

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



JERNEJ LONČARIČ

DOLOČANJE STRUPENOSTI MEŠANIC BISFENOLOV A, F IN AF NA RIBAH
ZEBRICAH IN VODNIH BOLHAH

ESTIMATING TOXICITY OF BISPHENOLS A, F AND AF MIXTURES ON
ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) AND WATER FLEAS (*DAPHNIA MAGNA*)

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo in na Kemijskem inštitutu v Odseku za okoljske vede in inženirstvo (D05) v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Tatjane Tišler.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in somentorici doc. dr. Tatjani Tišler za pomoč in potrpežljivost pri opravljanju praktičnega dela in pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi ostalim sodelavcem Odseka za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu za pomoč. Zahvala gre tudi mojima staršema za spodbudo in potrpežljivost tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom doc. dr. Tatjane Tišler.

Jernej Lončarič

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 HORMONSKI MOTILCI	1
1.1.1 Bisfenol A	3
1.1.2 Bisfenol F	6
1.1.3 Bisfenol AF	7
1.2 MEŠANICE.....	8
1.3 TESTNI ORGANIZMI.....	10
1.3.1 Vodne bolhe (<i>Daphnia magna</i>).....	10
1.3.2 Ribe zebrice (<i>Danio rerio</i>)	12
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 UPORABLJENE KEMIČALIJE	16
3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN.....	16
3.2.1 Priprava osnovne raztopine bisfenola A.....	16
3.2.2 Priprava osnovne raztopine bisfenola F	17
3.2.3 Priprava osnovne raztopine bisfenola AF	17
3.2.4 Priprava razredčevalne vodne raztopine.....	17
3.3 AKUTNI STRUPENOSTNI TESTI NA VODNIH BOLHAH	18
3.3.1 Pozitivna kontrola	18
3.3.2 Potek testa	18

3.4	AKUTNI STRUPENOSTNI TESTI NA RIBAH ZEBRICAH	19
3.4.1	Pozitivna kontrola	19
3.4.2	Potek testa	19
4	REZULTATI.....	24
4.1	TEST AKUTNE STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI.....	24
4.1.1	Določitev vrednosti EC bisfenola A.....	24
4.1.2	Določitev vrednosti EC bisfenola F	25
4.1.3	Določitev vrednosti EC bisfenola AF	26
4.1.4	Mešanica BPA + BPAF.....	28
4.1.5	Mešanica BPA + BPF	30
4.1.6	Mešanica BPAF + BPF	33
4.1.7	Mešanica BPA + BPAF + BPF	35
4.2	TEST AKUTNE STRUPENOSTI Z ZARODKI RIB ZEBRIC	36
4.2.1	Določitev vrednosti EC bisfenola A, F in AF	36
4.2.2	Mešanica BPA + BPAF.....	38
4.2.3	Mešanica BPA + BPF	40
4.2.4	Mešanica BPF + BPAF	41
5	RAZPRAVA	44
6	SKLEP	48
7	LITERATURA	49

KAZALO SLIK

Slika 1 - Sinteza bisfenola A	3
Slika 2 - Glukuronid bisfenola A	5
Slika 3 - Sulfat bisfenola A	5
Slika 4 - Sinteza bisfenola F	6
Slika 5 - Bisfenol AF	7
Slika 6 - Razmnoževalni cikel vodnih bolh (spolno in nespolno razmnoževanje) (38).....	11
Slika 7 - Odrasla riba zebriča (Danio rerio) (43).....	12
Slika 8 - Razvojni stadiji zarodkov zebrič (Danio rerio) (44).....	20
Slika 9 - Normalno pigmentiran zarodek	21
Slika 10 - Nepigmentiran zarodek.....	21
Slika 11 - Zarodek s prisotnim edemom	22
Slika 12 - Normalno razvit zarodek na levi sliki in koaguliran zarodek na desni sliki.....	23
Slika 13 - Na levi sliki je prikazan zarodek z deformirano jajčno vrečo in na desni sliki deformiran zarodek	23
Slika 14 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA po 24 h.....	24
Slika 15 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA po 48 h.....	25
Slika 16 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF po 24 h.....	26
Slika 17 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF po 48 h.....	26
Slika 18 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF po 24 h.....	27
Slika 19 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF po 48 h.....	27
Slika 20 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA pri konstantni koncentraciji BPAF (2,0 mg/L) po 24 h in 48 h.....	29
Slika 21 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF pri konstantni koncentraciji BPA (7,5 mg/L) po 24 h in 48 h.....	30
Slika 22 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA pri konstantni koncentraciji BPF (7,6 mg/L) po 24 h in 48 h	32
Slika 23 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF pri konstantni koncentraciji BPA (7,5 mg/L) po 24 h in 48 h.....	32
Slika 24 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF pri konstantni koncentraciji BPAF (2,0 mg/L) po 24 h in 48 h.....	34
Slika 25 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF pri konstantni koncentraciji BPF (7,6 mg/L) po 24 h in 48 h	34

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I - Uporabljene kemikalije.....	16
Preglednica II - Raztopine za pripravo razredčevalne vodne raztopine.....	17
Preglednica III - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA in BPAF v mešanici.....	28
Preglednica IV - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA in BPF v mešanici.....	31
Preglednica V - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPAF in BPF v mešanici.....	33
Preglednica VI - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA, BPAF in BPF v mešanici.....	35
Preglednica VII - vrednosti EC nepigmentacije, neizvaljenosti in smrtnosti pri zarodkih izpostavljenim bisfenolu A.....	37
Preglednica VIII - vrednosti EC nepigmentacije, neizvaljenosti in smrtnosti pri zarodkih izpostavljenim bisfenolu AF	37
Preglednica IX - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPA (9,4 mg/L).....	38
Preglednica X - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPAF (2,8 mg/L).....	39
Preglednica XI - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPA (3,3 mg/L).....	40
Preglednica XII - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPAF (1,0 mg/L).....	40
Preglednica XIII - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPF (0,7 mg/L).....	41
Preglednica XIV - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPF in konstantni koncentraciji BPA (3,3 mg/L).....	41
Preglednica XV - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPF (0,7 mg/L)	42
Preglednica XVI - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPF in konstantni koncentraciji BPAF (1,0 mg/L)	42

POVZETEK

Zaradi vse večje uporabe in proizvodnje bisfenola A in njegovih analogov se večja potreba po ekotoksikoloških raziskavah o učinkih teh spojin na okolje in živa bitja, predvsem v primerih, kjer smo izpostavljeni več spojinam hkrati. Bisfenoli (BP) spadajo v skupino hormonskih motilcev, ki posnemajo oziroma zavirajo delovanje endokrinih hormonov. Z njimi se srečujemo v vsakodnevem življenju, saj jih najdemo v hrani, pijači, embalažah, kozmetičnih in drugih izdelkih. V magistrski nalogi smo raziskovali učinke mešanic bisfenola A (BPA), bisfenola F (BPF) in bisfenola AF (BPAF) na vodne bolhe (*Daphnia magna*) in zarodke rib zebrič (*Danio rerio*). Najprej smo izvedli akutne teste toksičnosti, kjer smo organizme izpostavili posameznim bisfenolom in s pomočjo teh testov izračunali efektivne koncentracije (EC), ki v določenem času povzročijo učinek pri določenem odstotku rib zebrič oziroma vodnih bolh. Pri vodnih bolhah smo opazovali njihovo negibnost po 24 in 48 urah, medtem ko smo pri zarodkih rib zebrič opazovali smrtnost in nekatere subletalne učinke (pigmentacija telesa in oči, izvaljenost in pojav edema) po 24, 48, 72 in 96 urah. Za bisfenole smo na vodnih bolhah določili vrednosti EC₁₀ (koncentracije, ki so izvale 10 % učinek) po 48 h (48 h EC₁₀) za BPA (7,5 mg/L), BPF (7,6 mg/L) in BPAF (2,0 mg/L). Ob kombinaciji koncentracij, ki so povzročile 10 % učinek (48 h EC₁₀) enega bisfenola in 48 h EC₁₀ drugega bisfenola, smo pričakovali 20 % odziv, vendar je bil ta odziv v vseh preiskovanih mešanicah (BPA + BPF, BPA + BPAF in BPF + BPAF) maksimalen (100 %), zato smo v nadaljnjih testih uporabili nižje koncentracije, saj nas je zanimalo, koliko nižje koncentracije moramo uporabiti, da bi prišlo do 20 % odziva. Do 20 % odziva je prišlo pri približno 75-krat nižji koncentraciji vrednosti EC₁₀ BPA in BPF (ob konstantni koncentraciji EC₁₀ drugega bisfenola v mešanici), medtem ko smo morali koncentracijo BPAF v mešanici z BPA znižati za 400-krat. Pri zarodkih rib zebrič smo določili 96 h LC₁₀ vrednost pri BPA (9,4 mg/L) in BPAF (2,8 mg/L), ju med seboj mešali in tako kot pri vodnih bolhah tudi tukaj dobili veliko višji odziv od pričakovanega (100 % letalni odziv že po 24 urah). Določili smo tudi vrednost 48 h EC₁₀ pigmentacije pri BPA (3,3 mg/L), BPF (0,7 mg/L) in BPAF (1,0 mg/L) in jih med seboj kombinirali (BPA + BPAF, BPA + BPF, BPAF + BPF). Iz rezultatov smo ugotovili, da ima BPF najmočnejši vpliv na pigmentacijo. V magistrski nalogi smo dokazali, da je učinek mešanic bisfenolov A, F in AF veliko večji v primerjavi z učinkom posameznih bisfenolov tako na vodnih bolhah, kot tudi zarodkih rib zebrič. Kljub uporabi višjih koncentracij bisfenolov, kot so dejansko prisotne v okolju, smo pokazali, da gre pri preiskovani mešanici bisfenolov za sinergističen učinek, ki ima lahko pri daljši izpostavitvi mešanicam teh spojin

posledice tudi pri nižjih koncentracijah, ki bi lahko bile prisotne v okolju in bi zatoj bile potrebne nadaljnje raziskave vpliva teh mešanic v testih kronične toksičnosti.

Ključne besede: hormonski motilci, bisfenol A, F in AF, mešanice, vodne bolhe (*Daphnia magna*), ribe zebrice (*Danio rerio*), testi akutne toksičnosti

ABSTRACT

Because of a rapid increase in the usage and manufacturing of bisphenol A and its analogs, there's a certain need for ecotoxicological assessment of effects of these substances on the environment and its living inhabitants, especially in cases where we are exposed to a combination of different substances at the same time. Bisphenols (BP) belong to a group of so called endocrine disruptors, which mimic or inhibit the action of endocrine hormones. We can find them in everyday life, as they can be found in food, beverages, packaging, cosmetic and other products. In our master's thesis we estimated toxicity of mixtures of bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF) on water fleas (*Daphnia magna*) and zebrafish (*Danio rerio*). Firstly, we conducted an acute toxicity test, where we exposed previously mentioned organisms to a single bisphenol and determined effective concentrations (EC), which induced different effects on water fleas and zebrafish. We observed the mobility of water fleas after 24 and 48 hours and with zebrafish we observed lethality and various sublethal changes in development (pigmentation of the body and the eyes, ability to hatch, and edema) after 24, 48, 72 and 96 hours. In the acute test with water fleas we determined 48 h EC₁₀ values of BPA (7,5 mg/L), BPF (7,6 mg/L) and BPAF (2,0 mg/L). When we combined concentrations, that caused a 10 % effect (48 h EC₁₀) of one bisphenol and 48 h EC₁₀ of another bisphenol we expected a 20 % response, but instead there was a 100 % response in all of the studied combinations (BPA + BPAF, BPA + BPF, BPAF + BPF). Therefore, we conducted a new set of acute tests to determine at which concentrations we would achieve a 20 % response. 20 % response was obtained at a 75-fold lower concentration than 48 h EC₁₀ of BPA and BPF (we kept the other bisphenol in the mixture at a constant concentration at 48 h EC₁₀), while we had to use a 400-fold lower concentration of BPAF in the BPA + BPAF mixture to achieve a 20 % response. In the acute test with zebrafish, we determined 96 h LC₁₀ values of BPA (9,4 mg/L) and BPAF (2,8 mg/L). We combined these two concentrations in a mixture and achieved a 100 % lethal response after 24 hours. We also determined 48 h EC₁₀ pigmentation values of BPA (3,3 mg/L), BPF (0,7 mg/L) and BPAF (1,0 mg/L) and combined each other (BPA + BPAF, BPA + BPF, BPAF + BPF). We found that BPF has a major role in pigmentation in the mixture. In this master's thesis we have proven that the effect of mixtures of bisphenols A, F and AF is much higher than the effect of a single bisphenol. Even though we used concentrations of bisphenols that aren't present in environment, we have shown that bisphenols that we studied have a synergistic effect on each other, which can possibly have an effect at lower concentrations, if

one is to be exposed to them for a longer period of time. Therefore, a need for future studies on bisphenol mixtures with long-term tests is required.

Key words: endocrine disruptors, bisphenol A, F and AF, mixtures, water fleas (*Daphnia magna*), zebrafish (*Danio rerio*), acute toxicity tests

SEZNAM OKRAJŠAV

BPA	Bisfenol A
BPF	Bisfenol F
BPAF	Bisfenol AF
EC	(Efektivna) koncentracija, ki v določenem času povzroči odziv pri določenem odstotku organizmov
LC	(Letalna) koncentracija, ki v določenem času povzroču letalen odziv pri določenem odstotku organizmov
ER α	Estrogenski receptor alfa
ER β	Estrogenski receptor beta
AR	Androgeni receptor
TR	Tiroidni receptor
AHR	Receptor za arilne ogljikovodike
RV	Razredčevalna vodna raztopina
MEC	Izmerjene okoljske koncentracije določene kemikalije
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PBB	Polibromirani bifenili
PCB	Poliklorirani bifenili
DDT	Diklorodifeniltrikloroetan
GSH	Glutation
REACH	Uredba o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij
EPA	Ameriška Agencija za varstvo okolja

1 UVOD

1.1 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilec je definiran kot eksogena snov, ki moti sintezo, sekrecijo, transport, metabolizem, vezavo ali eliminacijo v organizmu naravno prisotnih hormonov, ki so odgovorni za homeostazo, reprodukcijo in razvojne procese. Povzročajo škodljive razvojne, reprodukcijske, nevrološke in imunske učinke v živalih, kot tudi pri ljudeh (1). Sprva so mislili, da hormonski motilci učinkujejo zgolj preko jedrnih hormonskih receptorjev, kot so estrogenski receptorji (ER), androgeni receptorji (AR), progesteronski receptorji, tiroidni receptorji (TR), retinoidni receptorji, itd, vendar so ugotovili, da so mehanizmi, preko katerih hormonski motilci delujejo, zelo raznoliki (2). Ti mehanizmi lahko vključujejo poleg delovanja preko jedrnih receptorjev tudi preko nejedrnih steroidnih receptorjev (membranski ER), preko nesteroidnih receptorjev (serotoninski receptorji, dopaminski receptorji, noradrenalinski receptorji), preko receptorjev sirot (receptor za arilne ogljikovodike - AhR) in tudi encimskih poti, ki so vključene v biosintezi in metabolizmu steroidov, ter tudi preko številnih drugih mehanizmov, ki so pomembni za delovanje endokrinega sistema. Hormonski motilci so torej spojine, ki so lahko naravnega ali sinteznega izvora, in ki zaradi izpostavljenosti organizma tem spojinam, vplivajo na hormonsko in s tem homeostazno ravnovesje v telesu.

Med hormonske motilce vključujemo sintezno pridobljene spojine, ki jih uporabljamo v industriji kot topila, lubrikante, pesticide (metoksiklor, DDT), fungicide (vinklozolin), farmacevtske učinkovine (dietilstilbestrol) in surovine pri izdelavi polikarbonatov in epoksi smol (bisfenol A in njegovi analogi).

Naravne spojine, najdene v rastlinah – fitoestrogeni, kot je genistein in kumestrol, lahko prav tako delujejo kot hormonski motilci. Te spojine, ki imajo načeloma nizko vezavno afiniteto na estrogenske receptorje, so v veliki meri sestavina v hrani in industrijsko pridelanem mleku za dojenčke. Nedavna raziskava je pokazala, da so bile koncentracije fitoestrogenov 500-krat višje v dojenčkih, hranjenih s sojinim mlekom, v primerjavi z dojenčki, ki so bili hranjeni s kravjim mlekom, zato je pomembno oceniti učinke fitoestrogenov kot hormonskih motilcev (3).

Hormonski motilci so zelo raznolike spojine, ki nimajo nujno podobnih strukturnih lastnosti, zato je težko predvideti, katera spojina je lahko potencialen motilec. Nekateri hormonski

motilci (dioksin, poliklorirani bifenili - PCB, polibromirani bifenili - PBB) imajo vezane halogene atome (brom, fluor, klor). V strukturi imajo tudi fenolni obroč, kar lahko posnema naravne steroidne hormone in omogoča, da hormonski motilci interagirajo s hormonskimi receptorji in povzročijo agonistični ali antagonistični učinek.

Iz raziskav na živalih so ugotovili mehanizme, preko katerih hormonski motilci vplivajo na endokrini sistem in spremenijo hormonske funkcije. Hormonski motilci lahko:

- Posnemajo ali delno posnemajo hormone, ki so naravni prisotni v človeškem telesu – estrogen (ženski spolni hormon), androgen (moški spolni hormon), tiroidne hormone – kar lahko vodi do prevelikih učinkov, ki jih imajo ti hormoni.
- Se vežejo na receptor in preprečijo vezavo endogenega hormona. S tem preprečijo učinek, ki bi ga ta endogeni hormon povzročil. Primer so antiestrogeni oziroma antiandrogeni.
- Motijo ali blokirajo proces nastanka ali presnove hormonov ali receptorjev, tako da vplivajo na njihov metabolizem v jetrih. Prav tako lahko vplivajo na encime, ki sodelujejo pri steroidogenezi. Primer so metaboliti PCB, ki inhibirajo sulfotransferazo, kar povzroči višje koncentracije estradiola (4).

Bilo je veliko deljenih mnenj glede hormonskih motilcev, kjer so nekateri zahtevali strožje omejitve pri njihovi uporabi, oziroma prepoved uporabe spojin, ki imajo endokrino delovanje. Nekateri hormonske motilce so prepovedali (dietilstilbestrol), vendar ni čisto razjasnjeno, ali hormonski motilci dejansko škodujejo ljudem in naravi pri koncentracijah, ki smo jim trenutno izpostavljeni, zato izvajajo številne raziskave, ki bi to ovrednotile (2).

Pomembni vplivi pri izpostavitvi hormonskim motilcem na njihove učinke so:

- Starost, razvojna stopnja organizma, ki je izpostavljen hormonskemu motilcu. Učinki na organizem se zelo razlikujejo pri izpostavljenosti odraslega človeka in dojenčka. Raziskave kažejo, da imajo hormonski motilci največji vpliv v prenatalnem in zgodnjem postnatalnem razvoju – v času, ko se oblikujejo in razvijajo organi in živčni sistem.
- Doba med izpostavljenostjo hormonskim motilcem in vidnimi učinki na organizmu. Raziskave ugotavljajo, da obstaja latentna doba med časom, ko je bil organizem izpostavljen motilcem, in časom, ko dejansko nastopijo posledice izpostavljenosti.

- Pomembnost mešanic hormonskih motilcev: če so ljudje izpostavljeni spojini, ki ima endokrino delovanje, je zelo verjetno, da je prisotnih še več takšnih spojin. Učinki med spojinami so lahko aditivni oziroma celo sinergistični.

