

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ALJA KREL**

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALJA KREL

**STRUPENOST BISFENOLOV A, F IN AF ZA RIBE ZEBRICE  
(*DANIO RERIO*), VODNE BOLHE (*DAPHNIA MAGNA*) IN  
BAKTERIJE *VIBRIO FISCHERI***

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

**TOXICITY OF BISPHENOLS A, F AND AF ON ZEBRAFISH (*DANIO  
RERIO*), WATER FLEAS (*DAPHNIA MAGNA*) AND BACTERIA  
*VIBRIO FISCHERI***

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo in na Kemijskem inštitutu v L05 Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom dr. Tatjane Tišler.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc in somentorici dr. Tatjani Tišler za vso pomoč, spodbudo in usmerjanje pri izvedbi in pisanju magistrske naloge. Posebna zahvala je namenjena staršema za podporo in potrpežljivost, ki sta mi jo izkazovala tekom študija.

### **Izjava**

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

Alja Krel

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	II
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
KAZALO PRILOG .....	VII
POVZETEK .....	VIII
ABSTRACT .....	X
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XII
1 UVOD .....	1
1.1 ENDOKRINI MOTILCI.....	1
1.1.1 Lastnosti BPA.....	3
1.1.2 Lastnosti BPF .....	5
1.1.3 Lastnosti BPAF .....	6
1.2 UGOTAVLJANJE STRUPENIH UČINKOV ENDOKRINIH MOTILCEV.....	8
1.2.1 Ribe zebrice ( <i>Danio rerio</i> ) .....	8
1.2.2 Vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ).....	10
1.2.3 Bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	13
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1 TESTNI REAGENTI.....	18
3.2 MERJENJE STRUPENOSTI BPA, BPF in BPAF ZA TESTNE ORGANIZME.....	18
3.2.1 BPA .....	18
3.2.2 BPF.....	32
3.2.3 BPAF .....	34
4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....	36
4.1 BISFENOL A .....	36

4.1.1	Strupenost BPA za zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) .....	36
4.1.2	Strupenost BPA za vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ).....	40
4.1.3	Strupenost BPA za luminiscenčne bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	41
4.1.4	Odziv testnih organizmov na strupenost BPA.....	42
4.2	BISFENOL F .....	44
4.2.1	Strupenost bisfenola F za zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) .....	44
4.2.2	Strupenost bisfenola F za vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) .....	46
4.2.3	Strupenost bisfenola F za luminiscenčne bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	48
4.2.4	Odziv testnih organizmov na strupenost BPF .....	49
4.3	BISFENOL AF .....	50
4.3.1	Strupenost bisfenola AF za zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) .....	50
4.3.2	Strupenost bisfenola AF za vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) .....	53
4.3.3	Strupenost bisfenola AF za luminiscenčne bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	54
4.3.4	Odziv testnih organizmov na strupenost BPAF .....	55
4.4	PRIMERJAVA STRUPENOSTI BISFENOLOV A, F in AF ZA TESTNE ORGANIZME .....	56
5	SKLEP.....	59
6	LITERATURA.....	62
7	PRILOGE.....	67

## KAZALO SLIK

Slika 1: Sinteza bisfenola A.....	3
Slika 2: Sinteza bisfenola F.....	5
Slika 3: Bisfenol AF.....	7
Slika 4: Odrasla riba zebrica ( <i>Danio rerio</i> ) (22).....	8
Slika 5: Odrasla vodna bolha ( <i>Daphnia magna</i> ) (27).....	11
Slika 6: Na levi sliki bakterija <i>Vibrio fischeri</i> ( $\lambda$ =500 nm) (33), desna slika pa prikazuje fluorescenčno zeleno obarvano populacijo bakterij <i>Vibrio fischeri</i> (34).....	13
Slika 7: Stadiji (od 4-celičnega do 128-celičnega) razvoja zarodkov rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) (38).....	21
Slika 8: Primerjava med zarodkom zebric ( <i>Danio rerio</i> ) brez razvitih oči (leva slika) (11,90 $\mu$ M BPAF) in normalno razvitim zarodkom v kontroli (desna slika) po 24 h.....	23
Slika 9: Nepigmentiran 72 h star zarodek rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) (49,94 $\mu$ M BPF).....	23
Slika 10: 72 h star zarodek z edemom (leva slika) (8,93 $\mu$ M BPAF) in 48 h star zarodek z deformirano rumenjarkovo vrečo (desna slika) (8,93 $\mu$ M BPAF).....	24
Slika 11: Primerjava med koaguliranim (leva slika) in normalno razvitim zarodkom (desna slika) po 48 h.....	24
Slika 12: Pri 48 h starem zarodku rep ni ločen od rumenjaka.....	25
Slika 13: Huda deformacija 72 h starega zarodka (11,90 $\mu$ M BPAF).....	25
Slika 14: Grafični prikaz priprave/redčenja vzorcev pri akutnem testu strupenosti z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> .....	30
Slika 15: Aparature za delo z luminiscenčnimi bakterijami <i>Vibrio fischeri</i> ; desno zgoraj vidimo merilni instrument (LUMIStox 300), pod njim pa termoblok (LUMIStherm).....	32
Slika 16: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA ..	37
Slika 17: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in teratogenih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 72 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA ..	38
Slika 18: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPA.....	40
Slika 19: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPA.....	41

Slika 20: Deleži zaviranja luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPA.....	42
Slika 21: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPF...	45
Slika 22: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in teratogenih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 72 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPF...	46
Slika 23: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPF .....	47
Slika 24: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPF .....	48
Slika 25 Deleži zaviranja luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPF .....	48
Slika 26: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 48 urni izpostavitvi BPAF.....	51
Slika 27: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebric ( <i>Danio rerio</i> ) po 72 urni izpostavitvi BPAF.....	52
Slika 28: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF .....	54
Slika 29: Deleži negibnih vodnih bolh ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF .....	54
Slika 30: Deleži zaviranja luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF .....	55

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljeni testni reagenti .....	18
Preglednica II: Izračunane 48 h oz. 72 h EC <sub>10</sub> , EC <sub>50</sub> in EC <sub>90</sub> vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebrih ob izpostavitvi BPA .....	38
Preglednica III: Primerjava izračunanih 48 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPA na posamezne testne organizme .....	42
Preglednica IV: Izračunane 72 h EC <sub>10</sub> , EC <sub>50</sub> in EC <sub>90</sub> vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebrih ob izpostavitvi BPF .....	46
Preglednica V: Primerjava izračunanih 48 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPF na testne organizme .....	49
Preglednica VI: Izračunane 48 h oz. 72 h EC <sub>10</sub> , EC <sub>50</sub> in EC <sub>90</sub> vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebrih ob izpostavitvi BPAF .....	53
Preglednica VII: Primerjava izračunanih 48 h, 72 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPAF na testne organizme .....	55



## KAZALO PRILOG

Tabela I: Učinki bisfenolov A, F in AF (6,10,11,15,16,18,19).....	67
Tabela II: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič ( <i>Danio rerio</i> ) v vzorcu s koncentracijo 70,09 $\mu$ M BPA .....	68
Tabela III: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA .....	68
Tabela IV: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA .....	69
Tabela V: Zaviranje luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA .....	69
Tabela VI: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič ( <i>Danio rerio</i> ) v vzorcu s koncentracijo 79,91 $\mu$ M BPF .....	70
Tabela VII: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF.....	70
Tabela VIII: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF.....	71
Tabela IX: Zaviranje luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF .....	71
Tabela X: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič ( <i>Danio rerio</i> ) v vzorcu s koncentracijo 11,90 $\mu$ M BPAF .....	71
Tabela XI: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 24 h izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF.....	72
Tabela XII: Negibne vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> ) po 48 h izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF.....	72
Tabela XIII: Zaviranje luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF.....	72
Tabela XIV: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za LC50, EC50 in IC50 vrednosti pri BPA .....	73
Tabela XV: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za EC50 in IC50 vrednosti pri BPF.....	73
Tabela XVI: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za LC50, EC50 in IC50 vrednosti pri BPAF.....	74

## POVZETEK

V zadnjih letih lahko najdemo v naravi vse več različnih naravnih in sintezno pridobljenih kemikalij, ki vplivajo na delovanje endokrinega sistema in posledično povzročajo neželene učinke na živali in ljudi. Dandanes je na voljo že veliko raziskav glede spojin, ki posnemajo ali zavirajo aktivnost endokrinih hormonov in katerim smo ljudje množično izpostavljeni preko hrane, pijače ter predmetov, ki jih vsakodnevno uporabljamo.

