prevreli (10 minut) in jih nato še filtrirali čez filter papir za hitro filtriranje (»črni trak« z velikostjo por 12 - 15 µm, Sartorius) (Nakrst in sod., 2010; Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku).

Preglednica 2: Razmerja Fentonovih reagentov uporabljena v eksperimentnih oksidacijah**Table 2: Ratio of reagents used in Fenton oxidation**

Testna spojina	Razmerje Fentonovih reagentov (Fe ²⁺ : H ₂ O ₂)	Koncentracije Fentonovih reagentov (Fe ²⁺ : H ₂ O ₂)
27,2 mg/l (E2)	1 : 0,5	1 M : 0,5 M
29,6 mg/l (EE2)	1 : 10	0,1 M : 1 M
20 mg/l (BPA)	1 : 20	0,05 M : 1 M
0,272 mg/l (E2)	1 : 0,5	0,001 M : 0,0005 M
0,296 mg/l (EE2)	1 : 10	0,001 M : 0,01 M
0,228 mg/l (BPA)	1 : 20	0,0005 M : 0,01 M

2.2.2.9 SPME/ GC-MS analiza

Preostanek spojin E2 in EE2 po ozonaciji smo določili z metodo SPME/GC-MS. Vzorevanje je potekalo z avtomatiziranim vzorčevalnikom Gerstel MultiPurposeSampler, analiza pa je potekala na plinskem kromatografu sklopljenim z masnim spektrometrom GC-MS Agilent 6890N/5973 (Agilent Technologies, Little Falls, DE, ZDA). Vzorce po ozonaciji oz. Fentonovi oksidaciji (18 ml) smo filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,3 µm in nato izvedli mikroekstrakcijo na nitki (Solid Phase Microextraction oz. SPME). Ekstrakcija spojin na poliakrilatno nitko (PA 85 µm) je potekala 30 min pri temperaturi 55 °C in konstantnem mešanju 250 rpm. Nato je sledila desorpcaija (3 min) v injektorju pri 250 °C, in ločevanje spojin na GC koloni HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Agilent Technologies) z naslednjim programom: 80 °C, 4 min; naraščanje temperature 15 °C/min do 300 °C, 10 min. Helij s konstantnim pretokom 1,1 ml/min smo uporabili kot nosilni plin. Temu je sledila detekcija, pri čemer smo uporabili MSD analizator, s katerim smo merili ione z *m/z* od 30-550. Retencijski časi in fragmentni ioni (v oklepaju) so bili naslednji: 16,89 (*m/z*: 213 in 228) za BPA; 19,63 (*m/z*: 272 in 213) za E2 in 20,07 (*m/z*: 296 in 213) za EE2.

Odstotek razgradnje testnih spojin (%) smo izračunali po enačbi 1.

$$\text{Razgradnja (\%)} = \frac{c_{\text{vzorec po ozonaciji}} (\mu\text{g/l})}{c_{\text{vzorec pred ozonacijo}} (\mu\text{g/l})} \times 100 \quad \dots (1)$$

2.2.2.10 SPE koncentriranje

Vzorce za analizo s testom YES smo pred izvedbo samega testa koncentrirali oz. ekstrahirali z metodo SPE. Pri tem smo uporabili kolone Waters Oasis® s polnilom Oasis® HLB 60 µm/500 mg (Waters Oasis Corporation, MA, USA). Kondicioniranje kolon je potekalo s 4 ml metanola (MeOH), sledilo je spiranje topil s 4 ml ultračiste vode (Purelab Option, Elga, Veolia Waters Solution and Technology, Velika Britanija), nanos vzorca ter spiranje nečistoč s kolone s 4 ml 5 % MeOH in sušenje kolon z nežnim pretokom dušika. Sledila je elucija spojin iz kolon z MeOH (4 ml) in dodatno preprihovanje z dušikom do končnega volumna 1 ml.

2.2.2.11 Test YES

Estrogenost posameznega vzorca po ozonaciji smo preverili s testom YES, kjer uporabljamo gensko spremenjen sev kvasovke *S. cerevisiae*, ki so ga pod vodstvom profesorja Sumpterja (Genetics Department of Glaxo Wellcome, Stevenage, UK) razvili za ugotavljanje prisotnosti estrogenov in estrogeno aktivnih snovi v vodnih vzorcih. Pridobili smo dovoljenje za uporabo kvasovk za izvedbo testa YES v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Postopek testa YES in izračun estrogene aktivnosti vzorcev je opisan v Bistan in sod. (2012a-d).

2.2.3 REZULTATI IN DISKUSIJA

2.2.3.1 Obstojnost E2 med *in vivo* testom

Z analizo sveže pripravljenih vodnih raztopin E2, vodnih raztopin E2 odvzetih iz akvarijev in vodnih raztopin E2, ki smo jih zbirali na iztoku iz akvarijev, smo ugotovili, da se med izvedbo testa del E2 izgubi. V vodi iz akvarija smo določili le še 65 % začetne količine E2 in na iztoku iz akvarija le še 40 % začetne količine E2, kar nakazuje na do 60 % izgubo E2 tekom izvedbe testa z ribami. Ker je naravni estrogeni hormon E2 hidrofobna spojina, ki se rada adsorbira na različne materiale (Walker in Watson, 2010), sklepamo, da se je del E2 adsorbiral na steklene površine akvarijev oz. plastične površine cevk, po katerih je vodna raztopina E2 potovala v akvarij oz. iz njega. Možno je tudi, da se je del E2 razgradil na svetlobi (Chowdhury in sod., 2011).

2.2.3.2 Kratkotrajen *in vivo* test z ribami zeb ricami *D. rerio*

Z Vtg-ELISA testom v ribah zeb ricah izpostavljenim E2 v kratkotrajnem testu nismo nikjer zaznali Vtg, najverjetneje zaradi prekratke izpostavljenosti rib naravnemu estrogenemu hormonu E2. Ugotovili smo tudi, da izvedba testa ne more in ne sme biti statičen sistem, saj sčasoma ribam začne primanjkovati kisika zaradi razgradnje iztrebkov.

2.2.3.3 Dolgotrajen *in vivo* test z ribami zeb ricami *D. rerio*

Kljub doslednemu upoštevanju vseh parametrov izvedbe testa z ribami zeb ricami (OECD, 2009) smo ugotovili, da se del E2 (do 60 %) tekom poskusa izgubi, najverjetneje zaradi fotorazgradnje in/ali adsorpcije na steklo ali plastične cevi in to kljub temu, da je bil test izveden s pretočnim sistemom in da je v akvariji konstantno pritekala sveža vodna raztopina E2. Prav tako smo ugotovili več kot 10 % umrljivost rib med izvedbo testa, zaradi česar je bil test neveljaven. Vtg smo sicer določili pri ribah izpostavljenih testni spojini E2 v koncentraciji 27,2 in 2,72 µg/l (Priloga B).

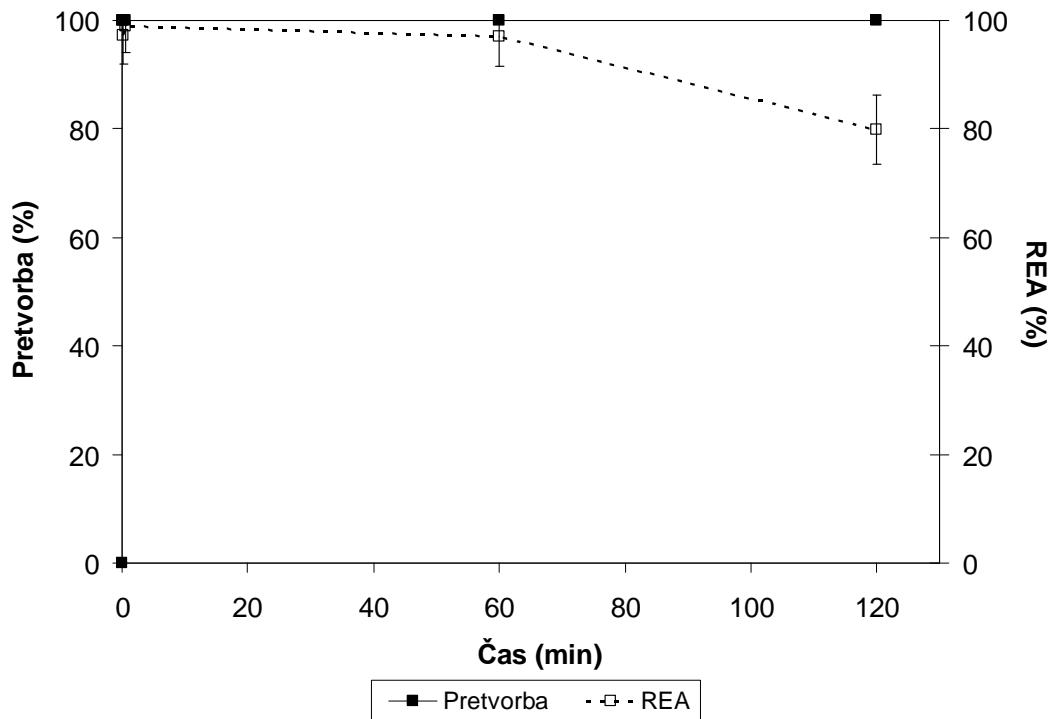
Odločili smo se, da v nadaljnih raziskavah testa z ribami zeb ricami za dokazovanje prisotnosti estrogeno aktivnih spojin ne bomo več izvajali, ker je test dolgotrajen, za test so potrebne velike količine vzorcev in ne omogoča stalne koncentracije testne spojine kljub pretočnemu sistemu. Ker smo potrebovali za naše nadaljne raziskave enostaven in hiter test, smo se odločili, da bomo v prihodnje za določanje estrogene aktivnosti uporabljali test YES.

2.2.3.4 Ozonacija

Ozonacija E2

Pretvorba E2 (v začetni koncentraciji 27,2 mg/l) v danih pogojih ozonacije (pretok kisika 20 l/h in 30 % ozona) doseže vrednost 92 % že po 10-ih minutah (Nakrst in sod., 2011). Vendar pa se kljub visokim odstotkom pretvorbe E2 tekom ozonacije estrogena aktivnost (REA) vzorcev ne spreminja in ostaja vedno 100 %. Razlog za to je dejstvo, da je koncentracija E2 kljub maksimalni pretvorbi 96,5 % po 60-ih minutah še vedno zelo visoka - 0,952 mg/l. Minimalna koncentracija E2, ki še povzroči estrogeno aktivnost je 15 ng/l, in koncentracija E2, ki povzroči maksimalni estrogeni odziv je enaka 340 ng/l (Bistan in sod., 2012a), zato lahko sklepamo, da 100 % REA povzroča ostanek E2 (0,952 mg/l - 6,09 mg/l) v vzorcih.

Na Sliki 14 je predstavljen potek pretvorbe E2 v začetni koncentraciji 0,272 mg/l v danih pogojih ozonacije (pretok kisika 20 l/h in 30 % ozona). Vidimo, da se že po 15 sekundah pretvori ves E2 oz. ga z metodo SPME/GC-MS ni moč zaznati (meja detekcije E2 metode SPME/GC-MS je 272 ng/l). Kljub temu, da z metodo SPME/GC-MS v vzorcih ne zaznamo E2, pa je estrogena aktivnost, ki jo v teh vzorcih zaznamo, še vedno zelo visoka in se giblje med 79,9 in 98,9 %. Glede na to, da je minimalna koncentracija E2, ki še povzroči estrogeno aktivnost, 15 ng/l (Bistan in sod., 2012a), in da E2 z dano metodo SPME/GC-MS, ki ima mejo detekcije E2 272 ng/l, ne zaznamo, sklepamo da je E2 v vzorcih prisoten v koncentraciji < 272 ng/l, ki je še vedno lahko estrogeno aktivna. K estrogeni aktivnosti pripomore tudi intermediat benzofenon, ki nastane med procesom ozonacije (in s časom ozonacije celo narašča) in ima sposobnost vezave na estrogeni receptor (IEH, 2005). Njegovo prisotnost smo potrdili s SPME/GC-MS analizo (Šalinger, 2009).



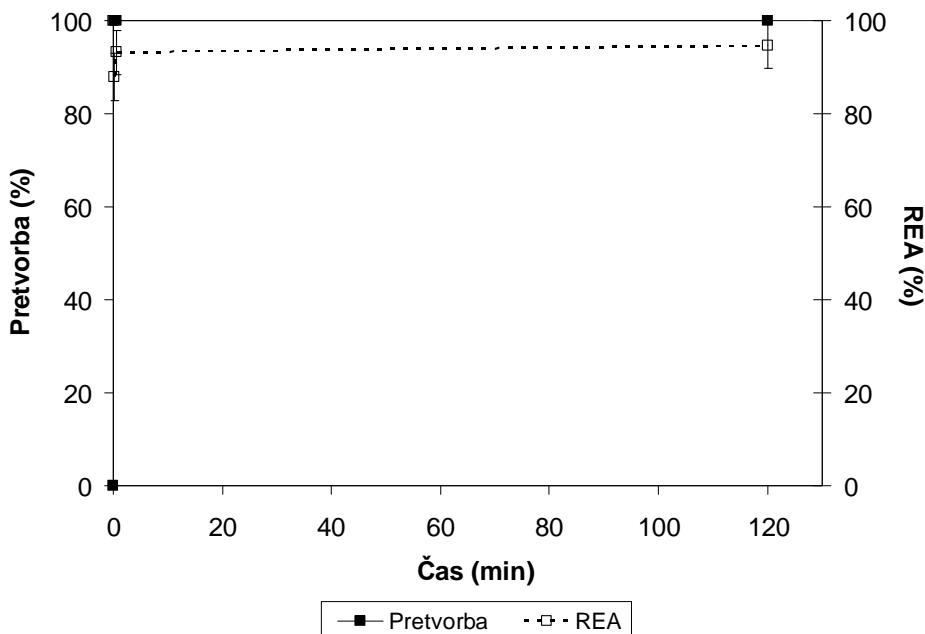
Slika 14: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) (%) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) v vzorcih po ozonaciji

Figure 14: Removal of E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) (%) and relative estrogenic activity (REA, %) in samples after ozonation

Ozonacija EE2

Pretvorba EE2 (v začetni koncentraciji 2,9 mg/l) v danih pogojih ozonacije (pretok kisika 20 l/h in 30 % ozona) doseže maksimalno vrednost 99,6 % po 120-ih minutah (Nakrst in sod., 2011). Kljub visokemu deležu pretvorbe EE2 tekom ozonacije se estrogena aktivnost (REA) vzorcev ne spreminja in ostaja vedno 100 %. Razlog za to je dejstvo, da je koncentracija EE2 kljub 99,6 % pretvorbi zelo visoka (0,116 mg/l). Minimalna koncentracija EE2, ki povzroči estrogeno aktivnost je 15 ng/l, in koncentracija EE2, ki povzroči maksimalni estrogenski odziv je enaka 370 ng/l (Bistan in sod., 2012a), zato sklepamo da 100 % REA vrednost povzroča ostanek EE2 v vzorcih, ki se giblje med 0,116 mg/l in 0,264 mg/l (Nakrst in sod., 2011).

Na Sliki 15 je predstavljena pretvorba EE2 (v začetni konc. 0,296 mg/l) v danih pogojih ozonacije (pretok kisika 20 l/h in 30 % ozona). Vidimo, da po 15 sekundah ozonacije EE2 več ne zaznamo, še vedno pa zaznamo estrogeno aktivnost (REA), ki po 120 min tretiranja pade le za 12 %. Glede na to, da je minimalna koncentracija EE2, ki še povzroči estrogeno aktivnost 15 ng/l (Bistan in sod., 2012a), in da EE2 z dano metodo SPME/GC-MS, ki ima mejo detekcije EE2 pri 296 ng/l, ne zaznamo, sklepamo, da REA v vzorcih povzroča preostanek EE2, ki je prisoten v koncentraciji < 296 ng/l. K izmerjeni estrogeni aktivnosti pripomore svoj delež tudi estrogeno aktiven intermediat dibutilftalat (IEH, 2005), ki nastane pri procesu razgradnje EE2 med ozonacijo (Šalinger, 2009). S časom njegova koncentracija narašča, kar smo potrdili s SPME/GC-MS analizo.



Slika 15: Pretvorba EE2 ($c_0 = 0,29$ mg/l) (%) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) v vzorcih po ozonaciji

Figure 15: Removal of EE2 ($c_0 = 0,29$ mg/l) (%) and relative estrogenic activity (REA, %) in samples after ozonation

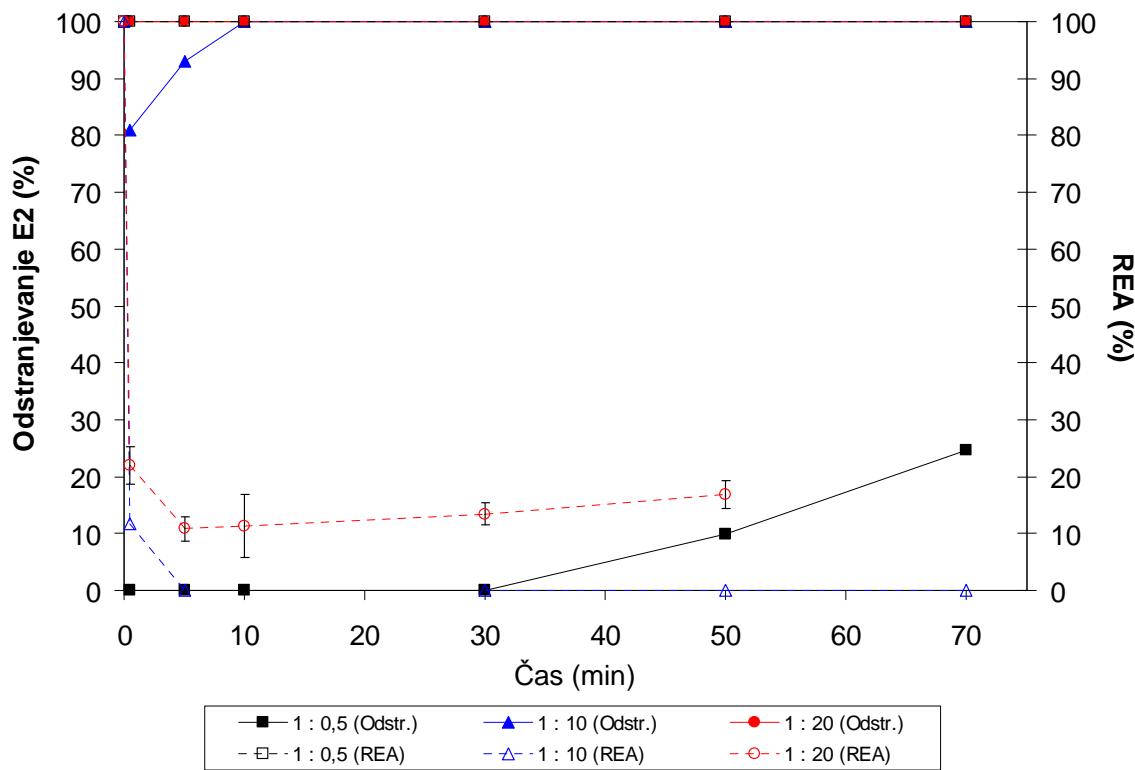
Potek pretvorbe E2 oz. EE2 med ozonacijo je zelo podoben (Nakrst in sod., 2011). Na začetku se sicer v 1. minuti pretvori 12 % več EE2 kot E2 (okoli 91 %, E2 pa le 78 %), vendar nato pretvorba enakomerno narašča v obeh primerih, in tako se po 15 minutah pretvori že več kot 95 % E2 oz. EE2. Ker sta E2 in EE2 strukturno podobni spojini, iz dobljenih rezultatov sklepamo, da je mehanizem razgradnje E2 in EE2 podoben.