- Netipična dinamika med koncentracijo in učinki hormonskih motilcev: lastnosti hormonskih motilcev so pokazale, da lahko tudi pri najmanjši izpostavljenosti tem učinkovinam povzročijo učinek na endokrini sistem organizma, še posebej, če je organizem tem učinkom izpostavljen v kritični dobi razvoja. Ugotovili so, da imajo lahko v nekaterih primerih nižje koncentracije celo večji učinek kot višje.

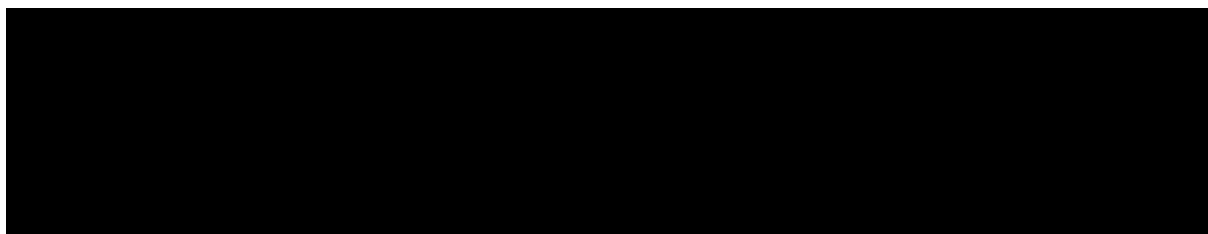
- Hormonski motilci lahko vplivajo na izpostavljene organizme, kot tudi na njihove potomce. Nedavne raziskave kažejo, da lahko mehanizem delovanja vpliva na reprodukcijo (4).

Obstojni hormonski motilci imajo nizko topnost v vodi in visoko topnost v lipidih, zaradi česar se akumulirajo v lipidnem tkivu. Endokrini sistem vseh organizmov je dovzeten za učinke hormonskih motilcev zaradi podobnih lastnosti z naravnimi hormoni in encimov, ki sintetizirajo, sproščajo in razgrajujejo te hormone (2).

V magistrski nalogi smo se osredotočili na bisfenol A in njegova analoga bisfenol F in bisfenol AF, zato jih bomo v naslednjih poglavjih podrobneje opisali.

1.1.1 Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) je organska sintezno pridobljena spojina s kemijsko formulo $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$, ki spada v skupino derivatov fenola z dvema hidroksilnima skupinama, ki sta vezani na aromatski obroč, kar omogoča pretvorbo v sol, ester ali eter. Z BPA lahko potečejo tudi elektrofilne substitucije, kot so nitiranje, sulfoniranje ali alkiliranje. Njegova molekulska masa je 228,29 g/mol in je brezbarvna trdna spojina, ki je dobro topna v organskih topilih in slabo topna v vodi. Kot je prikazano na spodnji sliki (slika 1), lahko BPA sintetiziramo iz dveh fenolov in acetona, ob prisotnosti kisline.



Slika 1 - Sinteza bisfenola A

BPA uporabljamo v velikih količinah predvsem pri izdelavi polikarbonatov in epoksi smol, kar pomeni, da ga najdemo v embalažah s hrano, plastenkah, medicinskih pripomočkih, vodovodnih ceveh, pločevinkah, itd. BPA uporabljajo v embalažah za hrano že od leta 1960 (5).

V letu 2012 so izdelali 6,5 milijonov ton BPA, in letno se ta številka poveča za približno 5 % (6). Zaradi pogostosti uporabe hrane in pijače v embalažah, ki vsebujejo BPA, so ljudje izpostavljeni vedno večjim koncentracijam BPA. Raziskave kažejo, da ga ljudje v Ameriki povprečno zaužijejo približno 34 nanogramov na kilogram človeške mase na dan (34 ng/kg/dan) (7). Najbolj pogost način vnosa v človeško telo je z zaužitjem, vendar raziskave poročajo tudi o absorpciji skozi kožo kot o enem izmed alternativnih načinov vnosa (8).

BPA se lahko sprošča iz polikarbonatov z difuzijo ali hidrolizo polimerov, vendar je difuzija veliko nižja pri BPA iz polikarbonatov. Nižji pH raztopine je bil povezan z večjo migracijo BPA v vodo, medtem ko višji pH ni imel učinka. BPA prav tako migrira hitreje iz polikarbonatnih plastenk, ki so starejše in izpostavljene višji temperaturi. Povišana temperatura in daljša uporaba plastenke poveča hidrolizo polimera, kar povzroči večje izločanje BPA v vodo (9).

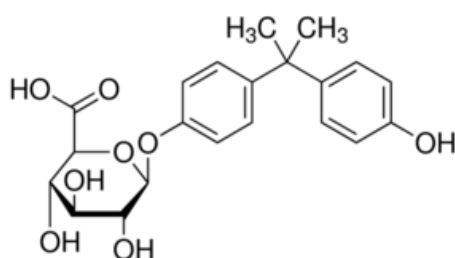
BPA ima kratko razpolovno dobo (nekje med 24 h in 96 h), vendar ga kljub temu najdemo v okolju zaradi stalnega sproščanja med proizvodnjo, transportom in obdelavo kemikalij. Okolje onesnažujemo z BPA tudi z odpadnimi vodami, ki se izločajo iz čistilnih naprav, pri sežigu gospodinjskih odpadkov in pri razgradnji plastike. Večina BPA je prisotna v vodi ter suspendiranih delcih v vodi (~53 %), zemlji (~25 %) in usedlinah (~23 %) (10).

Raziskave *in vitro* na živalih so pokazale povezavo med izpostavljenostjo organizma BPA in učinki na njihovo telesno maso, zaviranje možganske aktivnosti, spremenjene reprodukcijske sposobnosti, spremembe v imunskem sistemu in presnovi ter povečano možnostjo raka (11). Absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje je precej znano v živalskih modelih, medtem ko so pomanjkljivi podatki za ljudi (12).

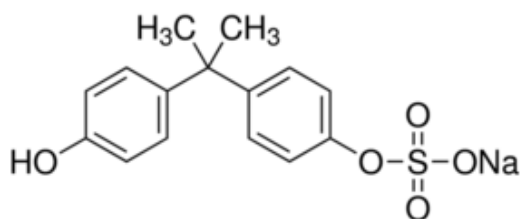
Epidemiološke raziskave kažejo posledice izpostavljenosti BPA na človeka (predvsem na občutljivejših populacijah). Veliko raziskav je povezano tudi z merjenjem koncentracije BPA v bioloških tekočinah, kot so slina, kri in mleko. Samo nekaj raziskav je odkrilo sledove BPA v človeškem tkivu (13, 14).

Potrjeno je, da je BPA ksenoestrogen, ki zavira funkcije endokrinega sistema. BPA deluje na podoben način kot naravni estrogen 17-beta-estradiol. BPA aktivira estrogenske receptorje, vendar v koncentracijah, ki so približno tisočkrat višje v primerjavi z estradiolom. BPA je bil označen kot šibek estrogen, katerega aktivnost na klasične jedrne ER α in ER β receptorje je 1000 – 10000-krat nižja v primerjavi z estradiolom, vendar je afiniteta do ER β receptorja večja (15). Dokazali so, da BPA zavira tudi funkcije ostalih hormonov, kot so leptin, inzulin, tiroksin, kar lahko povzroči hepatotoksične, imunotoksične, mutagene in karcinogene učinke. Številne raziskave so raziskovale učinek BPA na sladkorno bolezen, debelost, reprodukcijske motnje, kardiovaskularne težave, ledvične bolezni in raka. Izpostavljenost BPA lahko povzroča tudi manjšo število spermijev in njihovo mobilnost, povečano možnost za sindrom policističnih jajčnikov, zgodnjo puberteto in spontani splav (12).

BPA se oksidira s citokromom P450 v hidroksiliran in nato reaktivni benzokinonski presnovek ter se detoksificira z glukuronidacijo katalizirano z UDP-glukuronil transferazo (UGT) ali pretvorbo v sulfat (16). Glukuronid BPA (slika 2) je glavni metabolit. BPA se pri ljudeh hitro metabolizira v glukuronid in izloča z urinom, pomembnejši metabolit BPA pa je še sulfat BPA (slika 3) (17). V raziskavi na 30 prostovoljcih je bil glukuronid BPA glavni metabolit (69,5 %), sledila sta mu sulfat BPA (21,0 %) in nekonjugiran BPA (9,5 %) (18). Novejša raziskava pa je pokazala, da v veliki meri prevladuje kot metabolit glukuronid BPA (94,6 %), medtem ko sta sulfat (3,7 %) in nekonjugirana oblika (1,7 %) precej redka metabolita (19). Dokazali so, da je BPA manj toksičen za rastline, bakterije, glive in alge zaradi njihove sposobnosti pretvarjanja BPA v veliko manj toksične metabolite (15).



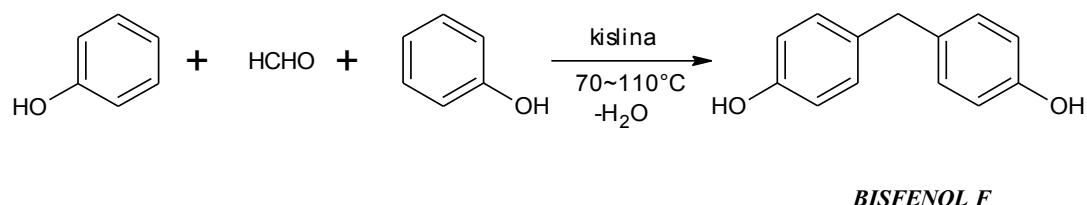
Slika 2 - Glukuronid bisfenola A



Slika 3 - Sulfat bisfenola A

1.1.2 Bisfenol F

Bisfenol F (4,4'-dihidroksidifenilmetan) je organska sintetična spojina s kemijsko formulo $\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$, ki spada v skupino derivatov fenola z dvema fenolnima obročema, povezanima z metilenskim mostom. Sintetiziramo ga iz fenola in formaldehida, kot je prikazano na sliki 4.



Slika 4 - Sinteza bisfenola F

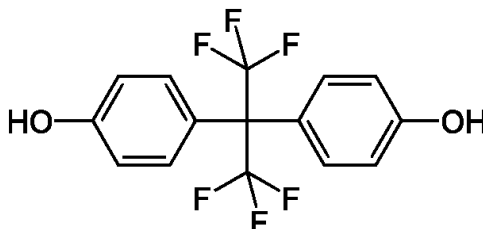
BPF je ena izmed spojin, s katero skušajo nadomestiti BPA v izdelkih in je široko uporabljen pri izdelavi polikarbonatnih plastik in epoksi smol, v strukturnih adhezivih, vodovodnih ceveh, lakih, zobnih tesnilih, itd. Zaradi vse večjega iskanja alternativ BPA, se je proizvodnja BPF povečala. Kot posledica večje proizvodnje se v vse večjih koncentracijah pojavlja v okolju – v zraku, prahu, dežju, zemlji, sedimentih in blatu. V eni izmed raziskav so izmerili 0,054 $\mu\text{g/g}$ BPF v prahu, v površinskih vodah so zaznali 0,18 $\mu\text{g/L}$ BPF, v blatu iz čistilnih naprav 181 $\mu\text{g/kg}$ suhe mase in 7,3 $\mu\text{g/kg}$ suhe mase v sedimentu (20). Zaradi velike uporabe BPF v embalaži so ga zaznali tudi v hrani in pijači pri povprečni koncentraciji 0,18 $\mu\text{g/L}$ (21). V urinu odraslih oseb so zaznali višje koncentracije BPF v primerjavi z BPA (1,20 $\mu\text{g/L}$ oziroma 1,25 μg BPA / g kreatinina) (22).

Raziskave *in vivo* in *in vitro* so pokazale, da ima BPF estrogensko aktivnost. Prav tako obstajajo raziskave, kjer so ugotavljali, da ima BPF poleg estrogenske aktivnosti tudi anti-androgeno delovanje, ker interagira tudi z androgenim receptorjem (20).

Obstajajo razne raziskave, kjer so preučevali metabolizem BPF in so prišli do različnih rezultatov. Med pogostejšimi metaboliti sta sulfat BPF in glukuronid BPF. BPF je pokazal primerljivo estrogensko in anti-androgeno delovanje kot BPA (23). Za razliko od BPF, hidroksilirani metaboliti BPF nimajo estrogenske aktivnosti. Tudi BPF oksidativni metabolit 4-(hidroksimetil)fenol ni imel aktivnosti ne na estrogenske, kot tudi ne na androgene receptorje (23).

1.1.3 Bisfenol AF

Bisfenol AF ((1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je analog BPA, kjer so metilne skupine (-CH₃) zamenjane s triflorometilnimi (-CF₃) (slika 5). Je v obliki belega, svetlo sivega ali rumenorjavega prahu. Njegova molekulska formula je C₁₅H₁₀F₆O₂ z molsko maso 336,23 g/mol.



Slika 5 - Bisfenol AF

BPAF pogosto uporabljajo v materialih za elektronske naprave, izdelavi membran, ki so plinsko prehodne, optičnih vlaknih in napravah za predelavo hrane. Približno 4,500 - 223,000 kg BPAF letno proizvedejo v Ameriki in 100,000 kg na Kitajskem (24, 25). Tako velika proizvodnja BPAF pospešuje onesnaževanje okolja z BPAF.

V raziskavah so raziskovali povezavo med strukturo molekule in aktivnostjo v primerjavi z drugimi analogi bisfenolov in ugotovili, da je zaradi menjave vodikovih atomov s flourovimi atomi spojina bolj toksična. -CF₃ skupine so bolj elektronegativne v primerjavi s -CH₃, kar je vzrok tudi za povečano estrogensko aktivnost. BPAF se veže na estrogenski receptor alfa (ER α) ali beta (ER β) z vezavno afiniteto, ki je 20 – 48-krat močnejša v primerjavi z BPA. Raziskave so pokazale da ima BPAF agonistično delovanje na ER α receptorju in antagonistično delovanje na ER β receptorju. Poleg močnega estrogenskega delovanja ima BPAF tudi močno antiandrogeno delovanje (26).

Pri presnovi BPAF je glavni metabolit glukuronid BPAF, ki mu sledijo še sulfat BPAF, diglukuronid BPAF in glukuronid sulfat BPAF. Večina BPAF se izloči iz telesa v nekonjugirani obliki z blatom ali urinom. Glavna produkta jetrnih encimov sta 4-heksafluorohidroksiizopropilidenfenol in hidroksilirani BPAF. Glukuronid BPAF in hidroksilirana oblika BPAF v primerjavi z nemetabolizirano obliko ne izražata niti estrogenske niti anti - androgene aktivnosti (27).

1.2 MEŠANICE

Večina toksikoloških raziskav v 20. stoletju je temeljila na raziskovanju učinkov posameznih spojin oziroma kemikalij na okolje in živa bitja, vendar realistično gledano nismo nikoli izpostavljeni le eni kemikaliji, ampak je večina ljudi in ostalih živih bitij v okolju hkrati izpostavljena velikemu številu kemikalij. V ameriški bazi podatkov je registriranih približno 84000 kemikalij, zato je možnost kombinacij in učinkov takšnih mešanic ogromna (28). Zaradi tako velikega števila ni možno testirati vseh možnih kombinacij, ki jih lahko posledično najdemo v okolju. Mešanice kemikalij oziroma spojin, ki jih najdemo v okolju, predstavljajo problem v ekotoksikologiji in zato so se in tudi se uvajajo metode za testiranje mešanic, s katerimi bi karakterizirali mešanice in tudi ocenili stopnjo tveganja ob izpostavitvi mešanicam.

Za lažjo ocenitev učinkov mešanic je ameriška Agencija za varstvo okolja (EPA – U.S. Environmental Protection Agency) razdelila mešanice na:

- Enostavne mešanice, ki vsebujejo dve ali več znanih spojin, ampak hkrati dovolj malo število spojin v mešanici, da lahko določimo toksičnost mešanice s seštevkom toksičnosti posameznih spojin in interakcij med spojinami v mešanici.
- Kompleksne mešanice, ki vsebujejo veliko število spojin in je kakršnakoli ocenitev na podlagi toksičnosti posameznih spojin v mešanici nesmiselna (29).

Ocenitev učinkov toksičnosti mešanic na zdravje človeka temelji na tem, da s pomočjo toksikoloških raziskav posameznih spojin v mešanici izračunajo stopnjo tveganja mešanice spojin.

V raziskavah so preizkušali razne modele, s katerimi bi lahko predvideli potencialne učinke, ki jih imajo lahko mešanice na organizme v okolju (30). Uporabljamo predvsem metode, kjer ocenimo oziroma predpostavimo učinek mešanic spojin glede na učinek posamezne spojine, ki je pristotna v mešanici. Dva najpogostejša modela, ki ju uporabljamo za ocenjevanje učinkov mešanic sta:

- Model seštevka koncentracij (angleško: Concentration addition - CA): model, ki sta ga razvila Loewe in Muischneck leta 1926 (31). Ta model je namenjen za mešanice, v katerih imajo spojine enak, oziroma podoben mehanizem delovanja. Torej upošteva le spojine, ki se vežejo na enaka vezavna mesta. Ta model predpostavlja, da lahko posamezno spojino v mešanici nadomestimo z enakim deležem druge spojine v

mešanici (ki je enako učinkovita) in se pri tem ne spremeni celokupna toksičnost mešanice.

- Model neodvisnega delovanja (angleško: Independent action - IA): ta model je razvil Bliss leta 1939 (32). Namenjen je za mešanice, v katerih imajo spojine različen mehanizem delovanja. Spojine v mešanici sicer delujejo preko različnih mehanizmov, vendar imajo enak toksikološki učinek (30).

Ta dva modela uporabljamo v ekotoksikoloških raziskavah tako enostavnih, kot tudi kompleksnih mešanic, ki vsebujejo spojine z enakim oziroma različnim delovanjem predvsem na vodno okolje in vodne organizme. V raziskavi so primerjali uspešnost obeh metod in ugotovili, da sta precej podobna in sta zadostna za ocenitev tveganja (33). Z modelom seštevka koncentracij, kot tudi z modelom neodvisnega delovanja lahko ocenimo učinke mešanic spojin, vendar modela nista zadostna kadar ni znan mehanizem delovanja ene ali več spojin v mešanici. Prav tako nobeden izmed teh modelov ne upošteva, da lahko med spojinama v mešanici potekajo interakcije, kar lahko spremeni učinek mešanice.

Primeri, kjer model seštevka koncentracija in model neodvisnega delovanja prav tako nista primerna, so naslednji: a) kadar gre med spojinami v mešanici za sinergizem (učinek dveh spojin v mešanici je večji kot seštevek učinkov posameznih spojin v mešanici pri isti koncentraciji), b) antagonizem (učinek dveh spojin v mešanici je manjši kot seštevek dveh učinkov posameznih spojin v mešanici pri isti koncentraciji) ali kompleksnejše situacije (sinergizem pri nižjih koncentracijah in antagonizem pri višjih koncentracijah) . Izvedli so raziskave, kjer so raziskovali interakcije v mešanicah spojin in ugotovili, da so te v mešanicah precej pogoste, vendar se razlikujejo v jakosti (34).

Potrebno bi bilo najti model, ki bi upošteval morebitne interakcije med spojinami v mešanicah. V eni od raziskav so preizkušali model, ki upošteva interakcije na treh nivojih:

- interakcije spojin v mešanici z okoljskimi mediji (zemlja, sedimentni delci, ...), kar lahko vpliva na večjo izpostavljenost organizmov tem spojinam,
- interakcije spojin v mešanici z naravnimi spojinami, prisotnimi v organizmih, kar lahko povzroči spremembe v presnovi oziroma izločanju spojin,
- interakcije spojin v mešanici z receptorji, na katere delujejo in s tem povzročijo spremenjeno toksičnost (34).