V magistrski nalogi smo raziskovali morebitne strupene učinke bisfenola A (BPA), bisfenola F (BPF) in bisfenola AF (BPAF) na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*. Bisfenoli so skupina kemikalij z dvema hidroksifenilnima skupinama, ki sta povezani preko ogljikovega atoma. Njihove strukturne lastnosti so zelo podobne steroidnim hormonom (estrogeni, androgeni, glukokortikoidni hormoni), kar jim ob dovolj visoki koncentraciji omogoča vezavo na njihove receptorje in vpliv na razvoj/razmnoževanje pri živalih in ljudeh. Strupenost testnih vzorcev različnih koncentracij treh hormonskih motilcev smo ugotavljali s pomočjo akutnih testov in na osnovi opaženih učinkov ter izračunanih LC, EC in IC vrednostih skušali določiti, kateri testni sistem se je izkazal kot najbolj občutljiv oz. pri katerem je bila motnja razvoja najbolj izražena. Pri testu z zarodki rib zebrič (*Danio rerio*) smo ugotavljali strupenost preko opazovanja morebitnih subletalnih, letalnih in teratogenih razvojnih sprememb, ki so se pojavile pri zarodkih ob izpostavitvi določenim koncentracijam izbranih spojin. Pri akutnem testu strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo spremljali gibljivost vodnih organizmov v petrijevkah ob izpostavitvi preiskovanim spojinam. Kot tretji modelni organizem za preizkušanje strupenosti izbranih endokrinih motilcev smo uporabili luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*, kjer smo na osnovi akutnega 30 minutnega testa merili zaviranje naravne emisije svetlobe teh mikroorganizmov v odvisnosti od izpostavitve določenim koncentracijam testiranih spojin. V zadnjem delu naloge pa smo se bolj posvetili primerjavi strupenosti BPA, BPF in BPAF za testne organizme in skušali s pomočjo že objavljenih študij poiskati razloge za morebitni večji oz. manjši vpliv strupenosti določene substance na organizme. Rezultati kažejo, da je največ razvojnih nepravilnosti pri zarodkih rib zebrič povzročil BPAF, saj se je pri večini subletalnih znakov ( nerazvit krvni obtok – 48 h  $EC_{50} = 8,54 \mu\text{M}$ , edem – 72 h  $EC_{50} = 8,29 \mu\text{M}$  in neizvalitev) in glede smrtnosti izkazal kot najbolj strupen (48 h  $LC_{50} = 8,97 \mu\text{M}$ ), izjema je bila le pigmentacija telesa, kjer je prevladoval strupeni vpliv BPF.

Vodne bolhe (*Daphnia magna*) so največjo občutljivost pokazale pri izpostavitvi BPAF, saj znaša izračunan 48 h EC<sub>50</sub> 6,45 µM, medtem ko sta ostala dva hormonska motilca povzročila 50 % negibnost vodnih organizmov ob izpostavitvi vzorcem z višjimi koncentracijami (BPA - 48 h EC<sub>50</sub> = 34,25 µM, BPF - 48 h EC<sub>50</sub> = 45,87 µM). Pri luminiscenčnih bakterijah pa smo ugotovili primerljivo strupenost vseh proučevanih spojin, saj so znašale izračunane EC<sub>50</sub> vrednosti za BPA, BPF in BPAF 13,63 µM; 12,15 µM in 13,76 µM.

**Ključne besede:** Endokrini motilci; BPA in analogi; strupenost; zarodki rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*); bakterije *Vibrio fischeri*

## ABSTRACT

In recent years we can find many different natural and synthetic chemicals in nature that influence the activity of the endocrine system and consequentially cause undesirable effects on animal and human beings. Nowadays, there is an ample number of research available regarding chemical compounds that mimic or block the activity of endocrine hormones, to which human beings are largely exposed to through different foods, drinks and items, which are used on a daily basis.

In this master thesis we studied possible toxic effects of bisphenols A, F and AF on zebrafish embryos (*Danio rerio*), water fleas (*Daphnia magna*) and the luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). Bisphenols are a chemical group with two hydroxyphenyl groups, which are connected with a carbon atom. Their structural characteristic resemble those of steroid hormones (estrogen, androgen and glucocorticoid hormones), which under a high enough concentration allow bonding with their receptors and consequentially to influence on human/animal development/reproduction. We determined the toxicity of samples of various concentrations of three hormone disruptors with the help of acute tests and on the basis of observations and calculations of LC, EC and IC values tried to determine which test system proved to be the most sensitive or in which test system were development disorder the most evident. In zebrafish embryo test (*Danio rerio*) we determined the toxicity by observing the sublethal, lethal and teratogen developmental changes, which appeared in embryos when exposed to certain concentrations of specific substances. Acute toxicity test with water fleas was based on observing the mobility of water organisms in petri dishes when exposed to different test samples. For the third model organism for testing toxicity of specific endocrine disruptors we used the luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*), where we, based on a 30 minute test, measured the obstruction of natural light emission of these organisms in relation to the exposure to specific concentrations of test compounds. In the last part of this master thesis we focused on comparing the BPA, BPF and BPAF toxicity levels for the test organisms and with the help of already published research determine reasons behind a possible higher/lower toxicity of different substances on these organisms. The results shows, that BPAF caused the most developmental abnormalities in zebrafish embryos, most sublethal signs (blood circulation – 48 h EC<sub>50</sub> = 8,54 µM, edema – 72 h EC<sub>50</sub> = 8,29 µM and hatching) and the mortality proved to be the most toxic ( 48 h LC<sub>50</sub> = 8,97 µM) for organisms when working with

BPAF, exception was only the pigmentation of the body, where BPF showed the highest toxicity. Water fleas showed the highest sensitivity in test samples with BPAF, because calculated 48 h EC<sub>50</sub> is 6,45 µM, while the other two endocrine disruptors caused 50 % immobility of aquatic organisms in test samples with higher concentrations (BPA – 48 h EC<sub>50</sub> = 34,25 µM; BPF – 48 h EC<sub>50</sub> = 45,87 µM). On the other side in working with luminescent bacteria we found a comparable toxicity of studied compounds, because calculated EC<sub>50</sub> values for BPA, BPF and BPAF are 13,63 µM; 12,15 µM and 13,76 µM.

**Key words:** Endocrine disruptors; BPA and analogs; toxicity, zebrafish embryos (*Danio rerio*), water flea (*Daphnia magna*), bacteria (*Vibrio fischeri*)

## SEZNAM OKRAJŠAV

AR	androgeni receptor
ARH	arilni ogljikovodikov receptor
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPF	bisfenol F
DDT	diklorodifeniltrikloroetan
DES	dietilstilbestrol
E2	17 $\beta$ -estradiol
EC <sub>10</sub> , EC <sub>50</sub> , EC <sub>90</sub>	efektivna koncentracija, ki povzroči določen odstotek (10 %, 50 % in 90 %) specifičnih odgovorov organizmov glede na kontrolo
ER	estrogenski receptor
ER $\alpha$	estrogenski receptor alfa
ER $\beta$	estrogenski receptor beta
FET test	test strupenosti na zarodkih rib
FMN	flavin mononukleotid
FMNH <sub>2</sub>	reduciran flavin mononukleotid
IC <sub>10</sub> , IC <sub>50</sub> , IC <sub>90</sub>	inhibitorna koncentracija, ki povzroči določen odstotek (10 %, 50 % in 90 %) specifičnih odgovorov organizmov glede na kontrolo
ISO	mednarodna organizacija za standardizacijo
LC <sub>10</sub> , LC <sub>50</sub> , LC <sub>90</sub>	koncentracija, ki povzroči smrt pri 10 %, 50 % in 90 % testnih organizmov
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
PBB	polibromirani bifenili
PCB	poliklorirani bifenili
PPAR	receptor aktiviran s proliferatorjem peroksisomov
PR	progesteronski receptor

REACH	Uredba o registraciji, ovrednotenju, avtorizaciji in omejevanju kemikalij
TR	ščitnični (tiroidni) receptor
US EPA	Ameriška agencija za okoljsko varnost

# 1 UVOD

Skupaj z rastočo industrializacijo sta se množično povečali proizvodnja in vstop različnih kemikalij v okolje. Nekatere od teh se obnašajo kot endokrini motilci, ki vplivajo na homeostazo in delovanje endogenih hormonov. Epidemiološke študije kažejo na povezavo med naraščajočo izpostavitvijo tem kemikalijam in razvojem nekaterih glavnih obolenj industrijskega sveta, kot so: motnje v reprodukciji, hormonsko odzivne vrste raka in presnovne motnje (debelost in sladkorna bolezen tipa 2). Kljub temu pa se o tej povezavi še razpravlja, saj smo še daleč od popolnega razumevanja vseh možnih molekularnih mehanizmov, na katerih temelji motnja endokrinega sistema in posledično razvoj bolezni (1). Vse več dokazov namreč nakazuje na obstoj naravnih in sinteznih kemikalij, ki lahko vplivajo na endokrini sistem in povzročajo neželene učinke na laboratorijske živali, prosto živeče organizme in ljudi. Te kemikalije najdemo v številnih proizvodih, ki jih vsakodnevno uporabljamo, kot so: sestavine plastenk in posod, obloge kovinskih pločevink za živila, detergenti, zaviralci gorenja, hrana in pijača, igrače, kozmetika in pesticidi. Čeprav je na voljo kar precejšnje število znanstvenih informacij o možnih škodljivih vplivih na zdravje ljudi, skrb še vedno narašča, saj je prisotnost nizkih odmerkov endokrinih motilcev v okolju pokazala neželene učinke na živali, ki bivajo v naravi in tudi tiste, ki jih vzgajamo v laboratorijih za poskuse ugotavljanja strupenosti endokrinih motilcev. Težavo pri ocenjevanju učinkov na področju javnega zdravja pa povečuje tudi dejstvo, da so ljudje izpostavljeni številnim endokrinim motilcem hkrati (2).

