

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA GERŽELJ  
MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA GERŽELJ

DOLOČANJE KRONIČNE STRUPENOSTI BISFENOLOV A, F IN AF NA ALGAH IN  
RAKIH

ESTIMATING THE CRONICAL TOXICITY OF BISPHENOLS A, F AND AF ON ALGAE  
AND CRUSTACEANS

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Kemijskem inštitutu pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Tatjane Tišler. Vse kronične teste, spektroskopske in druge meritve smo opravili na Kemijskem inštitutu, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

*Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za vso pomoč in usmerjanje pri pisanju magistrske naloge. Zahvala gre tudi dr. Tatjani Tišler za pomoč in nasvete pri izvedbi praktičnega dela in pisanju magistrske naloge ter ostalim sodelavcem Laboratorija za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu, še posebej Maji Plahuta. Posebej se zahvaljujem tudi svoji družini za vso podporo v času študija.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Tatjane Tišler.

Ljubljana, 2015

Urška Gerželj

# KAZALO

<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>v</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>v</b>
<b>KAZALO GRAFOV</b> .....	<b>v</b>
<b>KAZALO PRILOG</b> .....	<b>vi</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. ENDOKRINI SISTEM</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. HORMONSKI MOTILCI</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3. BISFENOLI</b> .....	<b>3</b>
1.3.1. BISFENOL A .....	3
1.3.2. BISFENOL AF .....	5
1.3.3. BISFENOL F .....	7
<b>1.4. PRISOTNOST ORGANSKIH ONESNAŽIL, BPA IN ANALOGOVI V POVRŠINSKIH IN PODZEMNIH VODAH</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5. Učinki hormonskih motilcev na vodne organizme</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6. Učinki hormonskih motilcev na človeka</b> .....	<b>11</b>
<b>1.7. EKOTOKSIKOLOŠKI TESTI STRUPENOSTI</b> .....	<b>13</b>
1.7.1. UPORABA TESTNIH ORGANIZMOV V TESTIH STRUPENOSTI .....	14
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. PRIPRAVA RAZTOPIN PREISKOVANIH SPOJIN IN MEDIJEV</b> .....	<b>17</b>
3.1.1. Priprava BPA/BPF/BPAF raztopin .....	17
3.1.2. Priprava medija M4 .....	18
3.1.3. Priprava medija po Jaworskem .....	20
3.1.4. Priprava ISO ravnega medija: .....	20
3.1.5. Priprava koncentriranega ISO ravnega medija: .....	20
<b>3.2. TEST ZA DOLOČANJE KRONIČNE STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI (<i>Daphnia magna</i>)</b> .....	<b>21</b>
3.2.1. Gojenje vodnih bolh .....	21

3.2.2. Potek testa .....	21
<b>3.3. TEST KRONIČNE STRUPENOSTI Z ZELENIMI ALGAMI (<i>Desmodesmus subspicatus</i>).....</b>	<b>23</b>
3.3.1. Gojenje alg .....	23
3.3.2. Potek testa .....	23
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1. Testi kronične strupenosti z vodnimi bolhami.....	28
4.2. Test kronične strupenosti z zelenimi algami .....	35
4.2.1. Rezultati podani glede na merjenje fluorescence.....	35
4.2.2. Rezultati podani glede na preštete alge pod mikroskopom .....	37
<b>5. Sklep .....</b>	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>43</b>
<b>PRILOGE.....</b>	<b>50</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula bisfenola A.....	4
Slika 2: Reakcija proizvodnje BPA.....	4
Slika 3: Strukturna formula BPAF.....	6
Slika 4: Strukturna formula BPF.....	7
Slika 5: Štetje v Bürkerjevi kamrici .....	24
Slika 6: Delovanje fluorescenčnega spektrofotometra .....	26

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki o preiskovanih spojinah.....	17
Preglednica 2: Uporabljene osnovne raztopine bisfenolov v strupenostnih testih. ....	17
Preglednica 3: Sestava medija po Jaworskem. ....	20
Preglednica 4: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPA po 21 dneh, s hranjenjem vsak dan.....	28
Preglednica 5: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPA po 21 dneh s hranjenjem 3-krat tedensko. ....	29
Preglednica 6: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPA po 21 dneh s hranjenjem vsak dan. ...	29
Preglednica 7: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPF po 21 dneh s hranjenjem vsak dan. ....	30
Preglednica 8: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPF po 21 dneh s hranjenjem 3-krat tedensko. ....	30
Preglednica 9: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPF po 21 dneh. ....	31
Preglednica 10: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPAF po 21 dneh, s hranjenjem vsak dan.....	31
Preglednica 11: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPAF po 21 dneh s hranjenjem 3-krat tedensko. ....	32
Preglednica 12: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPAF po 21 dneh. ....	32
Preglednica 13: Vrednosti 21d LOEC in 21d NOEC izračunane iz kroničnih testov strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i> za BPA, BPF in BPAF. ....	33
Preglednica 14: Vrednosti IC50 za kronično strupenost bisfenolov določene z merjenjem fluorescence in štetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije bisfenolov. ....	39

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPA. ....	36
Graf 2: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPF.....	36
Graf 3: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPAF.....	37

Graf 4: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno s štejetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPA.....	38
Graf 5: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno s štejetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPF.....	38
Graf 6: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno s štejetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPAF.....	39

## KAZALO PRILOG

Priloga 1: Skupine hormonskih motilcev .....	50
Priloga 2: Svetovna produkcija BPA.....	50
Priloga 3: Koncentracije bisfenolov A, F in AF v vzorcih iz okolja na Kitajskem .....	51
Priloga 4: Zbrane najvišje vrednosti BPA v naravi, iz različnih raziskav .....	51
Priloga 5: Vodna bolha- <i>Daphnia magna</i> .....	52
Priloga 6: Življenjski cikel vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) .....	52
Priloga 7: Zelene alge- <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	52

## POVZETEK

Onesnaževanje vodnih virov postaja dandanes vse večji problem. Vse večja je industrijska proizvodnja različnih umetnih snovi, mnoge med njimi so biološko slabo razgradljive, zato metode čiščenja odpadnih voda s konvencionalnimi biološkimi postopki niso dovolj učinkovite. Mednje sodijo tudi bisfenoli, kot so bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF). Znani so kot hormonski motilci, ki preko različnih mehanizmov motijo delovanje endokrinega sistema.

V magistrski nalogi smo preverjali strupenost bisfenola A in njegovih dveh analogov. Izvedli smo kronični, 21-dnevni, test na vodnih bolhah (*Daphnia magna*) in določili najvišjo testirano koncentracijo bisfenola, ki še ni imela vpliva na razmnoževanje vodnih bolh (NOEC) in najnižjo testirano koncentracijo, ki je imela toksične učinke na testne organizme (LOEC). Pri vodnih bolhah smo opazili vpliv bisfenolov na reprodukcijo, saj se je z višjo koncentracijo bisfenola zmanjšalo število mladih na odraslo vodno bolho. Za bisfenole smo določili 21-dnevni NOEC in LOEC za BPA (5 mg/L in 10 mg/L), za BPF (0,84 mg/L in 1,68 mg/L) ter za BPAF (0,225 mg/L in 0,45 mg/L). Bisfenoli imajo tudi pomembno vlogo pri levitvi vodnih bolh. Bisfenoli zavirajo ekdisteroidno aktivnost, kar se kaže v podaljšanem času med dvema levitvama. Ker je za rast bolh nujno potrebna levitev, je pri motnjah levitve motena tudi rast vodnih bolh. Glede na dolžino odrasle vodne bolhe ob koncu testa smo za bisfenole določili 21-dnevni NOEC in LOEC za BPA (5 mg/L in 10 mg/L), za BPF (1,68 mg/L in 3,35 mg/L) ter za BPAF (0,225 mg/L in 0,45 mg/L). Kot najbolj strupen se je izkazal bisfenol AF, saj je imel največji vpliv tako na reprodukcijo (21-dnevni LOEC 0,45 mg/L) kot na rast (21-dnevni LOEC 0,45 mg/L) vodnih bolh.

Izvedli smo tudi kronični, 72-urni, test na zelenih algah (*Desmodesmus subspicatus*) in določili koncentracijo, kjer smo imeli 50 % zaviranje rasti alg (IC<sub>50</sub>). Rast alg smo določali s štetjem alg pod mikroskopom in pa z merjenjem fluorescence alg po končanem testu. Po merjenju fluorescence smo za BPA določili 72 h IC<sub>50</sub> 21,36 mg/L, za BPF 24,45 mg/L, za BPAF pa 3,23 mg/L. Po štetju alg pod mikroskopom smo za BPA določili 72 h IC<sub>50</sub> 38,93 mg/L, za BPF 20,07 mg/L, za BPAF pa IC<sub>20</sub> 0,74 mg/L. Tudi pri algah se je za najbolj strupenega izkazal BPAF.

V magistrski nalogi smo dokazali strupene učinke testiranih bisfenolov na vodne organizme, kot so vodne bolhe in zelene alge. Potrdili smo pa tudi razliko v strupenosti med BPA in BPF ter na drugi strani BPAF, kar lahko razložimo z razliko v zgradbi vseh treh spojin in posledično z njihovimi različnimi toksikokinetičnimi, pa tudi toksikodinamičnimi lastnostmi.



**Ključne besede:**

hormonski motilci

bisfenoli A, F in AF

estrogena aktivnost

kronični ekotoksikološki testi

vodne bolhe (*Daphnia magna*)

zelene alge (*Desmodesmus subspicatus*)

## ABSTRACT

The pollution of water sources is becoming an increasingly worrying problem of our time. The production of various artificial materials is growing, and many among these materials are biologically harder to decompose, which means the methods of cleaning wastewater with the conventional biological procedures are not effective enough. Among these materials, we count bisfenols like bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) and bisfenol AF (BPAF). They are known as endocrine disruptors that bind to various receptors and disturb the working of endocrine system.

In this Master's Degree paper, we examine the toxicity of bisfenol A and its two analogues. With the help of toxicity tests, we have determined the concentrations, which had an affect on various life functions of the chosen water organisms. We conducted a chronic, 21-day test on waterfleas (*Daphnia magna*), and determined the maximal tested bisfenol concentration that has not yet had an effect on the procreating of the waterfleas (NOEC), as well as the minimal tested concentration that had toxic effect on the test organisms (LOEC). Studying the waterfleas, we observed the influence bisfenols have on their reproduction, namely that the number of the young per adult waterflea decreased with a higher concentration of bisfenol. For bisphenols we determined 21d NOEC and LOEC for BPA (5 mg/L and 10 mg/L), for BPF (0,84 mg/L and 1,68 mg/L) and for BPAF ( 0,225 mg/L and 0,45 mg/L)., Besides the influence on the reproduction, bisfenols have an important role in the sloughing of waterfleas. Bisfenols inhibit ecdysteroid activity which shows in the extended time between two sloughings. As sloughing is esencial for the growth of the waterflea, disturbances in sloughings mean disturbances in growth. Regarding the length of the adult waterflea at the end of the test, we determined for bisphenols 21d NOEC and LOEC LOEC for BPA (5 mg/L and 10 mg/L), for BPF (1,68 mg/L and 3,35 mg/L) and for BPAF (0,225 mg/L and 0,45 mg/L). Bisfenol AF proved the most poisonous as it had the biggest effect on the reproduction(21d LOEC 0,45 mg/L) as well as on the growth (21d LOEC 0,45 mg/L) of the waterfleas.

We also conducted a chronic, 72-hour test on the green algae (*Desmodesmus subspicatus*) and determined the concentracion, where we had a 50 % growth impediment of the algae (IC50). The growth of the algae was determined by counting the algae under the microscope and by measuring fluorescence algae after the completed test. After measuring the fluorescence, we determined for BPA 72h IC50 21,36 mg/L, for BPF 24,45 mg/L, and for BPAF 3,23 mg/L. After counting the algae under the microscope, we determined for BPA 72h IC50 38,93 mg/L,

for BPF 20,07 mg/L, and for BPAF IC 20 0,74 mg/L. With the algae, as well as with the waterfleas, BPAF proved to be the most poisonous.

In this Master's Degree paper, we prove the toxic effects the tested bisfenols have on water organisms like waterfleas and green algae. We also confirm the difference in the toxicity of BPA and BPF, and, on the other side, in BPAF, which can be explained by the difference in the structure of all three compounds, and consequentially, by their different toxicokinetic and toxicodynamic characteristics.

**Key words:**

endocrine disrupting compounds

bisphenols A, F and AF

estrogenic activity

chronic ecotoxicological tests

water fleas (*Daphnia magna*)

green algae (*Desmodesmus subspicatus*)

## SEZNAM OKRAJŠAV

BPA	bisfenol A
BPF	bisfenol F
BPAF	bisfenol AF
NOEC	(no observed effect concentration) najvišja koncentracija spojine, ki ne povzroči statistično različne spremembe merjenega odziva pri organizmu glede na kontrolo
LOEC	(lowest observed effect concentration) najnižja koncentracija spojine, ki povzroči statistično različne spremembe merjenega odziva pri organizmu glede na kontrolo
EC	efektivna koncentracija je koncentracija, ki v določenem času povzroči odziv pri določenem odstotku organizmov (npr. 24h EC50 je koncentracija, ki v 24 urah povzroči merjen odziv pri 50 % organizmov)
IC	inhibitorna koncentracija je koncentracija, ki v določenem času povzroči zaviranje določene aktivnosti pri določenem odstotku izpostavljenih organizmov (npr. 72h IC50 je koncentracija, ki v 72 urah povzroči 50 % zmanjšanje hitrosti rasti zelenih alg glede na kontrolo)
HM	hormonski motilec
ER $\alpha$	estrogenski receptor $\alpha$
ER $\beta$	estrogenski receptor $\beta$
MQ	ultra čista voda (18,2 M $\Omega$ -cm)

# **1. UVOD**

## **1.1. ENDOKRINI SISTEM**

Endokrini sistem regulira vse celične funkcije ter aktivnosti ljudi in živali s hormoni, ki se vežejo na specifične jedrne in membranske receptorje. Hormoni se izločajo iz žlez neposredno v kri in delujejo kot prenašalci informacij med organi in tkivi. Regulirajo metabolizem, rast, razvoj, razmnoževanje, kot tudi vodno in elektrolitsko ravnotežje. Za delovanje endokrinega sistema je bistvena vezava hormona na receptor. Posledica vezave je sprememba v ekspresiji posameznih proteinov, ki regulirajo delovanja tarčne celice. Sprememba je odvisna od koncentracije določenega hormona v krvi, števila razpoložljivih receptorjev v tarčni celici in od jakosti vezave med hormonom in receptorjem (1). Po vezavi hormona na receptor pride do izražanja določenih genov in sinteze novih proteinov ali pa do spremembe v signaliziranju celičnih proteinov (2). Spremembe in motnje v delovanju hormonskega sistema so nekaj povsem normalnega, dokler se jim telo lahko prilagodi. Ko pa se jim telo enkrat ne more več prilagajati, lahko pride do škodljivih posledic za organizem (3).

## **1.2. HORMONSKI MOTILCI**

V literaturi lahko zaznamo veliko različnih definicij hormonskih motilcev (HM), med katerimi so nekatere nenatančne. V endokrinem sistemu lahko pride do sprememb, ki so posledica fizioloških sprememb v organizmu in so namenjene ohranjanju hormonskega ravnovesja, ali pa do sprememb, ki povzročijo nenormalno delovanje organizma in s tem škodljive posledice. Za natančno definiranje hormonskih motilcev je torej zelo pomembno razlikovanje med tema dvema vrstama sprememb, kar pa veliko definicij ne upošteva (3). Svetovno najbolj priznana definicija hormonskih motilcev je definicija Svetovne zdravstvene organizacije (WHO), ki trdi, da je hormonski motilec substanca ali zmes substanc, ki vplivajo na eno ali več funkcij endokrinega sistema in s tem povzročijo škodljive spremembe v organizmu ali na njegovih potomcih (4). Pod škodljive spremembe spadajo spremembe v morfologiji, fiziologiji, razvoju, rasti, razmnoževanju ali dolžini življenjske dobe organizma ali (sub)populacije (3).

Raziskave so pokazale, da hormonski motilci vplivajo na različna tarčna mesta in tako dosegajo svoj učinek preko različnih mehanizmov delovanja (5).