V prihodnosti so potrebne raziskave na področju toksikologije mešanic in predvsem raziskave z mešanicami spojin, ki imajo sinergističen oziroma antagonističen učinek, saj je težko predvideti toksičnost takšnih mešanic in hkrati predstavljajo velik problem iz zdravstvenega, okoljskega in ekonomskega stališča.

1.3 TESTNI ORGANIZMI

V magistrski nalogi smo za določanje akutne strupenosti mešanic bisfenolov uporabili vodne bolhe (*Daphnia magna*) in ribe zebrice (*Danio rerio*). Oba organizma sta pogosto uporabljena za določanje toksičnih učinkov kemijskih spojin in protokol poizkusov je dobro poznan in standardiziran. Pri ribah zebricah je celoten postopek opisan v ISO standardu 15088 (2007), pri vodnih pa v ISO standardu 6341:2012.

1.3.1 Vodne bolhe (*Daphnia magna*)

Daphnia magna so sladkovodni nevretenčarji, ki spadajo v red *Cladocera* in razred *Branchiopoda*. Vodne bolhe najdemo v sladki vodi (jezera, reke, mlake) in somornici (do 8 ppt slanosti). Idealna temperatura vode je 18 – 22 °C, vendar jih lahko najdemo tudi v širšem razponu temperatur vode.

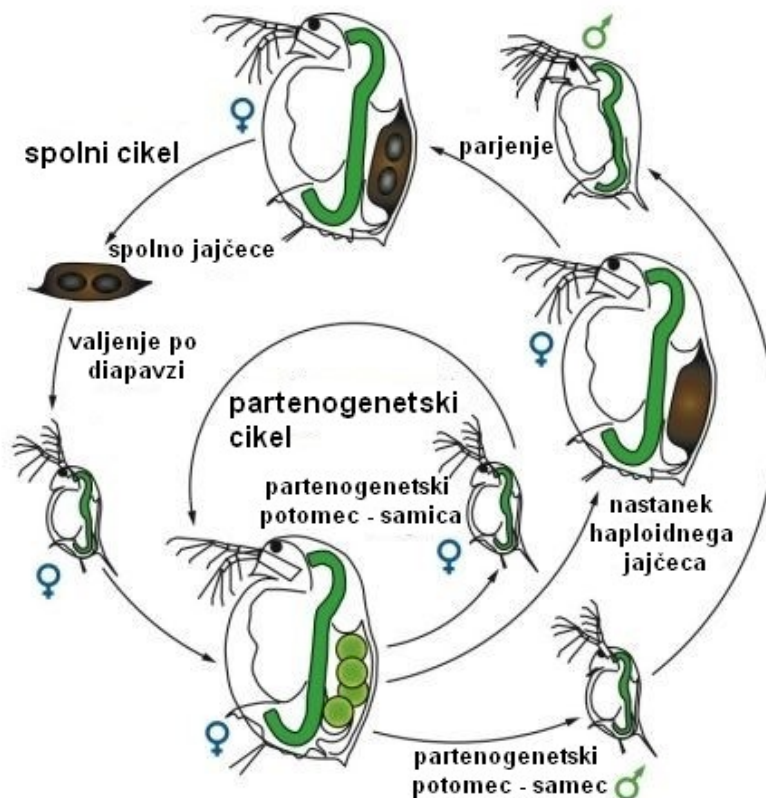
Vodne bolhe imajo sploščene, listu podobne noge, ki jim pomagajo ustvarjati vodni tok za filtracijo, in so obdane z oklepom, ki mu rečemo karapaks. Karapaks je sestavljen iz hitina, ki je polisaharid. Imajo dva para anten (en par je namenjen plavanju), klešče in 5 ali 6 parov okončin na telesu. Dolžina vodne bolhe je med 2 in 5 mm. Samci se razlikujejo od samic v velikosti (so manjši), imajo večje antene, spremenjen trebušni del in sprednje noge, ki so opremljene s kavljem, ki je namenjen za oprijem na samico pri razmnoževanju. Mlade in odrasle vodne bolhe imajo eno veliko kompaktno oko, ki jim pomaga pri orientaciji med plavanjem (35). Povprečna življenjska doba vodnih bolh je 40 dni pri 25 °C in 56 dni pri 20 °C.

Vodne bolhe se prehranjujejo z majhnimi, suspendiranimi delci v vodi. Primarna hrana vodnih bolh je zooplankton, fitoplankton in alge. Zelene alge so najbolj pogosta hrana tudi pri vodnih bolhah, gojenih za laboratorijske teste. Vodne bolhe se večinoma prehranjujejo z delci, ki so veliki 1 - 50 mikrometrov.

Barva vodnih bolh je odvisna od hrane, ki je najbolj pogosta v njihovi prehrani. Vodne bolhe, ki se prehranjujejo z zelenimi algami, so transparentne z odtenkom zelene ali rumene barve,

medtem ko so vodne bolhe, ki se prehranjujejo z bakterijami, bele ali roza barve. Intenziteta barve je odvisna od količine hrane, ki je na razpolago in dobre prehranjenosti vodnih bolh. Majhne količine kisika obarvajo vodne bolhe v rdečkasto barvo, ki pa je lahko tudi posledica prisotnosti parazitov (36).

Življenjski cikel se začne, ko samica proizvede jajčeca (ponavadi med 6 in 10 jajčec), ki se nahajajo v odprtini pod karapaksom. Jajčeca se razvijejo v mlade vodne bolhe v približno 2 - 3 dneh. Samice so spolno odrasle po tem, ko razvijejo valilno komoro, kar ponavadi traja 6 - 10 dni. Vodne bolhe se lahko razmnožujejo spolno ali nespolno (slika 6). Pri nespolnem razmnoževanju samice proizvajajo diploidna jajčeca, ki se razvijejo v enake klone, kar pomeni, da pri nespolnem razmnoževanju nastajajo samo samice. Pri neprimernih pogojih (malo razpoložljive hrane, neprimerna temperatura, visoka gostota populacije) se vodne bolhe razmnožujejo spolno. Med spolnim razmnoževanjem se samci primejo samic s pomočjo njihovih kavljev. Samice proizvajajo haploidna jajčeca, ki jih samci oplodijo. Nastanejo zimska jajčeca (efipij), ki so odpornejša na neugodne razmere. Spolno razmnoževanje večinoma poteka v poznih jesenskih obdobjih, kjer se iz jajčec izvalijo vodne bolhe v pomladanskih mesecih (37).



Slika 6 - Razmnoževalni cikel vodnih bolh (spolno in nespolno razmnoževanje) (38)

Vodne bolhe zelo pogosto uporabljamo pri ekotoksikoloških raziskavah zaradi njihove občutljivosti na kemijske substance in predstavljajo 8 % vseh toksikoloških raziskav na vodnih organizmih (36). Imajo pomembno vlogo pri raziskovanju strupenosti kemikalij, ki jih določajo razne agencije (npr. Ameriška agencija za okoljsko varnost). Vodne bolhe so dober model za ekotoksikološke raziskave tudi zaradi enostavnosti uporabe in gojenja v laboratoriju. V primerjavi z ostalimi vodnimi bolhami je vrsta *Daphnia magna* večja, zaradi česar so organizmi te vrste boljša izbira pri toksikoloških raziskavah. Prednost vodnih bolh je tudi njihovo nespolno razmnoževanje, ki ohranja genetsko enakost in s tem večjo možnost enake občutljivosti na preizkušano substanco. Pogosto so uporabljene v testih tudi zaradi njihove številčnosti in vloge v prehranjevalni verigi vodnih organizmov, ker se hranijo z algami in bakterijami, in so hkrati hrana ribam (39).

1.3.2 Ribe zebrice (*Danio rerio*)

Ribe zebrice so tropske sladkovodne ribe, ki spadajo v razred žarkoplavutaric (*Actinopterygii*) in družino krapovcev (*Cyprinidae*) (slika 7). Poimenovane so po njihovih petih, temno obarvanih, vzdolžnih črtah po telesu, ki dajejo izgled, kot jih imajo zebre. Zebrice zrastejo do približno 6,4 cm dolžine, vendar je povprečna dolžina v laboratorijskih pogojih 4 cm. Življenjska doba je 2 - 3 leta, do 5 let v idealnih pogojih. Spadajo v skupino vsejedcev in se prehranjujejo predvsem z zooplanktonom in vodnimi insekti. Takoj po izvalitvi so vse zebrice ženskega spola, šele po 5 oziroma 7 tednih se začne gonadna diferenciacija in traja približno 3 mesece, da se samci popolnoma razvijejo (40).



Slika 7 - Odrasla riba zebrica (*Danio rerio*) (43)

Strupenostni testi, ki jih izvajamo na ribah, spadajo med osnovni nabor testov, s katerimi ocenjujemo stopnjo tveganja uporabe kemikalij, kar je v skladu z zakonodajo REACH (Registracija, Evalvacija, Avtorizacija kemikalij) (41). Včasih so akutno strupenost kemikalij določali ob izpostavitvi odraslih rib določenim kemikalijam in nato opazovali njihovo smrtnost kot učinek. Ker je ta metoda invazivna in etično sporna, so iskali alternativne metode, ki bi bile prijaznejše za testne organizme. Tako se je kot ena izmed alternativnih metod uveljavila metoda za določanje akutne strupenosti na ribjih zarodkih. Zebrice so postale ena izmed najbolj uporabljenih modelov v biomedicinskih raziskavah (razvojna biologija, morfogeneza, nevrološke raziskave, regeneracija in staranje) in ekotoksikoloških testih.

Prednosti uporabe zebric oziroma njihovih zarodkov:

- Zaradi njihove majhnosti in neobčutljivosti lahko gojimo veliko število zebric v enem akvariju in z njimi tudi enostavno rokujemo, kar olajša njihovo vzdrževanje.
- Nizki stroški z uporabo in rejo
- V relativno kratkem času poteka rast in razvoj zebrice. V primernih pogojih traja razvojni čas približno 3 do 4 mesece. Zebrice se pri ugodnih laboratorijskih razmerah lahko razmnožujejo skozi vso leto.
- Izvalijo ogromno število jajčec v tedenskem intervalu, tako da imamo vedno zadostno količino testnih organizmov.
- Zarodki zebric so transparentni, kar omogoča enostaven vpogled v notranjost organizma in možne spremembe v razvoju in strukturi organizma.
- Zebrice si delijo približno 70 % genomske homologije z ljudmi.
- Imajo večinoma enake glavne organe in tkiva kot ljudje. Lastnosti mišic, krvi, ledvic in oči so podobne lastnostim človeškim organov.
- Genom zebric je bil popolnoma sekveniran, kar je omogočilo znanstvenikom raziskovati učinke mutacij njihovih genov.
- Razvoj zarodkov poteka v jajčecih izven živali, kar nam omogoča enostavno raziskovanje (42).

2 NAMEN DELA

Ob vedno večji proizvodnji in uporabi kemikalij se večja potreba po ekotoksikoloških raziskavah in poznavanju učinkov teh kemikalij na okolje in organizme v okolju. Med široko uporabljenimi kemikalijami so tudi spojine, ki spadajo v skupino hormonskih motilcev. Z njimi se ljudje srečujemo v vsakodnevnem življenju, saj jih najdemo v hrani, pijači in embalaži, kozmetiki, pesticidih, oblogah pločevink, detergentih in drugih izdelkih. V preteklih raziskavah so že nizki odmerki hormonskih motilcev povzročili neželene učinke na preizkušane živali. Raziskave poročajo o korelaciji med izpostavitvijo tem kemikalijam in učinkom na razmnoževanje, nevrološke motnje, povečano možnostjo raka, itd. Ne smemo zanemariti, da smo hkrati izpostavljeni več kemikalijam, in da se učinki seštevajo oziroma celo pomnožujejo.

Izvedenih je bilo že nekaj raziskav o toksičnosti bisfenola A in njegovih analogov (bisfenol F, bisfenol AF) na organizme v okolju, vendar manjkajo raziskave o učinku mešanic. V magistrski nalogi smo se osredotočili na raziskovanje učinkov mešanic bisfenola A, F in AF na vodne bolhe in zarodke rib zebrič. Zanima nas, kakšen je učinek, ko so organizmi hkrati izpostavljeni mešanici dveh ali treh bisfenolov hkrati – ali pride do večjega učinka, oziroma ali je ta učinek sinergističen ali aditiven. Prav tako bomo skušali obrazložiti, zakaj pride do takšnih učinkov, ko so organizmi izpostavljeni določeni mešanici. Na začetku bomo preverili akutno toksičnost posameznih bisfenolov na vodne bolhe (*Daphnia magna*) in zebričice (*Danio rerio*) in s tem določili koncentracije, katere bomo uporabili pri nadaljnjih akutnih testih, kjer bomo uporabili mešanice bisfenolov in preverili učinek teh mešanic na vodnih bolhah in zebričah. Pri akutnem testu na vodnih bolhah bomo spremljali zaviranje gibanja vodnih bolh 24 oziroma 48 ur po izpostavitvi, medtem ko bomo pri akutnem testu na ribah zebričah opazovali smrtnost in nekatere subletalne znake (odsotnost pigmentacije, neizvaljenost, pojav edema) po 24, 48, 72 in 96 urah.

Preverjali bomo naslednje hipoteze:

- Posamezni bisfenoli izzovejo letalne in subletalne učinke na vodne bolhe in zebričice pri različnih koncentracijah.
- Pri mešanicah bisfenolov (dveh ali treh) pričakujemo aditivne učinke na negibnost vodnih bolh (*Daphnia magna*) in aditivne učinke pri ugotavljanju letalnih in subletalnih znakov pri zebričah (*Danio rerio*) pri vseh določenih vrednostih EC.

- Mešanice, ki vsebujejo BPAF, imajo močnejše toksične učinke na vodne bolhe in zarodke rib zebrič pri nižjih koncentracijah, kot mešanice brez BPAF.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 UPORABLJENE KEMIKALIJE

V tem poglavju so v preglednici I našteje kemikalije, ki smo jih uporabljali tekom naše raziskave. Vse kemikalije imajo čistoto, višjo od 98 %.

Preglednica I - Uporabljene kemikalije

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]	PROIZVAJALEC	CAS ŠTEVILKA
Bisfenol A	$C_{15}H_{16}O_2$	228,29	Sigma-Aldrich	80-05-7
Bisfenol F	$C_{13}H_{12}O_2$	200,23	Sigma-Aldrich	620-92-8
Bisfenol AF	$C_{15}H_{10}F_6O_2$	336,23	Sigma-Aldrich	1478-61-1
3,4-dikloroanilin	$C_6H_5Cl_2N$	162,02	Merck	95-76-1
Kalijev dikromat	$K_2Cr_2O_7$	294,18	Merck	7778-50-9
Kalcijev klorid dihidrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,02	Merck	10043-52-4
Kalijev klorid	KCl	74,55	Merck	7447-40-7
Magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,47	Merck	10034-98-8
Natrijev hidrogen karbonat	$NaHCO_3$	84,01	Merck	144-55-8

3.2 PRIPRAVA RAZTOPIN

3.2.1 Priprava osnovne raztopine bisfenola A

Uporabili smo osnovno raztopino BPA s koncentracijo 20 mg/L, ki smo jo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 40 mg BPA in ga prenesli v 2 L bučko, ki smo jo napolnili z ultračisto vodo (prevodnost: 18,2 M Ω /cm). BPA je slabo topen zato smo bučko dali na mešalnik in mešali pri sobni temperaturi približno 2 dni, da se je ves BPA raztopil. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku.

3.2.2 Priprava osnovne raztopine bisfenola F

Uporabili smo osnovno raztopino BPF s koncentracijo 20 mg/L, ki smo jo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 40 mg BPF in ga prenesli v 2 L bučko, ki smo jo napolnili z ultračisto vodo (prevodnost: 18,2 MΩ/cm). Bučko smo dali na mešalnik in pri sobni temperaturi čez noč pustili mešati. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku.

3.2.3 Priprava osnovne raztopine bisfenola AF

Uporabili smo osnovo raztopino BPAF s koncentracijo 15 mg/L, ki smo jo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici zatehtali 15 mg BPAF in ga prenesli v 1 L bučko, ki smo jo napolnili z ultračisto vodo (prevodnost: 18,2 MΩ/cm). Bučko smo dali na mešalnik in pri sobni temperaturi čez noč pustili mešati. Osnovno raztopino smo hranili v hladilniku.

3.2.4 Priprava razredčevalne vodne raztopine

Razredčevalno vodno raztopino (RV) smo uporabljali za negativno kontrolo in redčenje osnovnih raztopin BPA, BPF in BPAF. Pripravili smo jo tako, da smo v 10 L stekleno posodo odpipetirali 40 mL raztopine 1.1, 10 mL raztopine 1.2, 10 mL raztopine 1.3 in 10 mL raztopine 1.4 (preglednica II). Te raztopine smo pripravili po ISO standardu (15088:2007). Potrebno količino soli smo natehtali v 1 L bučko in dodali ultračisto vodo do oznake.

Preglednica II - Raztopine za pripravo razredčevalne vodne raztopine

Raztopina 1.1	Kalcijev klorid dihidrat	294 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot x \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Raztopina 1.2	Magnezijev sulfat heptahidrat	123,3 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot x \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Raztopina 1.3	Kalijev klorid	5,5 mg/L KCl
Raztopina 1.4	Natrijev hidrogen karbonat	63,0 mg/L NaHCO_3

3.3 AKUTNI STRUPENOSTNI TESTI NA VODNIH BOLHAH

V tem poglavju bomo opisali pripravo vzorcev in postopek testiranja akutne strupenosti na vodnih bolhah.

3.3.1 Pozitivna kontrola

Pred začetkom izvajanja akutnih testov z mešanicami bisfenolov smo izvedli test s pozitivno kontrolo (kalijev dikromat - $K_2Cr_2O_7$), da smo preverili občutljivost vodnih bolh. Postopek je opisan v naslednjem poglavju. Pogoj za uspešnost testa je, da je izračunana 24 h EC_{50} med 0,6 mg/L in 2,1 mg/L $K_2Cr_2O_7$. Prav tako smo pri vsakem testu izvedli tudi kontrolo z razredčevalno vodno raztopino. Pogoj za uspešnost testa z razredčevalno vodno raztopino je, da po 24 h ne pride do učinka pri vsaj 90 % vodnih bolh (to pomeni, da je vsaj 90 % vodnih bolh normalno gibljivih).

Osnovna koncentracija kalijevega dikromata je bila 100 mg/L. Uporabili smo naslednje koncentracije kalijevega dikromata: 0,5 mg/L, 0,7 mg/L, 1,0 mg/L, 1,3 mg/L in 1,7 mg/L. Potrebno količino osnovne raztopine kalijevega dikromata smo odpipetirali v 100 mL bučko in dopolnili z razredčevalno vodno raztopino. Za vsako koncentracijo in negativno kontrolo, ki je bila razredčevalna vodna raztopina, smo vzeli po 2 petrijevki, v vsako petrijevko smo dali po 10, največ 24 h starih vodnih bolh. Po 24 h smo opazovali gibljivost vodnih bolh. S pomočjo programa Probit analiza (Probit analizni program Agencije za varstvo okolja v Združenih državah Amerike - USEPA Probit analysis Program, verzija 1.5) smo izračunali vrednost 24 h EC_{50} , ki je znašala 1,00 mg/L, kar pomeni, da je dobljena vrednost v predpisanem območju.