2.2.3.5 Fentonova oksidacija

Fentonova oksidacija E2

Pri odstranjevanju E2 (v začetni koncentraciji 27,2 mg/l) sta bili učinkoviti le razmerji reagentov 1 : 10 in 1 : 20, kjer se je že takoj po dodatku reagentov odstranilo več kot 30 % E2, po 60-ih minutah pa vsaj 80 % E2. Pri uporabljenem razmerju reagentov 1 : 0,5 do odstranitve E2 ni prišlo (Nakrst in sod., 2010). Estrogena aktivnost se tekom Fentonove oksidacije ni zmanjšala ali odstranila, saj je bil v vzorcih še vedno prisoten E2 v koncentracijah med 2,7 in 20,1 mg/l, v katerih je še vedno zelo estrogeno aktiven (Bistan in sod.., 2012a).

Pri odstranjevanju E2 v začetni koncentraciji 0,272 mg/l s Fentonovo oksidacijo smo opazili naslednje. Odstranitev E2 in estrogene aktivnosti (REA) je bila uspešna pri uporabljenih razmerjih reagentov 1 : 10 in 1 : 20, ne pa tudi pri razmerju 1 : 0,5, saj je v tem primeru po 70 minutah Fentonove oksidacije še vedno zaznati 75 % E2 in 100 % REA. V primeru razmerij reagentov 1 : 10 in 1 : 20 lahko govorimo o zelo dobrem odstranjevanju E2, saj takoj po dodatku reagentov zaznamo le okoli 10 oz. 20 % REA, kar pomeni da so bili vzorci le šibko estrogeni (Andersen in sod., 1999). Glede na to, da je meja detekcije estrogene aktivnosti (15 ng/l) pod mejo detekcije E2 z metodo SPME/GC-MS (272 ng/l), lahko sklepamo, da estrogeno aktivnost v vzorcih povzroča ostanek E2 < 272 ng/l.



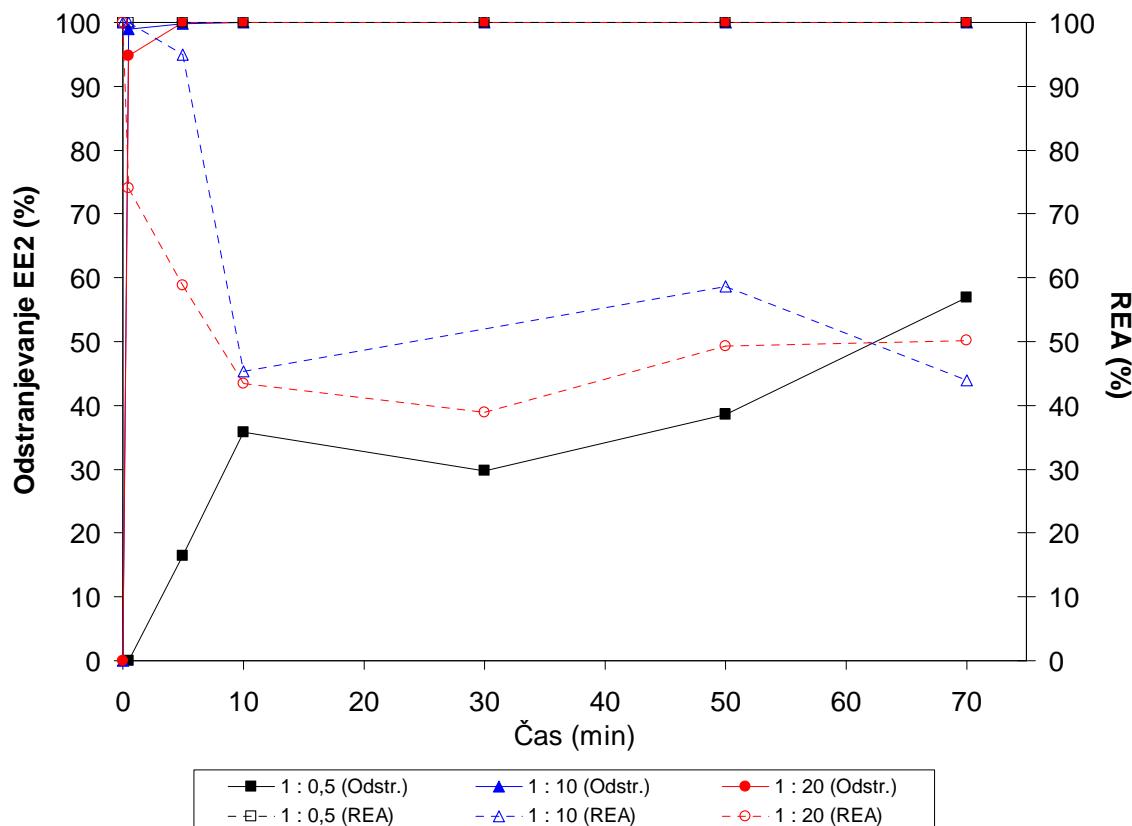
Slika 16: Odstranjevanje E2 (Odstr., %) ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe^{2+} in H_2O_2 (glej Preglednico 2) in relativna estrogena aktivnost (REA, %)

Figure 16: Removal of E2 (%) ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) during Fenton oxidation at different reagents ratios (see Table 2) and relative estrogenic activity (REA, %)

Fentonova oksidacija EE2

Pri odstranjevanju EE2 (v začetni koncentraciji 29,6 mg/l) sta razmerji reagentov 1 : 10 in 1 : 20 podobno uspešni, saj se po 70 minutah odstrani vsaj 99,1 % EE2, medtem ko se pri razmerju reagentov 1 : 0,5 po 70 minutah odstrani 78,8 % EE2. Estrogena aktivnost se ne odstrani, četudi se EE2 deloma razgradi. Glede na to, da je ostanek EE2 v vzorcih po 70 minutah še vedno med 0,296 in 6,275 mg/l, lahko sklepamo, da estrogeno aktivnost v vzorcih povzroča preostanek EE2.

Iz Slike 17 je vidno, da je bila odstranitev EE2 (v začetni koncentraciji 0,296 mg/l) najuspešnejša pri razmerju reagentov 1 : 10, saj je bila ugotovljena 100 % odstranitev EE2 iz vzorcev že po 5 oz. 10 minutah. Prav tako opazimo upad v preostanku estrogene aktivnosti, po 70 minutah zaznamo le še 44 % REA. Za manj učinkoviti razmerji reagentov sta se izkazali razmerji 1 : 0,5 in 1 : 20, saj sta se EE2 in estrogena aktivnost le delno odstranila.



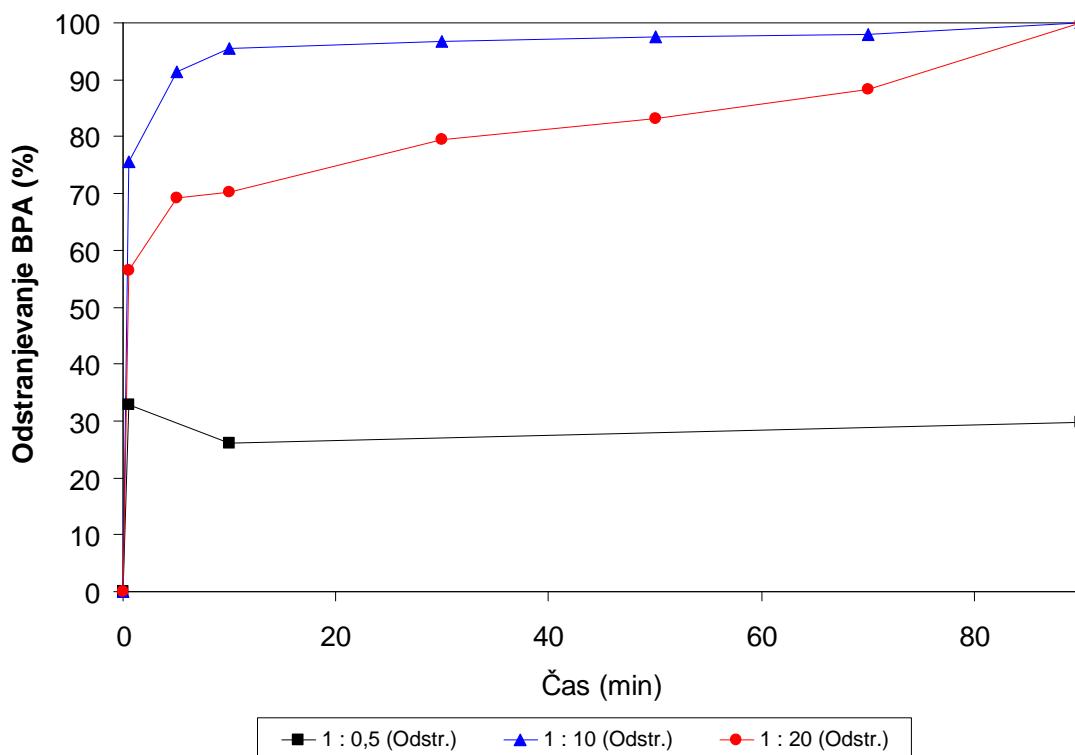
Slika 17: Odstranjevanje EE2 (Odstr., %) ($c_0 = 0,296 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe^{2+} in H_2O_2 (glej Preglednico 2) in relativna estrogena aktivnost (REA, %)

Figure 17: Removal of EE2 (%) ($c_0 = 0,296 \text{ mg/l}$) during Fenton oxidation at different reagents ratios (see Table 2) and relative estrogenic activity (REA, %)

Fentonova oksidacija BPA

Odstranjevanje BPA (v začetni koncentraciji 0,228 mg/l) s Fentonovo oksidacijo je prikazano na 18. Vidimo, da je razmerje reagentov $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 0,5$ najmanj učinkovito, saj se je BPA le delno odstranil. Bolj učinkoviti sta bili razmerji reagentov 1 : 10 in 1 : 20, kjer se je že takoj po dodatku reagentov odstranilo 55 oz. 75 % BPA. Pri obeh razmerjih po 90 minutah nismo več določili BPA. Podobne rezultate smo opazili tudi pri odstranjevanju BPA v začetni koncentraciji 20 mg/l (Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku).

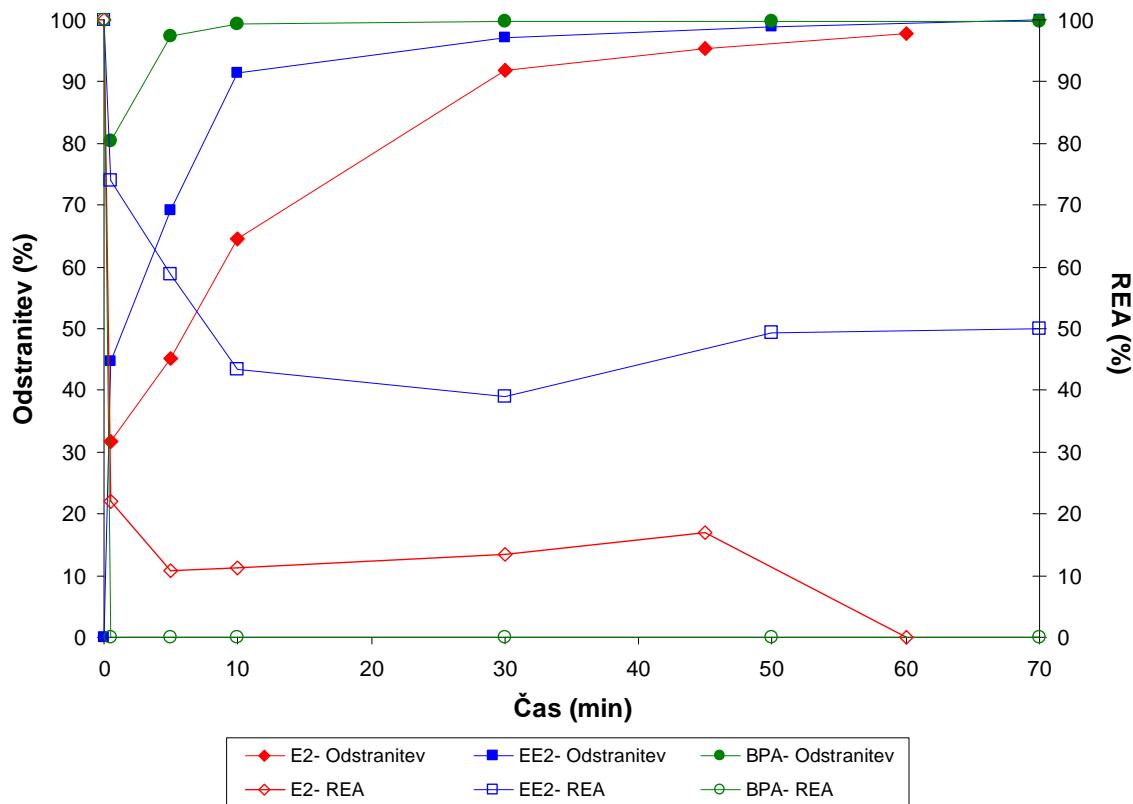
Estrogene aktivnosti (REA) nismo zaznali niti v tretiranih vzorcih niti v začetnem vzorcu (0,228 mg/l) zaradi šibke estrogene aktivnosti BPA (Bistan in sod., 2012a).



Slika 18: Odstranjevanje BPA (Odstr., %) ($c_0 = 0,228 \text{ mg/l}$) s Fentonovo oksidacijo pri različnih razmerjih oksidantov Fe^{2+} in H_2O_2 (glej Preglednico 2)

Figure 18: Removal of BPA (%) ($c_0 = 0,228 \text{ mg/l}$) during Fenton oxidation at different reagents ratios (see Table 2)

Na sliki 19 vidimo primerjavo poteka odstranitve E2, EE2 oz. BPA (rezultati dobljeni pri višjih začetnih koncentracijah testnih spojin) ter preostanek REA (rezultati dobljeni pri nižjih začetnih koncentracijah testnih spojin) tekom Fentonove oksidacije, ko je bilo uporabljeno razmerje reagentov $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 20$ (0,05 M: 1 M oz. 0,0005 : 0,01 M), kjer je lepo viden časovni potek odstranjevanja testnih spojin in hkratno zmanjševanje REA.



Slika 19: Odstranjevanje E2, EE2 oz. BPA (Odstr., %) in relativna estrogena aktivnost (REA, %) tekom Fentonove oksidacije pri uporabljenem razmerju reagentov $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 20$

Figure 19: Removal of E2, EE2 and BPA and relative estrogenic activity (REA) during Fenton oxidation at reagent ratio $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 20$

2.2.3.6 Adsorpcija testnih spojin na blato železovih oksidov in hidroksidov med Fentonove oksidacije

Med Fentonovo oksidacijo pride do nastanka železovih oksidov in hidroksidov, na katere se lahko adsorbirajo preiskovane spojine, za katere vemo, da imajo sposobnost adsorpcije na različne materiale (Clara in sod., 2004; Fent in sod., 2003, Mohapatra in sod., 2010, Zeng in sod., 2006; Kim in sod., 2011, Yoon in sod., 2003). Tako smo naredili tudi poskuse, v katerih smo preverili adsorpcijo E2, EE2 in BPA na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov. Rezultati so bili v soavtorstvu objavljeni v Nakrst s sod. (2010) in Žgajnar Gotvajn s sod. (v tisku), kjer poročamo o visokih odstotkih adsorpcije E2 in EE2 (26 - 50 % za E2 in 20 - 76 % za EE2) ter BPA (30 - 70 %) na nastalo blato tekom Fentonove oksidacije. Delež adsorpcije je odvisen od različnih parametrov, kot npr. od kontaktnega časa, koncentracije nastalega blata, temperature, pH, itd. (Preglednica 3).

Preglednica 3: Delež adsorpcije in oksidacije tekom Fentonove oksidacije pri različnih razmerjih reagentov (Nakrst s sod., 2010).

Table 3: Adsorption and oxidation of E2 and EE2 at different molar ratios of regents in Fenton's oxidation (Nakrst s sod., 2010).