## 1.1 ENDOKRINI MOTILCI

V zgodnjih 90. letih so znanstveniki postavili hipotezo o motnji endokrinega sistema, ki je predpostavljala, da lahko naravne in sintezno pridobljene spojine prisotne v okolju motijo delovanje endokrinega sistema pri prostoživečih živalih in ljudeh, kar lahko privede do neželenih sprememb v razvoju in razmnoževanju. Od tedaj se je število študij glede motenj endokrinega sistema močno povečalo, saj je to področje postalo pomemben predmet raziskav okoljskih znanosti (3). Endokrini motilci so eksogene kemikalije ali mešanice kemikalij, ki prizadenejo strukturo oz. funkcijo endokrinega sistema in povzročijo neželene učinke. Endokrini sistem uravnava množico razvojnih, metabolnih in reproduktivnih procesov, ki vključujejo razvoj zarodkov, oblikovanje spolnih žlez, diferenciacijo spola,



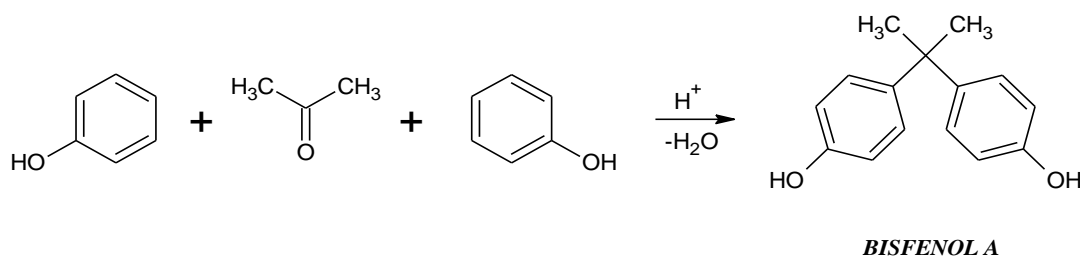
rast in presnovo. Endokrini motilci lahko prizadenejo te procese z vezavo na hormonske receptorje, s čimer se sproži ali prepreči hormonski odziv (4). Organizmi so se sposobni prilagoditi na endogene in eksogene kemične, fizične in biološke dražljaje iz okolja ter tako ohraniti notranjo homeostazo. Po drugi strani pa so lahko ranljivi za nehotene signale v njihovem okolju in ker se endokrini motilci obnašajo kot nenamerni zunanji signali, lahko motijo hormonsko nadzorovane fiziološke procese, kot so razvoj, rast, obnašanje, imunost, diferenciacija spola in reprodukcija (3). V zadnjem času vse bolj razumemo mehanizme, preko katerih endokrini motilci izražajo svoje učinke. Sprva so znanstveniki menili, da izvajajo endokrini motilci svojo aktivnost predvsem preko jedrnih (nuklearnih) hormonskih receptorjev, kamor spadajo estrogenski receptorji (ER), androgeni receptorji (AR), progesteronski receptorji (PR), ščitnični (tiroidni) receptorji (TR) in retinoidni receptorji, vendar danes temeljne znanstvene raziskave kažejo, da so mehanizmi delovanja mnogo širši, kot je bilo prvotno mišljeno. Ugotovili so namreč, da motilci endokrinega sistema ne delujejo samo preko jedrnih receptorjev, ampak tudi preko nejedrnih receptorjev za steroidne hormone (npr. membranski estrogenski receptorji), preko nesteroidnih receptorjev (npr. nevrottransmitterski receptorji, kot so serotoninški, dopaminski in noradrenalinški receptorji), preko receptorjev sirot (npr. arilni ogljikovodikov receptor - ARH), preko encimskih poti, ki sodelujejo pri biosintezi, transportu in presnovi steroidov in tiroidnih hormonov ter preko številnih drugih mehanizmov, ki so vezani na endokrini in reproduktivni sistem (5). S pomočjo študij, izvedenih na živalih, so raziskovalci veliko odkrili o mehanizmih, preko katerih endokrini motilci vplivajo na hormonski sistem in motijo hormonsko funkcijo. Te snovi lahko namreč:

- Posnemajo ali delno posnemajo delovanje naravnih hormonov v telesu, kot so estrogeni (ženski spolni hormoni), androgeni (moški spolni hormoni) in ščitnični hormoni.
- Vežejo se na receptor znotraj celice in blokirajo vezavo endogenega hormona, zato v telesu ne pride do nastanka normalnega signala in telo se ne more pravilno odzvati. Primeri kemikalij, ki preprečujejo učinek endogenih hormonov, so antiestrogeni in antiandrogeni.
- Motijo ali blokirajo proces nastanka ali metabolizma endogenih hormonov oz. njihovih receptorjev (2).

Skupina molekul, opredeljena kot endokrini motilci, je strukturno in funkcionalno zelo heterogena in vključuje sintezno pridobljene spojine, ki se uporabljajo kot industrijska topila oz. maziva in njihove stranske proizvode (npr. poliklorirani bifenili - PCB, polibromirani bifenili - PBB, dioksini), plastiko (npr. bisfenol A - BPA), mehčala (npr. ftalati), pesticide (npr. metoksiklor, klorpirifos, diklorodifeniltrikloroetan - DDT), fungicide (npr. vinklozolin), ter zdravilne učinkovine (dietilstilbestrol - DES). Kot motilci endokrinega sistema se lahko obnašajo tudi snovi, ki jih najdemo v človeški in živalski hrani (npr. fitoestrogeni, vključujoč genistein in kumestrol) (5). V naslednjih poglavjih smo bolj podrobno opisali lastnosti bisfenolov, s katerimi smo izvajali poskuse na izbranih organizmih in tako ugotavljali njihovo strupenost.

### 1.1.1 Lastnosti BPA

Med sintetičnimi ksenoestrogeni je BPA (4,4'-dihidroksi-2,2-difenilpropan) ena izmed najpomembnejših kemičnih spojin z letno proizvodnjo, ki presega 3,8 milijona ton (6). Uporablja se za izdelavo polikarbonatov, epoksi smol in termičnega papirja, tako da je prisoten v različnih izdelkih za vsakodnevno uporabo, kot so npr. vodovodne pipe oz. cevi, elektronske naprave, papir, igrače, posode, platenke, laki za premaz, poleg tega ima v proizvodnji vinil klorida vlogo stabilizatorja in antioksidanta. Leta 1891 je ruski kemik Aleksander P. Dianin prvič sintetiziral BPA s kondenzacijsko reakcijo dveh molekul fenola in ene molekule acetona v prisotnosti katalizatorja (vodikovega klorida ali ionsko-izmenjevalne smole) (slika 1):



Slika 1: Sinteza bisfenola A

BPA je bela, kristalinična trdna snov z molekulsko maso 228,29 g/mol, ki izkazuje dobro topnost v maščobah, v vodi pa je topnost slabša. Spada v skupino fenolov, ki imajo hidroksilni ostanek direktno vezan na aromatski obroč, zato je možna pretvorba teh snovi v eter, ester ali sol (6). Kljub kratki razpolovni dobi je BPA prisoten v okolju zaradi konstantnega sproščanja med proizvodnjo, transportom in obdelavo kemikalij. V okolje se izloča tudi preko odpadnih voda iz komunalnih čistilnih naprav, pri izpiranju iz odlagališč,

pri sežiganju odpadkov iz gospodinjstev in pri naravni razgradnji plastike v okolju. Največ BPA je prisotnega v abiotskih delih okolja, torej ga najdemo v vodi in suspendiranih snoveh (~ 53 %), v zemlji (~ 25 %) in v usedlinah (~ 23 %) (4). Molekula BPA ima podobne strukturne značilnosti kot 17  $\beta$ -estradiol (E2) in druge naravne estrogene spojine, ki jih najdemo v hrani (npr. daidzein v sojinih izdelkih), kar omogoča sposobnost vezave na estrogenske receptorje. Prav zaradi potenciala motenja naravne estrogensko odvisne fiziologije/aktivnosti spada BPA v skupino okoljskih onesnaževalcev imenovanih hormonski motilci (7).