3.3.2 Potek testa

Teste smo izvajali na največ 24 urah starih vodnih bolhah, kjer smo jih za 24 oziroma 48 ur izpostavili različnim koncentracijam bisfenola oziroma mešanicam bisfenolov in nato opazovali negibnost izpostavljenih vodnih bolh.

Testne vzorce smo pripravili tako, da smo v 100 mL bučko odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine bisfenola oziroma bisfenolov, dodali 0,4 mL raztopine 1.1, 0,1 mL raztopine 1.2, 0,1 mL raztopine 1.3, 0,1 mL raztopine 1.4 (preglednica II) in z ultra čisto vodo dopolnili do oznake. Za teste smo uporabili vodne bolhe, ki smo jih hranili z zelenimi algami (*Desmodesmus subspicatus*) štirikrat tedensko, kvasom enkrat na teden in hrano za ribe Tetramin® dvakrat tedensko. Iz akvarija z vodnimi bolhami smo prenesli zadostno število

vodnih bolh v manjšo časo, ki je bila napolnjena z razredčevalno vodno raztopino. Potem smo si pripravili 3 petrijevke, ki smo jih označili in napolnili s po 30 mL testnega vzorca za vsako izbrano koncentracijo in negativno kontrolo (RV). Iz čase smo prenesli po 20 vodnih bolh v prvo petrijevko z izbrano koncentracijo – ta petrijevka je služila temu, da je bil učinek redčenja pri prenosu v testne petrijevke manjši. Iz te petrijevke smo nato prenesli po 10 vodnih bolh v vsako izmed preostalih dveh petrijevk, v kateri je bila raztopina z enako koncentracijo bisfenola oziroma bisfenolov. Po istem postopku smo vodne bolhe prenesli še v ostale petrijevke, ki so vsebovale različne koncentracije bisfenola. Vodne bolhe smo prenašali s pomočjo kapalke in smo pri tem morali biti previdni, da se niso ujele v zračni mehurček, ki bi povzročil, da bi plavale na površju, kar bi povzročilo lažne rezultate. Po končanem prenosu smo vodne bolhe izpostavili dnevnu ciklu 16 h svetlobe / 8 h teme pri temperaturi 20 (\pm 2) °C. Po 24 h in 48 h smo opazovali gibljivost bolh. Vodno bolho smo označili kot negibno, če ni samostojno plavala, oziroma če po mehničnem dražljaju ni aktivno splavala. V obeh petrijevkah z isto koncentracijo testnega vzorca smo prešteli negibljive/gibljive vodne bolhe in obdelali rezultate, ki smo jih predstavili v obliki grafov.

3.4 AKUTNI STRUPENOSTNI TESTI NA RIBAH ZEBRICAH

V tem poglavju bomo opisali pripravo vzorcev in postopek za testiranje akutne strupenosti bisfenolov na ribah zebričah, katere parametre smo opazovali in katere koncentracije smo uporabili za nadaljnje teste z mešanici bisfenolov.

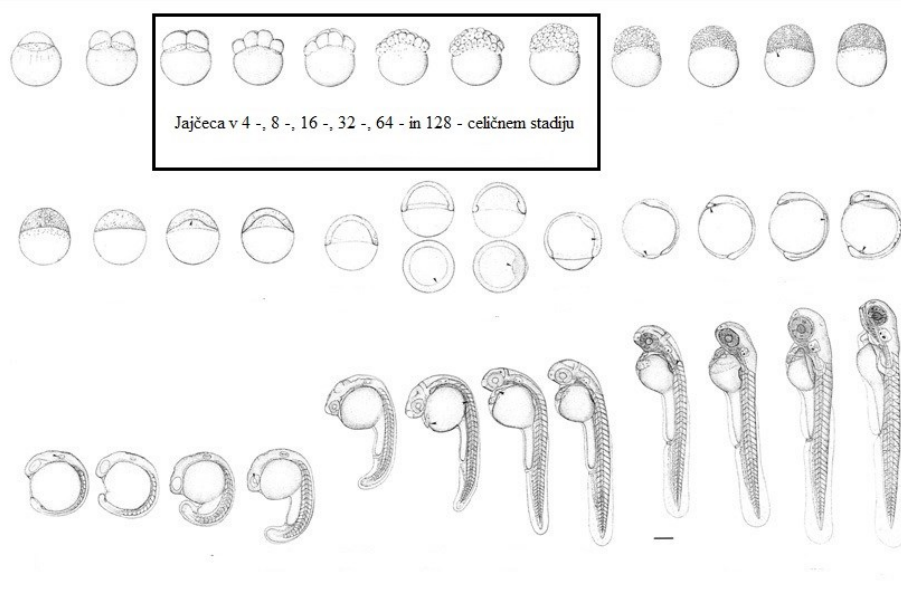
3.4.1 Pozitivna kontrola

Pred začetkom izvajanja testov za akutno strupenost na ribah zebričah smo opravili test z raztopino 3,4-dikloroanilina, ki služi kot pozitivna kontrola. Pogoji za uspešnost pozitivne kontrole je, da pride pri koncentraciji 3,7 mg/L 3,4-dikloroanilina do letalnega učinka pri vsaj 10 % zarodkov, pogoj za kontrolo z razredčevalno vodno raztopino pa, da preživi vsaj 90 % zarodkov. Imeli smo osnovno raztopino s koncentracijo 100 mg/L 3,4-dikloroanilina, iz katere smo odpipetirali 0,925 mL raztopine v 25 mL bučko, katero smo dopolnili z razredčevalno vodno raztopino.

3.4.2 Potek testa

Teste smo na izvajali na zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*), ki smo jih izpostavili različnim koncentracijam bisfenola oziroma mešanici bisfenolov in nato opazovali smrtnost in nekatere subletalne učinke v 24 urnih intervalih do izvalitve.

Testne vzorce smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučko odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine BPA, dodali 100 μ L raztopine 1.1, 25 μ L raztopine 1.2, 25 μ L raztopine 1.3, 25 μ L raztopine 1.4 (preglednica II) in do oznake dopolnili z ultra čisto vodo. Pri testiranju akutne toksičnosti smo izvedli postopek po ISO standardu 15088 (2007), v katerem je opisana celotna metoda. Za test smo uporabili zebrice, ki so se nahajale v akvariju s stalno temperaturo vode / temperaturo zraka $26 (\pm 1) ^\circ\text{C}$, in so bile izpostavljene dnevno / nočnemu ciklu. Zebrice smo hranili trikrat dnevno – ob 9., 12. in 15. uri s hrano za ribe, občasno pa tudi z vodnimi bolhami. Ko smo potrebovali zarodke za test, smo v akvarije vstavili plastične posodice, ki so bile opremljene z jekleno mrežico in umetnimi rastlinami, kjer so se zebrice drstile. Jeklena mrežica je služila kot prepreka med jajčeci in zebricami. Te posodice smo v akvarije vstavili en dan preden smo začeli s preizkusom in jih naslednji dan pred hranjenjem zebric odstranili. Jajčeca smo iz posodic s pomočjo akvarijske vode prenesli v petrijevko in jih pod lupo (Nikon SMZ 1000, Nikon) pregledali. Ločili smo oplojena jajčeca od neoplojenih oziroma poškodovanih. ISO standard 15088 (2007) določa, da lahko za test uporabimo jajčeca, ki so v najmanj 4-celičnem stadiju oziroma največ v 128-celičnem stadiju. Stadiji so ponazorjeni na spodnji sliki (slika 8).



Slika 8 - Razvojni stadiji zarodkov zebric (*Danio rerio*) (44)

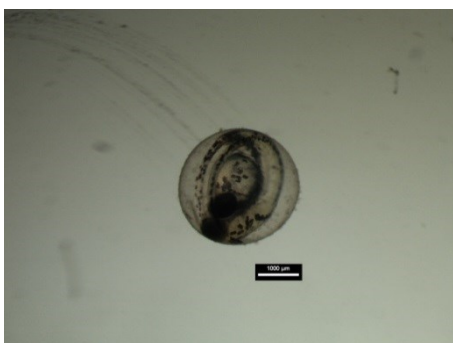
Potrebno število ustreznih oplojenih jajčec smo prenesli v petrijevko s termostatirano razredčevalno vodno raztopino in jih dali v inkubator, medtem ko smo pripravili vzorce. Test smo opravljali v mikrotitrskih ploščah s 24 vdolbicami. Za vsako koncentracijo smo uporabili 10 vdolbinic, kamor smo v vsako vdolbino odpipetirali po 1 mL raztopine. Prav tako smo v

10 vdolbinic prenesli pozitivno kontrolo (po 1 mL 3,4-dikloroanilina) in negativno kontrolo (po 1 mL razredčevalne vodne raztopine). Ko smo vse vdolbinice napolnili, smo mikrotitrške plošče prestavili v inkubator, kjer smo jih segrevali do približno 26 °C. Ko so bile termostahirane, smo iz segrete petrijevke v vsako, s testno raztopino napolnjeno vdolbinico, prenesli jajčece. Po končanem delu smo napolnjene mikrotitrške plošče pokrili s pokrovom in zavili s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje. Tako zavite plošče smo prenesli v termostahiran prostor ((26 ± 1) °C). Naslednjih par dni smo jih vedno ob isti uri pregledali, opazovali njihov razvoj oziroma morebitne deformiranosti. Po 72 oziroma 96 urah smo opazovali tudi izvaljenost.

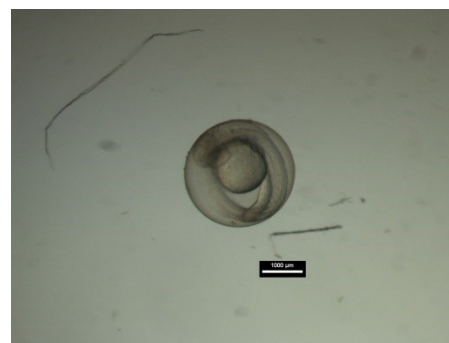
Opazovali smo nekatere subletalne in letalne znake. Subletalni znaki ne povzročajo smrti zarodkov in so naslednji:

- ni spontanega gibanja,
- nepravilen razvoj oči oziroma odsotnost razvoja oči,
- ni krvnega obtoka,
- nepigmentacija oči,
- nepigmentacija telesa,
- deformacija rumenjakeve vreče,
- neizvalitev.

Po 24 urah lahko opazimo gibanje zarodka, vendar v nekaterih primerih tudi s pomočjo mehanskih dražljajev ni bil opažen premik. Prav tako lahko po 24 urah opazimo razvoj oči. Po 48 urah smo opazovali krvni obtok, ki kljub srčnemu utripu ni vedno prisoten, oziroma je zelo šibek. Po 48 urah se obarvajo oči in po telesu, glavi in repu se začnejo pojavljati črne pike – pride do pigmentacije. Sliki 9 in 10 ponazarjata razliko med pigmentiranim in nepigmentiranim zarodkom. Pigmentacija je lahko v nekaterih primerih zamaknjena in se kasneje zarodek normalno pigmentira. Merilo na slikah od 9 do 13 je 1000 µm – dolžina bele črte na slikah.

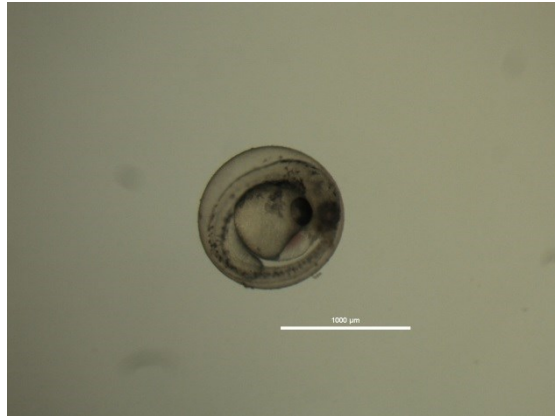


Slika 9 - Normalno pigmentiran zarodek



Slika 10 - Nepigmentiran zarodek

Opazovali smo tudi izvaljenost zarodkov. Nekateri zarodki, ki so bili izpostavljeni določenim koncentracijam, se tudi po 96 urah niso izvalili. Med subletalne znake spada tudi prisotnost edema, ki je bil med bolj pogostimi učinki. Na sliki 11 je zarodek, ki ima prisoten edem.

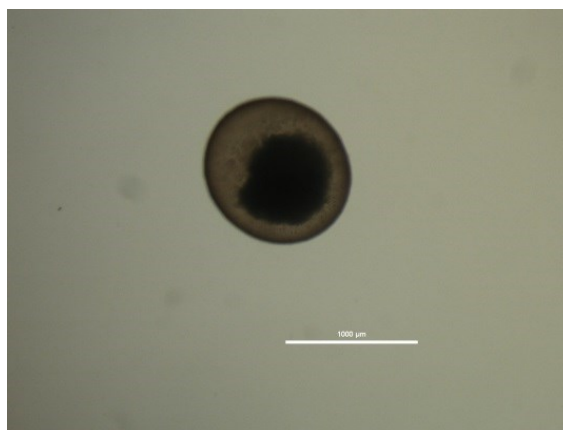


Slika 11 - Zarodek s prisotnim edemom

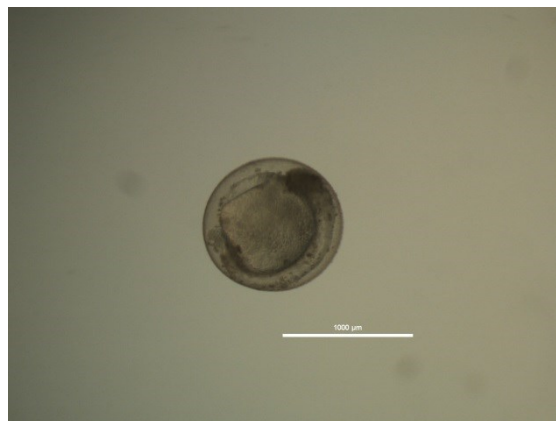
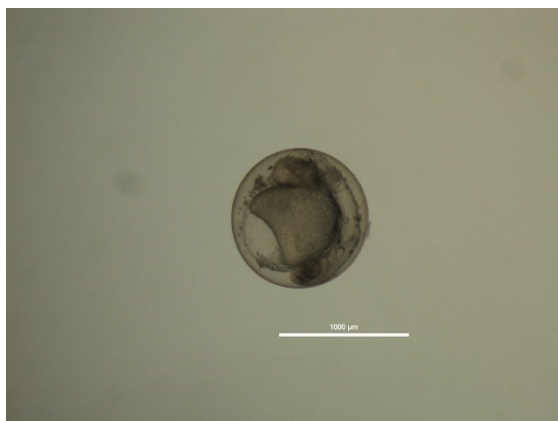
Letalni znaki povzročijo smrt organizma. Opazovali smo naslednje letalne znake:

- ali je zarodek koaguliral,
- ali se je rep ločil od rumenjaka,
- ali so se razvili somiti (vretenca),
- prisotnost oziroma odsotnost srčnega utripa.

Po 24 urah lahko opazimo razvoj somitov (vretenc). Razvoj somitov je lahko pri izpostavitvi z določenimi koncentracijami zamaknjen. Koagulacija je med najbolj razvidnimi znaki, saj je zarodek temnejše barve in netransparenten (slika 12). Po 48 urah je razvidna tudi odsotnost srčnega utripa. Če je rep po 48 urah še vedno enako povezan z rumenjarkovo vrečo kot pri 24 urah se opredeli kot letalen znak. Dovolj je, da je prisoten eden izmed zgoraj navedenih znakov, da zarodek opredelimo kot mrtev.



Slika 12 - Normalno razvit zarodek na levi sliki in koaguliran zarodek na desni sliki



Slika 13 - Na levi sliki je prikazan zarodek z deformirano jajčno vrečo in na desni sliki deformiran zarodek

Tako smo vsak dan ob isti uri opazovali znake in jih zapisovali v razpredelnico. Nekateri znaki so bili bolj izraziti od drugih, tako da smo se po zbranih rezultatih osredotočili na bolj izrazite znake in rezultate obdelali ter ovrednotili.

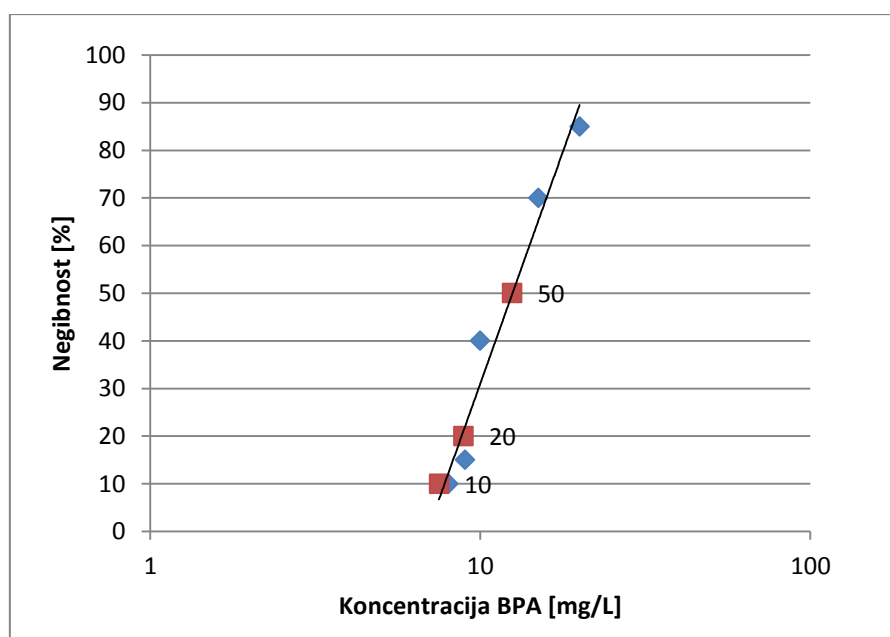
4 REZULTATI

4.1 TEST AKUTNE STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI

Strupenost mešanic bisfenolov smo določali z akutnim testom na vodnih bolhah, kjer smo opazovali negibnost. Po 24 urah oziroma 48 urah smo opazovali negibnost vodnih bolh. Vodno bolho smo označili kot negibno tudi v primeru, ko po mehničnem tresljaju ni samostojno splavala.

4.1.1 Določitev vrednosti EC bisfenola A

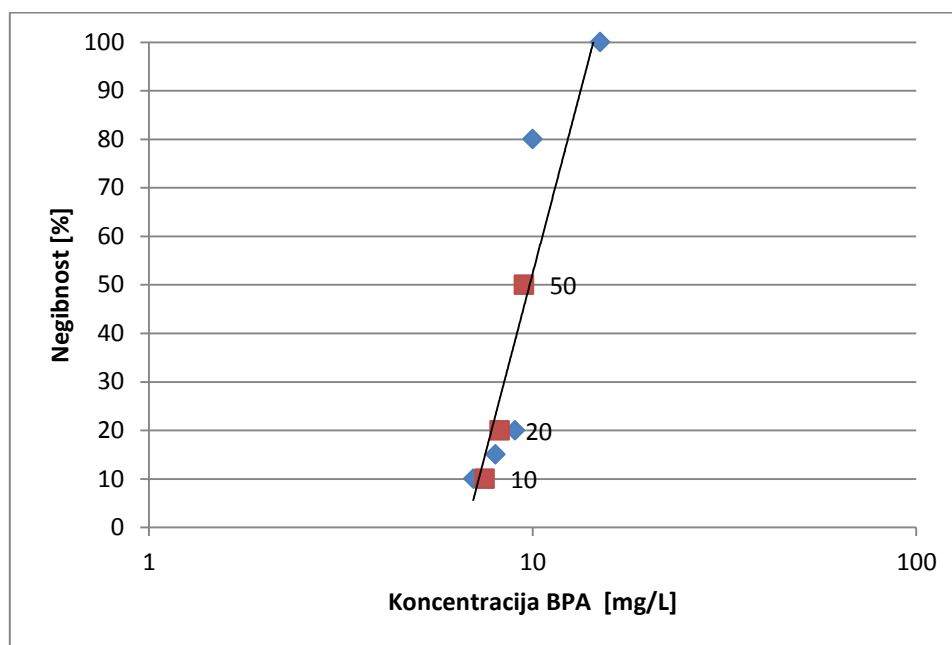
Vodne bolhe smo izpostavili različnim koncentracijam bisfenola A, ki smo jih izbrali glede na predhodne raziskave. Uporabili smo naslednje koncentracije: 20 mg/L, 15 mg/L, 10 mg/L, 9 mg/L, 8 mg/L in 7 mg/L. Postopek testa je enak opisanemu v prejšnjem poglavju. Po 24 h in 48 h smo prešteli negibne vodne bolhe in s pomočjo programa Probit analiza izračunali vrednosti EC.