Substance	C (mg L ⁻¹)	Ratio of reagents used in FO	pH	C of sludge formed (g L ⁻¹)	Adsorption/Oxidation (%/%)
E2	0.272	0.0003M:0.01M (1:33)	2.7	0.06	26/74
		0.0005M:0.01M (1:20)	2.7	0.12	38/62
		0.0005M:0.005M (1:10)	2.7	0.11	37/63
		0.001M:0.01M (1:10)	2.7	0.16	44/56
		0.001M:0.0005M (1:0.5)	2.7	0.37	60/40
	27.2	0.03M:1M (1:33)	2.7	3.25	50/50
		0.05M:1M (1:20)	2.7	6.00	57/40
		0.1M:1M (1:10)	2.7	10.22	64/17
		0.2M:2M (1:10)	2.7	6.55	58/39
		1M:0.5M (1:0.5)	2.7	90.01	99/1
EE2	0.296	0.0003M:0.01M (1:33)	2.7	0.15	19/28
		0.0005M:0.01M (1:20)	2.7	0.24	24/76
		0.0005M:0.005M (1:10)	2.7	0.16	20/80
		0.001M:0.01M (1:10)	2.7	0.30	27/73
		0.001M:0.0005M (1:0.5)	2.7	0.24	24/20
	29.6	0.03M:1M (1:33)	2.7	4.61	76/23
		0.05M:1M (1:20)	2.7	6.03	81/19
		0.1M:1M (1:10)	2.7	13.29	96/4
		0.2M:2M (1:10)	2.7	24.22	100/0
		1M:0.5M (1:0.5)	2.7	126.65	77/0

Adsorpcija je večja pri višjih pH vrednostih, kot tudi pri večji količini nastalega blata (kar pomeni pri nižjih razmerjih reagentov, saj pri nižjih razmerjih reagentov nastane več blata). Pri višjih pH vrednostih je v postopku Fentonove oksidacije favorizirana adsorpcija tako E2 in EE2 kot tudi BPA, pri nižjih pH vrednostih pa oksidacija. Pri višjih razmerjih reagentov (npr. 1 : 20) večji del odstranjevanja pripada oksidaciji, saj se tvori manj odpadnega blata (Nakrst in sod., 2010). Adsorpcija EE2 na nastalo blato je manjša in počasnejša kot adsorpcija E2 (Nakrst in sod., 2010), kar je najverjetneje posledica slabše topnosti E2 v vodi (Shareef in sod., 2006). BPA se slabo veže na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov, zaradi česar bi lahko prišlo kasneje do desorpcije (Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku).

Če povzamemo vse rezultate in pri tem upoštevamo pogoje izvedbe Fentonove oksidacije, pri katerih se tvori najmanj odpadnega blata in so pogoji dobro regulirani, lahko zaključimo, da se pri Fentonovi oksidaciji adsorbira vsaj 20 % E2 oz. EE2 in vsaj 30 % BPA ter tako dejansko oksidira do 80 % E2 oz. EE2 in do 70 % BPA (Nakrst in sod., 2010; Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku). Zato je potrebno razmisiliti o dejanski učinkovitosti Fentonove oksidacije, saj se z nastalim blatom železovih oksidov in hidroksidov del E2, EE2 in BPA spet vrne v okolje.

3 RAZPRAVA IN SKLEPI

3.1 RAZPRAVA

Pri našem delu, kjer smo preverjali tako estrogenost okoljskih vzorcev (odpadnih vod) kot tudi vzorcev testnih spojin po obdelavi z nekaterimi naprednimi oksidacijskimi postopki, smo uporabljali test z gensko spremenjenimi kvasovkami *S. cerevisiae*, t.i. test YES. Za določanje koncentracije testnih spojin v vodnih vzorcih smo uporabili metodo SPME/GC-MS ali HPLC.

3.1.1 Optimizacija testa YES za določanje estrogene aktivnosti in metode SPE za koncentriranje vodnih vzorcev

Optimizacija testa YES je zajemala tako določanje občutljivosti in specifičnosti testa YES in optimizacijo parametrov izvedbe omenjenega testa, kot tudi sam postopek priprave vzorcev za nadaljno obravnavo s testom YES, ki vključuje ekstrakcijo in koncentriranje spojin z metodo SPE, čiščenje ekstraktov vzorcev na silikagelu in dekonjugacijo estrogenih hormonov.

Specifičnost testa YES smo preverjali z naslednjimi spojinami: 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA), nonilfenol (NP), genistein (G), hidrokortizon (HC), dieldrin (D), atrazin (A), metoksiklor (M), testosteron (T) in progesteron (P) (Bistan s sod., 2012d). Dejstvo, da je estrogeni receptor dobro ohranjen med vrstami in da je njegovo vezavno mesto za estrogen fleksibilno in večje kot sama molekula 17β -estradiola (Brzozowski in sod., 1997; Kuruto-Niwa in sod., 2007), omogoča vezavo različnih, 17β -estradiolu strukturno podobnih spojin (t.i. ksenoestrogenov) na njegovo vezavno mesto. Tako smo dokazali specifičnost testa YES za vezavo naravnega in sintetičnega estrogena (E2 in EE2), industrijskih kemikalij (BPA in NP), fitoestrogenov (G) in nekaterih pesticidov (M). Na drugi strani pa smo preverjali vpliv homologije hormonov na vezavo na estrogeni receptor in ugotovili da le-ta nima vpliva. Namreč, hidrokortizon (HC), testosteron (T) in progesteron (P), katerih sinteza prav tako poteka iz holesterola (Slika 1), se ne vežejo na estrogeni receptor in torej nimajo estrogene aktivnosti. Pri zgoraj omenjenih spojinah, ki so se izkazale za sposobne vezave na estrogeni receptor (oz. za

estrogeno aktivne), smo dokazali, da je njihova estrogena aktivnost odvisna od koncentracije (več je (kseno)estrogena, večjo estrogeno aktivnost povzroči) ter določili občutljivost testa YES za te spojine. Rezultate občutljivosti testa YES smo podali podobno kot Kuruto-Niwa in sod. (2007) kot koncentracije, ki so povzročile minimalni estrogeni odziv, maksimalni estrogeni odziv in 50 % maksimalnega odziva (Bistan in sod., 2012a). Tako se je izkazalo, da je občutljivost testa YES za naravni in sintetični estrogeni hormon podobna (meja detekcije estrogene aktivnosti je pri 15 ng/l) ter da je občutljivost testa YES za ostale ksenoestrogene dosti nižja, in sicer 5-krat nižja za NP (meja detekcije estrogene aktivnosti je pri 73 ng/l), več kot 5000- krat nižja za BPA in G (meja detekcije estrogene aktivnosti je pri 78 oz. 312 µg/l) ter več kot 100000-krat nižja za M (meja detekcije estrogene aktivnosti je pri 2 mg/l). Podobno specifičnost in občutljivost testa YES so opisali tudi drugi avtorji (Daston in sod., 1997; Giesy in sod. 2002; Routledge in Sumpter, 1996 in Ternes in sod., 1999).

Z določanjem parametrov testa YES, kot npr. čas trajanja testa YES, količina (oz. koncentracija) dodanega substrata CPRG v testni medij ter izbira valovne dolžine za merjenje absorbance razgradnega produkta CPR, smo želeli določiti pogoje izvedbe testa YES za pridobitev optimalnih rezultatov. Tako smo določili, da v testu uporabimo kvasovke, ki so v rastnem mediju ob konstantnem mešanju (140 rpm) pri 28 °C rasle 18 do 24 ur in pri tem dosegle (optično gostoto merjeno pri $\lambda = 620$ nm) $OD_{620} = 0,8 - 1,3$ (Priloga C). Trajanje testa YES smo omejili na 48 do 58 ur; v tem času se razvije barva razgradnega produkta CPR in odziv kvasovk je koncentracijsko odvisen (kar vidimo iz sigmoidne krivulje). Ob podaljšanju časa trajanja testa YES na 72 ur je opazno popačenje sigmoidne krivulje in odziv kvasovk več ni koncentracijsko odvisen (Bistan in sod., 2012a). Nadalje, pri optimizaciji količine dodanega substrata CPRG v testni medij smo ugotovili, da smo zadovoljive rezultate dobili že ob dodatku 200 µl substrata CPRG (Bistan in sod., 2012a), ter da z merjenjem absorbance razgradnega produkta CPR pri valovni dolžini $\lambda = 575$ nm dobimo 75 % večji odziv kot z merjenjem absorbance pri $\lambda = 540$ nm, kar predlagata Routledge in Sumpter (1996). Odziv kvasovk smo nato predstavili kot aktivnost encima β -galaktozidaza, pri čemer izločimo (odštejemo) vpliv rasti kvasovk na njihov estrogeni odziv v testu YES. Namreč, vpliv na rast kvasovk ima lahko za

posledico lažno pozitivne rezultate testa YES (Andersen in sod., 1999; Bistan in sod., 2012a).

Ekstrakcijo in koncentriranje spojin z metodo SPE smo izvajali na kolonah, ki vsebujejo silikagel z vezanimi oktilnimi skupinami (C-18), to so SupelcleanTM ENVI 18-SPE (Supelco, Sigma-Aldrich, ZDA) in kolonah s polimernim polnilom Oasis[®] HLB SPE (Waters Milford, MA, ZDA), podobno kot Ballesteros in sod. (2006), Gabet in sod. (2007), Hernando in sod. (2004) ter Lopez de Alda in Barcelo (2001). Za kondicioniranje in spiranje/elucijo smo uporabili polarni organski topili metanol (zelo polarno topilo) in etilacetat (srednje polarno topilo). Ugotovili smo, da so izkoristki koncentriranja za testne spojine 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) in genistein (G) podobni (> 80 %), tako pri obeh uporabljenih kolonah, kot tudi pri obeh uporabljenih topilih (Bistan s sod., 2012a). V primeru uporabe etilacetata kot elucijskega topila, smo pri preverjanju estrogene aktivnosti s testom YES opazili, da se ob stiku etilacetata z mikrotitrsko ploščo tvori bela oborina, zato smo nadalje etilacetat po eluciji posušilili in ga nadomestili z metanolom (Bistan s sod., 2012a). Na podlagi teh opažanj smo se odločili, da bomo v prihodnje uporabljali kolone Oasis[®] HLB SPE (Waters Milford, MA, ZDA) in topilo metanol, ki smo ju tudi uporabili pri preverjanju izkoristkov koncentriranja z metodo SPE za različne koncentracije spojin E2, EE2 in BPA. Ugotovili smo, da so pri nižjih uporabljenih koncentracijah testnih spojin (0,136 µg/l E2, 0,148 µg/l EE2 in 2,5 mg/l BPA) večje izgube tekom postopka koncentriranja, saj so se izkoristki gibali med 60 in 80 %, medtem ko so pri višjih koncentracijah testnih spojin (13,6 µg/l E2, 14,8 µg/l EE2 in 10 mg/l BPA) izkoristki testnih spojin bili vsaj 99,6 %. Podobne rezultate so objavili tudi Ballesteros in sod. (2006), Lopez de Alda in Barcelo (2001), idr.

3.1.2 Določanje estrogene aktivnosti z *in vivo* testom Vtg-ELISA

S testom Vtg-ELISA smo želeli določiti vpliv estrogeno aktivnih spojin na mladice oz. samce rib zebrič *D. rerio* in sicer z določanjem vitelogenina z indirektnim testom ELISA.

Ugotovili smo, da kratkotrajen test ni bil uspešen, saj nikjer nismo zaznali vitelogenina, kljub izpostavljenosti rib visokim koncentracijam naravnega estrogenega hormona E2 (do

272 µg/l). Najverjetneje je bila izpostavljenost rib zebrič spojini E2 prekratka (OECD, 2006), namreč E2 izzove proizvodnjo Vtg pri samcih oz. mladicah rib zebrič že v koncentracijah > 21 ng/l (Brion in sod., 2002; Folmar in sod., 2002; Rose in sod., 2002). Prav tako ni bil uspešen dolgotrajen test izpostavljenosti rib zebrič naravnemu estrogenemu hormonu E2, saj je test dolgotrajen, zaradi česar imamo lahko probleme z umrljivostjo rib zebrič tekom poskusa. Ugotovili smo tudi, da se med izvedbo testa del E2 izgubi (do 60 %), najverjetneje zaradi fotorazgradnje (Chowdhury in sod., 2011) oz. zaradi adsorpcije na steklene površine akvarijev oz plastične površine cevk (Walker in Watson, 2010), po katerih je vodna raztopina E2 potovala v akvarij oz. iz njega.

Tako smo zaključili, da v prihodnje testa za določanje estrogene aktivnosti z ribami zebričami za naše potrebe ne bomo uporabljali, saj je omenjeni test preveč dolgotrajen, zanj potrebujemo velike količine vzorca in ne omogoča stalne koncentracije testirane spojine v vodni raztopini. Zato smo se odločili, da bomo za določanje estrogene aktivnosti uporabljali test YES, s katerim dobimo hiter odgovor o estrogeni aktivnosti testiranih vzorcev. Seveda pa se je potrebno v primeru ugotavljanja estrogenih učinkov na okolje poslužiti tudi *in vivo* testov (Kinnberg, 2003).

3.1.3 Določanje estrogene aktivnosti okoljskih vzorcev s testom YES

Test YES se je že večkrat izkazal kot primeren za določanje estrogenosti okoljskih vzorcev, kar so v svojih delih potrdili mnogi raziskovalci (Beck in sod. 2006; Eggen in sod., 2003; Fernandez in sod., 2007; Jürgens in sod., 2002; Ma in sod., 2007; Miège in sod., 2009a; Murk in sod., 2002; Nelson in sod., 2007; Stuer-Lauridsen in sod., 2005; Yang in Cicek, 2008). Uporabimo ga lahko tudi za ugotavljanje estrogenosti komunalnih in industrijskih odpadnih voda (Bistan in sod., 2011 in 2012a). V ta namen smo okoljske vzorce najprej ustrezno pripravili, kar je vključevalo čiščenje vzorcev na silikagelu (Beck in sod., 2005; Ma in sod., 2007; Sun in sod., 2008) in postopek dekonjugacije (Belfroid in sod., 1999; Mouatassim-Souali in sod., 2003). Pri postopku čiščenja vzorcev smo uporabili kolone Silikagel 60 (Merck, Nemčija) in po navodilih proizvajalca topilo etilacetat oz. 5 % aceton v etilacetatu. Za detekcijo vseh estrogenov (tako nekonjugiranih kot konjugiranih), oz. za določanje celokupne estrogene aktivnosti okoljskih vzorcev, je potrebno izvesti še

postopek dekonjugacije (Belfroid in sod., 1999; Mouatassim-Souali in sod., 2003), saj se estrogeni hormoni (tako naravni kot sintetični) iz telesa izločijo v konjugirani obliki in zato v okolju nimajo estrogene aktivnosti (Ingerslev in Halling-Sørensen, 2003), jo pa ponovno pridobijo ob stiku z mikroorganizmi v okolju ali pa na čistilni napravi. Estrogeno aktivnost okoljskih vzorcev smo primerjali z estrogeno aktivnostjo naravnega estrogenega hormona E2 in jo nato podali kot relativno estrogeno aktivnost (REA) (Bistan in sod., 2011 in 2012a).

Na čistilni napravi A, kamor pritekajo komunalne odpadne vode in odpadne vode iz farmacevtske, lesne, kemične, tekstilne in kovinske industrije smo v koncentratih vzorca vtoka zaznali do 62 % REA pred dekonjugacijo in po dekonjugaciji do 87 % REA vrednost, kar nakazuje na prisotnost konjugiranih estrogenih hormonov. V koncentratih vzorca iztoka smo zaznali do 91 % REA pred dekonjugacijo in po dekonjugaciji do 81 % REA; razlika je v tem primeru lahko posledica izgub (kseno)estrogenov med ponavljajočimi se SPE postopki (po dekonjugaciji vzorec zopet koncentriramo po SPE postopku). Opazimo lahko tudi, da se po čiščenju vzorca iztoka na silikagelu REA poveča za do 55 %, in to brez postopka dekonjugacije, iz česar lahko sklepamo, da se s čiščenjem na silikagelu znebimo drugih organskih in/ali anorganskih spojin, ki sicer niso motile rasti kvasovk, so pa vplivale na zaznavanje estrogene aktivnosti. Iz teh rezultatov vidimo, da nam postopek čiščenja na silikagelu omogoča zaznavanje estrogene aktivnosti, kadar so v vzorcu prisotne še druge organske in/ali anorganske spojine, ki motijo rast kvasovk, saj se le-teh po čiščenju s silikagelom znebimo (Bistan s sod., 2011).

Na čistilni napravi B, kamor pritekajo komunalne odpadne vode in deževnica, smo v koncentratih vzorca vtoka zaznali do 87 % REA pred dekonjugacijo in 100 % REA po dekonjugaciji, kar kaže na prisotnost konjugiranih estrogenih hormonov. Opazimo tudi, da so visoke vrednosti REA zaznane tudi v nižjih koncentratih, kar nakazuje na prisotnost estrogenov in ksenoestrogenov v odpadnih vodah (iz gospodinjstev), ki prispejo na čistilno napravo. V koncentratih vzorca iztoka, ki smo ga samo koncentrirali z metodo SPE (ne pa tudi čistili na silikagelu), smo zaznali do 60 % REA pred dekonjugacijo in do 95 % REA po dekonjugaciji, torej do 35 % povečanje REA po dekonjugaciji, kar kaže na prisotnost konjugiranih estrogenih hormonov. Prav tako smo zaznali REA v najnižjem koncentratu

vzorca iztoka B, kar nakazuje na prisotnost estrogenov in ksenoestrogenov v odpadni vodi, ki se je iztekala v površinsko vodo. Vendar, ko pogledamo rezultate koncentratov vzorca iztoka, ki smo jih po koncentriranju z metodo SPE še dodatno čistili s silikagelom, opazimo da estrogena aktivnost pred in po dekonjugaciji ostaja enaka, iz česar bi lahko sklepali, da v vzorcih ni prisotnih konjugiranih estrogenih hormonov. Prav tako vidimo, da v nižjih koncentratih vzorca iztoka več ne zaznamo REA, kar bi pomenilo, da je postopek čiščenja odpadne vode na čistilni napravi B uspešen v odstranjevanju estrogenov in ksenoestrogenov oz. njihove estrogene aktivnosti. Torej prihaja med čiščenjem na silikagelu do izgub estrogenov in ksenoestrogenov, zaradi česar bi lahko podali napačne sklepe, da je čistilna naprava B uspešna pri odstranjevanju estrogene aktivnosti. Zato sklepamo, da je postopek čiščenja vzorcev na silikagelu smiseln samo takrat, kadar so v vzorcih prisotne strupene organske in/ali anorganske snovi, ki zavirajo rast kvasovk.