Kljub različni kemijski strukturi hormonski motilci povzročijo v organizmih podobne učinke. Vežejo se na receptorje v telesu in s tem preprečijo vezavo oz. tekmujejo za vezavo z endogenimi hormoni. Z vezavo lahko povzročijo odziv tarčne celice (agonistično delovanje), lahko pa delovanje tudi preprečijo (antagonistično delovanje). Povzročijo lahko motnjo v sintezi ali metabolizmu endogenih hormonov ali ekspresiji specifičnih hormonskih receptorjev (6). Zaradi kompleksnosti endokrinega sistema so učinki hormonskih motilcev zelo nepredvidljivi in lahko prizadenejo različna mesta v organizmu, tudi tista, ki jih nismo pričakovali (5). Med HM spadajo različne vrste spojin, ki jih razdelimo v več skupin, kot so hormoni, industrijske kemikalije, pesticidi, izdelki za osebno higieno, farmacevtski izdelki (Priloga 1). Potrebno je poudariti, da med hormone uvrščamo tako naravne kot sintetične hormone. Naravni so steroidni in tiroidni hormoni, ki jih izločajo tako živali kot ljudje, in so pomembni za normalno delovanje reproduktivnih organov, kože in možganov. Med sintezne hormone štejemo peroralna kontracepcijska sredstva in zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje neplodnosti ter ostalih nepravilnosti v delovanju endokrinega sistema in se zaradi te uporabe pojavljajo tudi v okolju (6).

Izpostavljenost HM v različnih obdobjih življenja ima lahko različne posledice. Izpostavljenost v času razvoja endokrinega sistema lahko povzroči trajno spremembo v delovanju ali občutljivosti receptorjev. Medtem ko izpostavljenost v odrasli dobi ni tako nevarna, saj se endokrini sistem že lahko prilagaja na spremembe. Kljub številnim študijam še vedno močno primanjkuje podatkov o vplivu HM v času razvoja endokrinega sistema in kako to vpliva na bolezni v odrasli življenjski dobi (5). Raziskave so pokazale, da ima izpostavljenost HM škodljiv vpliv na nekatere živalske vrste in populacije, igra pa tudi pomembno vlogo pri pojavu sodobnih bolezni. Hormonski motilci naj bi pri ljudeh povzročali motnje v reproduktivnem sistemu, kot so zmanjšana kvaliteta semenčic, večje število spontanih splavov, manjše število rojenih moških osebkov in nenormalnosti pri moških reproduktivnih organih. Poleg tega lahko izpostavljenost povzroči endometriozo, prezgodnjo puberteto, imunološke in nevrološke spremembe ter povečano pojavnost nekaterih rakavih obolenj, kot so rak prostate, rak dojke, rak testisov (5).

Poznamo tako hidrofilne kot lipofilne hormonske motilce. Vodotopne molekule so dobro topne v vodi, akumulirajo se v vodnih kompartmentih in se ne porazdeljujejo v sediment in npr. živalsko maščobo. Spojine s slabšo topnostjo v vodi, ki imajo lipofilne strukturne fragmente, pa se adsorbirajo na sedimente in se akumulirajo v živih organizmih (5, 6).

HM najdeni v okolju so nagnjeni h kemični in mikrobiološki razgradnji, kot sta hidroliza in fotoliza, pri tem pa lahko nastanejo produkti s še močnejšim hormonskim delovanjem (6, 8). Lahko pa se hormonski motilci tudi akumulirajo v živih organizmih. Nekatere aktivne komponente peroralnih kontraceptivov so našli v vodnih organizmih, kjer so le-te povzročile neplodnost. V eni izmed študij je plazemska koncentracija levonorgestrela v ribah celo presegla terapevtski nivo pri človeku. Bioakumulacija HM v morskih živalih lahko tako predstavlja tudi veliko grožnjo za zdravje ljudi, saj le-te živali predstavljajo velik delež prehrane ljudi (7). Hkrati pa pri mnogih HM vemo premalo o njihovih akutnih in predvsem kroničnih učinkih na žive organizme, ki niso nujno povezani samo z vplivom na moduliranje endokrinega sistema.

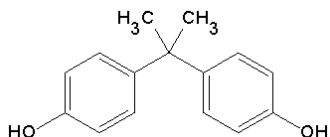
### **1.3. BISFENOLI**

Bisfenoli so skupina industrijskih kemikalij, ki sodijo med ene najbolj uporabljenih snovi na svetu. Med vsemi bisfenoli se proizvede največ bisfenola A, tudi več kot 5 milijonov ton letno (Priloga 2). Uporablja se v proizvodnji polikarbonatne plastike, epoksidnih smol, prevlek za papirnate materiale in barv v prahu. Analogi BPA se večinoma uporabljajo v industriji kot nadomestki za BPA pri premazih iz smole in pri izdelavi polikarbonatne plastike. Po vsem svetu se vedno več uporabljajo analogi BPA, za katere pa so prav tako kot za BPA dokazani toksični učinki na živa bitja (8). Ljudje smo izpostavljeni različnim bisfenolom preko hrane in pijače, ki jo uživamo, saj je le-ta shranjena v vsebnikih, ki so izdelani ali pa prevlečeni s polimeri bisfenolov. V stik z njimi pa pridemo tudi preko vodovodne vode, v kateri so dokazali koncentracije BPA 3,5-59,8 ng/L (9).

#### **1.3.1. BISFENOL A**

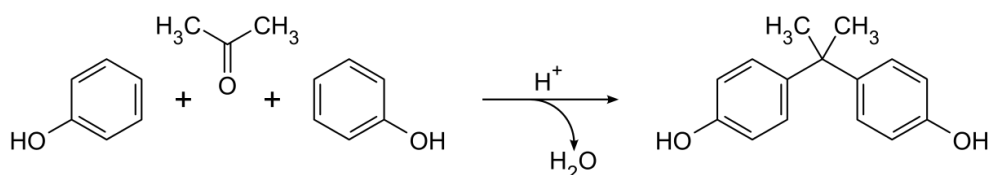
##### **FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI**

Bisfenol A (2,2-bis(4-hidroksifenil)propan) je kemijsko gledano spojina, sestavljena iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom, ki je substituiran z dvema metilnima skupinama (slika 1). Na vsak fenolni obroč je vezana še ena hidroksilna skupina. Prisotnost hidroksilnih skupin omogoča molekuli številne reakcije in tvorbo etrov, estrov in soli. Prisotne imamo lahko tudi reakcije, kot so substitucije, nitranje, sulfoniranje ali alkilacije (10).



Slika 1: Strukturna formula bisfenola A (11).

Bisfenol A nastane pri kondenzaciji med dvema fenolnima obročema in ene molekule acetona (slika 2). Pri reakciji imamo kot katalizator prisotno klorovodikovo kislino (HCl) ali ionsko-izmenjevalno smolo (10).



Slika 2: Reakcija proizvodnje BPA (12).

Je bela, kristalinična, trdna spojina, dobro topna v maščobah in slabo topna v vodi (120-300 mg/L) (11). Vrelišče ima pri 220 °C, tališče pa pri 156 °C. V naravi ga lahko razgrajujejo nekatere bakterije, alge, glive in rastline (10).

### UPORABA BPA

BPA je ena izmed najbolj pogosto proizvedenih in uporabljenih kemičnih spojin na svetu. Uporablja se večinoma (95 %) za proizvodnjo sintetičnih polimerov, kot so epoksidne smole in polikarbonati. Materiali, izdelani iz BPA, imajo zelo dobre mehanske lastnosti, imajo nizko adsorpcijo vlage in so toplotno stabilni, zato se uporabljajo za proizvodnjo produktov, kot so vodovodne pipe, vsebniki za hrano, plastenke, igrače, dude za dojenčke, medicinski pripomočki, električne naprave, zgoščenke. Uporablja se tudi kot stabilizator in antioksidant pri proizvodnji vinil klorida, ki je vmesni izdelek pri izdelavi polivinil klorida. BPA je prisoten tudi v termalnem papirju, ki se uporablja za blagajniške račune, v knjigah, za različne nalepke, po recikliranju pa tudi za brošure, pisemske ovojnice, časopise, kuhinjske brisačke, toaletni papir in papirnato embalažo za hrano. Poleg tega pa je prisoten tudi v proizvodnji poliakrilatov, poliestrov in različnih lakov, ki se uporabljajo kot premaz za pločevinke in konzerve ter jih tako ščitijo pred korozijo (10). Zaradi vse več podatkov o strupenosti BPA so nekatere države prepovedale uporabo polimerov, narejenih iz BPA, za izdelavo otroških plastenk in dud. Prva med njimi je bila Kanada, ki je to storila leta 2010, leta 2011 pa je uporabo BPA v otroških plastenkah prepovedala tudi Evropska unija (10, 13).



## **METABOLIZEM BPA**

Po peroralni aplikaciji je BPA podvržen metabolizmu prvega prehoda v jetrih in se tako popolnoma absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Poleg reakcij metabolizma prve stopnje se BPA metabolizira tudi preko reakcij druge stopnje, kot je konjugacija z glukuronsko kislino ali sulfatom. Konjugacijo obravnavamo kot detoksifikacijski proces, saj ima samo prosti BPA estrogensko delovanje. Konjugiran BPA, ki se tvori v jetrih, se s krvjo prenese v ledvice, kjer se izloči z urinom (razpolovni čas manj kot 6 ur). Če smo BPA izpostavljeni preko inhalacije ali dermalno, le-ta ni izpostavljen metabolizmu prvega prehoda, zato je njegov razpolovni čas daljši. Pri glodavcih je BPA podvržen enterohepatičnemu kroženju in se zato izloči kasneje in tako povzroči več škodljivih učinkov (14). Encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu BPA v jetrih (UDP-glukuronozil transferaze), so v času razvoja zarodka pri le-tem v veliko nižjih koncentracijah kot pri odraslem človeku, zaradi česar ima BPA na zarodek večji vpliv kot na odraslo osebo (11).

## **RAZGRADNJA BPA V VODI**

BPA v vodi ni stabilen zaradi prisotnosti različnih bakterij, gliv, rastlin in planktona, ki ga razgrajujejo. Razpolovni čas BPA v vodi je do 5 dni.

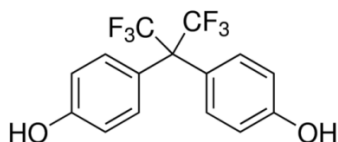
Poznamo veliko bakterij, ki so sposobne razgradnje BPA. V raziskavi je bilo ugotovljeno, da kar 40 od 44 vrst bakterij, prisotnih v testu, razgrajuje BPA. Vse te so sposobne delne razgradnje, tako da se koncentracija BPA bistveno zmanjša, vendar lahko le 6 vrst bakterij od 40 popolnoma razgradi BPA (15).

Razgradnja BPA je odvisna tudi od temperature, pri 20-30 °C je razpolovni čas 4-6 dni, pri 4 °C pa kar 20 dni. Poleg bakterij BPA razkrajajo tudi glive (15). Prav tako kot pri bakterijah je tudi pri glivah omejeno število tistih vrst, ki so sposobne razgraditi velik odstotek BPA. Od 26 vrst gliv jih je 11 sposobnih razgraditi BPA več kot 50 %.

Tudi nekatere zelene alge imajo sposobnost razgradnje BPA. Zelena alga *Chlorella fusca* razgradi na svetlobi 85 % začetne koncentracije BPA, v temi pa le 22 %. Rastline BPA hitro absorbirajo iz vode in ga pretvorijo v različne glikozilirane produkte, ki se akumulirajo v rastlinah in nimajo več estrogenega učinka (15).

### **1.3.2. BISFENOL AF**

Bisfenol AF (1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis(4-hidroksifenil) propan) je eden izmed analogov BPA. Sestavljen je iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom (slika 3). Za razliko od BPA vsebuje dve hidrofobni trifluorometilni (CF<sub>3</sub>) skupini (16).



Slika 3: Strukturna formula BPAF (17).

BPAF se nahaja kot prah bele, rumenorjave ali svetlo sive barve z molekulske formulo  $C_{15}H_{10}F_6O_2$ . Molska masa je 336,23 g/mol in temperatura vrelišča 400 °C (18).

Različne analize povezave med strukturo molekule in njeno aktivnostjo kažejo na to, da je BPAF bolj toksična estrogenska spojina kot BPA, in to zaradi zamenjave metilnih skupin ( $CH_3$ ) s še bolj hidrofobnimi  $CF_3$  skupinami, kar poveča estrogensko aktivnost (19).

Funkcionalna skupina  $CF_3$  je bolj elektronegativna kot  $CH_3$  pri BPA (20). V raziskavi so podganam vsak dan subkutano injicirali 100 mg/kg BPAF in opazili 337 % povečanje maternice. Pri BPA je bilo povečanje maternice manjše, pri 200 mg/kg BPA so opazili le 197 % povečanje (19).

#### **UPORABA BPAF**

BPAF se uporablja za proizvodnjo polimerov z izboljšanimi kemičnimi, termalnimi in mehničnimi lastnostmi (20). Iz BPAF se izdelujejo različni fluoro-elastomeri, uporablja se tudi kot monomer za izdelavo poliamidov, poliimidov, polikarbonatov in poliestrov (21). Najdemo ga kot material pri izdelavi električnih naprav, naprav za predelavo hrane in v optičnih vlaknih (22). V ZDA se letno proizvede od 4500 do 22500 kg BPAF (19).

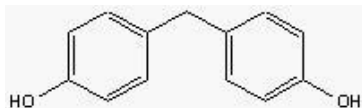
Največ BPAF v okolje zaide preko odpadnih voda iz industrije, ki niso ustrezno prečiščene. V Nemčiji so BPAF našli v treh četrtinah vzorcev površinskih voda in v polovici vzorcev sedimenta (22). Študije kažejo, da ima BPAF tako estrogensko kot anti-androgeno aktivnost. Dokazano je, da se BPAF na receptor  $ER\alpha$  veže 20-krat močneje kot BPA, na  $ER\beta$  pa kar 50-krat močneje. BPAF se 3-krat močneje veže na  $ER\beta$  kot na  $ER\alpha$ , na  $ER\alpha$  deluje kot agonist, na  $ER\beta$  pa kot antagonist (20).

#### **METABOLIZEM BPAF**

Študije kažejo, da se večina BPAF, ki se ga izloči iz telesa, izloči v nekonjugirani obliki z blatom, nekaj pa tudi z urinom (16). *In vitro* se BPAF hidroksilira pod vplivom citokroma P450. V prisotnosti humanih jetrnih encimov, GSH, NADPH in citokromov P450 tako nastaneta dva glavna produkta hidroksiliran BPAF in 4-heksafluorohidroksiizopropiliden-fenol (21).

### 1.3.3. BISFENOL F

Bisfenol F (4,4-dihidroksidifenil-metan) je eden izmed analogov bisfenola A. Sestavljen je iz dveh fenolnih obročev, povezanih z metilnim mostom (23) (slika 4). Pripravimo ga z reakcijo med formaldehidom in fenolom (24).



Slika 4: Strukturna formula BPF (25).

#### UPORABA BPF

Uporablja se kot osnovni monomer za izdelavo polikarbonatov in epoksidnih smol. Prisoten je v industriji pri izdelavi lepil, lakov, pločevink, konzerv in različnih plastičnih vsebnikov za hrano in pijačo. Najdemo ga v kolesarskih in motorističnih čeladah, v zobnih vsadkih in različnih protezah ter vodnih pipah (23, 26). Epoksidne smole, izdelane iz BPF, imajo manjšo viskoznost in so bolj odporne na topila kot tiste, ki vsebujejo BPA, zato je njihova uporaba iz leta v leto večja. Največji onesnaževalci okolja z BPF so tovarne in čistilne naprave, v okolici katerih lahko BPF prehaja v jezera, reke in zemljo (18). V Nemčiji so BPF našli v 77 % odvzetih vzorcev površinskih voda, v 72 % odvzetih vzorcev odpadnih voda in v 58 % odvzetih vzorcev sedimenta (23).

#### DELOVANJE BPF

BPF je hormonski motilec z estrogenskim in anti-androgenim delovanjem. BPF kot monomer lahko prehaja iz embalaže v hrano in pijačo. Preko uživanja le-teh pa se kopičijo v živih organizmih in povzročijo škodljive vplive. Lahko deluje direktno, tako da se veže na receptor, ali pa posredno, tako da moti biosintezo ali katabolizem steroidov.