Slika 14 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA po 24 h

Po 24 urah je bilo prišlo do učinka na 50 % testnih organizmov pri koncentraciji 12,5 mg/L, medtem ko je EC_{50} po 48 urah znašal 9,5 mg/L (sliki 14 in 15). Ti dve vrednosti smo primerjali z rezultati objavljenih raziskav, ki so prav tako določale vrednosti EC na vodnih bolhah po izpostavitvi z BPA. V člankih smo izsledili naslednje vrednosti EC_{50} po 24 urah: 9,55 mg/L, 13,8 mg/L, 8,6 mg/L, 12,5 mg/L in 48 urah: 7,8 mg/L, 12,8 mg/L, 10,0 mg/L, 7,7 mg/L (45, 46, 47, 48). Kot je razvidno, obstajajo razlike v rezultatih, kar je posledica dela na

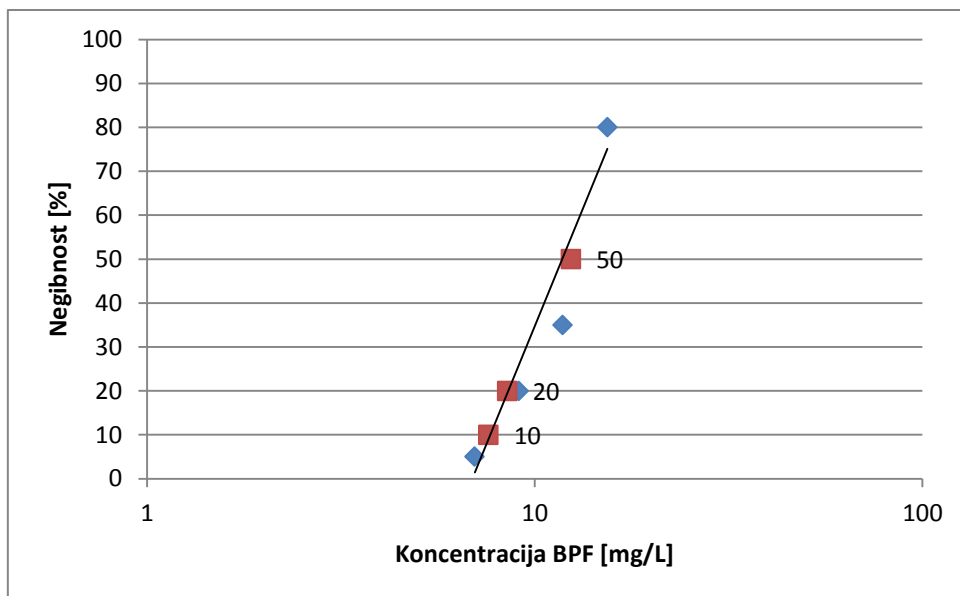
živih organizmih in njihovi variabilnosti. Naši rezultati se v precejšnji meri ujemajo z literaturnimi vrednostmi, zato testa nismo ponavljali in smo se osredotočili predvsem na mešanice bisfenolov. V mešanicah bisfenolov smo uporabili koncentracije BPA EC₁₀ po 24 urah (7,5 mg/L) in 48 urah (7,5 mg/L), ter EC₂₀ po 24 urah (8,9 mg/L) in 48 urah (8,2 mg/L).



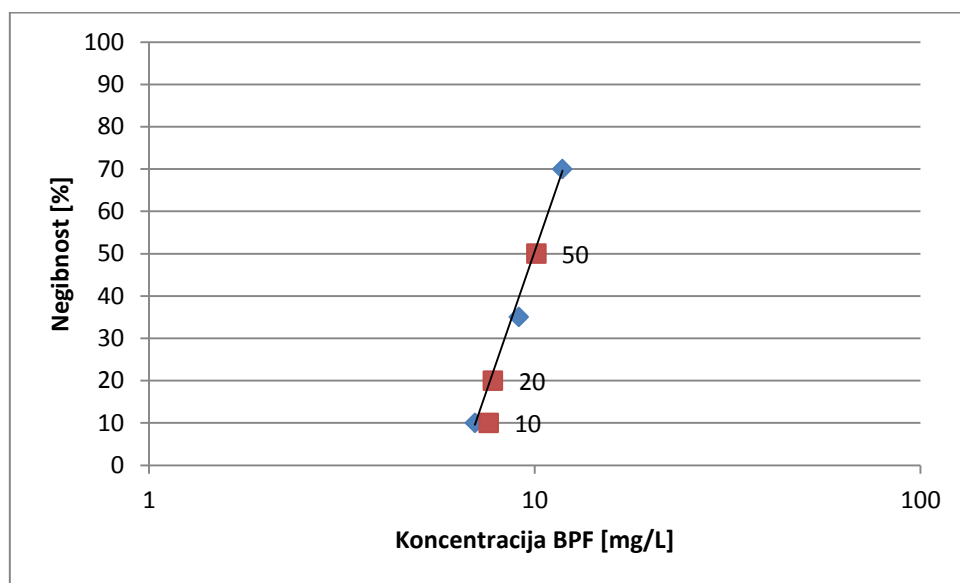
Slika 15 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA po 48 h

4.1.2 Določitev vrednosti EC bisfenola F

Tudi za določitev vrednosti EC₁₀ in EC₂₀ BPF smo upoštevali predhodne raziskave in s pomočjo le-teh izbrali naslednje koncentracije za naš test: 20 mg/L, 15,4 mg/L, 11,8 mg/L, 9,1 mg/L, 7,0 mg/L, in 5,4 mg/L. Po 24 h in 48 h smo opazovali učinek na vodnih bolhah in s pomočjo programa Probit analiza izračunali vrednosti EC (sliki 16 in 17). Po 24 urah je EC₅₀ znašal 12,4 mg/L, po 48 urah pa 10,1 mg/L. Kot pri BPA, smo tudi te vrednosti primerjali z rezultati predhodne raziskave, kjer je bil EC₅₀ po 24 urah 13,3 mg/L in 9,2 mg/L po 48 urah (45). Ker so bili naši rezultati primerljivi, testa nismo ponavljali. V mešanicah bisfenolov smo uporabili koncentracije BPF EC₁₀ po 24 urah (8,5 mg/L) in 48 urah (7,6 mg/L) in EC₂₀ po 24 urah (9,7 mg/L) in 48 urah (8,4 mg/L).



Slika 16 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF po 24 h

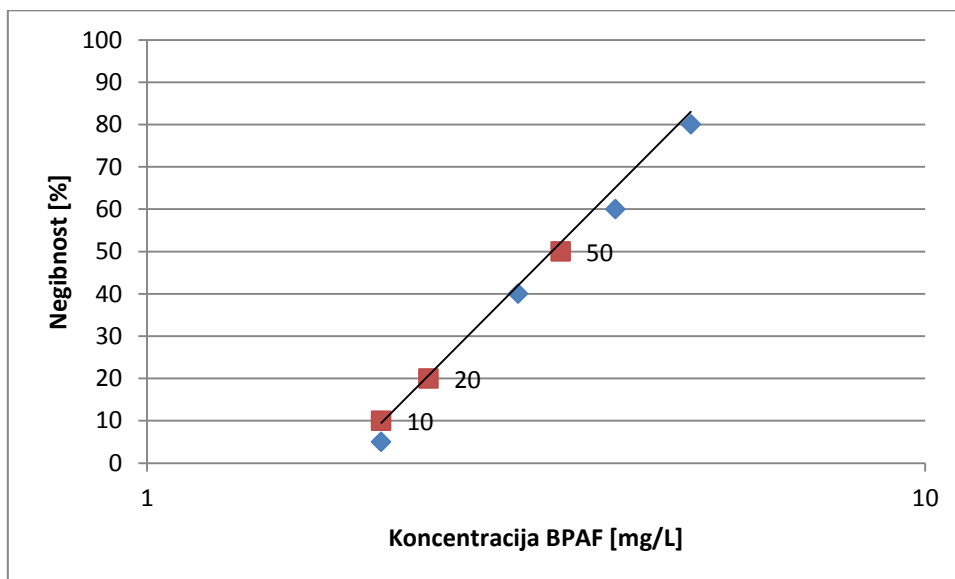


Slika 17 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF po 48 h

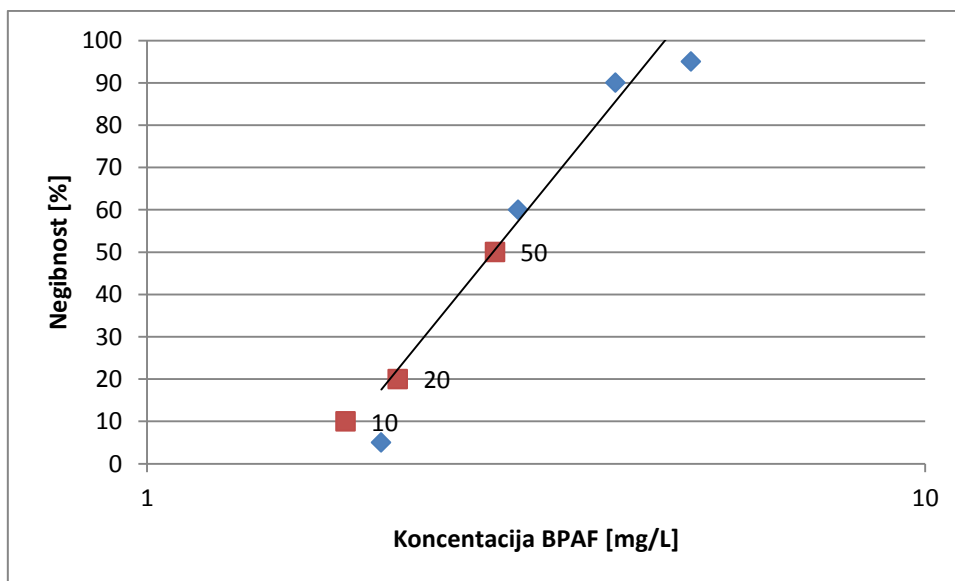
4.1.3 Določitev vrednosti EC bisfenola AF

Enako, kot v prejšnjem poglavju, smo naredili tudi pri BPAF, kjer smo izbrali koncentracije: 8 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L in 1 mg/L. Po 24 urni izpostavljenosti bisfenolu AF je EC_{50} znašal 3,4 mg/L (slika 18) in 2,9 mg/L po 48 urah (slika 19). V primerjavi z literaturnimi vrednostmi, kjer je bila vrednost EC_{50} po 24 urah 3,2 mg/L in po 48 urah 2,2 mg/L, lahko

trdimo, da so rezultati primerljivi, zato testa nismo še enkrat ponavljali (45). V mešanica bisfenolov smo uporabili koncentracije BPAF EC₁₀ po 24 urah (2,1 mg/L) in 48 urah (2,0 mg/L) in EC₂₀ po 24 urah (2,5 mg/L) in 48 urah (2,3 mg/L).



Slika 18 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF po 24 h



Slika 19 - Odstotek negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF po 48 h

4.1.4 Mešanica BPA + BPAF

Kot prvi poskus z mešanicami bisfenolov smo uporabili mešanico bisfenola A in AF, kjer smo uporabili koncentracije, pri katerem ima posamezen bisfenol učinek na 10 % oziroma 20 % testiranih organizmov (24 h oz 48 h EC₁₀/ EC₂₀). Izvedli smo test, kjer smo kombinirali:

- koncentraciji EC₁₀ BPA in BPAF po 24 urah,
- koncentraciji EC₁₀ BPA in BPAF po 48 urah,
- koncentraciji EC₂₀ BPA in BPAF po 24 urah,
- koncentraciji EC₂₀ BPA in BPAF po 48 urah.

Preglednica III - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA in BPAF v mešanici

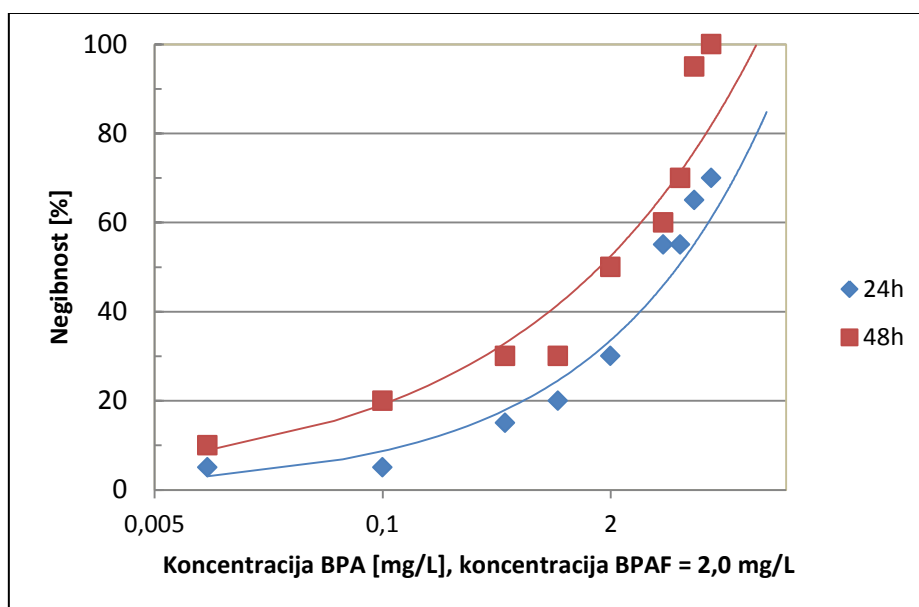
	BPA + BPAF	24 h	48 h
	Koncentracija	Negibne v. bolhe [%]	Negibne v. bolhe [%]
	K	0	10
EC₁₀ 24 h / EC₁₀ 48 h *	7,5mg/L BPA + 2,1mg/L BPAF	70	100
EC₂₀ 24 h	8,9mg/L BPA + 2,5mg/L BPAF	80	100
EC₂₀ 48 h	8,2mg/L BPA + 2,3mg/L BPAF	75	100

*vrednosti 24 h EC₁₀ in 48 h EC₁₀ za enaki za BPA

Kot je razvidno iz preglednice III, je prišlo že pri mešanici vrednosti EC₁₀ oziroma EC₂₀ do maksimalnega učinka po 48 urah. Ker je bil učinek maksimalen (100 % negibljivost po 48 urah) pri vseh mešanicah, nas je zanimalo, pri katerih koncentracijah bisfenolov v mešanici ne bo učinka. Naš eksperiment smo si zastavili tako, da smo v mešanici ohranili koncentracijo enega bisfenola konstantno in zniževali koncentracijo drugega bisfenola do koncentracije, ki bo za testne organizme nestrupena. Ker je bil učinek pri vseh koncentracijah maksimalen, smo pri BPA vzeli koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ po 24 urah oziroma 48 urah (enaka vrednost) in pri BPAF koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ po 48 urah, saj je bila pri teh vrednostih koncentracija najnižja.

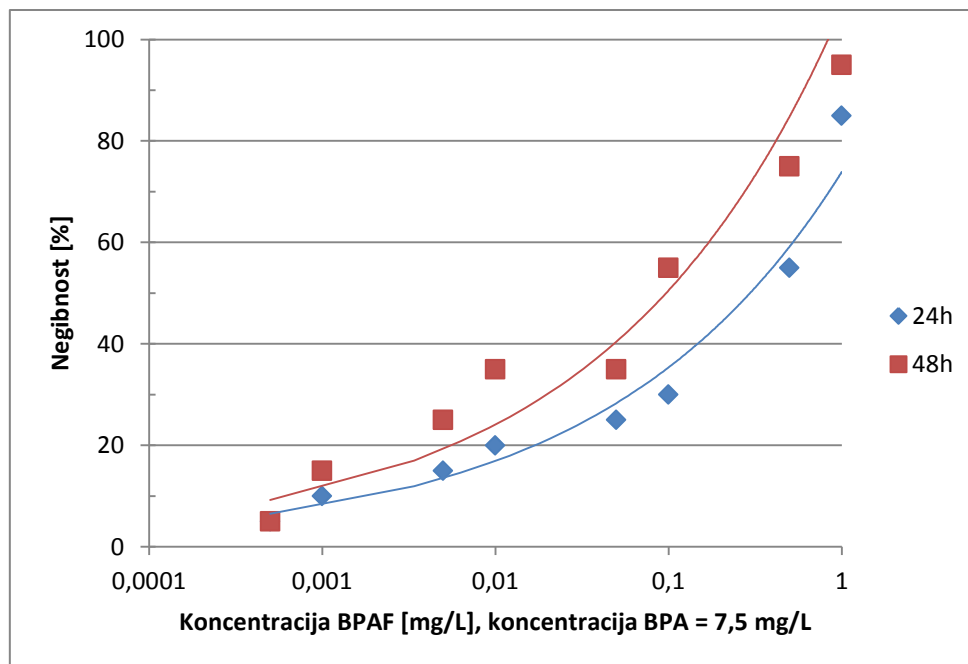
Tako smo se odločili, da bo raztopina BPAF v mešanici konstantna (2,0 mg/L), koncentracijo BPA bomo pa spreminjali. Izbrali smo 9 koncentracij BPA: 7,5 mg/L, 6,0 mg/L, 5,0 mg/L,

4,0 mg/L, 2,0 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L. Za te koncentracije smo se odločili na podlagi preliminarnih testov, kjer je najvišja koncentracija EC₁₀ (maksimalen učinek) in pri najnižji koncentraciji praktično ni bilo učinka. V 100 mL bučko smo odpipetirali potrebno količino osnovne raztopine BPAF in osnovne raztopine BPA, dodali 0,4 mL raztopine 1.1, 0,1 mL raztopine 1.2, 0,1 mL raztopine 1.3, 0,1 mL raztopine 1.4 (preglednica II) in dopolnili do oznake z ultra čisto vodo.



Slika 20 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA pri konstantni koncentraciji BPAF (2,0 mg/L) po 24 h in 48 h

Po 24 urah izpostavljenosti pri koncentracijah 0,01 mg/L BPA in 2,0 mg/L BPAF so bile skoraj vse vodne bolhe normalno gibljive (le eno smo označili kot negibljivo), kar pomeni, da je ta koncentracija za testirane organizme praktično nestrupena. Potrebno je upoštevati biološko variabilnost, saj izvajamo teste na živih organizmih. Strupenost mešanice je padala v obliki krivulje, pri višjih koncentracijah je bil strm naklon in bi lahko potegnili premico, medtem ko je pri nižjih koncentracijah učinek počasi izginjal. Pri 4,0 mg/L BPA je prišlo do približno 50 % učinka, kar pomeni, da je bila polovica vodnih bolh negibljivih. Po 48 urah izpostavitve smo opazili večjo smrtnost oziroma negibnost vodnih bolh v primerjavi z 24 urami (slika 20). Postopek smo ponovili s konstantno koncentracijo BPA (7,5 mg/L) in spreminjanjem koncentracije BPAF v mešanici: 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L, 0,01 mg/L, 0,005 mg/L, 0,001 mg/L in 0,0005 mg/L (slika 21).