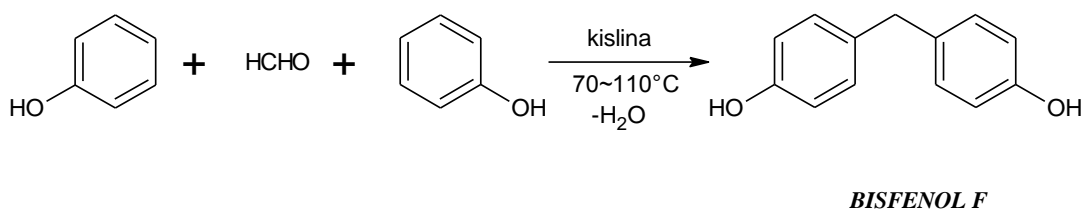
Objavljene so bile številne študije o strupenosti in endokrini aktivnosti BPA pri živalih. Nekatere od teh so bile izvedene v skladu z regulativo/OECD smernicami, ki poudarjajo peroralno aplikacijo, uporabo večjih skupin živali in različnih odmerkov, medtem ko so pri drugih uporabili manjše skupine živali, manjše število odmerkov ter različne načine aplikacije. Prav zaradi tega so se med temi študijami pojavile precejšnje razlike v rezultatih, ki so vezane predvsem na naravo opazovanih učinkov in na stopnjo, kjer se pojavijo. Največ skrbi predstavljajo učinki, ki so povezani s hormonsko aktivnostjo BPA in potencialni učinki na telesni, nevrološki in vedenjski razvoj organizmov (8). Kljub temu, da je na voljo veliko literature v zvezi z izpostavljenostjo živali in ljudi BPA, še vedno obstajajo nejasnosti v raziskavah glede molekularnega mehanizma delovanja, specifičnega vpliva na določena tkiva in glede znanja o koncentracijskih območjih, kjer so ciljna tkiva posebej občutljiva na delovanje BPA. Pomanjkanje celostnega in systemskega razumevanja delovanja BPA kot endokrinega motilca je zapletlo prizadevanja regulatornih organov za ustrezno oceno tveganja za zdravje in varnostna priporočila. Slabše poznavanje mehanizma delovanja BPA je posledica nepopolnega znanja o delovanju celic oz. tkiv ter omejenega razumevanja sistemov receptorjev in signalnih kaskad, preko katerih izraža BPA svoje učinke (9).

BPA se v splošnem obnaša kot agonist estrogenskih receptorjev, vendar lahko v določenih tkivih deluje tudi antagonistično na aktivnost estrogena (predvsem v možganih in maternici). Ima kombinirano agonistično/antagonistično aktivnost in spada v skupino selektivnih modulatorjev estrogenskih receptorjev (10). Bisfenol A je bil sprva obravnavan kot šibak okoljski estrogen, saj so ocenili, da je njegova relativna vezavna afiniteta na klasične jedrne estrogenske receptorje  $\alpha$  in  $\beta$  1000-10.000 x nižja v primerjavi z estradiolom. Nedavne študije pa so pokazale, da lahko BPA spodbudi nekatere celične odzive pri zelo nizkih koncentracijah in da je njegova jakost vezave enakovredna

estradiolu. Vse to je povezano s sposobnostjo vezave BPA na klasične in neklasične membranske estrogenske receptorje, na receptorje povezane z G-proteinom, poleg tega pa lahko povzroči učinke tudi preko drugih negenomskih poti (11). BPA pa je poleg delovanja na estrogenski receptor sposoben vezave tudi na androgeni receptor, arilni ogljikovodikov receptor, na receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov (PPAR), poleg tega pa lahko moti delovanje tudi ščitničnih hormonov. Zaradi sposobnosti motnje endokrinega sistema, hipometilacije DNA, oksidativnega in možnosti mutagenega delovanja lahko povzroča večsmerne toksične učinke pri živalih in verjetno tudi pri ljudeh. Dokazano je, da moti BPA delovanje številnih hormonov, vključno s spolnimi hormoni, leptinom, inzulinom in tiroksinom ter posledično povzroča hepatotoksične in imunotoksične učinke. Bisfenol A naj bi bil tudi nevrotoksičen, kancerogen, mutagen in teratogen, vendar si obstoječi rezultati glede tega še vedno nasprotujejo (tabela I v prilogi A). Raziskave so pokazale, da je BPA veliko manj strupen za rastline in mikroorganizme, kot so bakterije, glive in alge, ki so sposobni pretvorbe te spojine do metabolitov, kateri pa običajno izkazujejo manjšo strupenost in estrogenost kot BPA. Poleg tega so nekatere vrste bakterij in gliv sposobne mineralizirati BPA in ga uporabiti kot vir ogljika in energije. Organizme, ki pretvarjajo ali učinkovito odstranjujejo BPA, uporabljajo za odstranitev te spojine iz onesnaženega okolja (6).

### 1.1.2 Lastnosti BPF

Bisfenol F je industrijsko pomemben kemijski intermediat za pripravo epoksidnih smol in polikarbonatov v procesih vlivanja, tesnenja, premazovanja, lepljenja in laminiranja. Pridobivajo ga v procesu reakcije kondenzacije fenola s formaldehidom. V skladu s konvencionalno metodo se kot katalizator v pripravi bisfenola F uporablja kislina v tekočem stanju (oksalna, fosforna ali klorovodikova kislina) (slika 2) (12):



Slika 2: Sinteza bisfenola F

Agencija za zaščito okolja v Združenih državah Amerike (US EPA) je potrdila, da spada BPF (4,4'-dihidroksidifenil-metan) v skupino kemikalij, ki so sposobne motiti delovanje

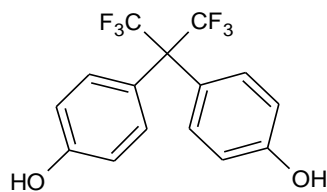
endokrinega sistema (13). Bisfenol F je monomer družine difenilalkanov in ima širok spekter uporabe v industriji, saj je prisoten v lakih, oblogah, samolepilnih plastikah, vodnih ceveh, poleg tega pa ga najdemo tudi v zobnih tesnilih, ustnih protetičnih napravah in v embalažah za pakiranje hrane. V nizkih koncentracijah je prisoten tudi v okolju, predvsem v vzorcih sedimenta in površinskih vodah (14). BPF je po strukturi zelo podoben BPA, zato poročajo, da naj bi imel tudi BPF agonistične učinke na delovanje estrogena (15). Omejeni podatki kažejo, da izraža BPF rahlo do zmerno akutno strupenost in šibko estrogenost, kar je bilo moč opaziti že pri BPA, vendar naj bi bila aktivnost BPF nižja kot pri BPA (tabela I v prilogi A) (16). V študijah, ki so preučevale strupenost BPF, je zelo malo podatkov o letni proizvodni količini, okoljskih koncentracijah in ekotoksičnosti. V raziskavi, kjer so ugotavljali prisotnost ftalatov, BPA in BPF v okolju, so odkrili BPF v 77 % vzorcev površinskih voda (0,0001-0,180 µg/L), v 72 % vzorcev odpadnih voda (0,022-0,123 µg/L) in v 58 % vzorcev sedimenta (1,2-7,3 µg/kg). Kot pri BPA lahko pride do sproščanja BPF v okolje med samo proizvodnjo in pri izpiranju iz končnih izdelkov. Glede na njegove kemijske lastnosti ( $\log K_{ow} = 3,06$ ; topnost v vodi = 360 mg/l) naj bi bili porazdelitev in usoda v okolju primerljivi z BPA (17).

Kot smo ugotovili, je BPF prisoten v okolju in živilih, kar pomeni, da so človek in ostali živi organizmi lahko izpostavljeni tej spojini in je zato potreba po novih študijah, s pomočjo katerih bomo lahko bolje razumeli potencialno strupenost in morebitne škodljive vplive na žive organizme, toliko večja.

### **1.1.3 Lastnosti BPAF**

Bisfenol AF (1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis (4-hidroksifenil) propan) ima v strukturi dva fenolna obroča, ki sta med seboj povezana preko ogljikovega atoma (slika 3). Je derivat BPA, kjer so metilne skupine perfluorirane in dokazano spojina, ki lahko moti normalno delovanje endokrinega sistema. BPAF se obsežno pojavlja v opremi za predelavo hrane, elektronskih napravah, optičnih vlaknih, poleg tega pa se zaradi odlične stabilnosti in natezne trdnosti uporablja kot reagent zamreženja v proizvodnji fluoropolimerov in fluoroelastomerov. Ima tudi vlogo monomera v proizvodnji številnih polimerov, kot so poliimidi, poliamidi, poliestri in polikarbonati. Kljub temu, da postaja industrijska proizvodnja BPAF vse bolj pomembna, nimamo podatkov (oz. so zelo omejeni) o letni proizvodnji, prisotnosti in usodi BPAF v okolju ter o njegovih toksikoloških lastnostih. V

eni izmed študij, ki so jo izvedli v Nemčiji, so odkrili prisotnost BPAF v 75 % vzorcev površinskih in odpadnih voda, ter v več kot 50 % vzorcev sedimenta (18,19).