*In vitro* študije so dokazale, da je BPF poleg BPA najbolj estrogenu aktivna substanca, prisotna v embalažah za hrano. Ima močnejše delovanje kot BPA, čeprav se na estrogenski receptor veže z enako afiniteto (28).

#### METABOLIZEM BPF

Metabolizem BPF je zelo kompleksen, saj nastane veliko različnih metabolitov. Ob prisotnosti citokromov P450 in NAHPH so zaznali dihidroksiliran BPF in dimere BPF ter kateholov (28). V *in vitro* testih so epoksidnim smolam, ki vsebujejo BPF, dokazali genotoksičnost (29). BPF lahko pri glodavcih celo prehaja placento. Zaradi toksičnih učinkov je Evropska agencija za varnost hrane leta 2005 prepovedala uporabo epoksidnih smol, ki vsebujejo BPF (29).

#### **1.4. PRISOTNOST ORGANSKIH ONESNAŽIL, BPA IN ANALOGOVI V POVRŠINSKIH IN PODZEMNIH VODAH**

Kemično onesnaževanje je v današnjih časih prisotno vsepovsod. Prisotnost BPA, BPF in BPAF je bila zaznana tako v površinskih vodah kot v sedimentih (Priloga 3) (30). BPA in ostali hormonski motilci lahko vstopajo v vodo preko različnih poti, kot so industrijski obrati in čistilne naprave odpadnih voda. Večkrat in v večjih koncentracijah so prisotni v površinskih vodah, saj le-te lažje in hitreje pridejo v direkten stik z viri onesnaževanja. Onesnaževanje podtalnice je manjše, največji viri onesnaževanja so podzemeljska odlagališča odpadkov, greznice in mešanje podtalnice s površinskimi vodami. Koncentracija BPA v površinskih vodah, glede na številne študije, je med 3 in 30 ng/L. V bližini večjih industrijskih obratov pa se koncentracija BPA lahko nahaja med 1 in 28 µg/L. BPA se nahaja tudi v podtalnici, čeprav v nižjih koncentracijah kot v površinskih vodah (Priloga 4) (30). Glede na številne študije vse koncentracije BPA, višje od 0,01 µg/L, povzročajo negativne učinke na testne živali. Koncentracija BPA, pri kateri je 95 % živali varnih pred negativnimi vplivi te substance, je 0,03 µg/L, v naravi pa velikokrat najdemo tudi do 100-krat višje koncentracije BPA, kar predstavlja veliko grožnjo vodnim organizmom (30). Odstranjevanje vodnih onesnažil iz voda je zaradi vse večjega onesnaževanja s strani človeka vedno bolj zahtevna naloga. Čistilne naprav z aktivnim blatom odstranijo do 90 % estrogenov prisotnih v odpadnih vodah. Te naprave v sekundarni stopnji čiščenja posnemajo aerobno samočistilno sposobnost vodnih ekosistemov. Takih čistilnih naprav je premalo, saj ostale, ki tega postopka ne uporabljajo, odstranijo le do 50 % estrogeno aktivnih spojin, ostale pa so izpuščene nazaj v okolje v tako velikih koncentracijah, da povzročijo škodljive učinke na vodne in kopenske organizme ter človeka (30, 31). Prav tako sta v naravi prisotna tudi BPF in BPAF. V Nemčiji so BPF zaznali v 77 % vzorcih površinskih voda v koncentracijah od 0,0001 do 0,180 µg/L in v 72 % odpadnih voda v koncentracijah od 0,022 do 0,123 µg/L. BPF pa je bil najden tudi v koncentracijah do 0,245 µg/L (32).

#### **1.5. Učinki hormonskih motilcev na vodne organizme**

Znani so samo učinki BPA na vodne organizme, saj na področju BPF in BPAF še ni bilo narejenih raziskav.

Estrogenski učinek BPA je poznan že od zgodnjih devetdesetih let prejšnjega stoletja, medtem ko je podatkov otovrstnih učinkih BPF in BPAF zelo malo. BPA se pri živalih lahko veže na estrogenski receptor in deluje kot agonist ali pa potencira delovanje

endogenega 17 $\beta$ -estradiola. V številnih študijah je bilo dokazano, da se BPA veže na estrogenski receptor številnih vretenčarjev, podatkov o vezavi na estrogenske receptorje nevretenčarjev pa je manj in so manj natančni (33). V eni izmed raziskav so preiskovali vpliv BPA na polže (*M. cornuarietis*). BPA je preprečil vezavo endogenega 17 $\beta$ -estradiola na ER. Na receptor se je vezal celo z večjo afiniteto kot endogeni hormon. Posledično sklepamo, da imajo mehkužci ER, ki je zelo dovzeten za vezavo BPA (34). BPA deluje kot ER agonist zaradi nesubstituiranih fenolnih skupin. Čeprav BPA deluje kot agonist, so lahko njegovi učinki različni od učinkov endogenega hormona. Vzrok lahko iščemo v tem, da se BPA z večjo afiniteto veže na ER $\beta$  kot pa na ER $\alpha$ . Ob vezavi na človeški ER $\beta$  deluje samo kot agonist, medtem ko ob vezavi na ER $\alpha$  deluje kot agonist in antagonist. Različno afiniteto vezave BPA na estrogenski receptor pri različnih vrstah si lahko razlagamo na dva načina. Vzrok je lahko v različni strukturi aminokislin v estrogenskem receptorju in posledično različni afiniteti BPA do ER, lahko pa je vzrok tudi v različni tkivni razporeditvi estrogenskih receptorjev pri različnih vrstah (33). Poleg neposredne vezave na estrogenski receptor pa lahko, kot že zgoraj omenjeno, BPA potencira delovanje endogenega 17 $\beta$ -estradiola.

To lahko doseže na tri načine:

### **1. Povečano število estrogenskih receptorjev v organizmu.**

BPA tako kot endogeni hormon stimulira akumulacijo mRNA estrogenih receptorjev. Kot rezultat dobimo večje število estrogenih receptorjev in s tem večjo dovzetnost za endogene in eksogene hormone.

### **2. Prekinjena povezava med 17 $\beta$ -estradiolom in njegovim prenašalnim proteinom.**

17 $\beta$ -estradiol je vezan na steroidni vezavni protein, ki regulira razpoložljivost endogenih steroidov za vezavo na receptorje.

### **3. Zaviranje izločanja endogenega 17 $\beta$ -estradiola iz organizma.**

17 $\beta$ -estradiol se metabolizira v jetrih, kjer se pretvori v hidrofilne produkte, ki se nato izločijo iz telesa. BPA zmanjša jetrni metabolizem 17 $\beta$ -estradiola (33). *In vitro* študija tkiva rečne postrvi je pokazala, da 22,8 mg/L BPA zmanjša jetrni metabolizem 17 $\beta$ -estradiola na 24,2 %, ledvični metabolizem pa na 52 % v primerjavi s tkivom, ki BPA ni bilo izpostavljeno (35).

## UČINKI NA RIBE

Ribe in ostali vodni organizmi so kronično izpostavljeni različnim koncentracijam hormonskih motilcev, predvsem BPA (30).

Ribe so zaradi velike občutljivosti na različne substance iz okolja dober indikator onesnaženosti vodnega okolja in estrogenske aktivnosti onesnaževalcev (36).

BPA pri odraslih ribah inducira ekspresijo specifičnih ženskih genov ( Fig1 $\alpha$ , Dax1 in Wt1 mRNA), zavira pa ekspresijo specifičnih moških genov (Sf1, Dmrt1 in Mis).

BPA povzroči motnje pri sproščanju gonadotropin sproščujočega hormona, pri koncentracijah 15  $\mu\text{g/L}$ . Poveča se ekspresija gena za receptor gonadotropin sproščujočega hormona v možganih nekaterih rib. Domnevajo, da je to posledica zmanjšane lokalne proizvodnje estrogena (30). BPA vpliva tudi na sintezo vitelogenina pri ribah. Vitelogenin je prekursor lipoproteinov in fosfoproteinov, ki sestavljajo večino proteinov v jajčnem rumenjaku oviparnih vretenčarjev. Pri ribjih samicah vitelogenin sintetizirajo jetra kot odgovor na estrogenski signal iz jajčnikov. Vitelogenin nato potuje do jajčnikov, kjer se vgradi v jajčece. Jetra samcev ne proizvajajo vitelogenina, razen če so izpostavljeni estrogenom. Prisotnost vitelogenina v krvi samcev oviparnih živali je dober pokazatelj izpostavljenosti estrogenskim motilcem (33). Histološko se negativni učinki na ribah kažejo kot povečanje primarnih oocitov, počasnejše dozorevanje in motnje v normalnem razvoju ženskih spolnih celic (oogeneza). 2,4  $\mu\text{g/L}$  BPA je pri potočni postrvi povzročilo zamik ovulacije za 2 tedna, 5  $\mu\text{g/L}$  BPA pa popolno odsotnost ovulacije (33). Najpomembnejši vpliv BPA na reprodukcijo pri odraslih ribjih samcih je zmanjšanje spermatogeneze, hkrati pa tudi manjša gibljivost semenčic (30). Hayashi s sodelavci je dokazal, da akutna izpostavljenost rib BPA-ju vodi do sprememb nevromastov. To je poseben čutilni organ, ki poteka od škržnega poklopca do repa vzdolž boka in je viden kot črta. S pobočnico ribe zaznajo tresljaje in spremembe vodnega toka ter določajo položaj svojega telesa v vodi (37). Dokazano je bilo, da pride do kasnejšega dozorevanja in slabše regeneracije poškodovanih dlačnic v pobočnici. S tem pride pri ribah do oviranega zaznavanja plena in izogibanja plenilcem (38).

## UČINKI NA DVOŽIVKE

Izpostavljenost različnim hormonskim motilcem se pri dvoživkah kaže v neenakomerni porazdelitvi spolov, pojavi se namreč veliko več ženskih osebkov kot moških (30).

## UČINKI NA VODNE PLAZILCE

Pri večini plazilcev je od temperature, pri kateri se inkubirajo jajca, odvisno, ali se bo razvila samica ali samec. Pri organizmih, izpostavljenih hormonskim motilcem, lahko pride do razvoja samice pri temperaturi značilni za razvoj samcev in obratno (30).

Krokodilja jajca širokogobčnega kajmana (*Caiman latirostris*) so izpostavili BPA. Jajca, inkubirana pri 30 °C, se pri normalnih pogojih razvijejo v ženske osebke, jajca, inkubirana pri 33 °C, pa v moške osebke. Ob aplikaciji 9mg BPA na lupino jajca (povprečna teža jajca 65,1 g) so se vsa jajca razvila v ženske osebke, vključno s tistimi inkubiranimi na temperaturi 33 °C. Vendar so jajca v okolju zelo težko izpostavljena tako visokim koncentracijam BPA, saj BPA normalno v vodi ne preseže 12 µg/L (33).

## UČINKI NA RAKE (vodne bolhe, vodne osličke)

Crain s sodelavci v svoji raziskavi omenja tudi morebiten vpliv BPA na levitveni proces, saj naj bi neodvisno od estrogenske aktivnosti povzročal nepravilnosti v lupini vodnih bolh (33). Alkilfenoli vplivajo na pigmentacijo in sklerotizacijo lupine žuželk in rakov. BPA zmanjšuje trdnost lupine s tem, ko preprečuje navzrkižno povezovanje proteinov (33).

Pri vodnih bolhah pride, ob izpostavljenosti BPA-ju, do sprememb na celičnem nivoju (aktivnost encimov) in na nivoju celotnega organizma (rast, pigmentacija, reprodukcija in smrtnost) (39). Pri vodnih osličkih pa so prav tako opazili inhibicijo rasti in hranjenja ter manjše število levitev. To so bili najbolj občutljivi parametri. Poleg tega pa BPA vpliva tudi na pigmentacijo in gibljivost vodnih osličkov (40).

## 1.6. Učinki hormonskih motilcev na človeka

Zaradi vse večje proizvodnje polimerov, kot so polikarbonati in epoksidne smole, smo ljudje vse bolj izpostavljeni BPA, do katerega pridemo preko stika z okoljem ali hrano in pijačo.

BPA smo lahko izpostavljeni preko:

- vodnih virov (odpadne vode iz čistilnih naprav lahko prehajajo v podtalnico ali se izlivajo v reke in morja),
- zraka (toksični učinki ob vdihovanju zraka, ki vsebuje delčke BPA, so zelo malo verjetni, izjema so le delavci v tovarnah, kjer izdelujejo izdelke iz BPA),
- pijače (plastenke z vsebnostjo BPA),
- hrane (konzervirana hrana, plastična embalaža z vsebnostjo BPA),

- ostalih izdelkov, s katerimi pridemo v stik (termalni papir, medicinski pripomočki ipd.) (41)

Ljudje smo BPA najbolj izpostavljeni preko uživanja hrane in pijače iz vsebnikov, ki vsebujejo BPA. Le-ta lahko prehaja iz embalaže v hrano oz. pijačo že zaradi napake v času proizvodnje. To je obdelava embalaže pri prenizkih temperaturah, saj pri tem BPA ostane na površini in tako lažje prehaja v hrano. V vsebino pa lahko prehaja tudi zaradi nepravilnega shranjevanja (dolgotrajno shranjevanje ali shranjevanje na soncu) ali zaradi termične obdelave izdelka (mikrovalovna pečica) (14, 41).

Leta 2004 je Evropska unija določila mejo vsebnosti BPA v hrani, ki znaša 0,6 mg/kg hrane (14). Ameriška agencija za varovanje okolja ja leta 1988 določila sprejemljivo mejo izpostavljenosti BPA, ki znaša 50 µg na kilogram telesne mase na dan (41).

Leta 2015 je Evropska agencija za varnost hrane, EFSA, predlagala mejo vsebnosti BPA v hrani, ki znaša 4 µg/kg telesne mase na dan (41). Na podlagi večih študij je dnevni vnos BPA manjši od 1 µg na kilogram telesne mase, kar je manj od dovoljene vrednosti v ZDA in Evropski uniji (41). Kljub temu so pa nekatere študije dokazale škodljive učinke na endokrini sistem že pri koncentracijah 0,025–0,2 µg/kg telesne mase/dan (41).

Endokrino delovanje BPA je bilo odkrito leta 1993.

BPA se lahko veže na različne receptorje:

- estrogenske receptorje,
- androgene receptorje,
- glukokortikoidne receptorje,
- estrogenskemu receptorju podoben  $\gamma$ -receptor,
- tiroidne receptorje (7, 42)

Štejemo ga med šibke estrogene, saj je njegova afiniteta do estrogenskih receptorjev 1000–10000-krat manjša od afinitete naravnega hormona. Poznamo dva tipa estrogenskih receptorjev: tip **alfa (ER $\alpha$ )** in tip **beta (ER $\beta$ )**, razlikujeta se po tem, v katerem tkivu se nahajata in kakšen je njun odgovor po vezavi liganda (7). BPA se veže prav tako na ER $\alpha$  kot na ER $\beta$ , čeprav ima večjo afiniteto do ER $\beta$ . Pri ER $\beta$  imamo agonistično, na ER $\alpha$  pa mešano agonistično-antagonistično delovanje (42). Za vezavo na estrogenski receptor je pomembna prisotnost fenolne skupine in določena geometrična razporeditev ostalih funkcionalnih skupin. Za vezavo BPA na ER sta od funkcionalnih skupin pomembni hidroksilna skupina na fenilnem obroču in hidrofobne skupine na centralnem ogljiku (7). Estrogenske receptorje  $\alpha$  in  $\beta$  so našli tudi izven jedra (v mitohondriju in v bližini



plazemske membrane). Ti receptorji se zelo hitro odzovejo na dražljaje. Odkrili so tudi druge membranske estrogenske receptorje, kot je receptor, vezan na protein G, predpostavili pa so tudi, da se BPA lahko veže direktno na nekatere neurotransmitterske receptorje ali ionske kanale in tako sproži hiter celični odgovor.