Slika 21 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF pri konstantni koncentraciji BPA (7,5 mg/L) po 24 h in 48 h

Tudi pri tem poskusu (slika 21) smo dobili enako obliko krivulje, vendar smo morali uporabiti veliko nižje koncentracije BPAF, da smo prišli do koncentracij, kjer več ni bilo učinka na vodne bolhe. Mešanica BPAF in BPA, ki več ni imela učinka na gibljivost vodnih bolh, je bila pri 0,0005 mg/L BPAF in 7,5 mg/L BPA, kjer je bilo po 24 h in 48 h 95 % vodnih bolh normalno gibljivih. Po 2-kratnemu zmanjšanju EC_{10} BPAF (iz 2,0 mg/L na 1,0 mg/L) ob 7,5 mg/L BPA je po 24 urah prišlo do 85 % učinka na vodne bolhe in po 48 urah do skoraj popolne negibnosti vodnih bolh, le eno smo označili kot gibljivo.

4.1.5 Mešanica BPA + BPF

Kot v prejšnjem poglavju smo tudi z mešanico BPA + BPF izvedli test, kjer smo kombinirali

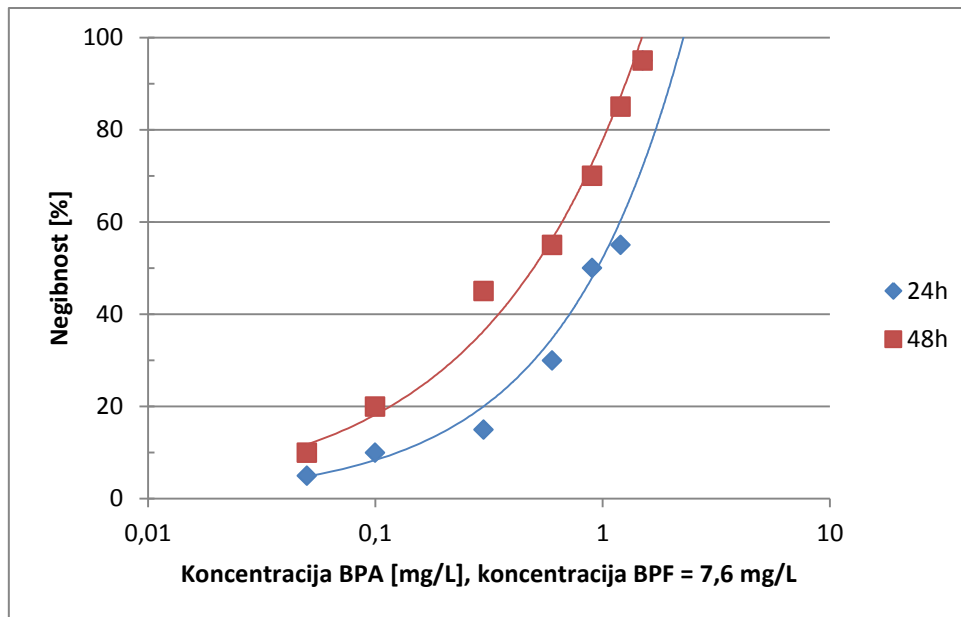
- koncentraciji EC_{10} BPA in BPF po 24 urah,
- koncentraciji EC_{10} BPA in BPF po 48 urah,
- koncentraciji EC_{20} BPA in BPF po 24 urah,
- koncentraciji EC_{20} BPA in BPF po 48 urah.

Preglednica IV - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA in BPF v mešanici

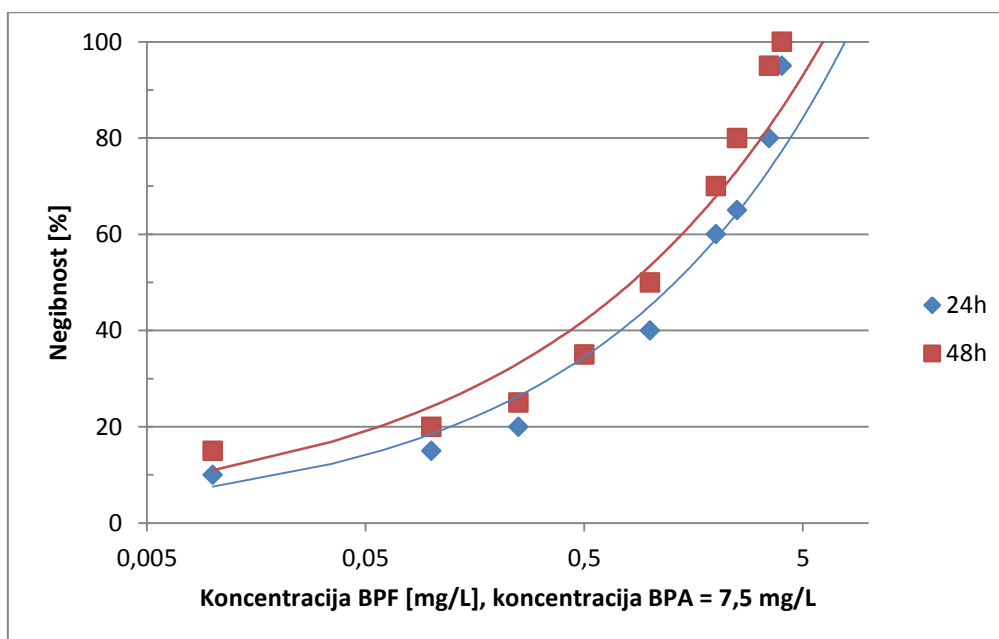
	BPA + BPF	24 h	48 h
	Koncentracija	Negibne v. bolhe [%]	Negibne v. bolhe [%]
	K	0	0
EC₁₀ 24 h	7,5mg/L BPA + 8,5mg/L BPF	100	100
EC₁₀ 48 h	7,5 mg/L BPA + 7,6mg/L BPF	90	100
EC₂₀ 24 h	8,9mg/L BPA + 9,7mg/L BPF	85	100
EC₂₀ 48 h	8,2 mg/L BPA + 8,4mg/L BPF	95	100

Pri tem testu je bil učinek pri vseh koncentracijah maksimalen (preglednica IV), zato smo pri BPA uporabili koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ po 24 urah oziroma 48 urah (enaka koncentracija) in pri BPF koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ po 48 urah. Ohranili smo koncentracijo enega bisfenola konstantno in spreminjali koncentracijo raztopine drugega bisfenola. Pri prvem poskusu smo ohranili koncentracijo raztopine BPF konstantno, in sicer 7,6 mg/L (Slika 22). Ta koncentracija je predstavljala vrednost EC₁₀ BPF. Zniževali smo koncentracijo BPA, pri kateri smo uporabili naslednjih 7 koncentracij BPA: 1,5 mg/L, 1,2 mg/L, 0,9 mg/L, 0,6 mg/L, 0,3 mg/L, 0,1 mg/L in 0,05 mg/L. Te koncentracije smo tako kot v prejšnjem poglavju izbrali na podlagi preliminarnih testov, kjer je bil pri najvišji koncentraciji maksimalen učinek in pri najnižji odsotnost učinka.

Pri mešanici BPA in BPF je krivulja na grafu (slika 22) enaka kot pri mešanici BPA + BPAF v prejšnjem poglavju. 20 % odziv po 48 urah smo dosegli pri konstantni koncentraciji 7,6 mg/L BPF in 0,1 mg/L BPA. Pri koncentraciji 0,05 mg/L BPA in 7,6 mg/L BPF je bilo po 24 urah negibnih 5 % vodnih bolh, medtem ko je bilo po 48 urah negibnih 10 %, iz česar lahko vidimo, da delež negibnih vodnih bolh s časom narašča. Pri drugem poskusu (slika 23) smo pa ohranili koncentracijo raztopine BPA konstantno (7,5 mg/L) in uporabili naslednje koncentracije raztopine BPF: 4,0 mg/L, 3,5 mg/L, 2,5 mg/L, 2,0 mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L. Najvišja koncentracija je predstavljala koncentracijo EC₁₀ BPF, najnižja pa koncentracijo, kjer je bil zanemarljiv učinek.



Slika 22 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA pri konstantni koncentraciji BPF (7,6 mg/L) po 24 h in 48 h



Slika 23 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF pri konstantni koncentraciji BPA (7,5 mg/L) po 24 h in 48 h

Pri konstantni koncentraciji 7,5 mg/L BPA in 0,1 mg/L BPF je prišlo do 20 % učinka na negibnost vodnih bolh. Do skoraj netoksičnih učinkov (10 % negibljivih) na vodne bolhe po 48 urah je prišlo pri koncentraciji 7,5 mg/L BPA in 0,01 mg/L BPF. Delež negibnih vodnih bolh je bil po 48 urah nekoliko višji, kot po 24 urah.

4.1.6 Mešanica BPAF + BPF

Tudi pri tej kombinaciji smo izvedli test, kjer smo kombinirali

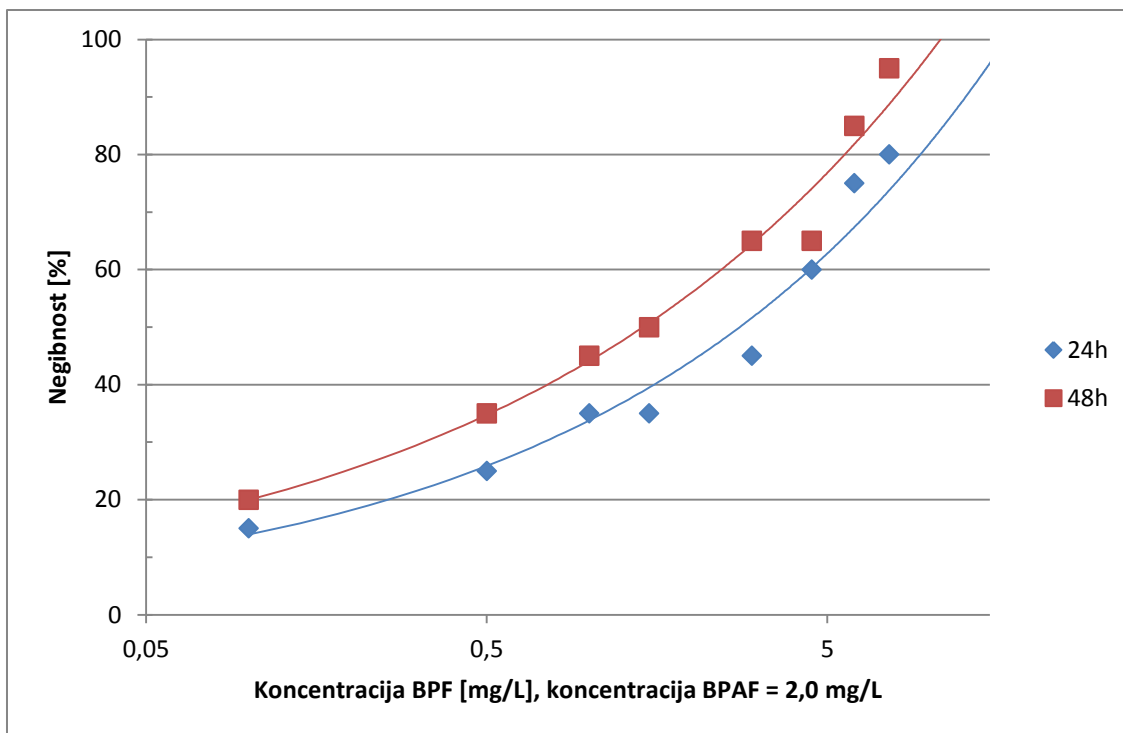
- koncentraciji EC₁₀ BPAF in BPF po 24 urah,
- koncentraciji EC₁₀ BPAF in BPF po 48 urah,
- koncentraciji EC₂₀ BPAF in BPF po 24 urah,
- koncentraciji EC₂₀ BPAF in BPF po 48 urah.

Preglednica V - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPAF in BPF v mešanici

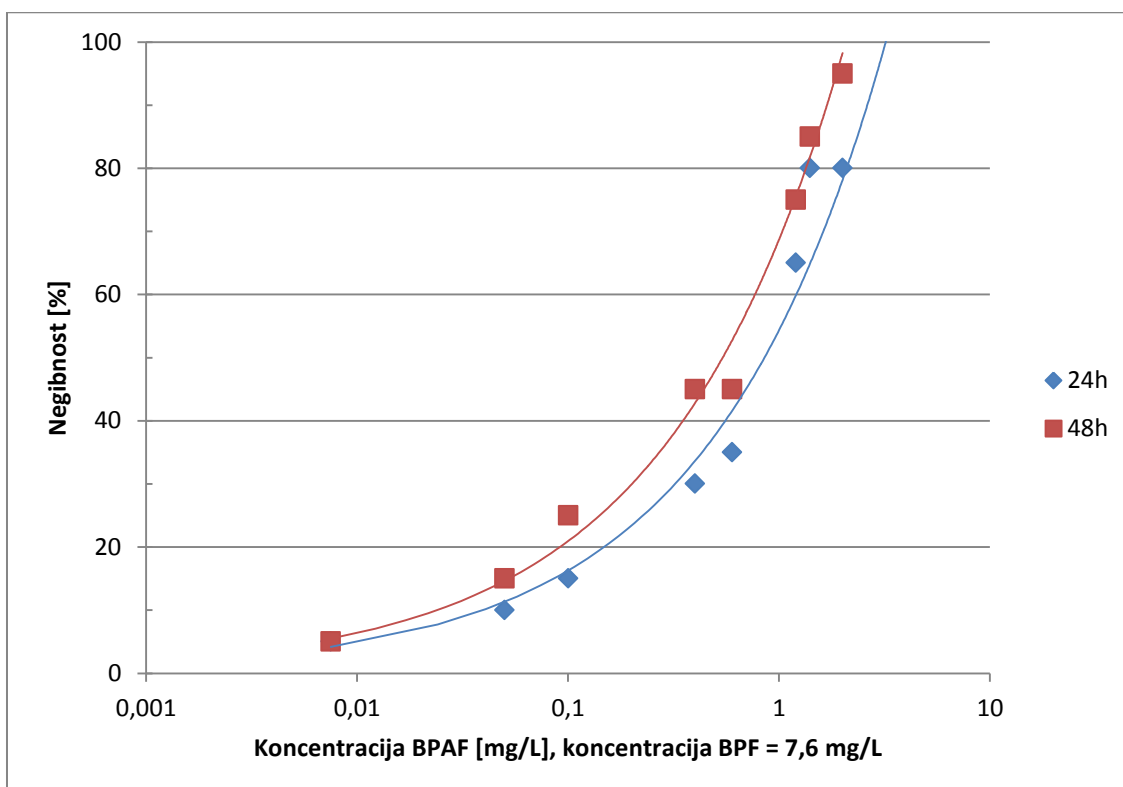
	BPF + BPAF	24 h	48 h
	Koncentracija	Negibne v. bolhe [%]	Negibne v. bolhe [%]
	K	0	5
EC₁₀ 24 h	8,5mg/L BPF + 2,1mg/L BPAF	75	100
EC₁₀ 48 h	7,6 mg/L BPF + 2,0mg/L BPAF	80	95
EC₂₀ 24 h	9,7mg/L BPF + 2,5mg/L BPAF	85	100
EC₂₀ 48 h	8,4 mg/L BPF + 2,3mg/L BPAF	80	100

Ker je bil učinek pri vseh koncentracijah maksimalen, smo pri BPAF vzeli koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ 24 h oziroma 48 h (enako) in pri BPF koncentracijo pri vrednosti EC₁₀ pri 48 urah, saj je pri teh vrednostih bila koncentracija najnižja.

Tudi pri mešanici BPAF in BPF je bil postopek enak. Vzeli smo koncentracijo enega bisfenola konstantno in spreminjali koncentracijo drugega bisfenola. Ohranili smo koncentracijo BPAF konstantno (2,0 mg/L) in spreminjali koncentracijo BPF. Uporabili smo naslednje koncentracije BPF: 7,6 mg/L, 6,0 mg/L, 4,5 mg/L, 3,0 mg/L, 1,5 mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L in 0,1 mg/L (slika 24). Nato smo ohranili koncentracijo BPF konstantno (7,6 mg/L) in spreminjali koncentracijo BPAF: 2 mg/L, 1,4 mg/L, 1,2 mg/L, 0,6 mg/L, 0,4 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L in 0,0075 mg/L (slika 25).



Slika 24 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPF pri konstantni koncentraciji BPAF (2,0 mg/L) po 24 h in 48 h



Slika 25 - Odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPAF pri konstantni koncentraciji BPF (7,6 mg/L) po 24 h in 48 h

Tudi pri mešanici BPAF + BPF se krivulji na grafih (sliki 24 in 25) približno ujemata s krivuljami ostalih mešanic. Pri koncentraciji 2,0 mg/L BPAF in 0,1 mg/L BPF je bilo po 48 urah 20 % vodnih bolh negibnih. V mešanici, kjer smo ohranili konstantno koncentracijo BPF pri 7,6 mg/L, smo morali znižati koncentracijo BPAF na 0,0075 mg/L, da smo prišli do 10 % negibljivosti vodnih bolh po 24 urah (slika 25). Negibljivost vodnih bolh je bila po 48 urah večja pri obeh mešanicah.

4.1.7 Mešanica BPA + BPAF + BPF

Zanimal nas je tudi učinek vseh treh bisfenolov v mešanici na vodne bolhe, zato smo tudi testirali mešanico vseh treh bisfenolov skupaj. Izbrali smo v literaturi navedene izmerjene okoljske koncentracije (MEC) BPA (49), BPF (50) in BPAF (25), ki so znašale: 28 µg/L BPA 0,180 µg/L, BPAF in 15,3 µg/L BPF.

Po 24 oziroma 48 urah so se vse vodne bolhe normalno gibale in so zato te koncentracije pri akutnem testu prenizke, da bi povzročile toksičen učinek. Zato smo se za primerjavo odločili izvesti test, kjer je zagotovo prišlo do toksičnih učinkov in smo nato zniževali koncentracije do netoksičnih koncentracij. Kombinirali smo vrednosti 48 h EC₁₀ vseh treh bisfenolov v mešanici in nato še postopoma zniževali koncentracije na 48 h EC₁, 5-krat manjši 48 h EC₁ in 10-krat manjši 48 h EC₁, da smo prišli do koncentracij, kjer več ni učinka.

Preglednica VI - Delež negibnih vodnih bolh glede na določene koncentracije BPA, BPAF in BPF v mešanici

BPA + BPF + BPAF	Koncentracija	24 h	48 h
		Negibnost [%]	Negibnost [%]
K		0	0
48 h EC₁₀	7,5 mg/L BPA + 2,0 mg/L BPAF + 7,6 mg/L BPF	100	100
48 h EC₁	5,0 mg/L BPA + 1,4 mg/L BPAF + 6,2 mg/L BPF	95	100
48 h $\frac{EC_1}{5}$	2,5 mg/L BPA + 0,7 mg/L BPAF + 3,1 mg/L BPF	15	45
48 h $\frac{EC_1}{10}$	0,5 mg/L BPA + 0,14 mg/L BPAF + 0,62 mg/L BPF	0	10

V mešanici smo uporabili koncentracije, ki predstavljajo vrednosti 48 h EC₁₀ BPA, BPF in BPAF. Kot je razvidno v preglednici VI, je prišlo že po 24 h do maksimalnega učinka, zato smo v preostalih testnih mešanicah uporabili nižje koncentracije. V mešanici, kjer smo

uporabili 5-krat manjše koncentracije 48 h EC₁ (2,5 mg/L BPA, 3,1 mg/L BPF in 0,7 mg/L BPAF), je bilo po 24 h 15 % negibnih vodnih bolh in po 48 h približno 50 % učinek na gibljivost vodnih bolh (EC₅₀). Vse vodne bolhe so bile gibljive pri 10-krat manjši koncentraciji 48 h EC₁ (0,5 mg/L BPA, 0,62 mg/L BPF in 0,14 mg/L BPAF) po 24 urah.