Na čistilni napravi C, kamor pritekajo odpadne vode iz prašičereje, smo opazili visoko zaviranje rasti kvasovk, tako ob izpostavitvi kvasovk koncentratom vzorca vtoka kot tudi vzorca iztoka, kar je posledica prisotnih strupenih organskih in/ali anorganskih spojin v vzorcih. REA vzorcev odpadne vode iz čistilne naprave C smo zaznali le pred dekonjugacijo in sicer na vtoku 66 % REA in na iztoku 35 % REA, medtem ko REA po dekonjugaciji (ne na vtoku, ne na iztoku) nismo zaznali. Rezultati kažejo, da so se prisotni (kseno)estrogeni, ki so pred dekonjugacijo povzročili estrogeno aktivnost izgubili tekom postopkov dekonjugacije in koncentriranja z metodo SPE (po dekonjugaciji) (Bistan in sod., 2011).

S testom YES smo torej ugotovili, da so tako v vtokih kot tudi na iztokih iz čistilnih naprav prisotni estrogeni in ksenoestrogeni, ki povzročajo estrogeno aktivnost. Tako smo zaznali REA v višjih koncentratih vzorcev (12,5-x in 6,3-x), v nekaterih primerih pa tudi v najnižjem koncentratu (1,6-x), kar nakazuje na prisotnost estrogeno aktivnih spojin v vodah, ki pritečejo na čistilno napravo kot tudi v iztokih iz čistilnih naprav.

Ugotovili smo, da s procesom čiščenja vzorcev na silikagel kolonah odstranimo strupene organske in/ali anorganske spojine, ki zavirajo normalno rast kvasovk v testu YES ter da z dekonjugacijo določimo celokupno estrogeno aktivnost vzorcev. Tako smo po dodatnem

čiščenju s silikagelom zaznali estrogeno aktivnost v večini vzorcev odpadnih vod. V nekaterih primerih se je REA v vzorcih po čiščenju na silikagelu celo povečala in sicer za 15 - 55 % (Bistan in sod., 2011), kar lahko razložimo z dejstvom, da se tekom čiščenja s silikagelom znebimo strupenih organskih in/ali anorganskih spojin, ki ne samo, da zavirajo rast kvasovk, temveč tudi vplivajo na zaznavanje estrogene aktivnosti. Opazno je tudi povečanje REA po dekonjugaciji (Tabela 2- vtok in Tabela 3-vtok v Bistan in sod., 2011), kar nakazuje na prisotnost konjugiranih naravnih in sintetičnih estrogenih hormonov, ki postanejo aktivni šele po dekonjugaciji. V vzorcih iztokov REA pred in po dekonjugaciji ostaja ista, kar pomeni, da so se konjugirani naravni in sintetični estrogeni hormoni dekonjugirali tekom procesa čiščenja odpadne vode v aktivnem blatu. Podobna opažanja so v svojih delih opisali tudi Baronti in sod. (2000), Belfroid in sod. (1999), D`Ascenzo in sod. (2003), Körner in sodelavci (2000), Pickering in Sumpter (2003) ter Ternes in sod. (1999). Iz primerjave REA dekonjugiranih vzorcev brez čiščenja in s čiščenjem na silikagelu (iztok vzorca B, Tabela 3 v Bistan in sod., 2011) opazimo razliko 30 %, kar nam nakazuje na možne izgube tekom procesa čiščenja na silikagelu, o čemer so poročali že Aerni in sod. (2004), Hájková in sod. (2007) in Stuer-Lauridsen in sod. (2005). Dodatno čiščenje na silikagelu je torej uporabno le v primeru kadar je po koncentriranju z metodo SPE v vzorcih še vedno prisotnih preveč strupenih spojin, ki motijo rast kvasovk in s tem zaznavanje estrogene aktivnosti.

S kemijsko analizo (SPME/GC-MS) smo v vzorcih odpadnih vod zaznali nekatere ftalate in fenole, ki so tudi estrogeno aktivni, vendar ne v taki meri, da bi povzročili REA kot smo jo zaznali s testom YES. Estrogenih hormonov z omenjeno metodo nismo zaznali, najverjetneje zaradi premajhne občutljivosti same metode. Vendar, ker obstajajo podatki o izmerjenih koncentracijah E1, E2 in E3 v slovenskih odpadnih vodah, in sicer do 66,3 ng/l E1, 12,6 ng/l E2 in 115,9 ng/l E3 v vtokih ter do 6,1 ng/l E1, 2,1 ng/l E2 in 98,4 ng/l E3 na iztokih čistilnih naprav (Avberšek in sod., 2009), lahko sklepamo da so tudi v naših vzorcih prisotni estrogeni hormoni in da so predvsem le-ti odgovorni za estrogeno aktivnost, ki smo jo zaznali (Desbrow in sod., 1998; Onda in sod., 2002).

3.1.4 Odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki

Nekatere estrogeno aktivne spojine so lahko deloma biorazgradljive (Czajka in sod., 2006; Gaulke in sod., 2008; Ivanov in sod., 2009; Jürgens in sod., 2002; Khunjar in sod., 2008; Larcher in sod., 2012; Li in sod., 2012; Shi in sod., 2004), vendar je proces biološke razgradnje estrogeno aktivnih spojin dolgotrajen in pogojen z dejavniki kot so temperatura in pH okolja, prisotnost drugih organskih spojin (ker razgradnja večkrat poteka v kometabolizmu), zadrževalni čas (na čistilnih napravah), itd. Prav tako so le deloma učinkoviti fizikalno - kemijski postopki, kot so procesi sedimentacije, koagulacije, različni membranski procesi ter uporaba aktivnega oglja (Chang in sod., 2004; Fukuhsara in sod., 2006; Nghiem in sod., 2004; Snyder in sod., 2007; Van der Bruggen in Vandecasteele 2003; Yoon in sod., 2003), ki onesnaževala le odstranijo iz vod (in prenesejo na membrano, aktivno oglje, itd.), ne pa tudi dejansko razgradijo. Zato smo se v našem delu osredotočili na odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin z naprednimi oksidacijskimi postopki. Uporabili smo naslednje postopke: ozonacijo, Fentonovo oksidacijo, fotolitsko/fotokatalitsko oksidacijo in mokro/katalitsko mokro oksidacijo ter testne spojine 17β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2) in bisfenol A (BPA). Kemijsko analizo ostankov testnih spojin smo določali z metodo SPME/GC-MS oz. metodo HPLC, estrogeno aktivnost v vzorcih pa smo določali s testom YES, pri čemer smo estrogeno aktivnost vzorcev po oksidacijskih postopkih primerjali glede na estrogeno aktivnost začetnih vzorcev in jo nato podali kot relativno estrogeno aktivnost (REA).

3.1.4.1 Ozonacija

V procesu ozonacije, kjer smo uporabili testni spojini 17β -estradiol (E2; 27,2 mg/l) in 17α -etinilestradiol (EE2; 2,9 mg/l) smo ugotovili, da se v danih pogojih (pretok ozona 20 l/h in 30 % ozona) po 60-ih minutah ozonacije pretvori 96,5 % E2 in po 120-ih min 99,6 % EE2 (Nakrst in sod., 2011). Odstranjevanje oz. pretvorba EE2 tekom ozonacije je v primerjavi z E2 na začetku hitrejša, saj se v 1. minutah razgradi 12 % več EE2 kot E2, vendar pa nato pretvorba obeh spojin enakomerno narašča do 120. minute (Nakrst in sod., 2011). Pri nižjih začetnih koncentracijah E2 in EE2 (0,272 mg/l in 0,29 mg/l) po ozonaciji v vzorcih nismo določili ne E2 niti EE2, vendar pa smo kljub temu v obeh primerih zaznali estrogeno

aktivnost (Slika 14 in 15). REA je bila po 120-ih minutah v vzorcih z E2 > 80 % oz. v vzorcih z EE2 > 88 %. Visoke vrednosti REA je povzročil ostanek nerazgrajenih E2 oz. EE2 ali pa estrogeno aktivni intermediati, ki so nastali tekom procesa ozonacije. Glede na to, da je meja detekcije estrogene aktivnosti za E2 in EE2 pri koncentraciji 15 ng/l (Bistan s sod., 2012a) ter da je meja detekcije metode SPME/GC-MS 272 ng/l za E2 oz. 296 ng/l za EE2, je verjeten vzrok za zaznano estrogeno aktivnost (REA) ostanek E2 oz. EE2 (> 15 ng/l in < 272 oz. 296 ng/l), ki ju z metodo SPME/GC-MS nismo zaznali. K estrogeni aktivnosti vzorcev po ozonaciji svoj delež prispevata tudi intermediata benzofenon oz. dibutilftalat, ki sta nastala med procesom ozonacije (Šalinger, 2010) in imata sposobnost vezave na estrogeni receptor (IEH, 2005).

3.1.4.2 Fentonova oksidacija

Pri procesu Fentonove oksidacije smo uporabili testne spojine 17β -estradiol (E2; 0,272 mg/l in 27,2 mg/l), 17α -etinilestradiol (EE2; 0,296 mg/l in 29,6 mg/l) in bisfenol A (BPA; 0,228 mg/l in 20 mg/l) ter reagente $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in H_2O_2 v razmerjih, ki so prikazana v Preglednici 2. Učinkovitost Fentonove oksidacije smo preverjali z metodo SPME/GC-MS in testom YES. Ugotovili smo, da odstranjevanje E2, EE2 in BPA tekom Fentonove oksidacije s časom narašča in da so različna razmerja reagentov različno uspešna (Slika 16-18). Razmerje 1 : 0,5 se je pri vseh treh uporabljenih testnih spojinah izkazalo za najmanj učinkovito, saj je le v primeru EE2 in BPA prišlo do delnega odstranjevanja, kar gre najverjetneje pripisati adsorpciji spojin na nastalo odpadno blato, ki ga pri tem razmerju reagentov nastane največ (Nakrst in sod., 2010; Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku). Razmerje reagentov 1 : 20 se je izkazalo za približno enako uspešno pri vseh treh spojinah (Slika 19), večje razlike pa je opaziti pri razmerju reagentov 1 : 10, ki se je izkazalo za učinkovito pri odstranjevanju EE2 in BPA, manj učinkovito pa za odstranjevanje E2.

Fentonova oksidacija je bila najhitrejša in najučinkovitejša pri odstranjevanju BPA, kjer se je že takoj po dodatku reagentov odstranilo od 55 do 75 % BPA ter 100 % po 90-ih minutah. Sledi odstranjevanje EE2, kjer se je takoj po dodatku reagentov odstranilo od 45 do 80 % EE2 ter do 100 % po 70-ih minutah, ter odstranjevanje E2, kjer se je takoj po dodatku reagentov odstranilo od 32 do 80 % E2 ter do 100 % po 60-ih minutah. Kar se tiče

odstranjevanja estrogene aktivnosti je bila Fentonova oksidacija bolj učinkovita pri odstranjevanju estrogene aktivnosti v vzorcih z E2, saj se je REA zmanjšala za 80 do 100 %, medtem ko je v vzorcih z EE2 REA zmanjšala le za 25 do 60 %. Seveda je pri vsem tem treba upoštevati tudi delež adsorbcije testnih spojin na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov, ki pa ni zanemarljiv (Nakrst in sod., 2010; Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku). Delež adsorpcije je odvisen od uporabljenega razmerja reagentov (pri nižjih razmerjih reagentov nastane več blata, zato pride do večje adsorpcije), tako prihaja tekom Fentonove oksidacije do 26 - 50 % adsorpcije E2 in 20 - 76 % adsorpcije EE2 (Nakrst in sod., 2010) ter do 30 - 70 % adsorpcije BPA (Žgajnar Gotvajn in sod., v tisku). Učinkovitost Fentonove oksidacije je zato pod vprašajem, saj se z adsorpcijo E2, EE2 in BPA na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov del teh spojin ne razgradi.

3.1.4.3 Fotolitska in fotokatalitska oksidacija ter mokra in katalitska mokra oksidacija

Pretvorbo 17β -estradiola (E2; 0,272 mg/l) in bisfenola A (BPA, 20 mg/l) smo študirali tudi s fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo ter z mokro in katalitsko mokro oksidacijo. Fotolitsko in fotokatalitsko oksidacijo smo izvajali v dvo- oz. trifaznem reaktorju ob konstantnem mešanju (360 rpm) in prepohovanju z zrakom (45 l/h) ter obsevanju z vidno svetlobo (halogenska žarnica, 150 W) ali UV svetlobo (UV 150 W žarnica, $\lambda = 365$ nm in UV 17 W žarnica, $\lambda = 254$ nm) in/ali uporabi katalizatorja TiO_2 Degussa P-25. Mokro in katalitsko mokro oksidacijo smo izvajali v trifaznem reaktorju s konstantnim pretokom testne spojine skozi reaktor (0,5 ml/min), pri temperaturi 200 °C oz. 230 °C in ob prisotnosti inertnega materiala SiC (mokra oksidacija) ali katalizatorja TiO_2 oz. Ru(3%)/ TiO_2 (katalitska mokra oksidacija). Učinkovitost fotolitske in fotokatalitske ter mokre in katalitske mokre oksidacije smo preverjali z metodo HPLC in testom YES. Ugotovili smo, da so bili vsi omenjeni postopki vsaj delno uspešni tako pri odstranjevanju testnih spojin (E2 in BPA) kot tudi pri zmanjševanju njihove estrogene aktivnosti (Bistan in sod., 2012b, c in d).

Iz poteka fotolitske in fotokatalitske oksidacije E2 (Priloga D) je opazno ujemanje pretvorbe E2 s sočasnim zmanjševanjem njegove estrogene aktivnosti. Pri fotolitski oksidaciji z vidno svetlobo (VS) vidimo postopno naraščanje pretvorbe E2, ki po 6-ih urah

doseže 45 %, hkrati pa se estrogena aktivnost ne spreminja, saj je v vzorcu še vedno prisoten E2 ($> 0,15 \text{ mg/l}$), ki povzroči maksimalni estrogeni odziv kvasovk (Bistan s sod., 2012a). Pri fotolitski oksidaciji z UV svetlobo $\lambda = 365 \text{ nm}$ (UV) vidimo, da se po 15-ih minutah pretvori že 50 % E2 ter po 120-ih minutah 100 % E2; hkrati tudi upada estrogena aktivnost, ki se popolnoma odstrani po 300-tih minutah. Pri fotokatalitski oksidaciji z vidno svetlobo (VS + kat.) se E2 popolnoma pretvori že po 60-ih minutah, njegova estrogena aktivnost pa se popolnoma odstrani šele po 300-tih minutah. Pri fotokatalitski oksidaciji z UV svetlobo $\lambda = 365 \text{ nm}$ (UV + kat.) smo opazili najhitrejšo pretvorbo E2, saj se že po 5-ih minutah pretvori več kot 90 % E2, hkrati pa opazimo tudi najhitrejše upadanje estrogene aktivnosti, ki se že po 180-ih minutah popolnoma odstrani. V obeh primerih fotokatalitske oksidacije (tako z vidno kot z UV svetlobo) in tudi pri fotolitski oksidaciji z UV svetlobo lahko sklepamo, da se tvorijo intermediati E2, ki še imajo estrogeno aktivnost, ter da se estrogena aktivnost popolnoma odstrani šele z njihovo razgradnjo. Ohko s sod. (2002) je v svojem delu predstavil pot razgrajevanja E2 tekom fotokatalitske oksidacije v prisotnosti TiO_2 Degussa P-25 (1 g/l) in obsevanju z UV svetlobo $\lambda = 365 \text{ nm}$ in nastale intermediate, ki so $10\beta\text{-}17\alpha\text{-dihidroksi-1,4-estradien-3-one}$ (DEO), 4,16-dien-3-one (ADO) in različne testosteronu podobne spojine.

Če povzamemo rezultate fotolitske in fotokatalitske oksidacije, vidimo, da smo po 6-ih urah pri fotolitski oksidaciji E2 z vidno svetlobo dosegli 45 % pretvorbo E2, medtem ko se estrogena aktivnost ni zmanjšala zaradi ostanka E2 (0,149 mg/l), ki je bil še vedno estrogeno aktiven. Pri fotolitski oksidaciji z UV svetlobo ($\lambda = 365 \text{ nm}$) ter fotokatalitski oksidaciji s TiO_2 Degussa P-25 (tako ob vidni kot UV svetlobi), smo po 6-ih urah dosegli 100 % pretvorbo E2 kot tudi popolno odstranitev estrogene aktivnosti, kar nakazuje na pospešeno pretvorbo E2 ob prisotnosti katalizatorja TiO_2 Degussa P-25 (Bistan s sod., 2012c).

Ker sta si E2 in EE2 strukturno podobna, verjetno zanj veljajo podobni mehanizmi pretvorbe tekom procesa fotolitske oz. fotokatalitske oksidacije, saj smo pri primerjavi naših rezultatov oksidacije E2 z rezultati oksidacije EE2 (Kralchevska in sod., 2012), opazili podobnosti. In sicer po 60-ih minutah fotolitske oksidacije z UV svetlobo $\lambda = 365 \text{ nm}$ se je pretvorilo 80 % EE2 (tudi mi smo dosegli 80 % pretvorbo E2 po 60-ih minutah), z

UV svetlobo $\lambda = 254$ nm pa celo 92 % EE2. Pri fotokatalitski oksidaciji se je ves EE2 pretvoril že po 30-ih minutah, v naših eksperimentih pa se je po 30-ih minutah pretvorilo 99,6 % E2, popolnoma pa se je E2 pretvoril po 120 min (Bistan in sod., 2012c).