**BISFENOL AF**

Slika 3: Bisfenol AF

Študij povezave med strukturo in aktivnostjo BPA in njegovih sorodnih spojin nakazuje na to, da naj bi bil BPAF zaradi zamenjave vodikov v metilnih skupinah pri BPA s fluorovimi atomi bolj nevarna sintezno pridobljena estrogenska kemikalija kot BPA. Ta vrsta substitucije namreč poveča estrogensko aktivnost (19). Obstaja skrb, da je BPAF potencialno bolj škodljiv za zdravje ljudi, saj so njegove  $\text{CF}_3$  skupine veliko bolj elektronegativne kot pa  $\text{CH}_3$  skupine pri BPA in je zato reaktivnost spremenjena v primerjavi z BPA. Nekatere študije so pokazale, da je akutna peroralna strupenost BPAF za laboratorijske živali nizka, vendar v zadnjem času raziskave kažejo, da ima ta kemikalija zaradi sposobnosti vezave na hormonske receptorje velik potencial kot endokrini motilec pri ljudeh in prostoživečih živalih.

Študije *in vitro* kažejo, da ima BPAF sposobnost vezave na oba estrogenska receptorja, vendar se na estrogenski receptor alfa ( $\text{ER}\alpha$ ) veže s približno 20 krat večjo jakostjo kot BPA, pri estrogenskem receptorju beta ( $\text{ER}\beta$ ) pa je jakost vezave BPAF skoraj 50 krat večja v primerjavi z BPA. Svojo sposobnost motnje endokrinega sistema izraža tako preko interakcij s člani družine jedrnih steroidnih receptorjev, kot so  $\text{ER}\alpha$ ,  $\text{ER}\beta$  in androgeni receptor. Bisfenol AF ima potrjeno visoko estrogensko in antiandrogeno delovanje (tabela I v prilogi A). Leta 2008 je Ameriški Nacionalni inštitut za okolje "Health Sciences" zaradi pomanjkanja ustreznih podatkov o strupenosti predlagal ovrednotenje celovitih toksikoloških lastnosti BPAF. V večini objavljenih študij so se raziskovalci osredotočali samo na mehanizem motnje endokrinega sistema BPAF *in vitro*, vendar je v zadnjem času vse več poudarka na razvoju zanesljivih metod za oceno strupenosti BPAF v organizmih po peroralni aplikaciji (18,19).

## 1.2 UGOTAVLJANJE STRUPENIH UČINKOV ENDOKRINIH MOTILCEV

Modelni organizem mora nuditi tehnične in praktične prednosti za preučevanje glavnih bioloških procesov, učinkov in mehanizmov. Poleg tega mora imeti lastnosti, ki jih je mogoče posplošiti, kar pomeni, da mora biti modelni organizem predstavnik za večje skupine organizmov in lahko rezultate na osnovi modelnega organizma ekstrapoliramo na druge vrste vretenčarjev oz. nevretenčarskih organizmov (3). V magistrski nalogi smo za preučevanje strupenosti hormonskih motilcev uporabili tri organizme in sicer: zarodke rib zebric (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in bakterije *Vibrio fischeri*.

### 1.2.1 Ribe zebrice (*Danio rerio*)

*Danio rerio*, v slovenskem jeziku poimenovane zebrice (angl. zebrafish), so tropske sladkovodne ribe iz družine krapovcev (*Cyprinidae*) (20) (slika 4). Pri temperaturi 26 °C je rast zarodkov hitra, saj dosežejo zrelost v roku 3 mesecev, odrasla riba pa meri 3-5 cm. Jajčeca zebric so telolecitalna (rumenjaki so acentrični - na vegetativnem polu velika količina rumenjaka), delitve pa so meroblastične (nepopolna delitev) in diskoidalne (delitev omejena le na animalni pol). Kmalu po oploditvi se namreč začne citoplazma nabirati na animalnem polu, kjer kasneje obda jedro zigota. Ta del jajčne citoplazme, imenovan blastodisk, je podvržen cepitvi, medtem ko je z rumenjaki bogato področje izključeno iz tega procesa (21).



Slika 4: Odrasla riba zebrica (*Danio rerio*) (22)

Uporaba zebric kot modelnega organizma se je začela med letoma 1960 in 1970, ko je George Streisinger uporabil to vrsto rib za lažje razumevanje genetskih osnov razvoja vretenčarjev. V naslednjih desetletjih so postale zebrice ustaljen modelni sistem ne samo za razvojne študije, temveč tudi za razumevanje genetskih, celično-bioloških in biokemijskih osnov številnih bioloških pojavov pri vretenčarjih. Poleg osnovnih raziskav

se zebriče vse bolj uporabljajo tudi kot model za raziskavo človeških bolezni, kar je povezano z visoko stopnjo ohranjenosti biokemijskih molekul in procesov med ljudmi in zebričami (20).

Za ugotavljanje strupenosti treh hormonskih motilcev smo uporabili zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), ki predstavljajo eno izmed najbolj obetavnih alternativnih pristopov k testiranju akutne strupenosti z odraslimi ribami. Preskus strupenosti za ribe je pomembna komponenta v procesih testiranja ekotoksičnosti. Akutni test strupenosti, izveden na odraslih ribah, ni združljiv z veljavno zakonodajo o dobrem počutju živali, saj je smrtnost primarno opazovani učinek, poleg tega pa zakonodaja predpostavlja, da ribe med testiranjem doživljajo stisko in morda tudi bolečino. Metode, do katerih so prišli s pomočjo alternativnih pristopov testiranja, so vključili v nove evropske predpise REACH-a, ki se bori za zmanjšanje števila poskusov z živimi organizmi. Od leta 2005 ima namreč test strupenosti z zarodki rib zebrič (FET) pomembno vlogo pri rutinskem testiranju odpadnih vod v Nemčiji, poleg tega pa je ta test že standardiziran na mednarodni ravni (ISO 15088:2007) (23). Razlogi za uporabo alternativnih metod (*in vitro* testi na celicah oz. celičnih linijah rib ali pa uporaba zarodkov) namesto larv, ki se same hranijo, mladih in odraslih rib v testiranjih ekotoksičnosti niso samo etični, temveč obstajajo tudi znanstveni in stroškovni vzroki, ki spodbujajo sprejetje drugačnega pristopa testiranja. Pri akutnem testiranju smrtnosti rib, ki se v zadnjem času vedno bolj opušča, pa je bila vloga koncepta treh R (REPLACEMENT - nadomestitev predvidene metode s kako drugo, REDUCTION - zmanjšanje števila poskusnih živali na najmanjše možno, REFINEMENT - izboljšanje same tehnike poskusa, tako da bo le-ta zanesljivo uspel, ter da bosta stres in bolečina za živali najmanjša in čim krajša) zelo pomemben faktor (24).

Zebriče (*Danio rerio*), ki so pomemben model v ekotoksikoloških študijah, imajo številne prednosti za ocenjevanje strupenosti kemikalij in sicer:

- S tehničnega in metodološkega vidika je ta vrsta priročna in stroškovno sprejemljiva za delo, poleg tega pa zagotavlja konceptualni vpogled v številne vidike biologije, genetike, toksikologije in bolezni vretenčarjev.
- Za to vrsto je na voljo široka paleta informacij, vključno s poznavanjem genoma.
- Nizki stroški vzdrževanja, enostavno rokovanje z zebričami, hitra izvedba testov, visoka rodnost, enostavnost opazovanja, razpoložljivost genetskih informacij, obstoj mutiranih sevov.



- V relativno majhnih akvarijih lahko gojimo večje število zebrič, kar pomeni, da se s tem stroški reje zmanjšajo.
- Prednost v primeru kroničnih in genetskih študij je tudi sorazmerno kratek generacijski čas (3-4 mesece), zebričice se lahko pod ustreznimi laboratorijskimi pogoji razmnožujejo skozi vse leto (ponavadi se drstijo enkrat na teden, izležejo 50-200 jajčec ali več, oploditev pa je zunanja), medtem ko je drstenje v naravi bolj sezonsko.
- Razvoj zarodkov je zelo hiter, saj lahko že po 24 h po oploditvi pod lupo vidimo prisotnost organov, medtem ko so po 96 h le-ti že popolnoma razviti.
- V nasprotju s sesalci, kjer se zarodki razvijajo znotraj maternice, pa pri zebričah razvoj poteka zunaj samice, kar pomeni enostavnost opazovanja strukturnih anomalij.
- Ribe zebričice so primerne tudi za fenotipske analize, saj so jajčeca/zarodki optično dobro pregledni, kar omogoča spremljanje fenotipskih sprememb, poleg tega pa se pogosto uporabljajo tudi za analize izražanja genov.
- Prednosti modela zebrič pred modelom nevretenčarjev vključujejo evlucijski odnos do višjih vretenčarjev; zebričice in višji vretenčarji imajo namreč veliko podobnih celičnih in fizioloških lastnosti ( npr. endokrini sistem, ki vključuje steroidne hormone in njihove receptorje).

Ena glavnih slabosti uporabe zarodkov rib zebrič kot modela za oceno učinkov in mehanizmov delovanja hormonskih motilcev je pogost pojav dveh nalezljivih boleznih v laboratorijskih kolonijah, mikrosporidioze in mikobakterioze, ki ju je težko zdraviti in/ali odstraniti iz akvarijev (3).