4.2 TEST AKUTNE STRUPENOSTI Z ZARODKI RIB ZEBRIC

Pri ribah zebricah smo strupenost mešanic bisfenolov določali z akutnim testom, kjer smo oplojeno jajčece izpostavili določenim koncentracijam bisfenolov in opazovali učinke na razvoj zarodka v 24 urnih časovnih intervalih do izvalitve.

4.2.1 Določitev vrednosti EC bisfenola A, F in AF

Izvedli smo akutne strupenostne teste, kjer smo ribje zarodke izpostavili različnim koncentracijam posameznih bisfenolov in smo s pomočjo teh rezultatov izračunali vrednosti EC₁₀ in EC₂₀ nekaterih letalnih oziroma subletalnih znakov, katere smo kasneje uporabili v mešanicah.

Za določitev vrednosti EC bisfenola A smo s pomočjo predhodnih raziskav izbrali naslednje koncentracije: 18 mg/L, 16 mg/L, 14 mg/L, 12 mg/L, 10 mg/L, 8,0 mg/L, 6,0 mg/L, 5,5 mg/L, 4,5 mg/L, 4,0 mg/L, 3,5 mg/L in 2,5 mg/L. Vsak dan smo opazovali spremembe v zarodku in po 96 urah končali s preizkusom. Osredotočili smo se predvsem na smrtnost, nepigmentiranost in neizvaljenost. Koncentracija, pri kateri je poginilo 50 % testnih organizmov, je znašala 9,4 mg/L, kar smo primerjali z literaturno vrednostjo (15,2 mg/L), ki je nekoliko višja od naše. Eden izmed izrazitejših znakov je bila nepigmentacija telesa, kjer smo določili 48 h EC₅₀, ki je znašal 5,5 mg/L. Literaturna podatka sta bila 3,2 mg/L in 7,5 mg/L, iz česar je razvidno, da so precej velika nihanja v vrednostih EC₅₀ (biološka variabilnost). Opazovali smo tudi neizvaljenost zarodkov, ki je bila manj zanesljiv znak. Koncentracija, pri kateri se po 96 urah ni izvalilo 50 % zarodkov, je znašala 5,5 mg/L (primerjava z literaturnim podatkom 4,1 mg/L) (45). EC₁₀ in EC₂₀ smo izračunali s pomočjo programa Probit analiza (Probit analizni program Agencije za varstvo okolja v Združenih državah Amerike - USEPA Probit analysis Program, verzija 1.5) in smo jih predstavili v preglednici VII.

Preglednica VII - vrednosti EC nepigmentacije, neizvaljenosti in smrtnosti pri zarodkih izpostavljenim bisfenolu A

	Nepigmentiranost 48 h	Neizvaljenost 96 h	Smrtnost 96 h
EC₁₀/LC₁₀	3,3 mg/L	4,8 mg/L	9,4 mg/L
EC₂₀/LC₂₀	4,0 mg/L	5,0 mg/L	10,3 mg/L

Po enakem postopku smo določili tudi vrednosti EC za bisfenol AF, kjer smo uporabili naslednje koncentracije: 8 mg/L, 5 mg/L, 4 mg/L, 3 mg/L, 2 mg/L in 1 mg/L. Izračunali smo 48 h LC₅₀, ki je znašala 3,6 mg/L (literaturna vrednost za primerjavo je bila 3,0 mg/L) (45). Tako kot pri BPA, smo tudi tukaj opazovali nepigmentiranost (48 h EC₅₀ 2,1 mg/L) in neizvaljenost (96 h EC₅₀ 3,6 mg/L). Izračunane vrednosti EC₁₀ in EC₂₀ so navedene spodaj (preglednica VIII).

Preglednica VIII - vrednosti EC nepigmentacije, neizvaljenosti in smrtnosti pri zarodkih izpostavljenim bisfenolu AF

	Nepigmentiranost 48 h	Neizvaljenost 96 h	Smrtnost 96 h
EC₁₀ /LC₁₀	1,0 mg/L	1,2 mg/L	2,8 mg/L
EC₂₀/LC₂₀	1,3 mg/L	1,4 mg/L	3,0 mg/L

Pri testu, kjer smo ribje zarodke izpostavili bisfenolu F, smo uporabili koncentracije: 0,01 mg/L, 2,0 mg/L, 1,2 mg/L, 1,0 mg/L, 0,9 mg/L, 0,6 mg/L, 0,3 mg/L in 0,1 mg/L. Prišlo je do zelo raznolikih rezultatov kljub večkratni ponovitvi tega testa, zato je bilo težje določiti vrednost EC nepigmentiranosti. S programom Probit analiza smo izračunali koncentracijo EC₁₀, ki je znašala 0,7 mg/L. Navedene koncentracije so bile prenizke in niso imele letalnega učinka na testirane organizme, medtem ko je bila neizvaljenost nezanesljiv znak.

4.2.2 Mešanica BPA + BPAF

Izvedli smo test, kjer smo kombinirali LC₁₀ BPA in BPAF in LC₂₀ BPA in BPAF. Že po 24 urah je pri vseh zarodkih prišlo do letalnih znakov, zato smo se odločili, da bomo vzeli koncentracijo enega bisfenola konstantno, in zniževali koncentracijo drugega bisfenola, da bomo prišli do koncentracij, kjer je manjši učinek. Tako smo ohranili koncentracijo BPA konstantno (9,4 mg/L) in smo uporabili naslednje koncentracije BPAF: 2,2 mg/L, 1,9 mg/L, 1,6 mg/L, 1,3 mg/L, 1,0 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L in 0,05 mg/L (preglednica IX). Pri drugem poskusu smo pa ohranili koncentracijo BPAF konstantno (2,8 mg/L) in uporabili naslednje koncentracije BPA: 7,5 mg/L, 7,0 mg/L, 6,0 mg/L, 5,0 mg/L, 4,0 mg/L, 3,0 mg/L in 1,0 mg/L (preglednica X). Opazovali smo nepigmentiranost po 48 urah v primerjavi z 72 urami – pri normalno razvitih zarodkih se pigmentacija pojavi po 48 urah. Pri nekaterih koncentracijah so bili zarodki po 48 urah še nepigmentirani, vendar se je pigmentacija normalno izrazila po 72 urah. Izvaljenosti nismo predstavili v preglednici, ker so bile koncentracije previsoke in se nobeden izmed zarodkov ni izvalil v raziskovanem časovnem intervalu. Poglavitni znak, ki smo ga pri mešanicah teh koncentracij opazovali, je bila smrtnost, ki je z zniževanjem koncentracije padala.

Preglednica IX - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPA (9,4 mg/L)

Konc. BPAF	Nepigmentiranost 48 h	Nepigmentiranost 72 h	Nepigm. oči 48 h	Nepigm. oči 72 h	Smrtnost 96 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	0	0	0	0	0
0,05	0	0	0	0	0
0,1	0	0	0	0	0
0,5	40	10	60	10	40
1,0	90	30	80	30	30
1,3	80	30	80	30	30
1,6	100	90	100	90	70
1,9	100	90	100	90	80
2,2	100	80	100	80	100

Preglednica X - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPAF (2,8 mg/L)

Konc. BPA	Nepigmentiranost 48 h	Nepigmentiranost 72 h	Nepigm. oči 48 h	Nepigm. oči 72 h	Smrtnost 96 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	0	0	0	0	0
1,0	20	0	10	0	0
3,0	10	0	50	20	0
4,0	20	10	40	10	20
5,0	90	70	90	70	70
6,0	90	50	100	50	60
7,0	100	60	100	60	70
7,5	100	100	100	100	90

Prav tako smo izvedli test, kjer smo izbrali koncentracijo BPA EC₁₀ nepigmentiranosti konstantno (3,3 mg/L) in uporabili naslednje koncentracije BPAF: 0,9 mg/L, 0,6 mg/L, 0,3 mg/L in 0,1 mg/L (preglednica XI). Pri drugem poskusu smo pa imeli konstantno koncentracijo BPAF (1,0 mg/L) - EC₁₀ nepigmentiranosti in uporabili naslednje koncentracije BPA: 3,0 mg/L, 2,0 mg/L in 1,0 mg/L (preglednica XII). Kot je razvidno iz preglednic XI in XII, nima mešanica bisfenolov bistvenega učinka na pigmentacijo, saj skoraj ni razlike med testom, kjer smo uporabili en bisfenol, in testom, kjer smo uporabili mešanico dveh bisfenolov (BPA + BPAF). Pri koncentraciji BPAF 1,0 mg/L je bilo nepigmentiranih 10 % zarodkov, medtem ko je pri mešanici 0,9 mg/L BPAF in 3,3 mg/L BPA (ta koncentracija predstavlja EC₁₀ nepigmentacije pri BPA) bilo nepigmentiranih 14 % zarodkov. Učinek mešanic bisfenolov je torej bolj izrazit pri višjih koncentracijah, kjer smo uporabili vrednosti LC₅₀, kot pri nižjih koncentracijah.

Preglednica XI - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPA (3,3 mg/L)

Konc. BPAF	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 48 h	Nepigm. oči 48 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]
K	10	0	0
0,1	0	0	0
0,3	0	0	0
0,6	28	14	14
0,9	25	12,5	0

Preglednica XII - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPAF (1,0 mg/L)

Konc. BPA	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 96h	Nepigm. oči 96h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]
K	10	0	0
1,0	12,5	0	0
2,0	12,5	0	0
3,0	25	0	0

4.2.3 Mešanica BPA + BPF

Kombinirali smo vrednosti EC_{10} oziroma nižje koncentracije za nepigmentacijo. Koncentracijo BPF smo ohranili konstantno pri 0,7 mg/L in uporabili koncentracije BPA: 3,3 mg/L, 2,6 mg/L, 1,7 mg/L in 0,9 mg/L (preglednica XIII). V drugem poskusu smo ohranili koncentracijo BPA konstantno pri 3,3 mg/L in uporabili koncentracije BPF: 3 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,0 mg/L, 0,7 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L in 0,001 g/L (preglednica XIV). Zaradi precej neponovljivih rezultatov smo večkrat opravili test s koncentracijo 1,0 mg/L BPF (v preglednici XIV smo predstavili rezultat pri koncentraciji 1,0 mg/L dvakrat). V nekaterih testih so bili zarodki pri koncentraciji 1,0 mg/L BPF normalno pigmentirani po 48 urah, v drugih testih pa so bili zarodkih po 48 urah še popolnoma nepigmentirani in se je pigmentiranost začela pojavljati šele po 72 urah. Pri tem testu smo tudi spremljali prisotnost edema, vendar je prisotnost edema pri nižjih koncentracijah glede na rezultate v spodnjih tabelah precej nihala, medtem ko je bil edem pri višjih koncentracijah jasno odvisen od koncentracije. Pri testu, kjer smo imeli konstantno koncentracijo BPF, so se vsi zarodki

pigmentirali, medtem ko je spreminjanje koncentracije BPF pri konstantni koncentraciji BPA imelo večji učinek na pigmentacijo (preglednica XIV).

Preglednica XIII - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPA in konstantni koncentraciji BPF (0,7 mg/L)

Konc. BPA	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 48 h	Nepigm. oči 48 h	Edem 48 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	70	0	0	0
0,9	70	0	0	0
1,7	70	0	0	0
2,6	40	0	0	0
3,3	10	0	0	0

Preglednica XIV - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPF in konstantni koncentraciji BPA (3,3 mg/L)

Konc. BPF	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 48 h	Nepigm. oči 48 h	Edem 48 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	0	0	0	0
0,001	86	0	0	29
0,01	78	0	0	0
0,1	29	0	0	14
0,5	62,5	0	0	14
0,7	/*	0	0	0
1,0	87,5	0	0	0
1,0	87,5	78	100	25
1,5	78	100	100	25
2,0	67	100	100	56
3,0	87,5	100	100	75

* Pri vrednosti 0,7 mg/L BPF ni podatka.

4.2.4 Mešanica BPF + BPAF

Tudi pri kombinaciji BPF in BPAF smo izbrali vrednosti EC₁₀ za nepigmentacijo. Koncentracijo BPF smo ohranili konstantno pri 0,7 mg/L in zniževali koncentracije BPAF: 1,0 mg/L, 0,5 mg/L in 0,1 mg/L (preglednica XV). Enako smo storili tudi pri konstantnem BPAF (1,0 mg/L) in zniževanju BPF: 3 mg/L, 2 mg/L, 1,5 mg/L, 1,0 mg/L, 0,7 mg/L, 0,5

mg/L, 0,1 mg/L, 0,01 mg/L in 0,001 mg/L (preglednica XVI). Kot pri mešanici BPA + BPAF smo tudi tukaj večkrat ponovili test s koncentracijo 1,0 mg/L BPF, kjer so bili vsi zarodki po 48 urah normalno pigmentirani ali pa so imeli vsi zarodki nepigmentirano telo in oči. Lahko sklepamo, da ima BPF najmočnejši učinek na pigmentacijo in gre predvsem za popolno prisotnost oziroma odsotnost pigmentacije namesto postopnega upada pigmentacije, kot se je recimo zgodilo pri višjih koncentracijah v mešanici BPA + BPAF. Pri višjih koncentracijah smo zaznali večjo možnost pojava edema, vendar ta ni bil najbolj zanesljiv znak, tako kot neizvaljenost (v kontroli 70 %).

Preglednica XV - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPAF in konstantni koncentraciji BPF (0,7 mg/L)

Konc. BPAF	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 48 h	Nepigm. oči 48 h	Edem 48 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	70	0	0	0
0,1	100	0	0	0
0,5	50	0	0	0
1,0	70	0	0	0

Preglednica XVI - Delež zarodkov, pri katerem se je izrazil določen znak v mešanici ob različnih koncentracijah BPF in konstantni koncentraciji BPAF (1,0 mg/L)

Konc. BPF	Neizvaljenost 96 h	Nepigmentiranost 48 h	Nepigm. oči 48 h	Edem 48 h
[mg/L]	[%]	[%]	[%]	[%]
K	0	0	0	0
0,001	40	0	0	10
0,01	38	0	0	0
0,1	29	0	0	0
0,5	20	0	0	0
0,7	/	0	0	0
1,0	30	0	0	0
1,0	30	100	100	60
1,5	20	100	100	30
2,0	44	100	100	33
3,0	66	100	100	33

* Pri vrednosti 0,7 mg/L BPF ni podatka.

Kot lahko vidimo iz zbranih podatkov v preglednicah XI – XVI, je pri vseh mešanicah neizvaljenost precej nezanesljiv znak, ki je domnevno neodvisen od koncentracije. Lahko da so bili zarodki izpostavljeni neoptimalnim pogojem in se zaradi tega niso izvalili, vendar tega nismo opazili v teku naših preizkušanj. Najbolj zanesljiva znaka sta bila smrtnost pri višjih koncentracijah in pigmentacija ob prisotnosti BPF.

5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo preverjali učinke mešanic bisfenolov (bisfenol A, F in AF) na vodne bolhe in zarodke rib zebrič pri koncentracijah, ki so predstavljale vrednosti EC_{10} različnih opazovanih učinkov oziroma posledično nižjih koncentracijah, ker je bil učinek pri teh vrednostih maksimalen. Naša raziskava je temeljila na ugotovitvi vrednosti EC posameznih bisfenolov in nato kombiniranju teh koncentracij med sabo. Bisfenol A, F in AF so široko uporabljene kemikalije v proizvodnji, industriji in predelavi hrane. V preteklih raziskavah so bile raziskave usmerjene v določanje akutne strupenosti s testi na zarodke rib zebrič in vodnih bolh s posameznimi bisfenoli, medtem ko z mešanici še ni bilo izvedenih raziskav, čeprav je velika verjetnost, da so organizmi v okolju hkrati izpostavljeni dvema ali več hormonskim motilcem hkrati.

V prejšnjem poglavju smo predstavili rezultate učinka mešanic bisfenolov na vodne bolhe v obliki tabel in grafov. Med seboj smo zmešali spojine (bisfenol A, F in AF) in njihove mešanice (BPA + BPAF, BPA + BPF in BPAF+ BPF) v koncentracijah, ki so povzročile 24 h oziroma 48 h EC_{10} in EC_{20} učinek na gibljivost vodnih bolh. Pri vseh navedenih mešanicah koncentracij, ki predstavljajo 24 h / 48 h EC_{20} in EC_{10} , je bil 100 % učinek na gibljivost vodnih bolh dosežen po 48 urah. Naša predpostavka je bila, da če smo zmešali koncentracijo BPA, pri kateri pride do učinka na 10 % testiranih organizmov in koncentracijo BPAF, pri kateri prav tako pride do učinka na 10 % testiranih organizmov, bo pri mešanici prišlo do 20 % učinka, vendar je v vseh naših testih prišlo do 100 % odziva. Iz tega smo sklepali, da ne gre za aditiven (skupen učinek je enak seštevku učinka vsake posamezne učinkovine oziroma spojine), ampak sinergističen učinek (skupen učinek dveh učinkovin je večji kot seštevku učinka vsake posamezne učinkovine oziroma spojine). Izvedli smo nadaljnje teste, kjer smo uporabili koncentracije enega izmed bisfenolov, pri katerih je bil manjši učinek. Zanimalo nas je, koliko nižje koncentracije moramo uporabiti, da dobimo učinek, ki bo enak 20 % odzivu ob kombinaciji dveh bisfenolov, če uporabimo enega pri konstantni koncentraciji. Pri kombinaciji BPA + BPAF je bil ta učinek dosežen pri 2,0 mg/L BPAF (kar predstavlja 48 h EC_{10} BPAF) in 0,1 mg/L BPA (kar predstavlja 75-krat nižjo koncentracijo 48 h EC_{10} BPA) (slika 20) oziroma pri 7,5 mg/L BPA (kar predstavlja vrednost 48 h EC_{10} BPA) in 0,005 mg/L (kar predstavlja 400-krat nižjo koncentracijo 48 h EC_{10} vrednosti BPAF) (slika 21). Kot vidimo, ima v mešanici BPAF bistveno močnejši učinek kot BPA, saj smo morali koncentracijo BPAF znižati na veliko nižjo koncentracijo, da smo prišli do enakega učinka na

vodne bolhe. Če ta rezultat primerjamo z mešanico BPF + BPAF in naredimo enak povzetek rezultatov - pri katerih koncentracijah bo učinek na 20 % vodnih bolh - dobimo naslednje vrednosti: 2,0 mg/L BPAF in 0,1 mg/L (kar predstavlja 76-krat nižjo koncentracijo 48 h EC₁₀ BPF) (slika 24) oziroma 7,6 mg/L BPF + 0,1 mg/L BPAF (kar predstavlja 20-krat nižjo koncentracijo 48 h EC₁₀ BPAF) (slika 25). Iz tega lahko sklepamo, da ima BPAF v kombinaciji z BPF manjšo toksičnost na testirane organizme kot BPAF z BPA. Pri konstantni koncentraciji BPAF 2,0 mg/L smo morali koncentracijo bisfenola A in F znižati približno 75-krat, da smo dobili odziv pri 20 % vodnih bolh. Razlika pri znižanju koncentracije BPAF je veliko bolj izrazita, saj smo pri konstantni koncentraciji 7,5 mg/L morali koncentracijo BPAF znižati 400-krat, pri BPF pa le 20-krat, kar smo navezali na dejstvo, da ima mešanica bisfenola A in AF močnejši učinek na vodne bolhe kot mešanica bisfenola F in AF. Pri mešanici bisfenola A in F smo dobili podobne rezultate: učinek na 20 % organizmov smo dosegli pri koncentraciji 7,5 mg/L BPA (EC₁₀) + 0,1 mg/L BPF (kar predstavlja 76-krat manjšo koncentracijo od 48 h EC₁₀ za BPF) (slika 23) oziroma 7,6 mg/L BPF (EC₁₀) + 0,1 mg/L BPA (kar predstavlja 75-krat manjšo koncentracijo od 48 h EC₁₀ za BPF) (slika 22). Glede na ta rezultat lahko sklepamo, da imata bisfenol A in F približno enakovreden učinek v mešanici. Najmočnejši učinek je torej predstavljal mešanica, ki je vsebovala BPAF. To smo si razlagali s strukturo bisfenola AF, ki ima vodikove atome zamenjane s fluorovimi. Fluorovi atomi v spojini imajo vpliv na lipofilne, elektronske in sterične parametre s posledičnim vplivom na farmakodinamiko in farmakokinetiko. Vezi med ogljikom in fluorom so veliko močnejše kot vezi med ogljikom in vodikom (bisfenol A) in s tem zagotavljajo večjo oksidativno in termično stabilnost spojin. Zaradi sposobnost podaljšanja biološke razpolovne dobe imajo fluorove skupine možnost izboljšave presnovne stabilnosti molekul. S tem ko povečamo lipofilnost molekule se poveča biorazpoložljivost in bioakumulacija v organizmih, kar posledično vpliva na močnejše strupene učinke bisfenola AF v primerjavi z ostalima dvema (51).