Estrogeni v našem telesu vplivajo na razvoj in delovanje možganov, kosti, skeletnih mišic, jeter, kardiovaskularnega in hormonskega sistema, zato BPA z vezavo na ER lahko vpliva na prav vse izmed teh sistemov (42). Veliko študij izpostavljenost BPA povezuje s pojavnostjo sladkorne bolezni, debelosti, kardiovaskularnih bolezni (povišan holesterol, hipertenzija, bolezni srca), kronične ledvične bolezni, reproduktivnih motenj (erektilna disfunkcija, neplodnost, slabša kvaliteta semenčic, večje število spontanih splavov, nepravilnosti pri moških reproduktivnih organih), raka (rak dojke, rak prostate), kronične respiratorne bolezni (astma), motenj imunskega in živčnega sistema (vedenjske motnje pri otrocih) in bolezni jeter (8, 10, 42, 43).

## **1.7. EKOTOKSIKOLOŠKI TESTI STRUPENOSTI**

Toksikologija je veja biologije, kemije in medicine oziroma farmakologije, ki obravnava vplive kemičnih substanc na žive organizme. Zelo pomembna je odvisnost med odmerkom, kateremu je organizem izpostavljen, in učinkom, ki ga substanca povzroči. Pri določanju toksičnosti se upošteva odmerek aplicirane substance, način aplikacije oziroma izpostavljenosti, leta, spol in okolje. Za lažje razumevanje v toksikologiji so uvedli podajanje rezultatov kot koncentracija, kjer imamo učinek na 50 % organizmov (**EC50**) oziroma koncentracija, kjer imamo 50 % umrljivost (**LC50**). Predvsem pri ljudeh vpliv toksičnih substanc merimo tudi z opazovanjem nevrotoksičnosti, karcinogenosti, endokrine aktivnosti, različnih fizioloških motenj (motenj živčnih funkcij) in biokemičnih efektov (poškodbe DNK) ter vedenjskih vplivov (44). Zaradi vse večje okoljske ozaveščenosti so leta 1969 uvedli izraz ekotoksikologija, ki obravnava škodljiv vpliv onesnaževal na celoten ekosistem. Ukvarja se s tem, na kakšen način in od kod pride substanca v okolje, ter ocenjuje in meri vplive le-te na okolje in organizme v njem (44). Kemijske analize nam povedo veliko informacij o tem, koliko je neke substance v okolju, ne povedo pa nič o njenih škodljivih vplivih na organizme. Da bi preprečili škodljive vplive toksičnih substanc na okolje, so nujno potrebne ekotoksikološke raziskave.

Eno izmed ekotoksikoloških orodij so strupenostni testi. Zaradi različne občutljivosti testov na toksične substance se za testiranje strupenosti uporablja različne teste in testne

sisteme (44, 45, 46). Ločimo jih glede na trajanje testov. Poznamo kratkotrajne teste, kjer opazujemo akutno toksičnost, in dolgotrajne teste, kjer opazujemo kronično toksičnost. Pri akutnih testih je organizem izpostavljen krajši čas, od nekaj minut do nekaj dni, in dobimo močan, intenziven odgovor na preiskovano substanco, včasih tudi smrtnost. Pri kroničnih testih je organizem izpostavljen subletalnim koncentracijam daljši čas, od nekaj tednov do nekaj let. Tu ne opazujemo le smrtnosti, temveč tudi razmnoževanje, razvoj itd. (47).

### **1.7.1. UPORABA TESTNIH ORGANIZMOV V TESTIH STRUPENOSTI**

Različni testni organizmi se na določeno substanco odzovejo drugače, zato se testi izvajajo na različnih vrstah organizmov (44). Običajno se za teste na vodnih organizmih uporabljajo ribe, raki in alge. Vedno bolj so v uporabi tudi bakterije (46).

Kljub temu da so *in vitro* testi hitre in poceni metode določanja estrogenske aktivnosti substanc v vodi, ti celični sistemi ne upoštevajo zapletenih *in vivo* reakcij zaradi različnih toksikodinamičnih in toksikokinetičnih parametrov. Med te reakcije sodijo absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje. Pri *in vitro* testih pa tudi ni vedno pravilno ocenjena aktivnost mešanic hormonskih motilcev, kjer prihaja do sinergizma, antagonizma ali aditivnosti (48).

#### **1.7.1.1. Strupenostni test z vodnimi bolhami *Daphnia magna***

Pri tem testu ugotavljamo vpliv substanc na planktonske organizme. Ti organizmi imajo pomembno vlogo v prehranjevalni verigi, saj so hrana večjim živalim, kot so ribe.

Vodne bolhe uvrščamo v red *Cladocera* in razred *Branchiopoda*. Poznanih je več kot 1000 različnih vrst, najbolj znane so pa tiste iz rodu *Daphnia*. Izvirajo iz severne in zahodne Severne Amerike, našli so jih tudi v nekaterih delih Afrike in Evrazije (Priloga 5) (49).

Zaradi svojega kratkega življenjskega cikla (40–50 dni) so zelo pogosto uporabljeni organizmi za akutne in kronične strupenostne teste. So enostavne za gojenje in občutljive na kemikalije (50). Vodne bolhe so raki in spadajo med členonožce. Prehranjujejo se s fitoplanktonom in služijo kot hrana večjim vretenčarjem. Prehranjujejo se s filtriranjem organskih delcev, kot so bakterije, alge, raztopljeni organski material.

Živijo v sladkovodnih stoječih vodah, npr. ribnikih, jezerih, mlakah.

Odrasla žival doseže milimetrске velikosti. *Daphnia magna*, ki smo jo uporabili v naših testih, meri v dolžino od 5 do 6mm. Vodna bolha ima posebno oblikovano glavo, na kateri ima sestavljeno oko. Njeno telo povsem obdaja karapaks v obliki lupine. Telo je na zadnji

strani podaljšano v trn. Na oprsju ima pet parov okončin, ki jih uporablja za plavanje. Telo je prosojno, brezbarvno, pigmentirano je le oko. Na hrbtni strani ima valilnik (marsupij), kjer se razvijajo mladiči. Za vodne bolhe je značilno, da se lahko razmnožujejo spolno ali nespolno, odvisno od pogojev. V ugodnih razmerah se razmnožujejo partenogenetsko, kjer samica producira diploidna jajčeca. Večinoma imamo tako v okolju prisotne le samice. Mlade vodne bolhe so v tem primeru genetsko identične odrasli. V neugodnih razmerah, kot so nizka temperatura, pomanjkanje hrane, strupene substance in veliko število organizmov, pa samice izležejo haploidna jajčeca, iz katerih se razvijajo samci. Samci nato oplodijo jajčeca in tako pride do spolnega razmnoževanja, kjer nastanejo zimska jajčeca (efipij), ki so bolj odporna na neugodne vplive (Priloga 6) (50). *Daphnia magna* ima pri 25 °C življenjsko dobo 40 dni, pri 5 °C nižji temperaturi pa se ta podaljša na 55 dni. Spolno zrelost doseže v 6-8 dneh (49, 51). Vodne bolhe, uporabljene v strupenostnih testih, dobimo z nespolnim razmnoževanjem, saj imamo pri tem osebk, ki so genetsko enaki in je tako večja možnost, da so tudi enako občutljivi na določeno substanco.

Fiziološki procesi, kot so levitev, ravnovesje ionov, razvoj spolnih žlez, metabolizem maščob, fiziologija, delovanje srca in prebava, so pri rakah regulirani z nevrohormoni. Večina hormonov pri nevretenčarjih je nevrohormonov (49).

#### **1.7.1.2. Strupenostni test z algami *Desmodesmus subspicatus***

Alge so lahko eno- ali večcelični organizmi. Nahajajo se v sladkih in slanih vodah. Pojavijo se tudi na kopnem. Vsebujejo številne pigmente, fluoksanin, fikoeritrin. Najpomembnejši pa je zelen pigment, imenovan klorofil, ki je ključen za fotosintezo (47). Alge *Desmodesmus subspicatus* so enocelične, sladkovodne, kokalne zelene alge. Imajo neobičkane celice z razvito steno, ki se združijo v kolonije. Najdemo jih predvsem v organsko onesnaženih vodah (Priloga 7) (47). Zelene enocelične alge predstavljajo zelo pomemben člen v vodni prehranjevalni verigi, zato lahko motnje v njihovi rasti močno vplivajo na celoten ekosistem (52). Alge se pogosto uporablja v testih za ugotavljanje strupenosti znanih kemikalij in vodnih vzorcev. Njihove prednosti so velika občutljivost na strupene substance, hitra rast, hitro odzivanje na spremembe v okolju, hitra izvedba testov in nizka cena (53).

Strupenostni testi na algah temeljijo na opazovanju zaviranja rasti alg. Določimo vrednosti IC50 preiskovane substance, to je koncentracija, pri kateri je rast alg za 50 % manjša glede na kontrolo.

## 2. NAMEN DELA

Onesnaževanje okolja postaja iz dneva v dan večji problem. Vsakodnevno v okolje, predvsem v vodne vire, spuščamo velike količine kmetijskih in industrijskih odpadnih snovi. Metode čiščenja odplak niso dovolj učinkovite, saj strupenih spojin ne odstranijo v celoti. Te se tako kopičijo v naravi, kjer so jim izpostavljeni vsi živi organizmi. Bisfenoli spadajo med zelo pogosto uporabljene industrijske spojine, predvsem v izdelavi plastičnih izdelkov. Zaradi množične uporabe bisfenolov velikokrat prihajamo v stik z njimi. Ljudje smo jim izpostavljeni preko onesnaženih voda ter preko uživanja hrane in pijače iz vsebnikov, ki vsebujejo bisfenole. Prisotni pa so tudi v nekaterih vodnih organizmih. Bisfenoli so znani kot hormonski motilci, ki motijo funkcije endokrinega sistema. Za bisfenol A (BPA) je znanih precej ekotoksikoloških podatkov, medtem ko za bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF) teh podatkov primanjkuje, so pa pomembni za oceno varnosti njihove uporabe.

Zato smo se odločili, da bomo v magistrski nalogi preverjali strupenost bisfenola A in njegovih dveh analogov. S pomočjo strupenostnih testov na vodnih organizmih bomo določili koncentracije BPA, BPF in BPAF, ki imajo strupen učinek na vodne organizme. Izvedli bomo kronični test na vodnih bolhah (*Daphnia magna*) in spremljali spremembe v reprodukciji (število mladih na odraslo vodno bolho) in dolžino odrasle vodne bolhe po končanem testu. Strupenost bisfenolov bomo določali tudi na zelenih algah (*Desmodesmus subspicatus*), kjer bomo prav tako izvedli kronični test. Po končanem testu bomo alge prešteli oziroma izmerili fluorescenco alg in nato izračunali procent zaviranja hitrosti rasti alg, ki so bile izpostavljene bisfenolom v primerjavi s hitrostjo rasti alg, ki bisfenolom niso bile izpostavljene.

Preverjali bomo naslednje hipoteze:

- BPA, BPF in BPAF imajo strupene učinke na vodne organizme v koncentracijah, ki se pojavljajo v okolju.
- Razlike v strukturi BPA, BPF in BPAF vplivajo na različno strupenost le-teh na vodne bolhe in zelene alge.

### 3. MATERIALI IN METODE

V preglednici 1 so predstavljeni bisfenol A in njegova dva analoga, ki smo jih proučevali v testih kronične strupenosti za vodne organizme.

Preglednica 1: Podatki o preiskovanih spojinah.

Spojina	Proizvajalec	Molska masa (g/mol)	CAS številka	Čistota (%)
BPA	Sigma-Alfrich, Nemčija	228,29	80-05-7	> 97
BPF	Sigma-Aldrich, Nemčija	200,23	620-92-8	> 97
BPAF	Sigma-Aldrich, Nemčija	336,23	1478-61-1	> 97

#### 3.1. PRIPRAVA RAZTOPIN PREISKOVANIH SPOJIN IN MEDIJEV

##### 3.1.1. Priprava BPA/BPF/BPAF raztopin

Izhodno raztopino ustreznega bisfenola (BPA, BPF, BPAF) smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici (Mettler Toledo, model XP 105 DR, Švica) zatehtali ustrezno količino bisfenola (preglednica 5) in ga prenesli v 2 L bučo. Dodali smo mu 1 L ultra čiste vode (18M $\Omega$ -cm) (MQ) in postavili bučo v ultrazvočno kopel za 1 uro. Nato smo jo prestavili na magnetno mešalo (Ika, model C-MAG HS 7 IKAMAG®, Nemčija) na temperaturo 30 °C. Zmes smo mešali, dokler nismo več zasledili kristalov (tudi čez noč) in jo nato dopolnili z MQ do 2 L ter mešali še 1 uro. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku. Kasneje smo le-to redčili za pripravo vzorcev z različnimi koncentracijami (Preglednica 2).

Preglednica 2: Uporabljene osnovne raztopine bisfenolov v strupenostnih testih.

SPOJINA	Molska koncentracija (mol/L)	Masna koncentracija (mg/L)
BPA	$8,76 \times 10^{-5}$	20
BPF	$9,99 \times 10^{-5}$	20
BPAF	$4,38 \times 10^{-5}$	14,73

### 3.1.2. Priprava medija M4 (54)

Medij za gojenje vodnih bolh in hkrati medij za kronične teste smo pripravili tako, da smo v 10 L stekleno posodo odpipetirali raztopine po sledečem vrstnem redu in dodali ultra čisto vodo ( 18,2 MΩ-cm) do 10 L.

- 40 mL raztopine 1.1.
- 10 mL raztopine 1.2.
- 10 mL raztopine 1.3.
- 10 mL raztopine 1.4.
- 1 mL raztopine 2.1.
- 5 mL raztopine 2.2.
- 2 mL raztopine 2.3.
- 50 mL raztopine 2.3.
- 5 mL raztopine 2.5.
- 1 mL raztopine 2.6.

Raztopine smo v MQ pripravili na sledeč način:

- Raztopina 1.1.: raztopina  $\text{CaCl}_2$   
73,52 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$
- Raztopina 1.2.: raztopina  $\text{MgSO}_4$   
123,3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$
- Raztopina 1.3.: raztopina KCl  
5,8 g/L KCl
- Raztopina 1.4.: raztopina  $\text{NaHCO}_3$   
64,8 g/L  $\text{NaHCO}_3$
- Raztopina 2.1.: kationska raztopina  
V 1 liter MQ smo zatehtali:
  - 3,60 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,
  - 3,06 g LiCl,
  - 0,71 g RbCl,
  - 1,52 g  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,
  - 0,16 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,

- 0,13 g  $\text{ZnCl}_2$ ,
- 0,10 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
- Raztopina 2.2.: anionska raztopina  
V 1 liter MQ smo zatehtali:
  - 0,54 g  $\text{NaNO}_3$ ,
  - 5,72 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,
  - 0,032 g  $\text{NaBr}$ ,
  - 0,13 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
  - 0,006 g  $\text{KJ}$ ,
  - 0,004 g  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,
  - 0,001 g  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .
- Raztopina 2.3.: silikatna raztopina  
475 mg/l  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$
- Raztopina 2.4.: EDTA raztopina  
V 1 liter MQ smo zatehtali:
  - 0,5 g  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
  - 0,19 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .
- Raztopina 2.5.: fosfatna raztopina  
V 1 liter MQ smo zatehtali:
  - 0,28 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
  - 0,19 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .
- Raztopina 2.6.: vitaminska raztopina  
V 1 liter MQ smo zatehtali:
  - 0,7 g tiamin hidroklorida ( $\text{B}_1$ ),
  - 0,01 g cianokobalamina ( $\text{B}_{12}$ ),
  - 0,007 g biotina ( $\text{B}_7$ ).

### 3.1.3. Priprava medija po Jaworskem (12)

V 2 L bučo smo odpipetirali po 2 mL sledečih raztopin in dopolnili z MQ do 2 L.

Preglednica 3: Sestava medija po Jaworskem.

	<b>raztopina</b>	<b>za 200 mL</b>
1.	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	4,0 g
2.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,48 g
3.	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	10,0 g
4.	NaHCO <sub>3</sub>	3,18 g
5.	EDTAFeNa	0,45 g
	EDTANa <sub>2</sub>	0,45 g
6.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,496 g
	MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	0,278 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x4H <sub>2</sub> O	0,20 g
7.	Cianokobalamin	0,008 g
	Tiamin HCl	0,008 g
	Biotin	0,008 g
8.	NaNO <sub>3</sub>	16,0 g
9.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O	7,2 g

### 3.1.4. Priprava ISO rastnega medija: (12)

V 1 L bučo smo odpipetirali sledeče raztopine in z MQ dopolnili do 1 L:

- 10 mL raztopine 1.1.,
- 1 mL raztopine 1.2.,
- 1 mL raztopine 1.3.,
- 1 mL raztopine 1.4..