### **1.2.2 Vodne bolhe (*Daphnia magna*)**

*Daphnia magna*, ki jih v slovenskem jeziku poimenujemo vodne bolhe, so sladkovodni nevretenčarji, ki jih uvrščamo v red *Cladocera* in razred *Branchiopoda* (slika 5). V ta razred spada približno 1000 vrst, med njimi so najbolj znane tiste iz rodu *Daphnia*, ki pa so tudi razširjene po vsem svetu. Življenjska doba vodnih bolh je odvisna od dejavnikov, kot sta temperatura in številčnost plenilcev. V nekaterih hladnih jezerih brez rib lahko vodne bolhe preživijo 13-14 mesecev, medtem ko imajo v laboratorijskih pogojih pri 20 °C relativno kratko življenjsko dobo (7-8 tednov), spolno zrelost pa dosežejo v roku 6-8 dni po izvalitvi (25). Ti vodni organizmi so zelo majhni, običajno merijo v dolžino okoli 2-5

mm, oblika njihovega telesa pa je podobna ledvičastemu fižolu. Samci so manjši od samic, ki lahko merijo v dolžino od 3-5 mm, samci pa dosegajo velikosti okoli 2 mm, vendar imajo le-ti daljše antene, spremenjen potrebušni del in prvo nogo, ki jo obdaja kavelj, kateri se uporablja za ujetje/objem samic med parjenjem. Telo vodnih bolh ni jasno razčlenjeno, regije prsnega koša in trebuha pokriva namreč školjki podobna struktura, imenovana karapaks, ki je v glavnem sestavljena iz hitina. Dvoloputast karapaks sega v ščit glave, kar je pomembna diagnostična značilnost za to vrsto, na zadnji strani pa je navadno podaljšan v trn. Imajo dva niza dolgih, dvakrat razvejanih anten/tipalnic (prvi par je skoraj zakrnel, drugi par pa je namenjen plavanju) in 4-6 parov okončin (torakopodov) na področju prsnega koša, ki so varno shranjeni znotraj karapaksa in pomagajo pri filtraciji vode ter pri dovajanju hrane in kisika do ust in škrg. Na področju trebuha imajo dvojne velike klešče/kremplje, ki so namenjene predvsem čiščenju karapaksa. Na sredini glave se nahaja eno samo sestavljeno oko, ki je nastalo z zlivanjem para oces pri njihovih prednikih (26).



Slika 5: Odrasla vodna bolha (*Daphnia magna*) (27)

Vodne bolhe se razmnožujejo tako spolno kot tudi nespolno in imajo ciklično partenogenetski življenjski cikel. Večji del leta je v ospredju nespolno razmnoževanje, kjer proizvajajo samice diploidna jajčeca (običajno 6-10) in jih nosijo v valilnih komorah pod karapaksom. Iz teh jajčec se razvijejo mlade vodne bolhe, ki so vse po vrsti samice. V primeru neugodnih razmer (pomanjkanje hrane, temperaturni ekstremi, velika gostota populacije, kopičenje izločkov ipd.) pa poteka spolno razmnoževanje, kjer vali samica haploidna jajčeca, iz katerih se razvijejo samci, ki kasneje oplodijo mlade samice (26). Pri vodnih bolhah oz. pri vseh rakah pride do rasti mladih vodnih bolh že v nekaj minutah po zapustitvi valilnika in še preden eksoskelet otrdi in izgubi elastičnost (25).

Vodne bolhe se že dolgo časa uporabljajo kot model za oceno strupenosti različnih snovi na vodne organizme. Nekatere izmed prvih strupenostnih študij je vodil genetik Ernest Warren (1900), ki je s pomočjo vodnih bolh definiral razpon koncentracij natrijevega klorida, ki jih omenjeni organizmi še lahko prenesejo. Edinstvene biološke lastnosti kažejo, da so vodne bolhe primeren modelni sistem za ekologijo in evolucijsko biologijo, poleg tega pa imajo pomembno vlogo tudi v ekotoksikologiji. Ti sladkovodni raki se običajno uporabljajo za spremljanje onesnaženosti okolja in so pomembni pri vzpostavljanju regulativnih meril s strani vladnih agencij (Mednarodna organizacija za standardizacijo – ISO, Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj-OECD, Ameriška agencija za okoljsko varnost-US EPA, Kanadska okoljska organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj, Japonska okoljska agencija) (28). Akutni test strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna* je priljubljen biološki test, ki se mednarodno uporablja za presejalne študije strupenosti kemikalij ter za ugotavljanje onesnaženosti voda. Številne mednarodne organizacije (ISO-Mednarodna organizacija za standardizacijo in OECD-Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj) priporočajo uporabo vodnih bolh kot standardni testni organizem za različne študije. Tako kot zebrice imajo tudi vodne bolhe številne prednosti kot modelni sistem v akutnih testih strupenosti:

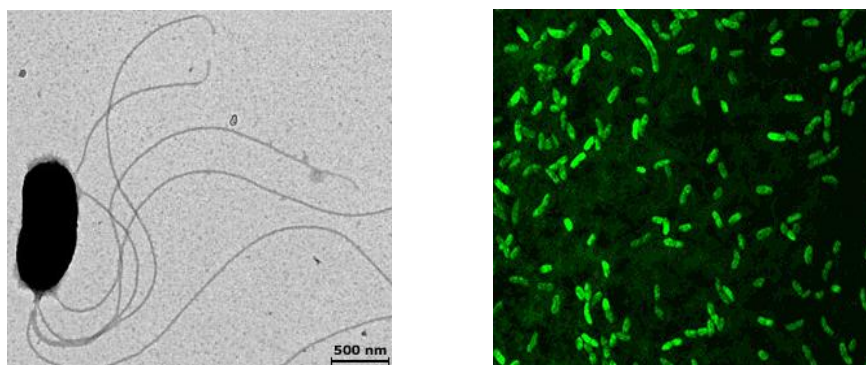
- Visoka občutljivost na strupene kemikalije (npr. na endokrine motilce)
- Kratek razmnoževalni cikel (29)
- Ciklično partenogenetski življenjski cikel, možnost spolnega in nespolnega razmnoževanja ter veliko število potomcev.
- *Daphnia magna* so v primerjavi z ostalimi vrstami vodnih bolh dokaj velike, poleg tega pa omogočajo enostavno rokovanje in gojenje pod laboratorijskimi pogoji.
- Od leta 1928 se vodne bolhe redno uporabljajo v študijah strupenosti (30).

Kljub dejstvu, da predstavljajo nevretenčarji okoli 95 % vseh živalskih vrst in so ključni elementi vseh ekosistemov, so študije glede učinkov endokrinih motilcev osredotočene predvsem na *in vivo* oceno pri sesalcih, plazilcih in ribah. Pri rakah uravnavajo nevrohormoni številne fiziološke procese, kot so presnova maščob, ionsko ravnotežje, levitev, rast, regeneracija, razvoj spolnih žlez, razmnoževanje, prebava in srčna aktivnost. Večina opredeljenih nevretenčarskih hormonov spada v skupino peptidnih nevrohormonov, vendar je na voljo premalo dokazov o vplivu endokrinih motilcev na signalne poti, ki temeljijo na peptidih. Po drugi strani pa najdemo pri rakah tudi hormone, ki so nepeptidnega izvora (npr. hormon levitve ekdison, juvenilni hormoni) in posledično

so lahko procesi, v katere so ti hormoni vključeni, bolj dovzetni za morebitne motnje (25). Strukturna podobnost med estrogenom pri vretenčarjih in nevretenčarskim hormonom levitve ekdisonom nakazuje na možnost interakcije estrogenih hormonskih komponent z endogenimi steroidi pri nevretenčarjih, čeprav je vse več dokazov o tem, da ti učinki niso posredovani preko hormonskega sistema členonožcev (31). Čeprav so znanstveniki odkrili prisotnost steroidov vretenčarskega tipa v tkivih rakov, pa njihov funkcionalni pomen še ni povsem pojasnjen (25).

### 1.2.3 Bakterije *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* so oksidazno pozitivne in Gram negativne bakterije, sestavljene iz celične stene, ki je zgrajena iz zunanje lipopolisaharidne membrane, periplazmatskega prostora s plastjo peptidoglikanov in notranje citoplazemske membrane (slika 6). Merijo 0,8-1,3  $\mu\text{m}$  v premeru in 1,8-2,4  $\mu\text{m}$  v dolžino. Spadajo v veliko družino  $\gamma$ -proteobakterij *Vibrionaceae*, ki so razširjene povsod v naravi, saj jih najdemo v morski vodi, sedimentu in koži rib. Te heterotrofne bakterije uporabljajo bičke za premikanje in so najbolj znane po svojih bioluminiscentnih lastnostih. Večinoma živijo v sožitju z različnimi globokomorskimi živalmi, kot so ribe in lignji, v majhnih količinah pa so kot prosto plavajoče bakterije prisotne tudi na razpadajočih organskih snoveh (32).