Da bi ponazorili tudi pogoje v realni situaciji, smo v literaturi poiskali podatke o okoljskih koncentracijah bisfenolov A (28 µg/L), F (15,3 µg/L) in AF (0,180 µg/L) in jih med seboj kombinirali in tej mešanici izpostavili vodne bolhe, vendar ni bilo učinka na vodne bolhe, vsaj ne pri akutnem testu. Možno je, da bi pri kroničnem testu dobili drugačne rezultate. Pri kombinaciji vrednosti EC₁₀ bisfenola A, F in AF je bil 100 % učinek (glede na to, da je bil 100 % učinek že pri mešanici z le dvema bisfenoloma). Za primerjavo, kjer smo uporabili vse tri bisfenole v mešanici, smo do 10 % učinka prišli pri koncentracijah bisfenolov, ki so

predstavljale 10-krat manjšo vrednost EC_1 (preglednica VIII). Do 10 % učinka je prišlo v mešanici, ki je vsebovala 0,14 mg/L BPAF (kar je 1000-krat višja koncentracija od izmerjene v okolju), 0,5 mg/L BPA (20 x višja koncentracija od izmerjene v okolju) in 0,62 mg/L BPF (50 x višja koncentracija od izmerjene v okolju). Glede na te rezultate lahko vidimo, da pri koncentracijah, katerim bi lahko bili izpostavljeni (koncentracije, izmerjene v okolju), niso dovolj visoke, da bi lahko imele škodljive učinke na vodne bolhe oziroma posledično tudi ljudi, vsaj ne v okviru akutne izpostavljenosti.

Čeprav so koncentracije, pri katerih imajo mešanice bisfenolov učinek na vodne bolhe, veliko višje kot najdene v okolju, smo z magistrsko nalogo še vedno pokazali, da obstaja sinergističen učinek med bisfenoli in bi bilo v prihodnosti potrebno izvesti nadaljnje raziskave in raziskati učinke mešanic, kjer je prisotnih več hormonskih motilcev hkrati, v daljših časovnih obdobjih izpostavljenosti (kronične raziskave).

Pri akutnem testu na zarodkih rib zebrič smo opazovali smrtnost in različne subletalne znake med razvojem zarodkov (pigmentacija telesa in oči, izvaljenost, prisotnost edema so bili najpogostejši znaki). Medtem ko nam je pri bisfenolu A in AF uspelo določiti smrtnost, so bile koncentracije pri bisfenolu F prenizke. Če bi izvedli teste pri višjih koncentracijah bisfenola F, bi bili rezultati nerelevantni zaradi visokih koncentracij, ki jih v okolju ni. Tako smo izvedli akutni test z zebričami, kjer smo kombinirali le vrednost 96 h LC_{10} bisfenola A in AF in pri tem ugotovili, da je prišlo do letalnih učinkov že po 24 urah, zato smo v prihodnjih testih te koncentracije znižali. Tudi tukaj smo predpostavljali, da če smo v raztopini uporabili koncentracijo bisfenola A, pri kateri pride do letalnega učinka na 10 % zarodkov in koncentracijo bisfenola AF, pri kateri pride prav tako do letalnega učinka na 10 % zarodkov, bi morali dobiti rezultat, kjer bi prišlo do smrtnosti pri 20 % zarodkov. Ker je bila pri uporabi kombinacije bisfenolov dosežena smrtnost na vseh organizmih, smo sklepali, da je to posledica sinergističnega učinka bisfenola A in bisfenola AF, tako kot pri vodnih bolhah. Do 20 % smrtnosti je prišlo pri koncentraciji 2,8 mg/L BPAF (kar predstavlja vrednost 96 h LC_{10} BPAF) + 4,0 mg/L BPA (kar predstavlja 2,35-krat manjšo koncentracijo od 96 h LC_{10} za BPA) (preglednica X). Če naredimo primerjavo z vodnimi bolhami je veliko manjša razlika v koncentraciji (nismo rabili izrazito zniževati koncentracij, da smo prišli do koncentracij, kjer več ni učinka), iz česar lahko sklepamo, da je mešanica BPA + BPAF bolj toksična za vodne bolhe kot zarodke rib zebrič. To si lahko razlagamo s tem, da zarodke ščiti ovojnica, medtem ko so vodne bolhe bolj izpostavljene tem spojinam, ker filtrirajo raztopino. Vodne bolhe so nam prav tako dale jasnejši pogled na učinek mešanic bisfenolov kot zarodki zebrič.

Nato smo izvajali teste z nižjimi koncentracijami (vrednosti 48 h EC₁₀ pigmentacije BPA, BPF in BPAF), kjer smo predvsem opazovali subletalne učinke mešanic na razvoj zarodkov. Eden izmed teh znakov je bila pigmentacija. V mešanicah, kjer smo uporabili bisfenol F, smo imeli težave z določanjem pigmentacije, saj je prihajalo do zelo raznolikih rezultatov, kljub večkratni ponovitvi testov. Sklepali smo, da ima bisfenol F najmočnejši vpliv na pigmentacijo, saj ob konstantni koncentraciji BPF (0,7 mg/L, kar smo določili za EC₁₀ pigmentacije) spreminjanje koncentracije BPA ali BPAF ni imelo vpliva na pigmentiranost (preglednici XIII in XV), medtem ko se je pri konstantni koncentraciji BPA ali BPAF pogostost ob različnih koncentracijah BPF spreminjala (preglednici XIV in XVI). Potrebno je omeniti, da pri pigmentaciji zarodkov ob prisotnosti bisfenola F ni prišlo do postopnega pojava nepigmentacije, ampak je bil ta preskok iz popolne nepigmentiranosti zarodka v popolnoma normalno pigmentiranost. Najbolj variabilni so bili rezultati pri koncentraciji 1,0 mg/L BPF ob konstantni koncentraciji 1,0 mg/L BPAF ali 3,3 mg/L BPA, saj je prišlo do prej omenjene situacije – pri enem testu je prišlo pri isti koncentraciji 1,0 mg/L BPF po 48 urah do popolne pigmentiranosti, medtem ko je pri drugem testu prišlo do popolne nepigmentiranosti po 48 urah. Zarodki pri 1,0 mg/L BPF, ki so bili po 48 urah 100 % nepigmentirani, so se normalno pigmentirali po 72 urah, torej lahko sklepamo na učinke bisfenolov, ki povzročijo zakasnitev v razvoju. Pigmentacija pri mešanici BPA + BPAF (48 h EC₁₀ pigmentacije) ni imela bistvenega pomena in je bila normalno izražena. V akutnih testih z zarodki rib zebri smo opazovali tudi izvalitev, vendar je bila precej nezanesljiva, saj je bila koncentracijsko neodvisna, predvsem pri nižjih koncentracijah. Nismo našli razlage za takšne razlike v neizvaljenosti zarodkov. Opazovali smo tudi pojav edema, ki je bil v večini naših testov koncentracijsko odvisen, vendar ne toliko jasen znak kot smrtnost oziroma pigmentacija.

Rezultati, ki smo jih v naši magistrski nalogi pridobili, nam lahko koristijo za nadaljnje raziskave, ki so na področju mešanic bisfenolov oziroma na splošno hormonskih motilcev potrebne. Do zdaj je izvedenih zelo malo raziskav z mešanicami in njihovih učinkov na organizme in tudi raziskav, kjer bi raziskovali učinek mešanic bisfenolov nismo zasledili. Čeprav smo teste izvajali pri koncentracijah, ki zaenkrat še niso prisotne v okolju, smo vseeno dokazali spremenjen (povečan) učinek mešanic na vodne bolhe in ribe zebri. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave na področju bolj dolgoročnih raziskav (kronični testi), da bi se opazil učinek, ki bi ga lahko mešanice imele tudi pri nižjih koncentracijah, ob dolgoročni izpostavitvi organizmov tem koncentracijam.

6 SKLEP

V okviru te magistrske naloge smo preverjali učinek mešanic bisfenolov A, F in AF na vodne bolhe in zarodke rib zebric. Naše rezultate smo primerjali s hipotezami, ki smo si jih zastavili v poglavju o namenu dela, in prišli do naslednjih ugotovitev:

- ❖ Lahko potrdimo hipotezo, da posamezni bisfenoli izzovejo učinke pri različnih koncentracijah. Ugotovili smo, da BPAF dosega učinek na vodne bolhe in zebrice pri nižjih koncentracijah, kot BPA oziroma BPF.
- ❖ Mešanice bisfenolov dosega enak učinek pri veliko nižjih koncentracijah kot posamezen testiran bisfenol. Gre za sinergističen učinek (skupen učinek dveh učinkovin je večji kot seštevek učinka vsake posamezne učinkovine). S tem lahko zavržemo hipotezo, kjer smo predpostavili, da imajo mešanice bisfenolov A, F in AF aditiven učinek na gibljivost vodnih bolh in smrtnost oziroma subletalne učinke na zarodke zebric.
- ❖ Bisfenol F je odločilen pri pigmentaciji zarodkov in dosega enak učinek pri veliko nižjih koncentracijah kot bisfenola A in AF.
- ❖ Vodne bolhe so občutljivejše na učinke mešanic bisfenolov, učinek se pojavi pri veliko nižjih koncentracijah kot pri zarodkih zebric. Primer: pri vodnih bolhah je bil 20 % učinek na negibljivost pri 0,1 mg/L BPA in 2,0 mg/L BPAF, medtem ko je bila pri zarodkih 20 % smrtnost pri 4,0 mg/L BPA in 2,8 mg/L BPAF.
- ❖ Pri zarodkih zebric pride do zakasnelega razvoja (pigmentacija je eden izmed očitnejših znakov).
- ❖ BPAF ima v mešanici najmočnejši učinek, medtem ko imata BPA in BPF v mešanicah približno enak učinek na vodne bolhe. S tem lahko potrdimo našo zadnjo hipotezo, kjer smo predpostavili, da mešanice, ki vsebujejo BPAF izzovejo učinek pri nižjih koncentracijah, kot mešanice brez BPAF.

7 LITERATURA

1. Endocrine disrupting chemicals (EDCs). *World Health Organization*. 2017. Dostopno na strani: <http://www.who.int/ceh/risks/cehemerging2/en/>. Datum dostopa: 3. marec 2017.
2. Diamanti-Kandarakis E, et al. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*. 2009;30(4):293-342.
3. Cao Y, Calafat AM, Doerge DR, et al. Isoflavones in urine, saliva and blood of infants - data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2009;19(2):223-234.
4. Endocrine disruptors. *Niehs.nih.gov*. 2017. Dostopno na strani: <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/>. Datum dostopa: 3. marec 2017.
5. J Tao, Sun LX, Le XC. Study of the effects on bisphenol A using human fetal lung fibroblasts. *Journal of Environmental Sciences*. 2016;48:6-10.
6. Im J, Löffler F. Fate of bisphenol A In terrestrial and aquatic environments. *Environmental Science & Technology*. 2016;50(16):8403-8416.
7. LaKind JS, Naiman DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005–2006 national health and nutrition examination survey. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 2010;21(3):272-279.
8. Liao C, Kannan K. Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*. 2011;45(21):9372-9379.
9. Petersen GA, Søren H, Højslev J. Migration of bisphenol A from polycarbonate plastic of different qualities. 2015. Dostopno na strani: <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2015/05/978-87-93352-24-7.pdf>. Datum dostopa: 22. maj 2017.
10. Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects and policy: A

- wildlife perspective. *Journal Of Environmental Management*. 2012;104:19-34.
11. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006;254-255:179-168.
 12. Nahar M, Liao C, Kannan K, Harris C, Dolinoy D. In utero bisphenol A concentration, metabolism, and global DNA methylation across matched placenta, kidney, and Liver in human fetus. *Chemosphere*. 2015;124:54-60.
 13. Padmanabhan V, et al. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *Journal of Perinatology*. 2008;28(4):258-263.
 14. Vandenberg L, Ehrlich S, Belcher S, et al. Low dose effects of bisphenol A. *Endocrine Disruptors*. 2013;1(1):e26490.
 15. Michałowicz J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2014;37(2):738-758.
 16. Lee DW, Oh WY, Yi SH, et al. Estimation Of Bisphenol A - Human toxicity by 3D cell culture arrays, high throughput alternatives to animal tests. *Toxicology Letters*. 2016;259:87-94.
 17. Gramec Skledar D, Peterlin Mašič L. Bisphenol A and its analogs: do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016;47:182-199.
 18. Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-Dichlorophenol, and 2-Hydroxy-4-Methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005;383(4):638-644.
 19. Provencher G, Bérubé R, Dumas P, et al. Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2014;1348:97-104.

20. Huang GM, Tian XF, Fang XD, Ji FJ. Waterborne exposure to bisphenol F causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Chemosphere*. 2016;147:188-194.
21. Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran MT. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2011;683(2):227-233.
22. Liao C, Liu F, Alomirah H, et al. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: Occurrence and Human Exposures. *Environmental Science & Technology*. 2012;46(12):6860-6866.
23. Fic A, Žegura B, Gramec D, Mašič L. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the xenoscreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere*. 2014;112:362-369.
24. Stout, M.D. National Toxicology Program (NTP) Research Concept: Bisphenol AF. 2008. Dostopno na strani: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_5_08.pdf. Datum dostopa: 3. marec 2017.
25. Song S, et al. Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. *Environmental Science & Technology*. 2012;46(24):13136-13143.
26. Kwon B, Kho Y, Kim P, Ji K. Thyroid endocrine disruption in male zebrafish following exposure to binary mixture of bisphenol AF and sulfamethoxazole. *Environmental Toxicology And Pharmacology*. 2016;48:168-174.
27. Li M, Yang Y, Yang Y, et al. Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *PLoS ONE*. 2013;8:12.
28. Hadrup N, Taxvig C, Pedersen M, Nellemann C, Hass U, Vinggaard A. Concentration addition, independent action and generalized concentration addition models for mixture effect prediction of sex hormone synthesis in vitro. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e70490.
29. Monosson E. Chemical mixtures: considering the evolution of toxicology and chemical assessment. Dostopno na strani:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1278475/>. Datum dostopa: 13. april 2017
30. Liu Y, Vijver M, Qiu H, Baas J, Peijnenburg W. Statistically significant deviations from additivity: What do they mean in assessing toxicity of mixtures? *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;122:37-44.
 31. Loewe S, Muischnek H. Über Kombinationswirkungen. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1926;114(5-6):313-326.
 32. Bliss C. The Toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology*. 1939;26(3):585-615.
 33. Kienzler A, Bopp S, van der Linden S, Berggren E, Worth A. Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2016;80:321-334.
 34. Spurgeon D, Jones O, Dome J, Svendsen C, Swain S, Stürzenbaum S. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Science of The Total Environment*. 2010;408(18):3725-3734.
 35. Daphnia Magna. *Cfbunhedu*. 2017. Dostopno na strani: http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladorocera/FDaphnidae/GDaphnia/Daphnia_magna/daphniamagna.html. Datum dostopa: 3. marec 2017.
 36. Ebert D. Introduction to Daphnia biology. *Ncb.nlm.nih.gov*. 2017. Dostopno na strani: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>. Datum dostopa: 3. marec 2017.
 37. Daphnia Magna. *Animal Diversity Web*. 2017. Dostopno na strani: http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/. Datum dostopa: 3. marec 2017.
 38. Vodne bolhe (Daphnia sp.). *ZGD*. Dostopno na strani: <http://www.zgd.si/vodne-bolhe-daphnia-sp/>. Datum dostopa: 3. marec 2017.
 39. Seda J, Petrusek A. Daphnia as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *Journal of Limnology*. 2011(70):337-344.

40. Danio rerio (Rerio). *Animal Diversity Web*. 2017. Dostopno na strani: http://animaldiversity.org/accounts/Danio_rerio. Datum dostopa: 3. marec 2017.
41. An Introduction to the Zebrafish: Danio Rerio | Society for Mucosal Immunology. *Society for Mucosal Immunology*. Dostopno na strani: <http://www.socmucimm.org/introduction-zebrafish-danio-rerio/>. Datum dostopa: 26. marec 2017
42. Jemec A, Tišler T. Določanje strupenosti onesnaževal na zarodke rib zebrič Danio rerio = Toxicity evaluation of pollutants to zebrafish (Danio rerio). V: Glavič P (ur.), Brodnjak-Vončina D (ur.). Slovenski kemijski dnevi 2008, Maribor, 25. in 26. september 2008 : [zbornik referatov]. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008, str. 1-9.
43. Why use the zebrafish in research? *Yourgenome.org*. 2017. Dostopno na strani: <http://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-zebrafish-in-research>. Datum dostopa: 3. marec 2017.
44. *Imcba-staredusg*. Dostopno na strani: <http://www.imcb.a-star.edu.sg/php/ittd-i-zff-wz.php>. Datum dostopa: 26. marec 2017
45. Tišler T, Krel A, Gerželj U, Erjavec B, Dolec M, Pintar A. Hazard identification and risk characterization of bisphenols A, F and AF to aquatic organisms. *Environmental Pollution*. 2016;212:472-479.
46. Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2006;64:49-55.
47. Jemec A, Tišler T, Erjavec B, Pintar A. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;86:213-218.
48. Plahuta M, Tišler T, Toman JM, Pintar A. Efficiency of advanced oxidation processes in lowering bisphenol A toxicity and oestrogenic activity in aqueous samples. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2014;65:77-87.

49. Yamamoto T, Yasuhara A, Shiraishi HANO. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere*. 2001(42):415-418.
50. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Müller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*. 2002;36(6):1429-1438.
51. Khetan SK, Collins TJ. Human Pharmaceuticals In The Aquatic Environment: A Challenge To Green Chemistry. *Chem Rev*. 2007;107(6):2319-2364.
52. Liao C, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(19):4655-4662.