### 3.1.5. Priprava koncentriranega ISO rastnega medija: (12)

V 100 mL bučko smo odpipetirali sledeče raztopine in dopolnili do 100 mL z MQ:

- 10 mL raztopine 1.1.,
- 1 mL raztopine 1.2.,
- 1 mL raztopine 1.3.,
- 1 mL raztopine 1.4..



## **3.2. TEST ZA DOLOČANJE KRONIČNE STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)**

Kronični test strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna* smo izvajali v skladu z OECD, No. 211, 2012. Kulturo vodnih bolh smo dobili iz inštituta ECT Oekotoxikologie iz Nemčije. Test smo ponovili trikrat za vsak bisfenol.

### **3.2.1. Gojenje vodnih bolh**

Vodne bolhe smo gojili v 3 L steklenih akvarijih, v mediju M4. Začetno število vodnih bolh v akvariju je bilo 20. Akvarije smo osvetljevali z belo fluorescenčno žarnico (36 W, dolžina 120 cm). Intenziteta svetlobe je bila 1800 luks, z dnevno nočnim ciklom, 16 ur svetlobe/8 ur teme.

Vodne bolhe smo hranili štirikrat tedensko (torek, četrtek, sobota, nedelja) z zelenimi algami *Desmodesmus subspicatus*. Alge smo pripravili tako da, smo jih filtrirali skozi filter ter jih sprali in razredčili z razredčevalno vodo. Vsaka vodna bolha je dobila med 0,1 in 0,2 mg ogljika na dan, to je približno 30 mL alg na akvarij. Dvakrat tedensko (ponedeljek in petek) smo jih hranili s Tetramin® (26,7 mg/akvarij), enkrat tedensko (sreda) pa s suhim kvasom (5 µg/akvarij).

### **3.2.2. Potek testa**

Kot testni organizem smo uporabili vodne bolhe, stare največ 24 ur. Za 21 dni smo jih izpostavili različnim koncentracijam bisfenolov in spremljali število mladih na vodno bolho in dolžino odraslih vodnih bolh po 21 dneh.

Za kontrolo smo izbrali le medij M4, brez dodanega bisfenola. Poleg kontrole pa smo pripravili še 5 različnih koncentracij bisfenolov z uporabo geometrijske vrste ( $f=2$ ). Za kontrolo in vsako koncentracijo bisfenola je bilo po 10 paralelk. Rastopino bisfenola smo redčili z medijem M4.

Vsako testno koncentracijo smo pripravili v 500 mL bučki. V bučki smo mediju M4 dodali določen volumen prej pripravljenih raztopin bisfenolov. Kot najvišjo koncentracijo smo vzeli vrednost 24h EC50, ki je bila določena v predhodno izvedenih akutnih testih.

Volumen dodane raztopine bisfenola smo izračunali po sledeči enačbi 1:

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} \quad \text{enačba 1}$$

$V_1$ - volumen dodane raztopine (mL)

$C_1$ -koncentracija vzorca, ki ga dodamo (izhodna raztopina) (mL)

$V_2$ -končni volumen v testni posodi (npr. 500 mL bučka)

$C_2$ -koncentracija vzorca, kateri želimo organizem izpostaviti (mg/L)

Test smo ponovili 3- krat za vsak bisfenol.

V steklene čaše z volumnom 100 mL smo prelili po 50 mL testnega vzorca in v vsako čašo s Pasteurjevo pipeto prestavili 1 vodno bolho. Paziti smo morali, da žival ni bila v stiku z zrakom, ker bi le-ta lahko prišel pod karapaks in tako oviral vitalne funkcije, kot je nemoteno plavanje. Test smo izvajali pri temperaturi  $21 \pm 2$  °C in dnevno nočnem ciklu, 18 ur svetlobe in 6 ur teme. Trikrat na teden smo žival prenesli v čašo z na novo pripravljeno raztopino z isto koncentracijo. S tem smo zagotovili enako izpostavljenost skozi celoten test. Hkrati smo odstranili mlade in jih prešteli. Vodne bolhe smo v dveh ponovitvah testov hranili vsak dan z algami *Desmodesmus subspicatus*, tako da je vsaka bolha dobila 0,1–0,2 mg ogljika na dan. V eni od ponovitev testa smo vodne bolhe hranili le 3-krat tedensko kot predvideva ISO standard.

Prešteto število mladih smo izrazili kot povprečno število mladih na odraslo vodno bolho in jih primerjali s številom mladih v kontroli.

Po 21 dneh, ob koncu testa, smo izmerili tudi dolžino vsake odrasle vodne bolhe.

S pomočjo računalniškega programa, Dunnettova analiza (US Environmental Protection Agency (1994). US Environmental Protection Agency toxicity data analysis software. Environmental Monitoring System Laboratory, Cincinnati, Ohio.), smo izračunali NOEC in LOEC po 21 dneh. NOEC je najvišja koncentracija, ki še ni imela vpliva na organizme, LOEC pa najnižja koncentracija, ki je vpliv na organizme že imela. Strupenost smo ovrednotili glede na zmanjšano število mladih na samico in pa manjšo velikost odrasle vodne bolhe (48).

### **3.3. TEST KRONIČNE STRUPENOSTI Z ZELENI MI ALGAMI (*Desmodesmus subspicatus*)**

Test smo izvajali po postopku, ki ga predpisuje mednarodni ISO standard 8692 (12). Določali smo zaviranje hitrosti rasti zelenih alg *Desmodesmus subspicatus*, Chodat 1926 iz zbirke kultur alg v Nemčiji (SAG 86/81, SAG Culture Collection of Algae, University of Göttingen, Nemčija) zaradi vpliva bisfenolov.

#### **3.3.1. Gojenje alg**

5 mL alg, ki niso starejše od 10 dni, smo sterilno, ob gorilniku, cepili v 500 mL erlenmajerico, v kateri smo imeli 200 mL medija po Jaworskem (poglavje 3.1.3.). Tako pripravljeno raztopino smo postavili na stresalnik. Za test zaviranja hitrosti rasti alg rabimo alge, stare vsaj 6 dni.

#### **3.3.2. Potek testa**

Tri dni pred začetkom testa smo alge sterilno cepili iz medija po Jaworskem v sveže pripravljen ISO rastni medij (poglavje 3.1.4.).

Vzeli smo 200 mL ISO rastnega medija in ga 30 min zračili tako, da smo s cevko v raztopino uvajali zrak ter ga nato še filtrirali skozi filter s porami 1,2  $\mu\text{m}$ . Uravnali smo mu pH na  $8,1 \pm 0,2$  s pomočjo 1 M HCl ali 1 M NaOH. Nato smo sterilno ob ognju cepili 5 mL alg iz medija po Jaworskem v pripravljen ISO rastni medij.

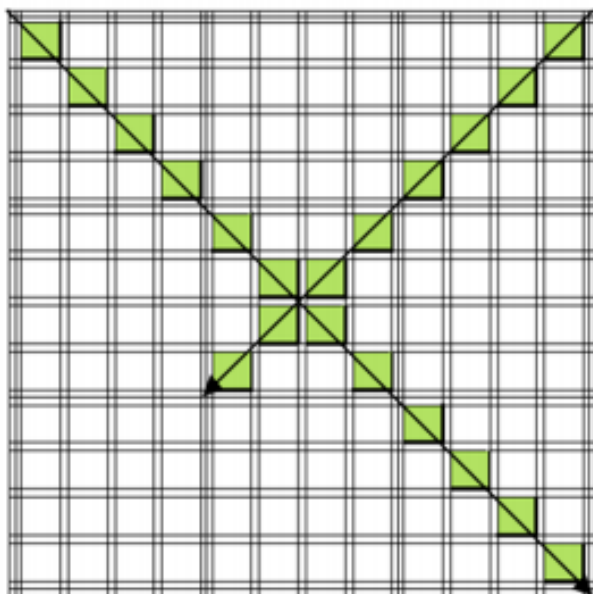
Erlenmajerico smo nato postavili na mešalo, na svetlobo 4000 luksov, na 125 obr/min za 3 dni (15 min stresa/15 min mirovanja).

Tik pred nastavitvijo testa smo pod mikroskopom s pomočjo Bürkerjeve kamrice (slika 8) prešteli alge in po enačbi 2 izračunali koncentracijo alg (št. alg/mL) v ISO rastnem mediju.

$$\text{Št. alg/ml} = \frac{a \times 1000}{b \times c \times d}$$

enačba 2

- Št. alg/ml..... koncentracija alg v ISO rastnem mediju  
 a..... št. alg prešteti v Bürkerjevi kamrici  
 b..... površina kvadratka [mm<sup>2</sup>]  
 c..... globina celice [mm]  
 d..... št. prešteti kvadratkov v Bürkerjevi kamrici



Slika 5: Štetje v Bürkerjevi kamrici

### Štetje alg:

Za štetje smo uporabili Bürkerjevo stekelce, ki ima 2 kamrici, vsaka od teh pa 12 krat 12 kvadratkov. Alge smo prešteli v 20 kvadratih, tako da smo šli po diagonali od zgornjega levega do spodnjega desnega kota (12 kvadratkov) in nato od desnega zgornjega kota proti levemu spodnjemu, le da smo tu prešteli le prvih 8 kvadratkov. Prešteli smo vse alge na sredini kvadratka in vse, ki ležijo na dveh robovih, npr. vedno na spodnjem in levem.

Iz izračunane koncentracije alg v ISO rastnem mediju smo nato po enačbi 3 izračunali volumen alg ( $V_a$ ), ki ga moramo dodati v bučko z volumnom 100 mL, v kateri smo pripravili testno raztopino ustreznega bisfenola.

Izhodna koncentracija alg v erlenmajericah v testu mora biti  $1 \times 10^4$  alg/mL, kar ustreza izmerjeni začetni fluorescenci 18,74.

$$V_a = \frac{10^4 \times 100\text{mL}}{\text{št. alg/mL}} \quad \text{enačba 3}$$

V bučkah z volumnom 100 mL smo, poleg kontrole (vzorec brez dodanih bisfenolov), pripravili 5 različnih testnih koncentracij ustreznega bisfenola. Pripravili smo po dve paralelki za vsako koncentracijo.

Testna raztopina:

- ustrezen volumen vnaprej pripravljene raztopine bisfenola,
- 10 mL koncentriranega ISO rastnega medija,
- izračunan volumen alg ( $V_a$ ),
- MQ do oznake na bučki.

Po 40 mL pripravljenih raztopin smo nato prelili v 100 mL erlenmajerice in jih postavili na stalno stresanje, 125 stresljajev/min za 72 ur ob stalni svetlobi (6000 do 10000 luksov).

Po 72 urah smo v vsakem vzorcu s pomočjo Bürkerjeve kamrice alge prešteli pod mikroskopom in izmerili fluorescenco na spektrofotometru.

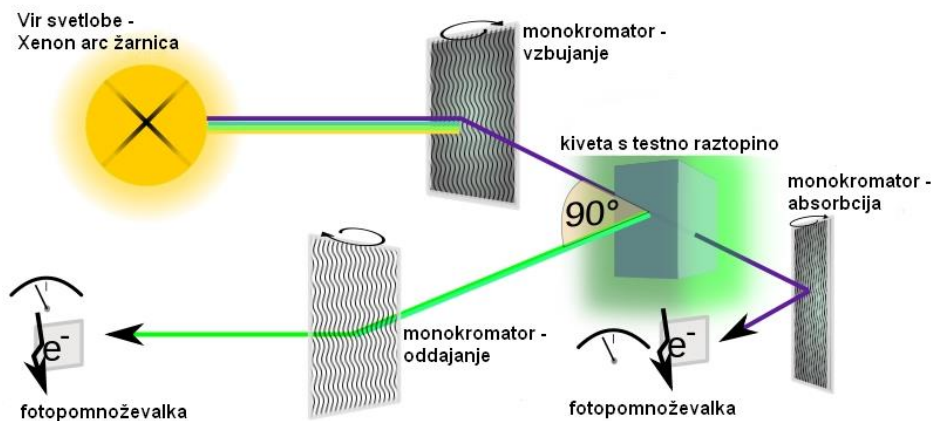
### **Fluorescenčna spektroskopija**

Fluorescenco smo merili s fluorescenčnim spektrofotometrom. Z njim merimo jakost fluorescence substance pri določeni valovni dolžini po vzburjanju z določenim spektrom svetlobe. Jakost oddane svetlobe je premosorazmerna s količino substance v vzorcu. Uporablja se v medicini, kemiji, biokemiji, molekularni biologiji itd.

Fluorescenčni spektrofotometer uporablja dva žarka, ki delujeta drug proti drugemu pod kotom  $90^\circ$ . Zgornji žarek najprej potuje skozi monokromator (naprava, ki iz širšega spektra izhodne svetlobe osami samo določene valovne dolžine) in nato skozi vzorec. Spodnji žarek potuje skozi atenuator (naprava, ki močno stanjša žarek svetlobe) in poskuša izenačiti moč emisijske fluorescence, ki jo oddaja vzorec. Atenuirani žarek in fluorescenco, ki izhaja iz vzorca, lovita ločena detektorja. Intenziteto svetlobe povečata s

pomočjo fotopomnoževalk in spremenita v električne signale, prikazane na zaslonu računalnika (slika 9) (55).

Fluorescenco alg smo merili pri ekscitacijski valovni dolžini 450 nm in emisijski 680 nm.



Slika 6: Delovanje fluorescenčnega spektrofotometra (56).

Hitrost rasti alg ( $\mu_i$ ) smo nato izračunali po enačbi 4, odstotek zaviranja rasti alg (I) za posamezno koncentracijo bisfenola smo pa izrazili z enačbo 5.

### ŠTETJE ALG:

$$\mu_i = \frac{\ln(\text{Št. alg/mL})_{3 \text{ dni}} - \ln(\text{Št. alg/mL})_{\text{zač}}}{3 \text{ dni}}$$

enačba 4

$\mu_i$  .....specifična hitrost rasti alg v vzorcu

$\ln(\text{št. alg/mL})_{3 \text{ dni}}$ .... koncentracija alg po 72 urah

$\ln(\text{št. alg/mL})_{\text{zač}}$ ..... koncentracija alg na začetku testa

## FLUORESCENCA:

$$\mu_i = \frac{\ln F_{3dni} - \ln F_{zač}}{3 dni}$$

*enačba 4*

$\mu_i$ ..... specifična hitrost rasti alg v vzorcu

$F_{3dni}$ ..... fluorescenca alg po 72 urah

$F_{zač}$ ..... fluorescenca alg na začetku testa

$$I = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c}$$

*enačba 5*

$\mu_c$ ..... specifična hitrost rasti alg v kontrolnem vzorcu

$\mu_i$ ..... specifična hitrost rasti alg v posameznem vzorcu

$I$ ..... zaviranje hitrosti rasti alg [%]

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Testi kronične strupenosti z vodnimi bolhami

#### BPA

Vodne bolhe smo izpostavili subletalnim koncentracijam BPA (1,25mg/L; 2,5mg/L; 5mg/L; 10 mg/L).

Za vsako koncentracijo smo, enako kot navajajo podobne študije, pripravili 10 paralelk. Kakšna izmed vodnih bolh nam namreč lahko umre, lahko jim pride zrak pod karapaks ali pa pride do kakšne druge napake, zato moramo imeti zadostno število bolh na koncentracijo za veljaven rezultat.

Kot nestrupeno koncentracijo za testni organizem smo določili 5 mg/L (21,9 $\mu$ mol/L), saj pri tej koncentraciji število mladih na vodno bolho ni bilo signifikantno različno od števila mladih v kontroli in prav tako dolžina odraslih vodnih bolh po koncu testa ni bila signifikantno različna od dolžine vodnih bolh v kontroli. Najnižja testirana koncentracija BPA, ki je že povzročila zmanjšanje števila mladih na samico kot tudi zaviranje rasti vodnih bolh, je bila 10 mg/L (13,8  $\mu$ mol/L) (Preglednici 4 in 6).