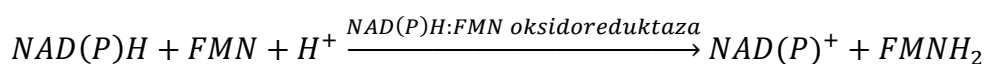


Slika 6: Na levi sliki bakterija *Vibrio fischeri* ( $\lambda = 500 \text{ nm}$ ) (33), desna slika pa prikazuje fluorescenčno zeleno obarvano populacijo bakterij *Vibrio fischeri* (34)

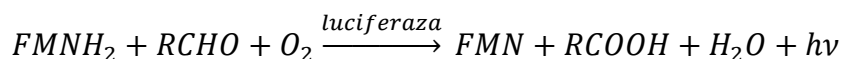
Luminiscenčne bakterije lahko v procesu normalnega metabolizma oddajajo modro-zeleno svetlobo. Leta 1854 je J.F. Heller določil prvi sev bioluminiscenčnih bakterij in tako je bila postavljena zgodnja referenca za ocenjevanje akutne strupenosti. Podjetje "Beckmann Instruments" pa je začelo leta 1978 test z luminiscenčnimi bakterijami na vodnih vzorcih

tržiti kot test Microtox in kasneje so številne države/regije postavile uradni standard za test zaviranja naravne emisije svetlobe bakterij (Francoski standard-DIN 38412-1990; Ameriški standard-ASTM D5660-1995; Kitajski standard-GB/T 15441-1995 in Evropski standard-EN ISO 11348).

Intenziteta sevanja odraža presnovno stanje bakterij, zato lahko trdimo, da je emisija svetlobe tesno povezana s celičnim metabolizmom. Svetloba, ki jo oddajajo luminiscenčne bakterije, je v glavnem vezana na bioluminiscentni encimski sistem, katerega sestavljata NAD(P)H:FMN oksidoreduktaza in luciferaza. V prvi reakciji, ki je katalizirana s strani encima NAD(P)H:FMN oksidoreduktaze, pride najprej do redukcije FMN do FMNH<sub>2</sub> v prisotnosti NAD(P)H in H<sup>+</sup>:



V drugi reakciji pa heterodimerni protein bakterijska luciferaza katalizira oksidacijo FMNH<sub>2</sub> do FMN v prisotnosti dolgoverižnega aldehida (RCHO) in O<sub>2</sub>. V spektralnem območju med 420 nm in 660 nm pride do sproščanja proste energije v obliki modro-zelene svetlobe:



*R*- alifatska skupina (daljša veriga ogljikovih atomov), ki je vezana na aldehidno oz. karboksilno skupino

Ob izpostavitvi luminiscenčnih bakterij strupenim spojinam se lahko zmanjša delovanje bakterijske luciferaze in posledično jakost svetlobe hitro upade. Za proizvodnjo bioluminiscence uporabljajo *Vibrio fischeri* proteine, ki so kodirani z nizom genov, imenovanim lux operon.

Princip tradicionalnega bakterijskega testa zaviranja luminiscence, ki se uporablja kot standard v mnogih državah in regijah, je merjenje emisije svetlobe bakterij ob izpostavitvi testnim vzorcem in primerjava le-te s kontrolno raztopino. Najbolj razširjeno merilo akutnega strupenostnega testa je IC<sub>50</sub>, ki pomeni tisto koncentracijo strupene substance, pri kateri je zaviranje emisije svetlobe po določenem času izpostavljenosti 50 % (35).

Morske luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri* so eden izmed najbolj pogosto uporabljenih testnih organizmov v študijah ekotoksičnosti, saj imajo številne prednosti:

- Omogočajo enostavno, hitro in zanesljivo merjenje strupenosti kemikalij in odpadnih voda.

- Uporabljajo se v različnih bioloških preizkusnih metodah za spremljanje akutnih toksičnih učinkov posameznih spojin oz. zmesi organskih in anorganskih snovi.
- Ta biološki test je primeren za veliko različnih okoljskih in industrijskih vzorcev, kot so vzorci površinskih in podzemnih voda, vzorci odpadnih voda in komunalnih odplak, ter vzorci sedimentov (36).
- V primerjavi z drugimi testi so stroški izvedbe nizki.
- Test z luminiscenčnimi bakterijami izkazuje odlično ujemanje z biološkimi testi, ki so izvedeni na višjih organizmih, kot so alge, raki in ribe, ter višjo občutljivost v primerjavi z drugimi bakterijskimi testi.
- Sprva je bil test namenjen samo za analize vzorcev vode ( v mnogih državah se uporablja kot referenčna metoda), sčasoma pa so ga začeli uporabljati tudi za oceno strupenosti drugih vrst vzorcev (motni in barvni vzorci) in za široko paleto spojin (droge, fenoli, pesticidi in policiklični aromatski ogljikovodiki) (37).

Velika pomanjkljivost te metode je zelo kratek čas izpostavljenosti, kar se odraža v nizki občutljivosti pri substancah z zapoznelim učinkom, kot so bakteriostatični agensi. S to konvencionalno metodo torej ne moremo oceniti kroničnih učinkov. Poleg tega standardna metoda ni združljiva s presejalno metodo z visoko pretočnostjo v mikrotitracijskem merilu, saj se preizkus običajno izvaja z običajnimi luminometri v velikosti kivete. Visoka pretočnost omogoča raziskovalcem hitro izvedbo velikega števila kemijskih, genetskih in farmakoloških preskusov, medtem ko smo pri testu strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami omejeni s številom vzorcev (36). Tretja slabost akutnega testa strupenosti, ki temelji na morskih bioluminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri*, je povezana s testnimi vzorci, saj jih pripravljamo s pomočjo 2-3 % raztopine NaCl, s čimer posnemamo slanost morske vode. S tem pa spremenimo lastnosti posameznih vzorcev, saj lahko pride do zmanjšanja biorazpoložljivosti kovinskih ionov ali povečanja topnosti organskih snovi (35).

## 2 NAMEN DELA

V zadnjih letih skrb glede izpostavitve hormonskim motilcem vse bolj narašča, saj lahko te spojine prizadenejo rast, razvoj, reprodukcijo in fiziološki sistem številnih vodnih organizmov v ekosistemu. Snovi, ki motijo endokrini sistem, so vse pogosteje predmet raziskav, vendar je na tem področju še veliko prostora za nove študije in dognanja, zato smo se odločili, da bomo v magistrski nalogi ugotavljali vpliv bisfenola A in njegovih dveh analogov na tri različne organizme. Poleg tega je zelo malo podatkov o ekotoksikoloških učinkih BPF in BPAF, zato smo želeli narediti raziskavo in priti do novih spoznanj tudi na tem slabo raziskanem področju, predvsem pa primerjati učinke teh dveh spojin z BPA.

V eksperimentalnem delu se bomo osredotočili na testiranje strupenosti bisfenola A (BPA), bisfenola F (BPF) in bisfenola AF (BPAF) na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*. Glavna naloga naše raziskave bo ugotoviti, kako lahko majhna sprememba v strukturi same molekule bisfenola vpliva na razvoj in vedenje posameznega organizma. Pri akutnem testu strupenosti z zarodki rib zebrič bomo spremljali morebitne subletalne, letalne in teratogene učinke prej omenjenih spojin in skušali razložiti, zakaj pride do določenih sprememb v razvoju pri izbranih koncentracijah teh spojin. Pri testu strupenosti z vodnimi bolhami bomo določali zaviranje gibanja v odvisnosti od koncentracije in tako za vsako spojino določili koncentracijo, ki povzroči negibnost pri 50 % izpostavljenih vodnih bolh po 24 in 48 h. Strupenost treh hormonskih motilcev bomo spremljali tudi s pomočjo biološkega testa na osnovi luminiscenčnih bakterij, kjer bomo določali delež (v %) zaviranja naravne emisije svetlobe pri teh mikroorganizmih v primerjavi s kontrolo pri različnih koncentracijah vzorcev.

Osnovni namen našega dela bo na osnovi bioloških testov ugotoviti vrstno-specifične letalne in subletalne učinke BPA, BPF in BPAF na vodne organizme iz različnih trofičnih nivojev. Dobljene rezultate bomo predstavili tudi v grafični obliki in tako s pomočjo linearne regresije ter izračunanih koncentracij snovi, ki povzročijo v določenem času specifične odgovore pri 50 % testnih organizmov, določili katera izmed testiranih substanc je najbolj strupena za posamezen testni organizem. Kljub temu, da je bilo o proučevanih endokrinih motilcih in njihovem vplivu na okolje in živali narejenih že veliko študij (predvsem so bile raziskave usmerjene v ugotavljanje strupenosti BPA), menimo, da je na

področju ekotoksikoloških raziskav v zvezi z BPF in BPAF še veliko odprtih vprašanj in upamo, da bomo z našimi rezultati in zaključki prispevali k večjemu poznavanju strupenosti omenjenih analogov BPA na vodne organizme.