Za uspešen postopek odstranjevanja E2 in njegove estrogenosti se je izkazal tudi postopek mokre in katalitske mokre oksidacije (Priloga E), kjer smo dosegli 70 % oz. 90 % pretvorbo E2 v procesu mokre oksidacije ter vsaj 93 % pretvorbo E2 v procesu katalitske mokre oksidacije. Estrogeno aktivnost smo zaznali v vzorcih po mokri oksidaciji (kjer je bila razgradnja 70 oz 90 %) ter v vzorcu po katalitski mokri oksidaciji, ki smo jo izvajali pri temperaturi 230°C in ob prisotnosti TiO₂ (93 % pretvorba E2). Preostalo estrogeno aktivnost vzorcev pojasni ostanek nerazgrajenega E2 v vzorcih, ki je bil od 0,08 mg/l do 0,02 mg/l; E2 je v teh koncentracijah še vedno zelo estrogeno aktiven (Bistan in sod. 2012a). V prisotnosti katalizatorja Ru(3%)/TiO₂ smo pri obeh temperaturah (200 in 230°C) dosegli tako 100 % pretvorbo E2 kot tudi popolno odstranitev njegove estrogene aktivnosti, kar nakazuje na popolno razgradnjo E2 (Bistan in sod., 2012b).

Fotolitska in fotokatalitska oksidacija ter mokra in katalitska mokra oksidacija BPA so bile manj uspešne tako v odstranjevanju BPA kot tudi njegove estrogene aktivnosti (Bistan in sod., 2012d) v primerjavi z E2 (Bistan in sod., 2012b in c).

Iz poteka fotolitske in fotokatalitske oksidacije BPA (Priloga F) vidimo, da sta fotolitski oksidaciji z vidno svetlobo in z UV svetlobo $\lambda = 365$ nm potekali zelo počasi in sta bili manj uspešni. V procesu fotolitske oksidacije z vidno svetlobo je bila po 6-ih urah pretvorba BPA le 3 %, z UV svetlobo pa 16 % ($\lambda = 365$ nm) oz. 84 % ($\lambda = 254$ nm). Ob dodatku katalizatorja TiO₂ Degussa P-25 se je odstotek pretvorbe v obeh primerih povečal za okoli 80 % (Bistan in sod., 2012d). Tako smo 100 % pretvorbo BPA zaznali v primeru fotokatalitske oksidacije ob osvetljevanju z UV svetlobo $\lambda = 365$ nm in v prisotnosti katalizatorja TiO₂ Degussa P-25. Hkrati smo v vseh vzorcih po oksidacijskih procesih zaznali estrogeno aktivnost (REA), ki se je gibala med 22 in 100 %. Najmanjšo REA vrednost (22 %) smo zaznali v vzorcu po fotolitski oksidaciji z UV svetlobo $\lambda = 254$ nm, kjer je prišlo do 84 % pretvorbe BPA. Delno zmanjšanje estrogene aktivnosti (REA) smo zaznali tudi v vzorcih po obdelavi z vidno svetlobo (87 % REA), z UV svetlobo $\lambda = 365$

nm (52 % REA) ter v vzrocih po obdelavi z UV svetlobo $\lambda = 365$ nm v prisotnosti katalizatorja TiO₂ Degussa P-25 (77 % REA). Estrogena aktivnost vzorca po obdelavi z vidno svetlobo v prisotnosti katalizatorja TiO₂ Degussa P-25 pa je ostala enaka kot v začetnem vzorcu (100 % REA). V primerih fotolitske oksidacije (tako z vidno kot z UV svetlobo) je za preostanek REA kriv ostanek BPA v vzorcu, ki je bil od 3,2 mg/l do 19,4 mg/l, saj je BPA v teh koncentracijah še vedno estrogeno aktiven (Bistan in sod., 2012a). V primerih fotokatalitske oksidacije s TiO₂ Degussa P-25, kjer kljub 82 oz. 100 % pretvorbi BPA še vedno zaznamo 100 oz. 77 % REA, lahko sklepamo, da za zaznano estrogeno aktivnost ni kriv le preostanek BPA v vzorcu (ki je 3,6 mg/l). Najverjetneje so k estrogeni aktivnosti prispevali svoj delež tudi intermediati, ki nastanejo tekom fotokatalitske oksidacije BPA, in so po poročanju Nomiyama in sod. (2007) lahko različne hidroksilirane oblike bisfenola A, različni karboksilni in fenolni intermediati ter drugi intermediati, ki se tvorijo s cepitvijo benzenovega obroča. Podobne intermediate pri fotokatalitski oksidaciji BPA je svojem delu opisal tudi Ohko s sod. (2001).

Pri mokri in katalitski mokri oksidaciji BPA smo dosegli do 60 % pretvorbo (mokra oksidacija) oz. do 100 % pretvorbo BPA (katalitska mokra oksidacija) (Priloga G; Bistan in sod., 2012d). Vidimo, da je pri mokri oksidaciji izvedeni pri 230 °C pretvorba BPA za okoli 20 % višja kot pri mokri oksidaciji izvedeni pri 200 °C. V obeh primerih smo zaznali estrogeno aktivnost, ki je posledica ostanka BPA v vodni raztopini (12,3 mg/l oz. 8,3 mg/l). Pri katalitski mokri oksidaciji smo dosegli od 87,5 do 96,2 % pretvorbo BPA ob prisotnosti katalizatorja TiO₂, oz. 100 % razgradnjo BPA ob prisotnosti katalizatorja Ru(3%)/TiO₂. V vzrocih po katalitski mokri oksidaciji kjub ostanku BPA (v koncentraciji do 2,5 mg/l) estrogene aktivnosti nismo zaznali. Iz tega lahko zaključimo, da je bil naujspešnejši postopek katalitske mokre oksidacije ob prisotnosti katalizatorja Ru(3%)/TiO₂, saj smo zaznali tako 100 % pretvorbo BPA kot tudi popolno odstranitev njegove estrogene aktivnosti (Bistan in sod., 2012d).

3.2 SKLEPI

- Test YES, v katerem uporabljam gensko spremenjene kvasovke *S. cerevisiae*, je specifičen za zaznavanje estrogeno aktivnih spojin sposobnih vezave na estrogeni receptor, med katere spadajo 17β -estradiol (naravni estrogeni hormon), 17α -etinilestradiol (sintetični estrogeni hormon), bisfenol A in nonilfenol (industrijski kemikaliji), genistein (fitoestrogen) ter metoksiklor (pesticid).
- Občutljivost testa YES je odvisna od strukturne podobnosti z naravnim estrogenim hormonom 17β -estradiolom, in je za ksenoestrogene vsaj 5-krat nižja od občutljivosti testa YES za naravni in sintetični estrogeni hormon.
- Optimalne rezultate testa YES dobimo ob upoštevanju naslednjih parametrov izvedbe testa YES: trajanje testa od 48 do 58 ur; dodatek 200 μ l substrata CPRG v testni medij in merjenje absorbance razgradnega produkta CPR pri $\lambda = 575$ nm.
- Postopek priprave okoljskih vodnih vzorcev (odpadne vode, iztoki iz čistilne naprave) za obravnavo s testom YES za določanje celokupne estrogene aktivnosti vključuje ekstrakcijo in koncentriranje spojin z metodo SPE, čiščenje vzorcev na silikagelu in dekonjugacijo estrogenih hormonov.
- *In vivo* test Vtg-ELISA z ribami zebričami za določanje estrogene aktivnosti ni bil uporaben za naše namene, saj je preveč dolgotrajen, zanj potrebujemo velike količine vzorca, med poskusom pa prihaja tudi do izgub testne spojine.
- S testom YES smo dokazali prisotno estrogeno aktivnost v odpadnih vodah v Sloveniji (v koncentratih vzorcev vtokov in iztokov), ki jo povzročajo različni (kseno)estrogeni.
- Del naravnih in sintetičnih estrogenih hormonov v odpadnih vodah (tako na vtokih kot na iztokih) je v konjugirani obliki, saj smo po dekonjugaciji zaznali tudi do 40 % povečanje relativne estrogene aktivnosti (REA).
- Pri določanju estrogene aktivnosti odpadnih vod je postopek čiščenja s silikagelom smiselnou uporabiti le v primeru zaviranja rasti kvasovk po koncentriranju z metodo SPE, saj s tem postopkom odstranimo tudi del estrogenov in ksenoestrogenov, zato je zaznana estrogene aktivnost lahko nižja od dejanske estrogene aktivnosti.

- Del estrogeno aktivnih spojin se z iztoki iz čistilnih naprav izteka v površinske vode, kar nakazuje na to, da obstoječi procesi čiščenja odpadnih vod na čistilnih napravah niso dovolj učinkoviti za odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin.
- Postopek ozonacije je delno uspešen pri odstranjevanju naravnega in sintetičnega estrogena (E2 in EE2), saj kljub njuni popolni pretvorbi nastanejo intermediati, ki so še vedno estrogeno aktivni.
- Postopek Fentonove oksidacije je delno uspešen pri odstranjevanju E2, EE2 in BPA, saj med samim procesom oksidacije prihaja sočasno tudi do adsorpcije omenjenih spojin na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov.
- Fotolitska in fotokatalitska oksidacija ter mokra in katalitska mokra oksidacija sta se izkazala kot učinkovita postopka za odstranjevanje spojine E2 in BPA in njune estrogene aktivnosti, saj smo povsod zaznali vsaj delno pretvorbo spojine kot tudi delno zmanjšanje njene REA.
- Popolno pretvorbo E2 in popolno odstranitev njegove estrogene aktivnosti smo dosegli tako pri fotolitski oksidaciji z UV svetlobo ($\lambda=365$ nm) in fotokatalitski oksidaciji ob uporabi katalizatorja TiO_2 ter osvetljevanju z vidno ali UV ($\lambda = 365$ nm) svetlobo, kot tudi v primeru katalitske mokre oksidacije pri $T > 200^\circ C$ in v prisotnosti katalizatorja TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$.
- Popolno pretvorbo BPA in popolno odstranitev njegove estrogene aktivnosti smo dosegli s katalitsko mokro oksidacijo pri $T > 200^\circ C$ in v prisotnosti katalizatorja TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$.

4 POVZETEK (SUMMARY)

4.1 POVZETEK

Že pred desetletji so znanstveniki začeli opozarjati na pojav estrogeno aktivnih spojin in njihov vpliv na okolje in tam živeče organizme. Prva alarmna sporočila so prišla iz Velike Britanije že leta 1993, čemur so sledile prve znanstvene publikacije na temo identifikacije teh spojin in določanja njihovega delovanja na organizem. Tako v skupino estrogeno aktivnih spojin spadajo naravne spojine, kot npr. estrogeni hormoni, in spojine, ki jih je proizvedel človek (ksenoestrogeni). Estrogeno aktivne spojine lahko z različnimi mehanizmi delovanja vplivajo na ravnovesje hormonov v telesu in posledično vplivajo na nastanek, razvoj in potek določenih bolezenskih stanj.

Današnji trendi za ugotavljanje prisotnosti in aktivnosti estrogeno aktivnih spojin v vodah sledijo trendom monitoringa kakovosti odpadnih vod, ki težijo k celostnemu pristopu, kar vključuje tako kemijske analitske metode kot tudi biološke metode. Tako z ustreznimi biološkimi metodami ugotovimo morebitno estrogeno aktivnost vzorcev, nato pa s kemijskimi analitskimi metodami identificiramo in kvantificiramo spojine, ki povzročajo učinke estrogenosti. Za monitoring estrogenosti okoljskih vzorcev se danes velikokrat uporablja test YES (Yeast Estrogen Screen).

Z optimizacijo testa YES smo dokazali njegovo specifičnost in občutljivost za zaznavanje estrogeno aktivnih spojin sposobnih vezave na estrogeni receptor, kot so 17β -estradiol (naravni estrogeni hormon), 17α -etinilestradiol (sintetični estrogeni hormon), bisfenol A in nonilfenol (industrijski kemikaliji), genistein (fitoestrogen) ter metoksiklor (pesticid). Določili smo tudi optimalne parametre izvedbe testa YES in postopek priprave okoljskih vodnih vzorcev, ki vključuje ekstrakcijo in koncentriranje spojin z metodo SPE, čiščenje ekstraktov vzorcev na silikagelu in dekonjugacijo estrogenih hormonov.

Ugotovili smo, da *in vivo* test Vtg-ELISA z ribami zebričami za določanje estrogene aktivnosti pri našem delu ni bil uporaben, saj je dolgotrajen, zanj potrebujemo velike količine vzorca in koncentracija testne spojine med poskusom ni bila stalna kljub pretočnemu sistemu in konstantnemu dotoku sveže vodne raztopine testne spojine.

Pri preverjanju estrogenosti slovenskih odpadnih voda s testom YES smo ugotovili, da so estrogeno aktivne spojine prisotne tako na vtokih odpadnih voda na čistilne naprave kot tudi na iztokih iz čistilnih naprav, kar pomeni, da obstoječi procesi čiščenja odpadnih vod na čistilnih napravah niso dovolj učinkoviti za odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin. Ugotovili smo tudi, da je del naravnih in sintetičnih estrogenih hormonov v odpadnih vodah v konjugirani obliki, saj smo po dekonjugaciji zaznali tudi do 40 % povečanje relativne estrogene aktivnosti (REA).

Učinkovitost različnih oksidacijskih postopkov (ozonacija, Fentonova oksidacija, fotolitska/fotokatalitska oksidacija, mokra/katalitska mokra oksidacija) za odstranjevanje estrogeno aktivnih spojin E2 (17β -estradiol), EE2 (17α -etinilestradiol) in BPA (bisfenol A) iz vodnih vzorcev smo preverjali s kemijsko analizo (SPME/GC-MS in HPLC) in biološkim testom (test YES).

Ugotovili smo, da je bil postopek ozonacije E2 in EE2 delno uspešen, saj smo kljub njuni popolni pretvorbi v vzorcih po ozonaciji še vedno zaznali estrogeno aktivnost. Prav tako je bil pri odstranjevanju E2, EE2 in BPA delno uspešen tudi postopek Fentonove oksidacije, saj se je med samim procesom oksidacije del testnih spojin sočasno adsorbiral na nastalo blato železovih oksidov in hidroksidov.

Bolj uspešna sta bila postopka fotolitske/fotokatalitske in mokre/katalitske mokre oksidacije, saj smo povsod zaznali delno odstranitev E2 in BPA kot tudi delno zmanjšanje njunih estrogenih aktivnosti. Popolno odstranitev E2 in njegove estrogene aktivnosti smo dosegli tako pri fotolitski oksidaciji z UV svetlobo ($\lambda = 365$ nm) in fotokatalitski oksidaciji ob uporabi katalizatorja TiO_2 ter osvetljevanju z vidno ali UV ($\lambda = 365$ nm) svetlobo, kot tudi v primeru katalitske mokre oksidacije pri $T > 200$ °C in v prisotnosti katalizatorja TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$. Popolno odstranitev BPA in njegove estrogene aktivnosti smo dosegli s katalitsko mokro oksidacijo pri $T > 200$ °C in v prisotnosti TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$.

Izmed uporabljenih oksidacijskih postopkov je bil najučinkovitejši postopek katalitske mokre oksidacije ob uporabi TiO_2 ali $Ru(3\%)/TiO_2$, kjer smo zaznali tako popolno pretvorbo E2 in BPA kot tudi popolno zmanjšanje njune estrogene aktivnosti.

4.2 SUMMARY

Water pollution with endocrine disrupting compounds (EDCs), which are daily released into aquatic environment, is gaining an increasing amount of attention from scientists worldwide. After first alarming messages on hermaphrodite fish caused by compounds present in sewage treatment plant effluents came from the UK, the US Environmental Protection Agency in 1996 published endocrine disruption as environmental health issue. Large numbers of compounds possessing ability of causing estrogenic activity were identified, such as different natural substances and manmade (industrial) compounds (so called xenoestrogens), and the number continuously increases. The group of EDCs needs special attention, since they can potentially affect aquatic organisms living in polluted aquatic environment. Therefore, an efficient control of EDCs in wastewater based on biological and analytical techniques is required. With biological assays the estrogenicity of environmental samples is detected and further identification and quantification of compounds causing estrogenic effect is possible by chemical analyses.

In our study, optimization of a yeast estrogen screen (YES) has been carried out. The optimized YES assay was sensitive and responded specifically to the selected estrogenic and nonestrogenic compounds in aqueous samples, such as 17β -estradiol (natural estrogen hormone), 17α -ethinylestradiol (synthetic estrogen hormone), bisphenol A and nonylphenol (industrial chemicals), genisteine (phytoestrogen) and metoxychlor (pesticide). Sensitivity of YES assay was at least 5-times lower for xenoestrogens. Also, the optimization of parameters such as assay duration, addition of CPRG in the test medium and measurement of degradation product CPR's absorbance was carried out. For screening estrogenicity of effluents, samples should be prepared properly, which involves extraction by SPE method, silica gel clean-up step and deconjugation step.

In vivo bioassay Vtg-ELISA was found to be inappropriate for our purposes, since the assay itself is time consuming, requires large samples volumes and losses of test compounds have been detected during the assay duration.

The introduced YES assay was used to investigate the estrogenic activity of influents and effluents from different wastewater treatment plants (WWTPs) in Slovenia. The presence

of EDCs was determined in influents and effluents samples which indicates that the treatment process in those WWTPs is insufficient to remove all estrogens and xenoestrogens in wastewaters. Further, a part of natural and synthetic estrogen hormones in Slovenian wastewaters is in conjugated form, since up to 40 % of increase in estrogenic activity was detected after deconjugation step.

Different advanced oxidation processes (such as ozonation, Fenton oxidation, photolytic/photocatalytic oxidation, wet air/catalytic wet air oxidation) have been used for removal of different EDCs (17β -estradiol (E2), 17α -ethinylestradiol (EE2), bisphenol A (BPA)) from aqueous samples. Removal efficiency has been studied by chemical analytical technique (SPME/GC-MS or HPLC) and biological technique (YES assay).

Ozonation and Fenton oxidation were partially successful in the removal of E2, EE2 and BPA and theirs estrogenicity. Though the completely removal of E2 and EE2 was achieved during ozonation, estrogenic activity could be still detected in the samples after ozonation. In the process of Fenton oxidation a part of the E2, EE2 and BPA was adsorbed to iron oxides and hydroxides formed during the process of oxidation.