**Preglednica 4: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPA po 21 dneh, s hranjenjem vsak dan.**

Koncentracija BPA (mg/L)	Koncentracija BPA ( $\mu$ mol/L)	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	71
1,25	5,475	72
2,5	10,95	73
<b>5*</b>	<b>21,9</b>	70
<b>10**</b>	<b>43,8</b>	13

\*21d NOEC

\*\*21d LOEC

V ponovitvi testa, kjer smo vodne bolhe hranili le 3- krat tedensko, smo po 21 dneh, ob koncu testa, dobili precej manjše število mladih na odraslo vodno bolho (preglednica 5). Po tem lahko sklepamo, da so bile vodne bolhe premalo hranjene, saj se zaradi tega niso razmnoževale.



**Preglednica 5: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPA po 21 dneh s hranjenjem 3- krat tedensko.**

Koncentracija BPA (mg/L)	Koncentracija BPA ( $\mu$ mol/L)	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	24
5	21,9	20
10	43,8	8

**Preglednica 6: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPA po 21 dneh s hranjenjem vsak dan.**

Koncentracija BPA (mg/l)	Koncentracija BPA ( $\mu$ mol/l)	Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe po 21 dneh ( $\mu$ m)
0	0	3350,9
1,25	5,475	3258,8
2,5	10,95	3232,7
<b>5*</b>	<b>21,9</b>	3200,7
<b>10**</b>	<b>4,38</b>	1883,2

**\*21d NOEC**

**\*\*21d LOEC**

V testu strupenosti BPA z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo dokazali, da se s povečevanjem koncentracije BPA povečuje strupenost za vodne bolhe.

Kot najvišjo testno koncentracijo smo vzeli 24h EC50, to je koncentracija, pri kateri je bilo v 24 urah 50 % bolh negibljivih. Le ta koncentracija je bila določena v že prej opravljenih raziskovalnih nalogah.

Že objavljene rezultate kroničnih testov na vodnih bolhah smo našli le za BPA, saj za BPF in BPAF še niso bili narejeni.

Literatura nam za BPA poda nekoliko višje vrednosti za 21-d NOEC in LOEC, ki znašata NOEC= 6,9 mg/L in LOEC= 13,8 mg/L, tako za število mladih kot za dolžino vodnih bolh ob koncu testa (39). 21-d NOEC in LOEC v našem primeru sta bila namreč izmerjena 5 mg/L in 10 mg/L, vendar so rezultati kljub temu primerljivi, saj je razlika minimalna.

## BPF

Vodne bolhe smo izpostavili subletalnim koncentracijam BPF (0,84 mg/L; 1,68 mg/L; 3,35 mg/L; 6,7 mg/L).

Kot koncentracijo BPF, pri kateri nismo opazili signifikantno manjšega števila mladih na samico glede na kontrolo, smo določili 0,84 mg/l (4,195  $\mu\text{mol/L}$ ). Najnižja testirana koncentracija, ki je povzročila kronično strupenost pri testu strupenosti z vodnimi bolhami, je bila 1,68 mg/L (8,39  $\mu\text{mol/L}$ ) (Preglednica 7).

**Preglednica 7: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPF po 21 dneh s hranjenjem vsak dan.**

Koncentracija BPF (mg/L)	Koncentracija BPF ( $\mu\text{mol/L}$ )	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	61
<b>0,84*</b>	<b>4,195</b>	51
<b>1,68**</b>	<b>8,39</b>	32
3,35	16,73	10
6,7	33,46	1

\*21d NOEC

\*\*21d LOEC

V ponovitvi testa, kjer smo vodne bolhe hranili le 3-krat tedensko, smo dobili precej manjše število mladih na odraslo vodno bolho (Preglednica 8).

**Preglednica 8: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPF po 21 dneh s hranjenjem 3- krat tedensko.**

Koncentracija BPF (mg/L)	Koncentracija BPF ( $\mu\text{mol/L}$ )	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	31
0,84	4,195	28
1,68	8,39	17
3,35	16,73	3
6,7	33,46	1

Kot koncentracijo BPF, pri kateri povprečna dolžina vodnih bolh ob koncu testa ni bila signifikantno različna od dolžine vodnih bolh v kontroli, smo določili 1,68 mg/L (8,39  $\mu\text{mol/L}$ ). Najnižja koncentracija, ki je imela vpliv na dolžino vodnih bolh, je 3,35 mg/L (16,73  $\mu\text{mol/L}$ ) (Preglednica 9).

**Preglednica 9: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPF po 21 dneh.**

Koncentracija BPF (mg/L)	Koncentracija BPF ( $\mu\text{mol/L}$ )	Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe po 21 dneh ( $\mu\text{m}$ )
0	0	3554,3
0,84	4,195	3702,9
<b>1,68 *</b>	8,39	3621,9
<b>3,35 **</b>	16,73	3436,1
6,7	33,46	3211,4

**\*21d NOEC**

**\*\*21d LOEC**

### **BPAF**

Vodne bolhe smo izpostavili subletalnim koncentracijam BPAF (0,1125 mg/L; 0,225 mg/L; 0,45 mg/L; 0,9 mg/L)

Kot koncentracijo BPAF, pri kateri število mladih na vodno bolho ni bilo signifikantno manjše od števila mladih na vodno bolho v kontroli, smo določili 0,225 mg/L (0,68  $\mu\text{mol/L}$ ). Najnižja testirana koncentracija BPAF, kjer smo opazili signifikantno manjše število mladih na vodno bolho, pa je bila 0,45 mg/L (1,34  $\mu\text{mol/L}$ ) (Preglednica 10).

**Preglednica 10: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPAF po 21 dneh, s hranjenjem vsak dan.**

Koncentracija BPAF (mg/L)	Koncentracija BPAF ( $\mu\text{mol/L}$ )	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	65
0,1125	0,335	56
<b>0,225 *</b>	0,669	64
<b>0,45 **</b>	1,338	21
0,9	2,677	2

**\*21d NOEC**

**\*\*21d LOEC**

V ponovitvi testa, kjer smo vodne bolhe hranili le 3- krat tedensko, smo dobili precej manjše število mladih na odraslo vodno bolho (preglednica 11).

**Preglednica 11: Povprečno število mladih na odraslo vodno bolho za BPAF po 21 dneh s hranjenjem 3- krat tedensko.**

Koncentracija BPAF (mg/L)	Koncentracija BPAF ( $\mu$ mol/L)	Povprečno število mladih na vodno bolho
0	0	43
0,1125	0,335	35
0,225	0,669	34
0,45	1,338	17
0,9	2,677	2,5

Kot koncentracijo, pri kateri povprečna dolžina vodnih bolh po koncu testa ni bila signifikanto različna od povprečne dolžine vodnih bolh v kontroli, smo določili koncentracijo 0,225 mg/L (0,68  $\mu$ mol/L). Najnižja koncentracija, kjer je bila povprečna dolžina vodnih bolh po koncu testa signifikanto manjša pa je bila 0,45 mg/L (1,34  $\mu$ mol/L) (Preglednica 12).

Določili smo enak 21d NOEC za število mladih na odraslo vodno bolho in pa 21d NOEC glede na povprečno število.

**Preglednica 12: Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe za BPAF po 21 dneh.**

Koncentracija BPAF (mg/L)	Koncentracija BPAF ( $\mu$ mol/L)	Povprečna dolžina odrasle vodne bolhe po 21 dneh ( $\mu$ m)
0	0	3455,75
0,1125	0,335	3369,556
<b>0,225 *</b>	0,669	3281,1
<b>0,45 **</b>	1,338	2856,5
0,9	2,677	2276

\*21d NOEC

\*\*21d LOEC

V preglednici 13 so navedene vrednosti 21d NOEC in 21d LOEC.

Z večanjem koncentracije testiranega bisfenola smo opazili večjo strupenost le-tega na vodne bolhe. Vodne bolhe so imele manjše število mladih na samico glede na kontrolo in manjšo dolžino odrasle vodne bolhe po 21 dneh.

**Preglednica 13: Vrednosti 21d LOEC in 21d NOEC, izračunane iz kroničnih testov strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna* za BPA, BPF in BPAF.**

<i>Daphnia magna</i>	BPA mlade	BPA dolžina	BPF mlade	BPF dolžina	BPAF mlade	BPAF dolžina
<b>21d NOEC</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	21,90	21,90	4,19	8,39	0,67	0,67
<b>21d NOEC</b> (mg/L)	5	5	0,84	1,68	0,225	0,225
<b>21d LOEC</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	43,80	43,80	8,39	16,73	1,34	1,34
<b>21d LOEC</b> (mg/L)	10	10	1,68	3,35	0,45	0,45

Z dobljenimi rezultati smo potrdili naši hipotezi, da imajo BPA, BPF in BPAF škodljiv vpliv na vodne organizme in da se njihov vpliv nanje razlikuje glede na spremembe v strukturi molekule.

Za najbolj strupenega se je izkazal BPAF, saj je 21d LOEC, glede na število mladih na samico in glede na dolžino, že pri 0,45 mg/L.

BPAF vsebuje zelo lipofilno skupino  $-\text{CF}_3$ . Verjetno pride pri BPAF zaradi večje lipofilnosti do večje pasivne difuzije preko membran, boljše biološke razpoložljivosti in tako večjega toksičnega učinka BPAF na organizme (57). Res pa je tudi, da ima organizem učinkovite encime, ki lahko biotransformirajo spojino, ki se tako izloči iz telesa. Sledi mu BPF, kjer je 21d LOEC glede na število mladih na samico 1,68 mg/L, glede na dolžino pa 3,35 mg/L. Za najmanj strupenega se je pa izkazal BPA, kjer 21d LOEC glede na število mladih na samico in glede na dolžino znaša 10 mg/L (Preglednica 13).

Vrstni red glede na kronično strupenost za vodne bolhe je BPAF>BPF>BPA.

Izbrali smo različne testne koncentracije v odvisnosti od bisfenola, saj smo že iz prej opravljenih raziskav vedeli, da ima BPAF največji vpliv na organizme, BPA pa najmanjši. Tako smo za BPA vzeli najvišje koncentracije za BPAF pa najnižje. V večini vodnih vzorcev se pojavljajo nižje koncentracije bisfenolov, kot smo jih imeli mi v testih, vendar pa so v okolici čistilnih naprav lahko te koncentracije še višje od naših testnih. Kljub temu

pa bomo ob tolikšni uporabi bisfenolov lahko kmalu dosegli naše testne koncentracije tudi v okolju, ki ni v bližini čistilnih naprav, kar bi povzročilo množično nepopravljivo škodo na organizmih.

Kot testni organizem smo uporabili vodne bolhe (*Daphnia magna*), saj imajo kratek življenjski cikel (30 dni), so enostavne za gojenje in občutljive na različne spojine. Ena izmed slabosti pri uporabi vodni bolh kot testnega organizma pa je ta, da je razvoj spola lahko pogojen tudi z zunanjimi pogoji. Pri ugodnih življenjskih razmerah se razmnožujejo partenogenetsko (imamo le samice), v neugodnih razmerah (nizka temperatura pomanjkanje hrane ipd.) pa se razmnožujejo spolno in pojavijo se tudi samci. Tako lahko pride pri testu do dvoma, ali so se samci pojavili zaradi vpliva testirane spojine ali pa so bile vodne bolhe podvržene prenizki temperaturi oz. smo jih premalo hranili.

BPA ima pri vodnih bolhah vpliv na celičnem nivoju in na nivoju celotnega organizma, kar so potrdili že v predhodnih študijah (39). Za ostala dva analoga BPA pa teh podatkov primanjkuje oz. jih ni.

Na celičnem nivoju BPA v subletalnih koncentracijah poveča aktivnost glutation S-transferaze. To je eden izmed encimov v glutationskem sistemu, ki ga najdemo pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih. Ima antioksidativno delovanje, z visoko aktivnostjo proti lipidnim peroksidom. Povečana aktivnost glutation S-transferaze nam pokaže, da se BPA metabolizira s pomočjo te detoksifikacijske poti. BPA lahko povzroči oksidativni stres in deluje kot prooksidant. Oksidira se v derivat katehola, ta pa se ponovno oksidira do o-kinona. o-Kinon lahko že v zelo majhnih količinah povzroči nastanek radikalov oz. reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (39).

Na nivoju celotnega organizma pa BPA vpliva na reprodukcijo in rast vodnih bolh. Vpliv BPA na rast in reprodukcijo vodnih bolh lahko razložimo z zaviranjem delovanja ekdisteroidov (39).

Ekdisteroidi so skupina steroidnih hormonov, značilnih za členonožce (žuželke, rake). Predstavljajo pomemben del regulacije razvoja, rasti in razmnoževanja in imajo podobno funkcijo kot androgeni, estrogeni in tiroidni hormoni pri vretenčarjih. Sodelujejo pri regulaciji embrionalnega razvoja pri rakih, regulirajo proces levitve, sodelujejo pa tudi pri regulaciji spermatogeneze, kar jim daje funkcijo reproduktivnega hormona. BPA zavira ekdisteroidno aktivnost, kar se kaže v podaljšani fazi med dvema levitvama in v motnjah v embrionalnem razvoju (58). Čas med rojstvom in prvo levitvijo se pri vodnih bolhah

podaljša, kadar so osebkii izpostavljenim koncentracijam BPA, višjim od 5mg/L (59). Slednje se je pokazalo tudi pri naših testih, saj je bila prav koncentracija 5 mg/L tista zadnja, ki še ni pokazala vpliva na vodno bolho.

Ker je za rast pri vodnih bolhah nujno potrebna levitev, je posledično pri motnji levitve motena tudi rast. Drugi razlog za manjšo rast vodnih bolh bi lahko bil ta, da vodne bolhe več svoje energije usmerijo v odstranjevanje, izločitev ali biotransformacijo toksične substance in jim je s tem manj ostane za rast (40).

Pri vodnih bolhah smo pri povečanju koncentracije BPA, opazili tudi manjšo pigmentacijo, ki pa je natančno nismo spremljali. Pigmentacija pri rakih je kontrolirana hormonsko in razporeditev temnega pigmenta je nadzorovana preko hormona BPDH (black pigment dispersing hormone). Poročali so, da hormonski motilci v subletalnih koncentracijah zavirajo sproščanje BPDH-ja, v našem primeru lahko sklepamo, da tudi BPA vpliva na razporeditev temnega pigmenta pri vodnih bolhah (40).

Že objavljenih podatkov o kronični izpostavljenosti vodnih bolh BPF in BPAF nismo našli, saj na tem področju še ni bilo narejenih in objavljenih raziskav.

## **4.2. Test kronične strupenosti z zelenimi algami**

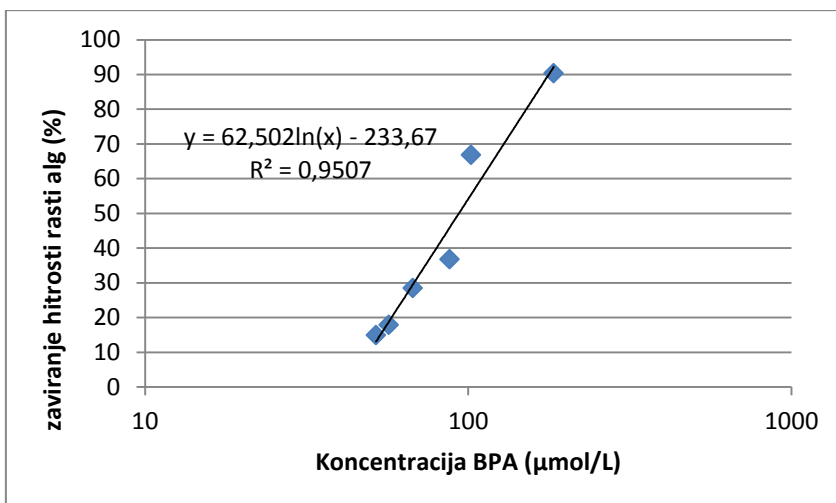
### **4.2.1. Rezultati, podani glede na merjenje fluorescence**

#### **BPA**

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPA (6,99 mg/L; 12,96 mg/L; 15,38 mg/L; 20,00 mg/L; 23,33 mg/L; 41,99 mg/L).

Za vsako koncentracijo smo pripravili po tri paralelke in jih čim bolj enakomerno razporedili pod svetlobo. Količina svetlobe namreč zelo vpliva na rast alg. V erlenmajericah, ki so bile postavljene na robu testne plošče, je zrastle nekoliko manj alg kot v erlenmajericah, postavljenih na sredini plošče, kjer so prejemale svetlobo bolj enakomerno.

72h IC50 vrednost za BPA, glede na merjenje fluorescence, je znašala 21,36 mg/L (90,0  $\mu$ mol/L) (graf 1). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 11,83 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja hitrosti rasti (90 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPA 41,98 mg/L.

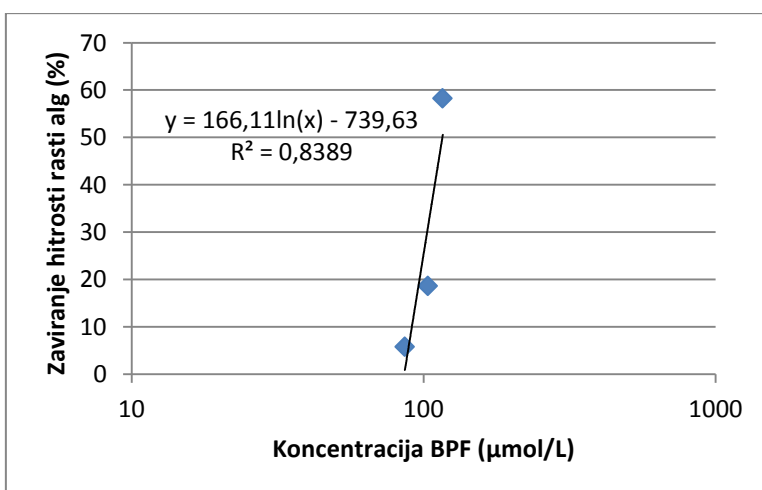


Graf 1: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPA.

#### 4.2.1.2. BPF

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPF (2,22 mg/L; 14,40 mg/L; 17,28 mg/L; 20,74 mg/L; 23,30 mg/L).

72h IC50 vrednost za BPF, glede na merjenje fluorescence, je 24,45 mg/L (116,0 µmol/L) (graf 2). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 14,40 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja hitrosti rasti (58 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPF 23,30 mg/L.



Graf 2: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPF.

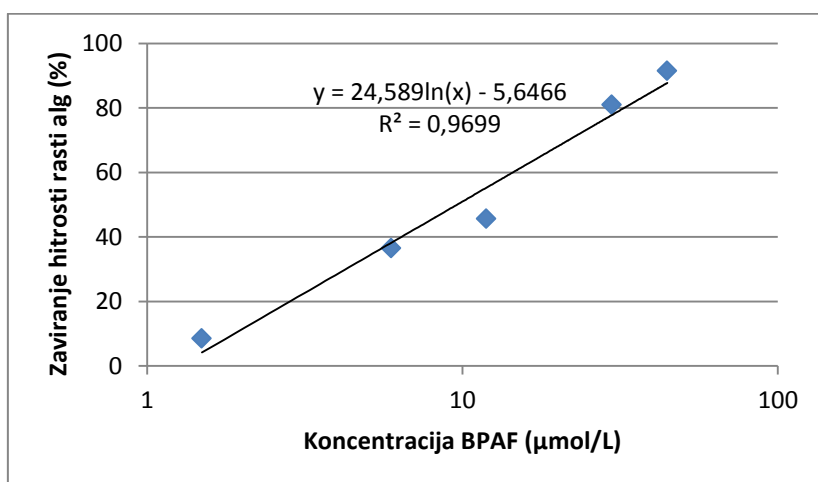


## BPAF

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPAF (0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 1,85 mg/L; 3,99 mg/L; 9,99 mg/L; 14,99 mg/L).

72h IC50 vrednost za BPAF, glede na merjenje fluorescence, je 3,23 mg/L (9,6  $\mu$ mol/L) (graf 3). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 0,50 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja hitrosti rasti (91 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPAF 14,99 mg/L.

Ker smo že pri vodnih bolhah opazili veliko večjo strupenost BPAF v primerjavi z BPA in BPF, smo pri testu z BPAF vzeli nižje koncentracije bisfenola, kar se je izkazalo za pravilno, saj smo že pri koncentraciji 15 mg/L dobili zaviranje hitrosti rasti alg višje od 90 %.



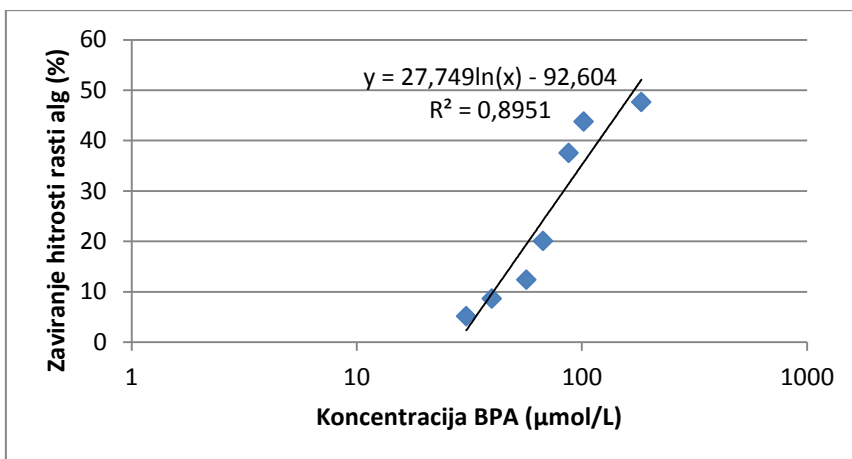
Graf 3: Zaviranje hitrosti rasti alg, določeno z merjenjem fluorescence, v odvisnosti od koncentracije BPAF.

### 4.2.2. Rezultati podani, glede na preštete alge pod mikroskopom

#### BPA

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPA (6,99 mg/L; 12,96 mg/L; 15,37 mg/L; 20,00 mg/L; 23,32 mg/L; 41,99 mg/L)

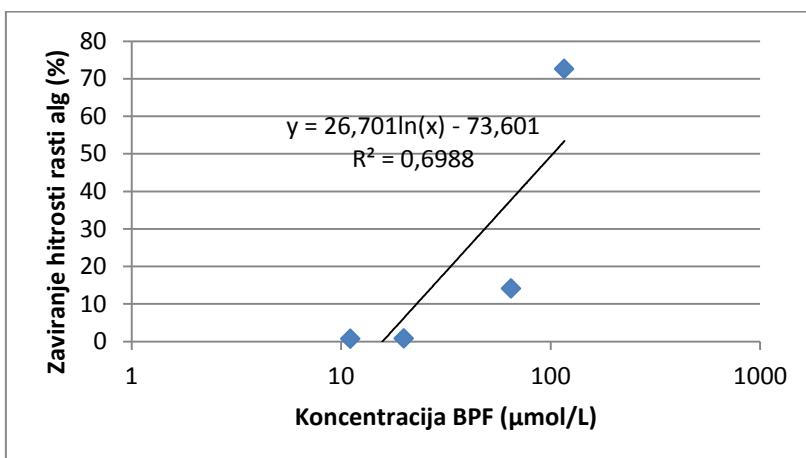
72h IC50 vrednost za BPA, glede na štetje alg, smo določili pri 38,93 mg/L (170,0  $\mu$ mol/L) (graf 4). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 6,99 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja (48 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPA 41,99 mg/L.



Graf 4: Zaviranja hitrosti rasti alg, določeno s štetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPA.

### BPF

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPF (2,22 mg/L; 14,40 mg/L; 17,28 mg/L; 20,74 mg/L; 23,30 mg/L). 72h IC<sub>50</sub> vrednost za BPF, glede na štetje alg, je znašalo 20,07 mg/L (102,4 µmol/L) (graf 5). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 7,20 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja (73 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPF 23,30 mg/L.



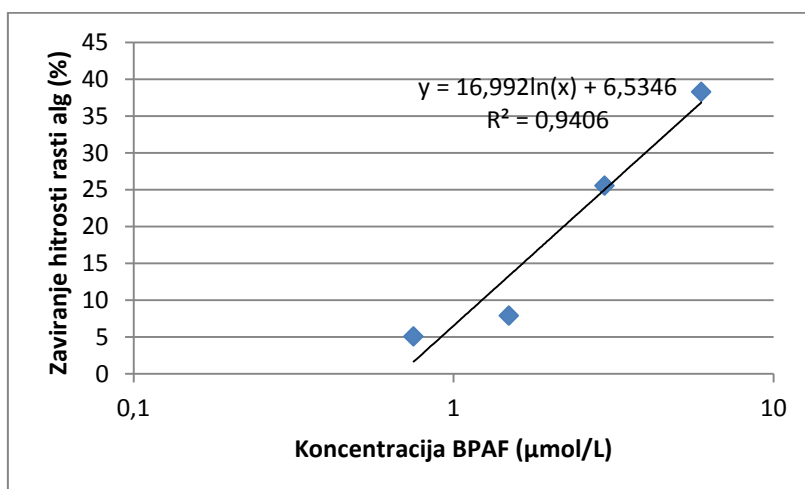
Graf 5: Zaviranja hitrosti rasti alg, določeno s štetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPF.

### 4.2.2.3. BPAF

Alge smo izpostavili različnim koncentracijam BPAF (0,25 mg/L; 0,50 mg/L; 1,85 mg/L; 3,99 mg/L; 9,99 mg/L; 14,99 mg/L).

72h IC<sub>20</sub> vrednost za BPAF, glede na štetje alg, je 0,74 mg/L (2,2 µmol/L) (graf 6). Zaviranje hitrosti rasti alg se je začelo pri koncentraciji 0,25 mg/L, najvišjo stopnjo zaviranja (38 %) pa smo pri našem testu opazili pri koncentraciji BPAF 2,00 mg/L. Pri

BPAF smo izračunali le IC20 namesto IC50, saj smo za največjo stopnjo zaviranja dobili komaj 38 %. Pri višjih koncentracijah BPAF je bilo število alg tako majhno, da ga pod mikroskopom nismo več mogli prešteti.



Graf 6: Zaviranja hitrosti rasti alg, določeno s štetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije BPAF.

V preglednici 14 so podane vrednosti 72h IC50 za posamezen bisfenol, glede na izmerjeno fluorescenco in glede na štetje alg pod mikroskopom. Z večanjem koncentracije bisfenolov smo opazili povečano zaviranje hitrosti rasti alg.

Kot najbolj strupen se je zopet pokazal BPAF, sledi mu BPA, najmanj vpliva na hitrost rasti alg pa je imel BPF.

**Preglednica 14: Vrednosti IC50 za kronično strupenost bisfenolov, določene z merjenjem fluorescence in štetjem pod mikroskopom, v odvisnosti od koncentracije bisfenolov.**

Fluorescenca	BPA	BPF	BPAF
72h IC50 (µmol/L)	90,0	116,0	9,6
72h IC50 (mg/L)	21,36	24,45	3,23
72h IC90 (µmol/L)	180,0	/	50,0
72h IC90 (mg/L)	4,21	/	15,79
<b>Štetje</b>			
72h IC20 (µmol/L)	60,0	30,0	2,0
72h IC20 (mg/L)	13,21	6,68	0,74
72h IC50 (mmol/L)	0,17	0,10	/
72h IC50 (mg/L)	38,93	20,07	/

Zaviranje rasti alg smo določali na dva različna načina, s štetjem alg pod mikroskopom smo dobili nižje vrednosti IC50 kot pri merjenju fluorescence alg. Vzrok temu bi lahko bile težave, ki smo jih imeli pri štetju alg pri višjih koncentracijah bisfenolov. Tam smo imeli namreč tako majhno število alg, da jih pod optičnim mikroskopom nismo mogli prešteti.

Narejenih je bilo že veliko raziskav vpliva BPA na različne vrste zelenih alg. Med preiskovanimi vrstami alg so bile nekatere bolj občutljive za BPA kot *Desmodesmus subspicatus*, nekatere pa nekoliko manj. Res pa je, da je večina testov potekala daljši čas, to je 96 oz 120 ur, v našem primeru je bil čas izpostavitve alg bisfenolom 72h.

Staples s sodelavci (1998) je v svojem pregledu zbral 96h EC50 za BPA za zelene alge, ki so znašali od 1,00 do 3,10 mg/L BPA (60). Za zeleno algo *Selenastrum capricornutum* je 96h EC50 za BPA znašal 2,70 mg/L (61) oz. 2,50 mg/L (62), za zeleno algo *Skeletonema costatum* pa 1,00 mg/L (61). Za zeleno algo *Stephanodiscus hantzschii* je bila dokazana višja vrednost EC50  $8,65 \pm 0,26$  mg/L (63). Slednje zelene alge so na BPA precej bolj občutljive kot *Desmodesmus subspicatus*, glede na naše teste.

120h EC50 za BPA za zeleno algo *Chlamydomonas mexicana* je znašal 44,8 mg/L, za zeleno algo *Chorella vulgaris* pa 39,8 mg/L. Zadnji dve algi pa sta se izkazali za manj občutljivi na BPA kot *Desmodesmus subspicatus*, vendar moramo upoštevati, da so testi v tej raziskavi potekali 120 ur, naši pa le 72 ur, kar lahko vpliva na rezultat.

Pri 25mg/L BPA je bila rast alg rahlo inhibirana v prvih petih dneh poskusa, nato pa so si alge do 10 dneh, to je do konca poskusa, nekoliko opomogle. Medtem ko je bilo pri 50 mg/L BPA dokazano močno zaviranje rasti, pri *C. mexicana* 18%, pri *C. vulgaris* pa kar 85% (64).

Podatkov o strupenosti BPF in BPAF na alge v literaturi še ni objavljenih, saj na tem področju še ni bilo narejenih raziskav.

## 5. Sklep

Na podlagi našega eksperimentalnega dela smo dobili naslednje zaključke:

### 1. Strupeni učinek BPA, BPF in BPAF na vodne organizme

#### • Vodne bolhe

S pomočjo kroničnih strupenostnih testov smo dokazali vpliv BPA, BPF in BPAF na razmnoževanje in rast vodnih bolh.

Pri vplivu na razmnoževanje vodnih bolh smo določili naslednje vrednosti:

- BPA: 21d NOEC 5 mg/L; 21d LOEC 10 mg/L,
- BPF: 21d NOEC 0,84 mg/L; 21d LOEC 1,68 mg/L,
- BPAF: 21d NOEC 0,225 mg/L; 21d LOEC 0,45 mg/L.

Prišli smo do zaključkov, da bisfenoli vplivajo na delovanje ekdisteroidov, tako da jih inhibirajo. Ekdisteroidi so steroidni hormoni, ki predstavljajo pomemben del regulacije razvoja, rasti in razmnoževanja pri vodnih bolhah.

Pri vplivu na rasti vodnih bolh smo določili naslednje vrednosti:

- BPA: 21d NOEC 5 mg/L; 21d LOEC 10 mg/L,
- BPF: 21d NOEC 1,68 mg/L; 21d LOEC 3,35 mg/L,
- BPAF: 21d NOEC 0,225 mg/L; 21d LOEC 0,45 mg/L.

V večini vodnih vzorcev sicer najdemo nižje vrednosti bisfenolov (BPA= 0,007-0,075 µg/L, BPF= 0,0025 µg/L, BPAF= 0,0009- 0,246 µg/L ), vendar pa lahko izcedne vode v bližini deponij oz. čistilnih naprav vsebujejo tudi veliko višje vrednosti BPA, tudi take, kot smo jih mi uporabili v testu.

#### • Zelene alge

S pomočjo kroničnih strupenostnih testov smo dokazali vpliv BPA, BPF in BPAF na hitrost rasti zelenih alg. Ob izpostavljenosti zelenih alg bisfenolom je prišlo do zaviranja hitrosti rasti alg.

Pri določevanju alg s fluorescenco smo dobili naslednje vrednosti:

- BPA: IC50= 21,36 mg/L,
- BPF: IC50= 24,45 mg/L,
- BPAF: IC50= 3,23 mg/L.

Pri štetju alg pod mikroskopom smo dobili naslednje vrednosti:

- BPA: IC<sub>50</sub>= 38,93 mg/L,
- BPF: IC<sub>50</sub>= 20,07 mg/L,
- BPAF: IC<sub>20</sub>= 0,74 mg/L.