The processes of photolytic/photocatalytic oxidation and wet air/catalytic wet air oxidation were highly efficient in the removal of E2 and BPA as well as their estrogenic activity. Complete removal of E2 and its estrogenic activity was achieved by photolytic oxidation with UV ($\lambda = 365$ nm) light, by photocatalytic oxidation in the presence of TiO_2 catalyst with visible or UV ($\lambda = 365$ nm) light and by catalytic wet air oxidation at the temperature $> 200^\circ C$ and in the presence of TiO_2 or Ru(3%)/ TiO_2 catalyst. Complete removal of BPA and its estrogenic activity was achieved by catalytic wet air oxidation at the temperature $> 200^\circ C$ and in the presence of TiO_2 or Ru(3%)/ TiO_2 catalyst.

Among AOPs used in our work the most efficient was catalytic wet air oxidation by using TiO_2 or Ru(3%)/ TiO_2 catalyst, since complete removal of E2 and BPA as well as theirs estrogenic activity was achieved.

5 VIRI

- Aerni H.-R., Kobler B., Rutishauser B.V., Wettstein F.E., Fischer R., Giger W., Hungerbuhler A., Marazuela M.D., Peter A., Schonenberger R., Vogeli A.C., Suter M.J.-F., Eggen R.I.L. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 688-696
- Altmann D., Schaar H., Bartel C., Schorkopf D.L.P., Miller I., Kreuzinger N., Möstl E., Grillitsch B. 2012. Impact of ozonation on ecotoxicity and endocrine activity of tertiary treated wastewater effluent. *Water Research*, 46: 3693-3702
- Alum A., Yoon Y., Westerhoff P., Abbaszadegan M. 2004. Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynodiol and byproduct estrogenicity. *Environmental Toxicology*, 19: 257-264, 2004.
- Andersen H.R., Andersson A.-M., Arnold S.F., Autrup H., Barfoed M., Beresford N.A., Bjerregaard P., Christiansen L.B., Gissel B., Hummel R., Bonefeld Jøgensen E., Korsgaard B., Le Guevel R., Leffers H., McLachlan J., Møller A., Nielsen J.B., Olea N., Oles-Karasko A., Pakdel F., Pedersen K.L., Perez P., Skakkebæk N.E., Sonnenschein C., Soto A.M., Sumpter J.P., Thorpe S.M., Grandjean P. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107: 89-108
- Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R. 1999. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53: 51-59
- Araña J., Herrera Melián J.A., Doña Rodríguez J.M., González Díaz O., Viera A., Pérez Peña J., Marrero Sosa P.M., Espino Jiménez V. 2002. TiO₂-photocatalysis as a tertiary treatment of naturally treated wastewater. *Catalysis Today*, 76: 279-289
- Arslan I., Balcioglu I.A. 2001. Advanced oxidation of raw and biotreated textile industry wastewater with O₃, H₂O₂/UV-C and their sequential application. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 53-60
- Avberšek M., Bergles J., Sollner Dolenc M., Burica O., Stražar M., Šomen J. Heath E. 2009. Steroidni estrogeni v slovenskem okolju. V: Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, 24-25 Sept. 2009. Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko inženirstvo: 1-11
- Bagnall J.P., Ito A., McAdam E.J., Soares A., Lester J.N., Cartmell E. 2012. Resource dependent biodegradation of estrogens and the role of ammonia oxidising and heterotrophic bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240: 56-63
- Ballesteros O., Zafra A., Navalón A., Vilchez J.L.J. 2006. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivates in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 112: 154-162
- Barbieri Y., Massad W.A., Diaz D.J., Sanz J., Amat-Guerri F., Garcia N.A. 2008. Photodegradation of bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of riboflavin: Kinetics, mechanism and photoproducts. *Chemosphere*, 73: 564-571

- Barlow D.H. 2001. Environmental effects on reproductive health: Introduction. *Human Reproduction*, 16, 5: 971
- Baronti C., Acurini R., D'Ascenzo G., Dicordia A., Gentili A., Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, 34, 24: 5059-5066
- Beck V., Pfitscher A., Jungbauer A. 2005. GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 64:19-37
- Beck I.C., Bruhn R., Gandrass J. 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen, *Chemosphere*, 63, 1870-1878
- Behnisch P.A., Fujii K., Shiozaki K., Kawakami I., Sakai S. 2001. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere*, 43: 977-984
- Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*, 225: 101-108
- Belgiorno V., Rizzo L., Fatta D., Della Rocca C., Lofrano G., Nikolaou A., Naddeo V., Meric S. 2007. Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*, 215: 166-176
- Bistan M., Marinšek Logar R., Tišler T. 2011. Estrogenic activity of Slovenian wastewaters detected by bioassay. *Central European Journal of Biology*, 6, 5: 829-837
- Bistan M., Podgorelec M., Marinšek Logar R., Tišler T. 2012a. Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 4: 427-433
- Bistan M., Tišler T., Pintar A. 2012b. Ru/TiO₂ catalyst for efficient removal of estrogens from aqueous samples by means of wet-air oxidation. *Catalysis Communications*, 22: 74-78
- Bistan M., Tišler T., Pintar A. 2012c. Conversion and estrogenicity of 17β-estradiol during photolytic/photocatalytic oxidation and catalytic wet-air oxidation. *Acta Chimica Slovenica*, 59: 389-397
- Bistan M., Tišler T., Pintar A. 2012d. Catalytic and photocatalytic oxidation of aqueous bisphenol A solutions: Removal, toxicity, and estrogenicity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51: 8826-8834
- Braeutigam P., Franke M., Schneider R.J., Lehmann A., Stolle A., Ondruschka B. 2012. Degradation of carbamazepine in environmentally relevant concentrations in water by hydrodynamic-acoustic-cavitation (HAC). *Water Research*, 46: 2469-2477

- Brion F., Nilsen B.M., Eidem J.K., Goksøy A., Porcher J.M. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 8: 1699-1708
- Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J., Flammarion P. 2004. Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology, 68: 193-217
- Brossa L., Marce' R.M., Borrull F, Pocurull E. 2005. Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental water samples from Catalonia, Spain. Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 2: 261-267
- Brzozowski A.M., Pike A.C., Dauter Z., Hubbard R.E. Bonn T., Engström O., Ohman L., Greene G.L., Gustafsson J.A., Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature, 389: 753-758
- Burrows H.D., Canle L M., Santaballa J.A, Steenken S. 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 67: 71-108
- Bursch W., Fuerhacker M., Gemeiner M., Grillitsch B., Jungbauer A., Kreuzinger N., Moesti E., Scharf S., Schmid E., Skutan S., Walter I. 2004. Endocrine disrupters in the aquatic environment: the Austrian approach-ARCEM. Water Science and Technology, 50, 5: 293-300
- Cajthaml T., Křesinova Z., Svobodova K., Moder M. 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. Chemosphere, 75: 745-750
- Campbell C.G., Borglin S.E., Green F.B., Grayson A., Wozei E., Stringfellow W.T. 2006. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. Chemosphere, 65: 1265-1280
- Clara M., Strenn B., Saracevic E., Kreuzinger N.. 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 β -estradiole and 17 α -ethinylestradiole to sewage sludge. Chemosphere, 56: 843-851
- Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M., Ternes T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. Water Research, 38: 2918-2926
- Chakravarthy A., 2011. ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay <http://exploreable.wordpress.com/2011/05/25/elisa-enzyme-linked-immunosorbent-assay/> (11. 1. 2013)
- Chang, S., Waite, T., Ong, P., Schäfer, A., and Fane, A. 2004. Assessment of trace estrogenic contaminants removal by coagulant addition, powdered activated carbon adsorption and powdered activated carbon/microfiltration processes. Journal of Environmental Engineering, 130, 7: 736-742
- Chen P.-J., Rosenfeldt E.J., Kullman S.W., Hinton D.E., Linden K.G. 2007. Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant

- concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. *Science of the Total Environment*, 376: 18-26
- Chowdhury R.R., Charpentier P.A., Ray M.B. 2011. Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: Kinetics and influencing water parameters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219: 67-75
- Collins B.M., McLachlan J.A., Arnold S.F. 1997. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, 62: 365-372
- Cosmo Bio Co., Ltd. 1997. Japanese Quail Vitellogenin(Vg) ELISA Kit and Vitellogenin ELISA Kit
http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/kits/elisa/products_kyk_20050412.asp?entry_id=3837 (11. 1. 2013)
- Czajka C.P., Londry K.L. 2006. Anaerobic biotransformation of estrogens. *Science of the Total Environment*, 367: 932-941
- D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R. 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment*, 302: 199-209
- Daston G.P., Gooch J.W., Breslin W.J., Shuey D.L., Nikiforov A.I., Fico T.A., Gorsuch J.W. 1997. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data, *Reproductive Toxicology*, 11: 465-481
- de Mes T. 2007. Doktorska disertacija: Fate of estrogens in biological treatment of concentrated black water. Wageningen, Wageningen University: 154 str.
- Deng Y., Englehardt J.D. 2006. Treatment of landfill leachate by the Fenton process. *Water Research*, 40: 3683-3694
- Denier X., Couteau J., Baudrimont M., Hill E.M., Rotchell J., Minier C. 2008. In vitro study of the effects of cadmium on the activation of the estrogen response element using the YES screen. *Marine Environmental Research*, 66: 108-110
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldoch M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, 32: 1549-58
- Ding X., Ai Z., Zhang L. 2012. Design of a visible light driven photo-electrochemical/electro-Fenton coupling oxidation system for wastewater treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 239- 240: 233-240
- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. L348/84. 24.12.2008
- Dray J., Dray F., Tiller F., Ulman A. 1972. Hydrolysis of urine metabolites of different steroid hormones by β -glucuronidase from *E. coli*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 123: 853-857

- Ebrahimi M. 2005. Vitellogenin assay by enzyme-linked immunosorbent assay as a biomarker of endocrine disruptor chemicals pollution. Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine, 9, 2: 65-70
- Eertmans F., Dhooge W., Stuyvaert S., Comhaire F. 2003. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. Toxicology in Vitro, 17: 515-524
- Eggen R.I.L., Bengtsson B.E., Bowmer C.T., Gerritsen A.A.M., Gibert M., Hylland K., Johnson A.C., Leonards P., Nakari T., Norrgren L., Sumpter J.P., Suter M.J.-F., Svenson A., Pickering A.D. 2003. Search for the evidence of endocrine disruption in the aquatic environment: Lessons to be learned from joint biological and chemical monitoring in the European project COMPREHEND. Pure and Applied Chemistry, 75: 2445–2450.
- Eisert R., Levsen K. 1996. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water. Journal of Chromatography A, 733: 143-157
- Fent G., Hein W.J., Moendel M.J., Kubiak R. 2003. Fate of ¹⁴C-bisphenol A in soils. Chemosphere, 51: 735-746
- Fent K., Escher C., Caminada D. 2006. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. Reproductive Toxicology, 22: 175-185
- Fernandez M.P., Ikonomou M.G., Buchanan I. 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. Science of the Total Environment, 373: 250-269
- Folmar L.C., Hemmer M., Denslow N.D., Kroll K., Chen J., Cheek A., Richman H., Meredith H., Grau E.G. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynodiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. Aquatic Toxicology, 60: 101-110
- Fukuhara T., Iwasaki S., Kawashima M., Shinohara O., Abe I. 2006. Adsorbability of estrone and 17 β -estradiol in water onto activated carbon. Water Research, 40: 241-248
- Gabet V., Miège C., Bados P., Coquery M. 2007. Analysis of estrogens in environmental matrices. Trends in Analytical Chemistry, 26, 11: 1113-1131
- Gaulke L., Strand S.E., Kalhorn T.F., Stensel H.D. 2008. 17 α -ethynodiol transformation via abiotic nitration in the presence of ammonia oxidizing bacteria. Environmental Science & Technology, 42: 7622-7627
- Giesy J.P., Hilscherova K., Jones P.D., Kannan K., Machala M. 2002. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples, Marine Pollution Bulletin, 45: 3-16
- Gogate P.R., Shirgaonkar I.Z., Sivakumar M., Senthilkumar P., Vichare N.P., Pandit A.B. 2001. Cavitation reactors: efficiency assessment using a model reaction. AIChE Journal, 47, 11: 2526-2538

- Gogate P.R., Pandit A.B. 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*, 8: 501-551
- Gogate P.R. 2008. Treatment of wastewater streams containing phenolic compounds using hybrid techniques based on cavitation: A review of the current status and the way forward. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15: 1-15
- Gómez M., Garralón G., Plaza F., Vílchez R., Hontoria E., Gómeza M.A. 2007. Rejection of endocrine disrupting compounds (bisphenol A, bisphenol F and triethyleneglycol dimethacrylate) by membrane technologies. *Desalination*, 212: 79–91
- Guillette L.J.Jr., Crain D.A., Gunderson M.P., Kools S.A.E., Milnes M.R., Orlando E.F., Rooney A.A., Woodward A.R. 2000. Alligators and endocrine disrupting contaminants: A current perspective¹. *American Zoologist*, 40:438-452
- Gulyas H., von Bismarck R., Hemmerling L. 1995. Treatment of industrial wastewaters with ozone/hydrogen peroxide. *Water Science and Technology*, 32,7: 127-134
- Gustafsson J.-Å. 1999. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology*, 163: 379-383
- Hájková K., Pulkrabová J., Schůrek J., Hajšlová J., Pousta J., Nápravníková M., Kocourek V. 2007. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:1351–1363
- Hansen P.-D., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M., Blaise Ch. 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry*, 17, 7: 448-451
- Hernando M.D., Mezcua M., Gómez M.J., Malato O., Aguera A., Fernández-Alba A.R. 2004. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1047: 129-135
- Hill R.L., Janz D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology*, 63: 417-429
- Huber M.M., Ternes T.A., von Gunten U. 2004. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Science & Technology*, 38: 5177-5186
- IEH. Chemicals purported to be endocrine disrupters: A compilation of published lists (Web report W20). 2005. Emeny J., Harrison P. Stutt E. (ur.). Leicester, UK, MRC Institute for Environment and Health: 91 str.
- Ingerslev F., Halling-Sørensen B. 2003. Evaluation of analytical chemical methods for detection of estrogens in the environment. Working Report No. 44. Environmental Protection Agency Denmark
<http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/2003/87-7972-968-1/pdf/87-7972-970-3.pdf> (3.1.2013)

- Irmak S., Erbatur O., Akgerman A. 2005. Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *Journal of Hazardous Materials B*, 126: 54-62
- ISO 7346-1. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton Buchanan, Teleostei, Cyprinidae), Part 1: Static method. 1996. Ženeva, Švica, International Organization for Standardization: 11 str.
- Ivanov V., Lim J.J.-W., Stabnikova O., Gin K.J.-H. 2010. Biodegradation of estrogens by facultative anaerobic iron-reducing bacteria. *Process Biochemistry*, 45: 284-287
- Janex-Habibi M.-L., Huyard A., Esperanza M., Bruchet A. 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. *Water Research*, 43: 1565-1576
- Jiang Y., Petrier C., Waite T.D. 2006. Sonolysis of 4-chlorophenol in aqueous solution: Effects of substrate concentration, aqueous temperature and ultrasonic frequency. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 415-422
- Jobling, S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, 32: 2498-2506
- Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A. 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment*, 256: 163-173
- Jungbauer A., Beck V. 2002. Yeast reporter system for rapid determination of estrogenic activity. *Journal of Chromatography B*, 777: 167-178
- Jürgens M.D., Holthaus K.I.E., Johnson A.C., Smith J.J.L., Hetheridge M., Williams R.J. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 3: 480-488
- Kajitvichyanukul P., Suntronvipart N. 2006. Evaluation of biodegradability and oxidation degree of hospital wastewater using photo-Fenton process as the pretreatment method. *Journal of Hazardous Materials B*, 138: 384-391
- Kalumuck K.M., Chahine G.L. 1998. The use of cavitating jets to oxidize organic compounds in water. V: Proceedings of FJIDSM'98. ASME Fluids Engineering Division Summer Meeting, Washington, DC, 21-25 jun. 1998.
- Karpova T., Preis S., Kallas J. 2007. Selective photocatalytic oxidation of steroid estrogens in water treatment: urea as co-pollutant. *Journal of Hazardous Materials*, 146: 465-471
- Karthikeyan S., Titus A., Gnanamani A., Mandal A.B., Sekaran G. 2011. Treatment of textile wastewater by homogeneous and heterogeneous Fenton oxidation processes. *Desalination*, 281: 438-445
- Keiter S., Rastall A., Kosmehl T., Wurm K., Erdinger L., Braunbeck T., Hollert H. 2006. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube river. *Environmental Science and Pollution Research*, 13,5: 308-319

- Khunjar, W.O., Mackintosh, S.A., Skotnicka-Pitak, J., Baik, S., Aga, D.S., Love, N.G. 2011. Elucidating the relative roles of ammonia oxidizing and heterotrophic bacteria during the biotransformation of 17 α -ethinylestradiol and trimethoprim. *Environmental Science & Technology*, 45: 3605-3612
- Kim T.-H., Park C., Lee J., Shin E.-B., Kim S. 2002. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process-chemical coagulation-electrochemical oxidation). *Water Research*, 36: 3979–3988
- Kim Y.-H., Lee B., Choo K.-H., Choi S.-J. 2011. Selective adsorption of bisphenol A by organic-inorganic hybrid mesoporous silicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, 138: 184-190
- King A.J., Readman J.W., Zhou J.L. 2003. The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*, 25: 69-75
- Kinnberg K. 2003. Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment. Working Report No. 43. Danish Environmental Protection Agency
<http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2003/87-7972-922-3/pdf/87-7972-923-1.pdf> (3.1.2013)
- Kralchevska R., Milanova M., Bistan M., Pintar A., Todorovsky D. 2012. The photocatalytic degradation of 17 α -ethynylestradiol by pure and carbon nanotubes modified TiO₂ under UVC illumination. *Central European Journal of Chemistry*, 10, 4: 1137-1148
- Körner W., Spengler P., Bolz U., Schuller W., Hanf V., Metzger J.W. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 10: 2142–2151
- Kuruto-Niwa R., Ito T., Goto H., Nakamura H., Nozawa R., Terao Y. 2007. Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 121-128
- Larcher S., Yargeau V. 2012. Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria. *Environmental Pollution*, 173: 17-22
- Larsson D.G.J., Adolfsson E.M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., Forlin L. 1999. Ethinylestradiol- An undesired fish contraceptive?. *Aquatic Toxicology*, 45, 2-3: 91-97
- Legler J. 2002. Determination of the estrogenic potency of phyto- and synthetic estrogens using in vitro bioassays. V: Natural and Synthetic Estrogens Aspects of the Cellular and Molecular Activity. Dopp E., Stopper H., Alink G. (ur.). Trivandrum, India, Transworld Research Network: 1-11
- Leitman D.C., Paruthiyil S., Vivar O.I., Saunier E.F., Herber C.B., Cohen I., Tagliaferri M., Speed T.P. 2010. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Current Opinion in Pharmacology* 2010, 10:629-636

- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A. 2003. Endocrine disruptors in the environment. Pure and Applied Chemistry, 75: 631-681
- Li Y., George J.E., McCarty C.L. 2007. Online in situ analysis of selected semi-volatile organic compounds in water by automated microscale solid-phase extraction with large-volume injection/gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1176: 223-230
- Li C., Li X.Z., Graham N., Gao N.Y. 2008. The aqueous degradation of bisphenol A and steroid estrogens by ferrate. Water Research, 42: 108-120
- Li G., Zu L., Wong P.K., Hui X., Lu Y., Xiong J. An T. 2012. Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strain *Bacillus* sp. GZB: Kinetics, mechanism and estrogenic transition. Bioresource Technology, 114: 224-230
- Liu Z., Kanjo y., Mizutani s. 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. Science of the Total Environment, 407: 731-748
- Lopez de Alda M.J., Barceló D. 2001. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. Journal of Chromatography A, 938: 145-153.
- Ma M., Rao K., Wang Z. 2007. Occurrence of estrogenic effects in sewage and industrial wastewaters in Beijing, China. Environmental Pollution, 147: 331-336
- Mandal T., Dasgupta D., Mandal S., Datta S. 2010. Treatment of leather industry wastewater by aerobic biological and Fenton oxidation process. Journal of Hazardous Materials, 180: 204-211
- Marttinen S.K., Kettunen R.H., Rintala J.A. 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. The Science of the Total Environment, 301: 1-12
- Meulenberg E.P., Mulder W.H. Stoks P.G. 1995. Immunoassays for pesticides. Environmental Science & Technology, 29, 3: 553-561
- Miège C., Karolak S., Gabet V., Jugan M.-L., Oziol L., Chevreuil M., Levi Y., Coquery M. 2009a. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. Trends in Analytical Chemistry, 28, 2: 186-195
- Miège C., Bados P., Brosse C., Coquery M. 2009b. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. Trends in Analytical Chemistry, 28, 2: 237-244
- Mohapatra D.P., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. 2010. Physico-chemical pretreatment and biotransformation of wastewater and wastewater sludge - Fate of bisphenol A. Chemosphere, 78: 923-941
- Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S.L., Perdiz D., Cargouet M., Levi Y. 2003. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and

- conjugated estrogens in environmental water samples. *Journal of Separation Science*, 26: 105-111.
- Mueller S.O. 2002. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*, 777: 155-165
- Munter R. 2001. Advanced oxidation processes – current status and prospects. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, 50, 2: 59-80
- Murk A.J., Legler J., Van Lipzig M.M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkinkel A., van der Burg B., Rijs G.B.J., Vethaak D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 1: 16-23.
- Murugananthan M., Yoshihara S., Rakuma T., Uehara N., Shirakashi T. 2007. Electrochemical degradation of 17 β -estradiol (E2) at boron-doped diamond (Si/BDD) thin film electrode. *Electrochimica Acta*, 52: 3242-3249
- Nagel R. 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19, 38-48.
- Nakada N., Nyunoya H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T., Takada H. 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 12: 2807-2815
- Nakrst J., Bistan M., Tišler T., Zagorc-Končan J., Žgajnar Gotvajn A. 2010. Feasibility of Fenton's oxidation for removal of estrogens from aqueous solutions. *Acta Chimica Slovenica*, 57: 90-99
- Nakrst J., Bistan M., Tišler T., Zagorc-Končan J., Derco J., Žgajnar Gotvajn A. 2011. Comparison of Fenton's oxidation and ozonation for removal of estrogens. *Water Science & Technology*, 63, 10: 2131-2137
- Nash J.P., Kime D.E. Van der Ven L.T.M., Wester P.W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C.R. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynodiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*, 112, 17: 1725-1733
- Nelson J., Bishay F., van Roodselar A., Ikonomou M., Law F.C.P. 2007. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. *Science of the Total Environment*, 374: 80-90
- Nghiem L.D., Manis A., Soldenhoff K., Schäfer A.I. 2004. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science*, 242: 37-45
- Nicolopoulou-Stamati P., Hens L., Howard C.V. 2001. Endocrine Disrupters. *Environmental Health and Policies*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 398 str.
- Nilsen B.M., Berg K., Eidem J.K., Kristiansen S.-I., Brion F., Porcher J.-M., Goksøyr A. 2004. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 621-633

- Nilsson R. 2000. Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicologic Pathology*, 28, 3:420-431
- Nomiyama K., Tanizaki T., Koga T., Arizono K., Shinohara R. 2007. Oxidative degradation of BPA using TiO₂ in water, and transition of estrogenic activity in the degradation pathways. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 8-15
- OECD. Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 60. Report of the initial work towards the validation of the 21-day fish screening assay for the detection of endocrine active substances (Phase 1a). 2006. Pariz, Francija, Organisation for Economic Co-operation and Development: 61 str. <http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282006%2927&doclanguage=en> (8.1.2013)
- OECD Test No. 230. OECD guideline for the testing of chemicals. 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition. 2009. Pariz, Francija, Organisation for Economic Co-operation and Development: 61 str. http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/environment/test-no-230-21-day-fish-assay_9789264076228-en (8.1.2013)
- Ohko Y., Ando I., Niwa C., Tatsuma T., Yamamura T., Nakashima T., Kubota Y., Fujishima A. 2001. Degradation of bisphenol A in water by TiO₂ photocatalyst. *Environmental Science & Technology*, 35: 2365-2368
- Ohko Y., Iuchi K.-I., Niwa C., Tatsuma T., Nakashima T., Iguchi T., Kubota Y., Fujishima A. 2002. 17β-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environmental Science & Technology*, 36: 4175-4181
- Onda K., Yang S.-Y., Miya A., Tanaka T. 2002. Evaluation of estrogen-like activity on sewage treatment processes using recombinant yeast. *Water Science and Technology*, 46, 11-12: 367-373
- Papoulias D.M., Noltie D.B., Tillitt D.E. 1999. An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinyl estradiol. *Aquatic Toxicology*, 48: 37-50
- Parson S. 2004. Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment. 1st edition. London, IWA Publishing: 356 str.
- Pauwels B., Deconinck S., Verstraete W. 2006 Electrolytic removal of 17α-ethinylestradiol (EE2) in water streams. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1338-1343
- Peng Z., Wu F., Deng N. 2006. Photodegradation of bisphenol A in simulated lake water containing algae, humic acid and ferric ions. *Environmental Pollution*, 144: 840-846
- Peters D. 2001. Sonolytic degradation of volatile pollutants in natural ground water: conclusions from a model study. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8:221-226
- Poole C.F. 2003. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 6: 362-373

- Pravilnik o imisijskem monitoringu kakovosti površinskih voda, ki se jih odvzema za oskrbo s pitno vodo. Ur. l. RS št. 40-2315/2001
- Pravilnik o prvih meritvah in obratovalnem monitoringu odpadnih vod ter o pogojih za njegovo izvajanje. Ur. l. RS št. 74-3983/2007
- Reungoat J., Escher B.I., Macova M., Argaud F.X., Gernjak W., Keller J. 2012. Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, 46: 863-872
- Richfield D., Häggström M. 2009. Steroidogenesis (28. 3. 2009)
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg> (11. 1. .2013)
- Rodrigo M.A., Cañizares P., Sánchez-Carretero A., Sáez C. 2010. Use of conductive-diamond electrochemical oxidation for wastewater treatment. *Catalysis Today*, 151: 173-177
- Rose J., Holbech H., Lindholst C., Nørum U., Povlsen A., Korsgaard B., Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethynodiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 131: 531-539
- Rosenfeldt E.J., Linden K.G. 2004. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethynodiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology*, 38: 5476-5483
- Routledge E.J., Sumpter JP. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 3: 241-248
- Ruggiero R.J., Likis F.E. 2002. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 47, 3: 130-138
- Sanseverino J., Gupta R.K., Layton A.C., Patterson S.S., Ripp S.A., Saidak L., Simpson M.L., Schultz T.W., Sayler G.S. 2005. Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8: 4455-4460
- Schaar H., Clara M., Gans O., Kreuzinger N. 2010. Micropollutant removal during biological wastewater treatment and a subsequent ozonation step. *Environmental Pollution*, 158: 1399-1404
- Shareef A., Angove M.J., Wells J.D., Johnson B.B. 2006. Aqueous solubilities of estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethynodiol, and bisphenol A. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 51: 879-881
- Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M.. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research*, 38: 2323-2330
- Shimada K., Mitamura K., Higashi T. 2001. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *Journal of Chromatography A*, 935, 1-2: 141-72

- Schultis T., Metzger J.W. 2004. Determination of estrogenic activity by LYEST-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). Chemosphere, 57: 1649-1655
- Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P., 2000. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. Environmental Science & Technology, 33: 2814-2820.
- Snyder S.A., Adham S., Redding A.M., Cannone F.S., DeCarolis J., Oppenheimer J., Werta E.C., Yoon Y. 2007. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. Desalination, 202: 156-181
- Soliman M.A., Pedersen J.A., Suffet I.H. 2004. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. Journal of Chromatography A, 1029: 223-237
- Sorbtech. Sorbent Technologies. 2011. Solid Phase Extraction
<http://www.sorbtech.com/wordpress/2011/06/solid-phase-extraction/> (11. 1. 2013)
- Stahlschmidt-Allner P., Allner B., Römbke J., Knacker T. 1997. Endocrine disrupters in the aquatic environment. Environmental Science and Pollution Residues, 4, 3: 155-162
- Streck G. 2009. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. Trends in Analytical Chemistry, 28, 6: 635-652
- Stuer-Lauridsen F., Kjølholt J., Høibye L., Hinge- Christensen S., Ingerslev F., Hansen M., Andresen Krogh K., Andresen H.R., Halling-Sørensen B., Hansen N., Køppen B., Bjerregaard P., Frost B. 2005. Survey of estrogenic activity in the Danish aquatic environment. Environmental Project Nr. 977, Danish Ministry of the Environment
<http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2005/87-7614-505-0/pdf/87-7614-506-9.pdf> (3.1.2013)
- Sumpter J.P., Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamintion of the aquatic environment. Environmental Toxicology and Chemistry, 103: 173-178
- Sumpter J.P. 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 33: 9-16.
- Sun Q., Deng S., Huang J., Shen G., Yu G. 2008. Contributors to estrogenic activity in wastewater from a large wastewater treatment plant in Beijing, China. Environmental Toxicology and Pharmacology, 25: 20-26
- Supelco. 1998. Solid phase microextraction: Theory and optimization of conditions. Bulletin 923A.
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> (11.1.2013)
- Šalinger S. 2009. Diplomsko delo: Odstranjevanje hormonskih motilcev iz vodnih raztopin z ozonacijo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 67 str.
- Tekin H., Bilkay O., Ataberk S.S., Balta T.H., Ceribasi H., Sanin F.D., Dilek F.B., Yetis U. 2006. Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. Journal of Hazardous Materials B, 136: 258-265

- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 225: 81-90
- Uruse T., Kikuta T. 2005. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research*, 39: 1289-1300
- U.S.EPA. Special Report on Endocrine Disruption. Fact Sheet. 1997. Washington, EPA D.C.: 4. str.
- Van der Bruggen B, Vandecasteele C. 2003. Removal of pollutants from surface water and groundwater by nanofiltration: Overview of possible applications in the drinking water industry. *Environmental Pollution*, 122: 435-445
- Van Emon J.M., Lopez-Avila V. 1992. Immunochemical methods for environmental analysis. *Analytical Chemistry*, 64, 2: 79-88
- Van Emon J.M., Gerlach C.L. 1998. Environmental monitoring and human exposure assessment using immunochemical techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 121–131
- Viganó L., Benfenati E., van Cauwenberge A., Eidem J.K., Erratico C., Goksýr A., Kloas W., Maggioni S., Mandich A., Urbatzka R. 2008. Estrogenicity profile and estrogenic compounds determined in river sediments by chemical analysis, ELISA and yeast assays. *Chemosphere*, 73: 1078-1089
- Vogelpohl A., Kim S.-M. 2004. Advanced oxidation processes (AOPs) in wastewater treatment. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 10, 1: 33-40
- Voulvoulis N., Scrimshaw M.D. 2003. Methods for the determination of endocrine disrupters. V: Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes. Birkett J.W., Lester J.N. (eds.). Boca Raton, CRC Press LLC: 61-90.
- Walker C.W., Watson J.E. 2010. Adsorption of estrogens on laboratory materials and filters during sample preparation. *Journal of Environmental Quality*, 39: 744-748
- Weber L.P., Hill R.L., Janz D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquatic Toxicology*, 63: 431-446
- Wells M.J.M. 2003. Principles of extraction and the extractions of semivolatile organics from liquids. V: Sample preparation techniques in analytical chemistry. Somenath M. (ur.). New Jersey, John Wiley & Sons: 37-131
- Wells M.J.M. 2000. Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. V: Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications. Simpson N. J. K. (ur.). New York, Marcel Dekker: 97-123
- Wharfe J. 2004. Hazardous Chemicals in Complex Mixtures - A role for direct toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 13: 413-421
- Wikipedia Common. 2007
wikipedia.org (11. 1. 2013)

- Yang L., Luan T., Lan C. 2006. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1104: 23-32
- Yang W., Cicek N. 2008. Treatment of swine wastewater by submerged membrane bioreactors with consideration of estrogenic activity removal. *Desalination*, 231: 200-208
- Ying G.-G., Kookana R.S., Kumar A. 2008. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1: 87–94
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A., Esparza M. 2003. HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynodiol estradiol on powdered activated carbon. *Water Research*, 37: 3530-3537
- Zafra A., del Olmo M., Suárez B., Hontoria E., Navalón A., Vílchez J.L. 2003. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. *Water Research*, 37: 735-742
- Zeng G., Zhang C., Huang G., Yu J., Wang Q., Li J., Xi B., Liu H. 2006. Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China. *Chemosphere*, 65: 1490-1499
- Zhang H., Choi H.J., Huang C.-P. 2005. Optimization of Fenton process for the treatment of landfill leachate *Journal of Hazardous Materials B*, 125: 166-174
- Žgajnar Gotvajn A., Bistan M., Tišler T., Englande A.J., Zagorc-Končan J. The relevance of bisphenol A adsorption during Fenton's oxidation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v tisku (DOI: 10.1007/s13762-012-0153-4)

ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Tatjani Tišler in somentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za vso pomoč in za usmerjanje tekom nastajanja tega dela ter za marsikatero vzpodbudno besedo. Hvala vama!

Za vso tehnično pomoč in za vse vesele trenutke se zahvaljujem vsem zdajšnjim in bivšim zaposlenim v Laboratoriju za okolske vede in inženirstvo Kemijskega inštituta. Posebna zahvala za pomoč pri delu s kemijsko analizo na GC-MS gre doc. dr. Matjažu Kunaverju. Za sodelovanje pri eksperimentalnem delu Fentonove oksidacije se zahvaljujem Jani Nakrst, Matjažu Pevcu in doc. dr. Andreji Žgajnar Gotvajn. Za sodelovanje pri eksperimentalnem delu ozonacije se zahvaljujem Suzani Šalinger in zaposlenim na Fakulteti za kemijo in živilsko tehnologijo v Bratislavi.

Hvala tudi Katarini Lah, Vesni Brgez, Dragani Stegić, Mojci Podgorelec, Jani Krautberger, Maji Plahuta in Tini Smodej za vso pomoč in za vse lepe skupne trenutke.

Za financiranje doktorske disertacije se zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Komisiji za zagovor disertacije se zahvaljujem za vse konstruktivne popravke in predloge.