2. Razlika v strupenosti med različnimi analogi bisfenola A

Kot najbolj strupen, z največ vpliva na vodne bolhe in zelene alge, se je izkazal BPAF (21d LOEC<sub>razmnož.</sub> 0,45 mg/L; 21d LOEC<sub>dolžina</sub>= 0,45 mg/L; IC<sub>50F</sub>= 3,23 mg/L; IC<sub>20štetje</sub>= 0,74 mg/L). BPAF, z razliko od BPA in BPF, vsebuje zelo lipofilno skupino -CF<sub>3</sub>. Verjetno pride pri BPAF zaradi večje lipofilnosti do večje pasivne difuzije preko membran, boljše biološke razpoložljivosti in tako večjega toksičnega učinka BPAF na organizme. Po strupenosti BPAF sledi BPF, kot najmanj strupen, z najmanj vpliva na organizme, se je izkazal BPA.

## 6. LITERATURA

1. LaFleur AD, Schug KA: A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous system. *Anal Chim Acta* (2011) 6-26.
2. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP):  
<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/whatare.htm> Dostop: 8.12.2014.
3. Dekant W, Colnot T: Endocrine effects of chemicals: Aspects of hazard identification and human health risk assessment. *Toxicol Lett* 2013: 280-6.
4. Endocrine Disrupting Chemicals-2012:  
[http://unep.org/pdf/9789241505031\\_eng.pdf](http://unep.org/pdf/9789241505031_eng.pdf) Dostop: 8.12.2014.
5. IPCS Global Assessment of ECDs:  
<http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf?ua=1> Dostop 22.12.2014.
6. Silva CP, Otero M, Esteves V: Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environ Pollut* 2012; 165: 38-58
7. Schmidt J, Peterlin Mašič L: Organic Synthetic Environmental Endocrine Disruptors: Structural Classes and Metabolic Fate. *Acta Chim Slov* 2012; 59: 722-38.
8. Lee S, Liao C, Song GJ, Ra K, Kannan K, Moon HB: Emission of bisphenol analogues including bisphenol A and bisphenol F from wastewater treatment plants in Korea. *Chemosphere* 2015; 119: 1000-1006.
9. Santhi VA, Sakai N, Ahmad ED, Mustafa AM: Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water; *Scie of the Total Environ* 2012; 427-428: 332-338.
10. Michalowicz J: Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37: 738-58.
11. <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-9433.html> , Dostop: 22.1.2015
12. International Organisation for Standardization 2012. Water quality- Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Standard ISO 8692:2012, Geneve.

13. Rogers JA, Metz L, Yong VW: Review: Endocrine disruption chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol* 2013; 53: 421-30.
14. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scioppo ML, Van Loco J, Covaci A: A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 2012; 50:3725-40.
15. Kang JH, Katayama Y, Kondo F: Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals; *Toxicol* 2006;217:81-90.
16. Yang Y, Yin J, Yang Y, Zhou N, Zhang J, Shao B, Wu Y: Determination of bisphenol AF (BPAF) in tissues, serum, urine and feces of orally dosed rats by ultra-high-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2012; 901: 93-7.
17. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/257591?lang=en&region=SI> , Dostop: 22.1.2015
18. Chemical Information Profile for Bisphenol AF [CAS No. 1478-61-1]. Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program. National Toxicology Program 2008. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem\\_background/exsumpdf/bisphenolaf\\_093008\\_508.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_508.pdf) , Dostop: 22.1.2015
19. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B: Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol Lett* 2012; 211: 201-9.
20. Matsushima A, Liu X, Okada H, Shimohigashi Y: Bisphenol AF Is a Full Agonist for the Estrogen Receptor ER $\alpha$  but a Highly Specific Antagonist for ER $\beta$ . *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1267-72.
21. Schmidt J, Kotnik P, Trontelj J, Knez Ž, Peterlin Mašič L: Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicol in Vitro* 2013; 27: 1267-76.
22. Zhang L, Lv J, Xu T, Yang L, Jiang X, LI Q: High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound-bisphenol AF from wastewaters. *Sep Purif Technol* 2013; 116: 145-53.



23. Lu Z, Lin K, Gan J: Oxidation of bisphenol F (BPF) by manganese dioxide. *Environ Pollut* 2011; 159: 2546-51.
24. Gruber T, Nestler R, Seichter W, Bombicz P: Crystal structures and isometricity comparison of methylated bisphenol F derivatives. *J Mol Struct* 2014; 1056-1057: 319-25.
25. <http://store.accustandard.com/bisphenol-f.html> , Dostop: 23.1.2015
26. Zhang L, Pan F, Liu X, Yang L, Jiang X, Yang J, Shi W: Multi-walled carbon nanotubes as sorbent for recovery of endocrine disrupting compound-bisphenol F from wastewater. *Chem Eng J* 2013; 218: 238-46.
27. Wang X, Yang L, Jin X, Zhang L: Electrochemical determination of estrogenic compound bisphenol F in food packaging using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Food Chem* 2014; 157: 464-9.
28. Cabaton N, Zalko D, Rathahao E, Canlet C, Delous G, Chagnon M, Cravedi J, Perdu E: Biotransformation of bisphenol F by human andr at liver subcellular fractions. *Toxicol in Vitro* 2008; 22: 1697-704.
29. Cabaton N, Dumont C, Severin I, Perdu E, Zalko D, Cherkaoui-Malki M, Chagnon MC: Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 2009; 255: 15-24.
30. Bhandari RK, Deem SL, Holliday DK, Jandegian CM, Kassotis CD, Nagel SC, Tillitt DE, vom Saal FS, Rosenfeld CS: Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species; *General and Comparative Endocrinology* 2014;xx:xx-xx
31. Braga O, Smythe GA, Schafer AI, Feitz AJ: Steroid estrogens in primary and tertiary wastewater treatment plants; *Water Sci Technol* 2005; 52: 273-278.
32. Fromme H, Kuchler T, Otto T, Muller J, Wenzel A: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 2002; 36: 1429-38.
33. Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette Jr. LJ: An ecological assessment of bisphenol-A:Evidence from comparative biology; *Reproductive Toxicol* 2007; 24:225-239.

34. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W: Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 127-33.
35. Jurgella GF, Marwah A, Malison JA, Peterson R, Barry TP: Effects of xenobiotics and steroids on renal and hepatic estrogen metabolism in lake-trout. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 148:273-81.
36. Lee CC, Jiang LY, Kuo YL, Chen CY, Hsieh CY, Hung CF, Tien CJ: Characteristics of nonylphenol and bisphenol A accumulation by fish and implications for ecological and human health; *Science of the Total Environment* 2015; 502: 417-425.
37. [http://mss.svarog.si/biologija/index.php?page\\_id=8088](http://mss.svarog.si/biologija/index.php?page_id=8088) , Dostop: 6.4.2015
38. Hayashi L, Sheth M, Young A, Kruger M, Wayman GA, Coffin AB: The effect of the aquatic contaminants bisphenol-A and PCB-95 on the zebrafish lateral line; *NeuroToxicology* 2015; 45: 125-136.
39. 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 environm safety*; 2012; 86: 213-218.
40. Plahuta M, Tišler T, Pintar A, Toman MJ: Adverse effects of bisphenol A on water louse (*Asellus aquaticus*); *Ecotox and Environm Safety* 2015; 117:81-88.
41. Kang JH, Kondo F, Katayama Y: Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 2006; 226: 79-89.
42. Alonso-Magdalena P, Belén Ropero A, Soriano S, García-Arévalo M, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Nadal A. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355:201-7.
43. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B: Bisphenol A and human cronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int* 2014; 64: 83-90.
44. Walker C, *Ecotoxicology, Effects of Pollutants on the Natural Enviroment*, Taylor and Francis Group, 2014.

45. Plahuta M, Tišler T, Toman MJ, 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.
46. Tišler T, Jemec A, Mozetič B, Trebše P: Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 2009; 76: 907-914.
47. Eaton AD, Clesceri LS, Rice WE, Greenberg EA: Standard methods for the examination of water & wastewater, 21st edition. Washington, American Public Health Association, 2005.
48. Chen PJ, Linden KG, Hinton DE, Kashiwada S, Rosenfeldt EJ, Kullman SW: Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis an UV advanced oxidation. *Chemosphere* 2006; 65: 1094-1102.
49. Brennan SJ, Brougham CA, Roche JJ, Fogarty AM: Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*; 2006; 64: 49-55.
50. Ebert D, Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*, National Library of Medicine (US), 2005.
51. <http://www.zgd.si/vodne-bolhe-daphnia-sp/>
52. Laohaprapanon S, Kaczala F, Salomon PS, Marques M, Hogland W: Wastewater generated during cleaning/washing procedures in a wood-floor industry: toxicity on the microalgae *Desmodesmus subspicatus*; *Environ Technol* 2012: 1-8.
53. Pavlič Ž, Vidaković-Cifrek Ž, Puntarić D: Toxicity of surfactants to green microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*; 2005; 61: 1061-1068.
54. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 211, 2012: *Daphnia magna* Reproduction Test. ULR: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712171e.pdf?expires=1423417959&id=id&accname=guest&checksum=A223F152E395F3D3E4FC1211C2B455E1> , Dostop 8.2.2015
55. An introduction to Fluorescence Spectroscopy: <http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf> , Dostop: 30.3.2015

56. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Fluorimeter\\_diagram\\_en.svg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Fluorimeter_diagram_en.svg)
57. Khetan SK, Collins TJ: Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry, *Chemical Reviews*; 2007;107: 2319-2364.
58. Mu X, LeBlanc GA: Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacea *Daphnia magna*.; *The Journal of Experimental Zoology* 2002; 292(3): 287-292.
59. Mu X, Rider CV, Hwang GS, Hoy H, LeBlanc GA: Covert signal disruption: Anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways; *Environm Toxicol and Chem* 2005;24:146-152.
60. Staples CA, Dom PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR: A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A; *Chemosphere* 1998; 36:2149-2173.
61. Alexander HC, Cill DC, Smith LW, Guiney PD, Dorn PB: Bisphenol A: acute aquatic toxicity; *Environ Toxicol Chem* 1988; 7:19-26.
62. Stephenson RR: Diphenylal propane: acute toxicity to *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum*. Group Research Report: Shell Research Limited, Sittingbourne Research Centre, Sittingbourne, Kent, England, 1983.
63. Li R, Chen GZ, Tam NFY, Luan TG, Shin PKS, Cheung SG, Liu Y: Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*; *Ecotox and Environm Safety* 2009; 72: 321-328.
64. Ji MK, Kabra AN, Choi J, Hwang JH, Kim JR, Abou-Shanab RAI, Oh YK, Jeon BH: Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae *Chlamydomonas mexicana* and *Chlorella vulgaris*; *Ecolog. Enginnee* 2014; 73: 260-269.
65. Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A: Endocrine disruptors in the environment (IUPAC technical Report); *Pure and Applied Chemistry* 2003; 75, 5: 631-681.
66. Huang YO, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L, Wong MH: Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int* 2012; 42: 91-99.
67. Yang Y, Lu L, Zhang J, Yang Y, Wu Y, Shao B: Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid

- chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2014; 1328:26-34.
68. Nakanishi J, Miyamoto K, Kawasaki H: Bisphenol A Risk Assessment Document (AIST Risk Assessment Document Series No. 4) Summary. 2007. New Energy and Industrial Technology Development Organization, Research Center for Chemical Risk Management, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.
  69. <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php> , Dostop: 27.1.2015
  70. <http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>, Dostop: 31.1.2015

## PRILOGE

Priloga 1: Skupine hormonskih motilcev (65).

<b>Skupine hormonskih motilcev</b>	<b>Hormonski motilci</b>
<b>Naravni steroidni hormoni</b>	Estrogeni, androgeni in progesteroni-proizvajajo jih ljudje in živali ter jih izločajo v okolje.
<b>Sintetični steroidni hormoni</b>	Farmacevtski izdelki, kot so peroralni kontraceptivi (hormoni za preprečevanje ovulacije) in steroidi za terapije v menopavzi.
<b>Pesticidi</b>	Biološko aktivne snovi, DDT, ciklodieni, metoksiklor, linuron, atrazin ter pesticidi, ki imajo na organsko skupino vezano kovino živo srebro, svinec ali tributil kositer.
<b>Fitoestrogeni</b>	Naravni rastlinski proizvodi z estrogeno aktivnostjo, kot so flavonoidi in lignani.
<b>Poliklorirane spojine</b>	Policiklični aromatski ogljikovodiki, ki nastajajo pri nepopolnem izgorevanju, poliklorirani bifenili, ki jih uporabljamo v industriji kot plastifikatorje, maziva, hladilne tekočine itd.
<b>Organske kisikove spojine</b>	Bisfenoli in ftalati, ki se dodajajo plastiki ter dioksini, ki jih najdemo v plastiki, belilih in smolah.
<b>Površinsko aktivne snovi</b>	Kemikalije, ki se uporabljajo predvsem v proizvodnji detergentov, predvsem nonilfenolne in oktilfenolne spojine.

Priloga 2: Svetovna produkcija BPA (66).

<b>Država/regija</b>	<b>Produkcija (10<sup>3</sup> ton/leto)</b>	<b>Procenti (%)</b>
<b>USA</b>	1075	22,9
<b>Tajvan</b>	615	13,1
<b>Japonska</b>	611	13,0
<b>Nemčija</b>	456	9,7
<b>Nizozemska</b>	410	8,7
<b>Španija</b>	280	6,0
<b>Koreja</b>	260	5,5
<b>Singapur</b>	230	4,9
<b>Centralna Kitajska</b>	167	3,6

<b>Rusija</b>	165	3,5
<b>Tajska</b>	160	3,4
<b>Brazilija</b>	27	0,6
<b>Poljska</b>	12	0,3
<b>Češka in Slovaška</b>	8,5	0,2
<b>Skupaj</b>	<b>4696,5</b>	<b>100</b>

Priloga 3: Koncentracije bisfenolov A, F in AF v vzorcih iz okolja na Kitajskem (67).

<b>Vzorec</b>	<b>ng/L</b>		
	<b>BPA</b>	<b>BPF</b>	<b>BPAF</b>
<b>Vzorec reka 1</b>	74,58	2,47	123,44
<b>Vzorec reka 2</b>	26,39	2,84	245,69
<b>Vzorec reka 3</b>	11,40	Ni zaznan	2,17
<b>Vzorec reka 4</b>	10,84	Ni zaznan	1,73
<b>Vzorec reka 5</b>	6,59	Ni zaznan	0,90
<b>ng/g suhe teže</b>			
<b>Vzorec sediment 1</b>	20,56	<MLOQ*	111,65
<b>Vzorec sediment 2</b>	42,76	30,16	2009,80
<b>Vzorec sediment 3</b>	6,63	6,24	708,81
<b>Vzorec sediment 4</b>	9,09	0,66	488,90
<b>Vzorec sediment 5</b>	1,37	Ni zaznan	0,18

\*MLOQ=meja kvantifikacije

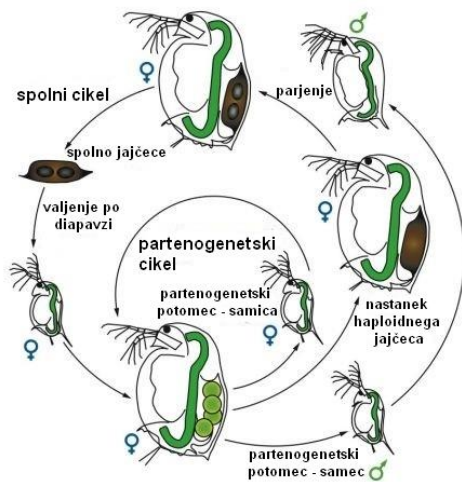
Priloga 4: Zbrane najvišje vrednosti BPA v naravi, iz različnih raziskav (68).

	<b>Vrednosti BPA</b>
<b>Podzemne vode</b>	3,29 µg/L
<b>Površinske vode</b>	22 µg/L
<b>Vode iz čistilnih naprav</b>	0,42 µg/L
<b>Vodovodna voda</b>	0,007 µg/L
<b>Deževnica</b>	0,04 µg/L
<b>Ribe in školjke</b>	30 µg/kg

Priloga 5: Vodna bolha- *Daphnia magna* (69).



Priloga 6: Življenjski cikel vodne bolhe (*Daphnia magna*) (51).



Priloga 7: Zelene alge- *Desmodesmus subspicatus* (70).