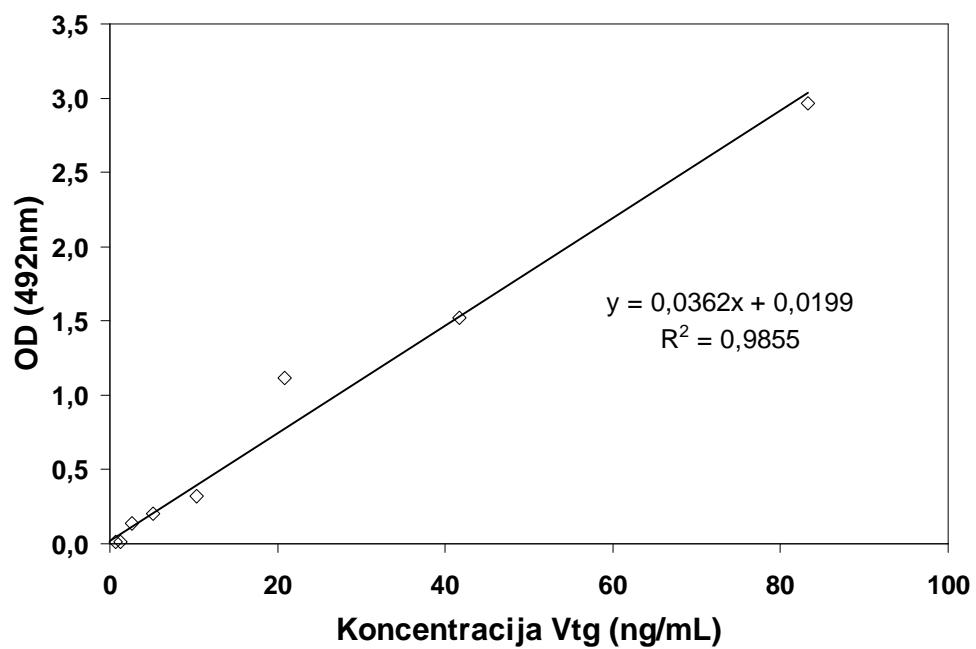
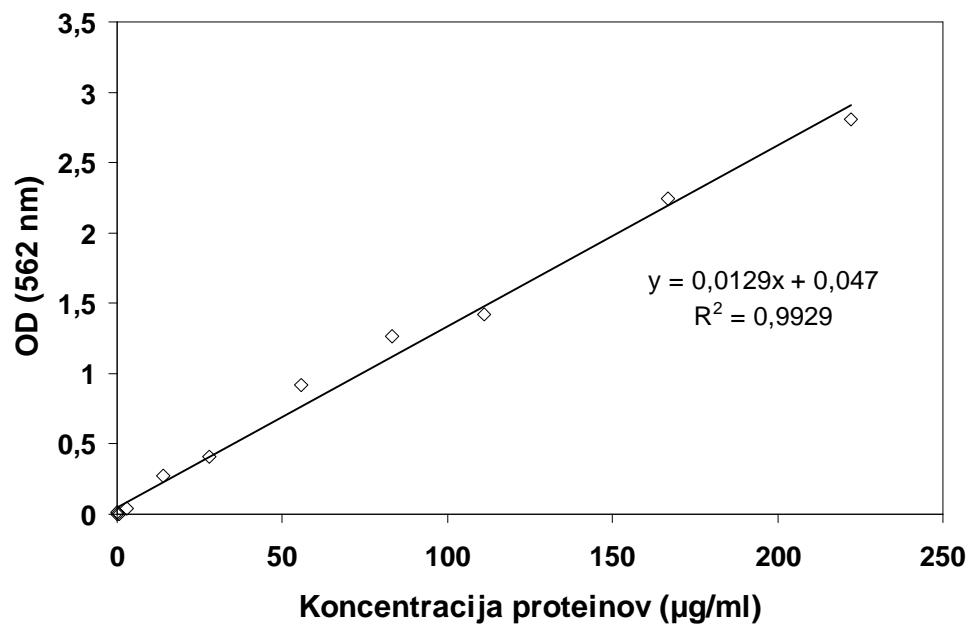
Navsezadnje pa se zahvaljujem tudi vsem mojim domačim in prijateljem, ki mi stojijo ob strani, se veselijo z mano in me vzpodbujujo. Hvala vam!

Mirjana

PRILOGE (ANNEXES)

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov (zgoraj) in vitelogenina- Vtg (spodaj).

Annex A: Calibration curve to determine concentration of proteins (upper) and vitellogenin- Vtg (down).



Priloga B: Vitelogenin v ribah zebričah *D. rerio* izpostavljenih testni spojini E2.

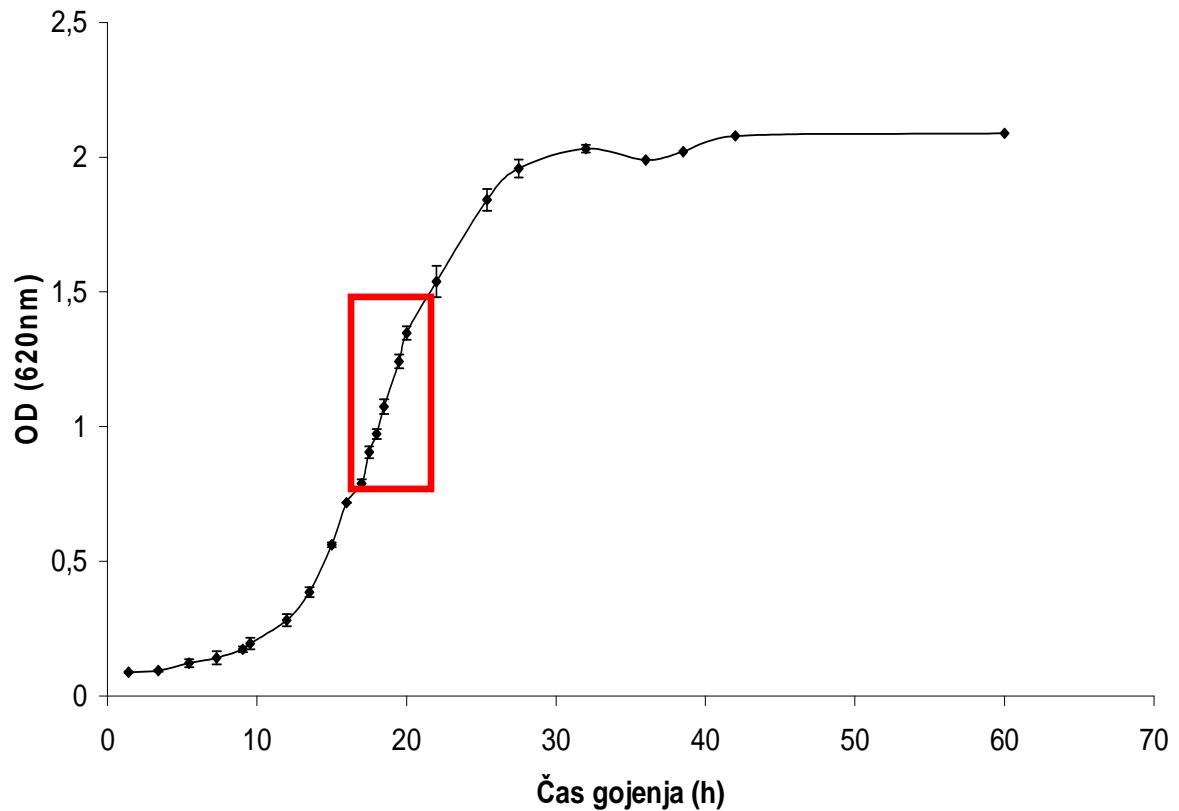
Annex B: Detection of Vtg in zebrafish *D. rerio* when exposed to test compound E2.

Koncentracija E2 v akvariju (µg/l)	Koncentracija Vtg (ng/ml)
K (n = 3)	0,01 – 0,04
K + EtOH (n = 3)	0,01 – 0,06
0,272 (n = 9)	1,2 – 3,0
2,72 (n = 9)	1,2 – 5,3
27,2 (n = 9)	3,8 – 7,7

(n = št. izpostavljenih rib)

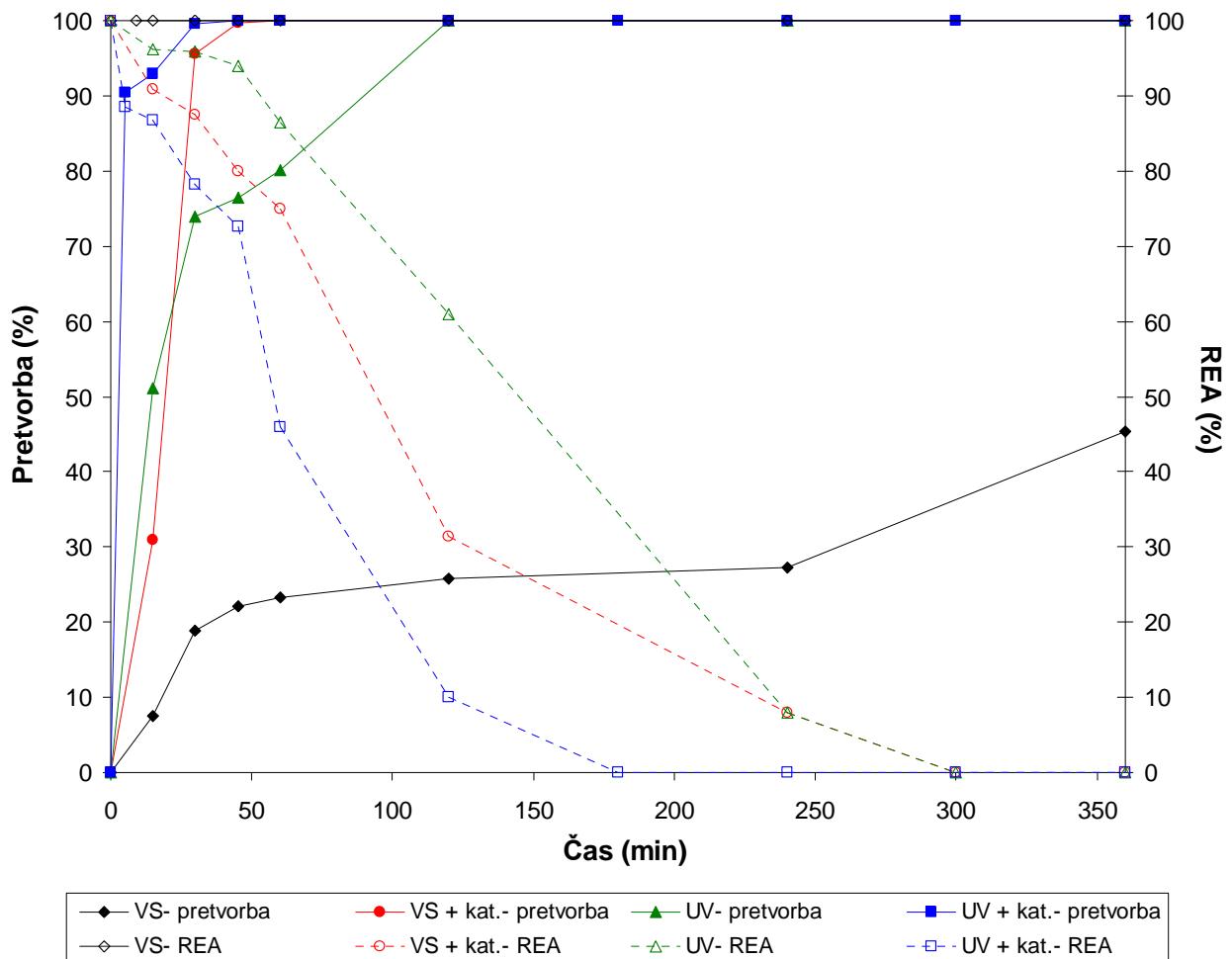
Priloga C: Rastna krivulja *Saccharomyces cerevisiae*. Z oznako (■) je označeno območje, v katerem je rast kvasovk primerena za uporabo v testu YES.

Annex C: The growth course of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; (■) indicates when yeast growth is suitable for use in YES assay.



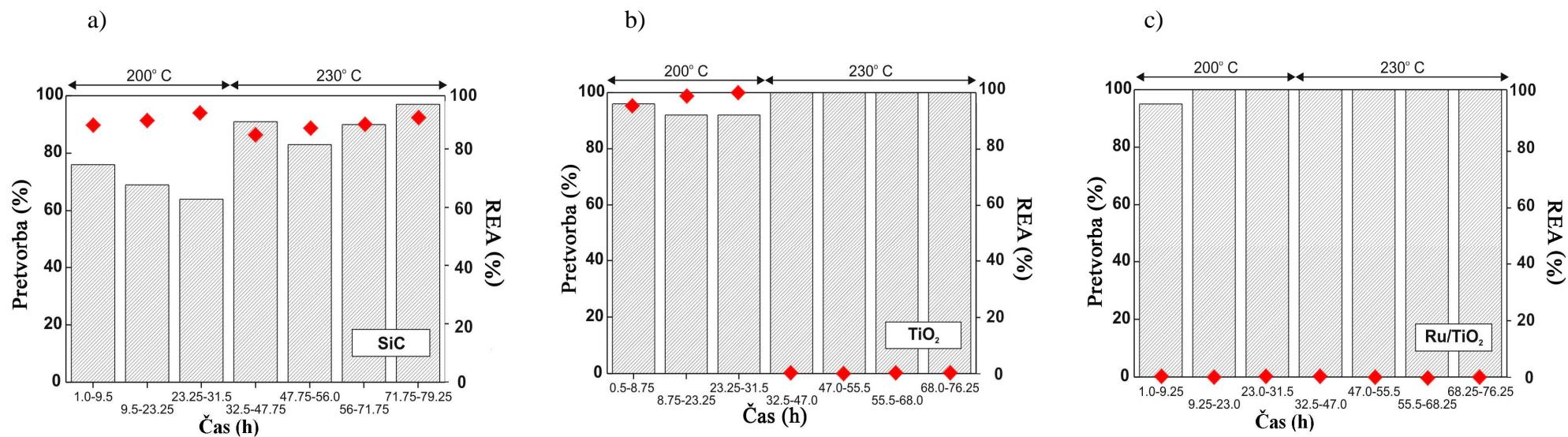
Priloga D: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) in zmanjševanje REA tekom fotolitske oz. fotokatalitske oksidacije (VS- vidna svetloba; UV- UV svetloba (365 nm); kat.- katalizator TiO_2 Degussa P-25).

Annex D: Conversion of E2 ($c_0 = 0,272 \text{ mg/l}$) and its estrogenicity during photolytic and photocatalytic oxidation (VS- visible light; UV- UV light (365 nm); kat.- catalyst TiO_2 Degussa P-25).



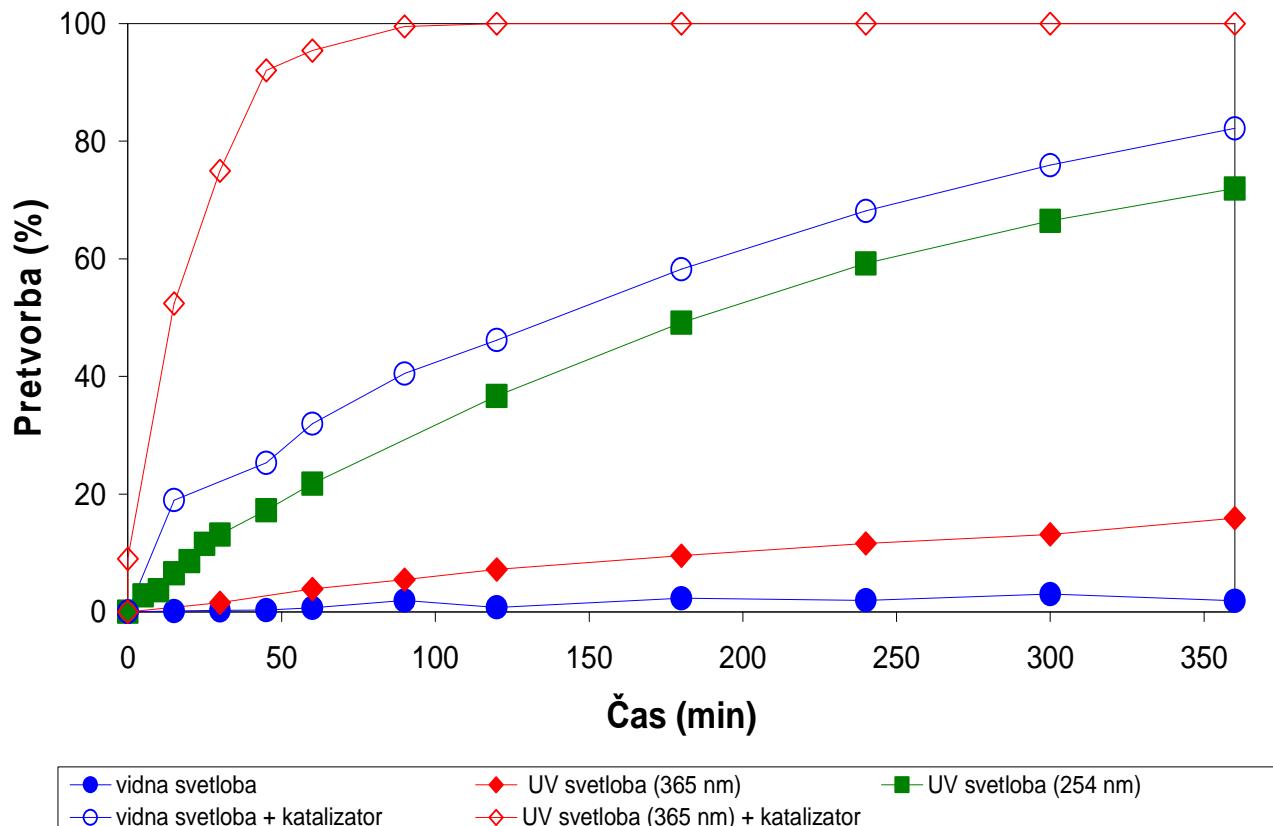
Priloga E: Pretvorba E2 ($c_0 = 0,272$ mg/l) (■) v postopku mokre oksidacije (SiC) (a), in postopkih katalitske mokre oksidacije ob prisotnosti TiO_2 (b) in $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ (c) pri temperaturi 200 in 230 °C; ter relativna estrogena aktivnost (REA, %) (◆) v vzorcih po mokri in katalitski mokri oksidaciji.

Annex E: Conversion of E2 ($c_0 = 0.272$ mg/l) (■)as a function of time on stream in the process of wet air oxidation (on SiC) (a), and in the processes of catalytic wet air oxidation on TiO_2 extrudates (b) and $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ catalyst (c) at 200 and 230 °C; and relative estrogenic activity (REA, %) (◆) in samples treated by wet air oxidation and catalytic wet air oxidation.



Priloga F: Pretvorba BPA v postopku fotolitske oz. fotokatalitske oksidacije ob uporabi TiO₂ Degussa P-25 katalizatorja.

Annex F: Conversion of BPA during photolytic and photocatalytic oxidation in the presence of catalyst TiO₂ Degussa P-25.



Priloga G: Pretvorba BPA ($c_0 = 20$ mg/l) (▨) v postopku mokre oksidacije (SiC) (a), in postopkih katalitske mokre oksidacije ob prisotnosti TiO_2 (b) in $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ (c) pri temperaturi 200 in 230 °C; ter relativna estrogena aktivnost (REA, %) (◆) v vzorcih po mokri in katalitski mokri oksidaciji.

Annex G: Conversion of BPA ($c_0 = 20$ mg/l) (▨) as a function of time on stream in the process of wet air oxidation (on SiC) (a), and in the processes of catalytic wet air oxidation on TiO_2 extrudates (b) and $\text{Ru}(3.0\%)/\text{TiO}_2$ catalyst (c) at 200 and 230 °C; and relative estrogenic activity (REA, %) (◆) in samples treated by wet air oxidation and catalytic wet air oxidation.