V magistrski nalogi smo si postavili naslednje hipoteze:

- BPAF je zaradi prisotnih fluorovih atomov v strukturi bolj toksičen od BPA in BPF.
- Pri vseh treh organizmih strupenost proučevanih spojin pada v istem vrstnem redu: BPAF>BPA>BPF.
- Z naraščanjem koncentracij spojin, ki so jim proučevani organizmi izpostavljeni, narašča tudi jakost učinkov.
- Koncentracije izbranih hormonskih motilcev, ki so povzročile signifikantne (bistvene strupene) učinke pri izpostavljenih proučevanih vodnih organizmih, so prisotne tudi v okolju (glede na literaturo).



## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 TESTNI REAGENTI

Preglednica I: Uporabljeni testni reagenti

KEMIKALIJA	KEMIJSKA FORMULA	MOLEKULSKA MASA [g/mol]	PROIZVAJALEC
3,4-Dikloroanilin	$C_6H_5Cl_2N$	162,02	Merck
Bisfenol A (BPA)	$C_{15}H_{16}O_2$	228,29	Sigma-Aldrich
Bisfenol F (BPF)	$C_{13}H_{12}O_2$	200,23	Sigma-Aldrich
Bisfenol AF (BPAF)	$C_{15}H_{10}F_6O_2$	336,23	Sigma-Aldrich
Kalcijev klorid dihidrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147,02	Merck
Kalijev klorid	KCl	74,55	Merck
Magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,47	Merck
Natrijev hidrogen karbonat	$NaHCO_3$	84,01	Merck
Kalijev dikromat	$K_2Cr_2O_7$	294,18	Merck
Natrijev hidroksid - 0,1 M	NaOH	40,00	Merck
Klorovodikova kislina - 0,1 M	HCl	36,46	Merck
Reaktivacijska raztopina- LCK 482			Hach-Lange/ Dr. Lange
Natrijev klorid	NaCl	58,44	Merck in Hach-Lange

- Čistota vseh uporabljenih spojin je bila večja od 98 %.

### 3.2 MERJENJE STRUPENOSTI BPA, BPF in BPAF ZA TESTNE ORGANIZME

#### 3.2.1 BPA

V eksperimentalnem delu magistrske naloge smo z akutnimi testi preizkušali strupenost BPA za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in bakterije *Vibrio fischeri*. Bisfenol A je bil naša prva izbira pri izvajanju poskusov predvsem zaradi številnih že izvedenih študij in raziskav s to spojino, katere so nam bile v pomoč pri izbiri ustreznega intervala koncentracij, izvedbi, vrednotenju in primerjavi rezultatov.

#### Priprava osnovne raztopine BPA

Pri vseh treh testnih organizmih smo na enak način pripravili osnovno raztopino BPA s koncentracijo 43,80  $\mu\text{M}$ . To smo naredili tako, da smo 20 mg BPA, ki smo ga predhodno zdrobili v terilnici, saj smo s tem omogočili hitrejše raztapljanje, prenesli v 2 L bučko in jo približno do polovice napolnili z ultra čisto vodo s prevodnostjo 18,2  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ . Na podlagi preteklih študij smo vedeli, da je bisfenol A (BPA) slabo topen v vodi, v kar smo se prepričali tudi sami, saj smo morali pripravljeno raztopino za popolno raztopitev mešati 2 dni na magnetnem mešalu. Sprva smo raztopino BPA tudi nekoliko segrevali ( $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$ ) in vsako uro za približno 10 minut dajali bučko v ultrazvočno kadičko, kar pa ni bila dobra odločitev, saj se je koncentracija, ki smo jo na koncu raztapljanja preverili na HPLC-ju, znižala za več kot 10 %. Zaradi tega smo vse raztopine, ki smo jih kasneje pripravljali, mešali samo na magnetnem mešalu brez segrevanja in uporabe ultrazvoka. Preden smo pričeli s poskusi, smo raztopino do oznake na bučki dopolnili z ultra čisto vodo, dodali potrebne količine soli in dobro premešali. Na osnovi prvih rezultatov smo videli, da je izbrana najvišja koncentracija 43,80  $\mu\text{M}$  BPA prenizka za določitev letalnih učinkov, kot je npr. smrtnost, zato smo se odločili za pripravo 1 x bolj koncentrirane raztopine, ki smo jo pripravili po prej opisanem postopku. Po 2 dneh smo koncentracijo končne raztopine preverili s HPLC in ugotovili, da se izmerjena koncentracija le v manjši meri razlikuje od nominalne, zato smo za nadaljnje poskuse in redčitve uporabljali raztopino BPA s koncentracijo 87,61  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.1.1 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z ZARODKI RIB ZEBRIC (*Danio rerio*)**

V tem poglavju bomo najprej opisali pripravo redčitev osnovne raztopine BPA, nato pa se bomo podrobno posvetili postopku dela in vrednotenju rezultatov.

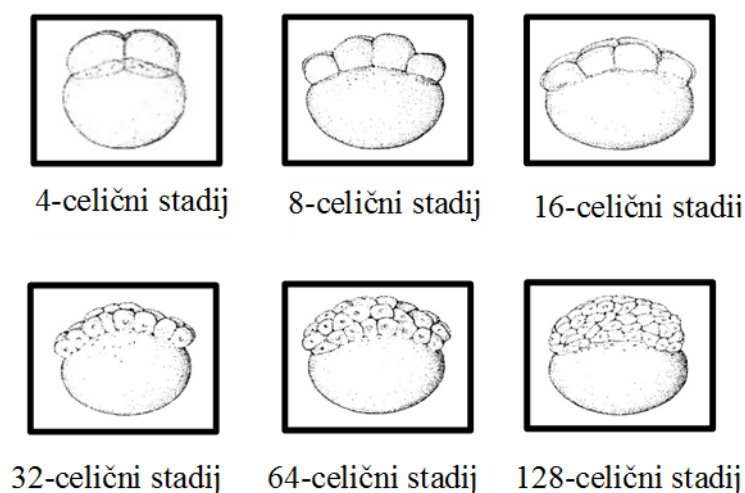
#### **Priprava vzorcev**

Za izvedbo testa z zarodki rib zebrič (*Danio rerio*) smo uporabili naslednjih 14 koncentracij raztopine BPA: 8,76  $\mu\text{M}$ ; 10,95  $\mu\text{M}$ ; 15,33  $\mu\text{M}$ ; 17,52  $\mu\text{M}$ ; 19,71  $\mu\text{M}$ ; 24,10  $\mu\text{M}$ ; 26,28  $\mu\text{M}$ ; 35,04  $\mu\text{M}$ ; 43,80  $\mu\text{M}$ ; 52,56  $\mu\text{M}$ ; 61,33  $\mu\text{M}$ ; 70,09  $\mu\text{M}$ ; 78,85  $\mu\text{M}$  in 87,61  $\mu\text{M}$ . Redčitve smo pripravili iz osnovne raztopine bisfenola A s koncentracijo 87,61  $\mu\text{M}$ , pri čemer smo kot topilo za redčenje uporabili razredčevalno vodo (RV), ki smo jo pripravili tako, da smo v 10 L stekleno posodo odpipetirali 40 mL raztopine - 1.1 (raztopina kalcijevega klorida dihidrata), 10 mL raztopine - 1.2 (raztopina magnezijevega sulfata heptahidrata), 10 mL raztopine - 1.3 (raztopina kalijevega klorida) in 10 mL

raztopine - 1.4 ( raztopina natrijevega hidrogenkarbonata). Vse omenjene raztopine smo pripravili v skladu z ISO standardom, tako da smo v 1 L bučo natehtali spodaj omenjeno količino določene spojine (v mg) in dodali ultra čisto vodo do oznake (23). Raztopina 1.1 vsebuje 294 mg/L  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , raztopina 1.2 vsebuje 123,3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , raztopina 1.3 vsebuje 5,5 mg/L KCl in raztopina 1.4 vsebuje 63,0 mg/L  $\text{NaHCO}_3$ . Vsa redčenja smo opravili v 25 mL bučki, osnovni raztopini BPA, ki je bila pripravljena z ultra čisto vodo, pa smo dodali preračunane volumne soli. Tako pripravljene raztopine smo shranili v hladilniku in jih pred testom postavili v prostor s temperaturo  $26\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ , da smo dosegli isto temperaturo, pri kateri smo kasneje izvajali poskuse. Kontrola pri testu strupenosti z zarodki rib zebric je bila razredčevalna voda (RV), pozitivno kontrolo pa je predstavljala raztopina referenčne substance 3,4-dikloroanilina s koncentracijo 3,7 mg/L. Želena koncentracijo smo dobili tako, da smo v 25 mL bučko odpipetirali 925  $\mu\text{L}$  raztopine 3,4-dikloroanilina s koncentracijo 100 mg/L in z razredčevalno vodo dopolnili do oznake.

### **Izvedba testa**

Akutni test toksičnosti z zarodki rib zebric (*Danio rerio*) smo izvedli glede na ISO standard 15088 (2007), kjer so opisani reagenti, aparature in standardni postopki dela (23). Zebrice so se nahajale v akvarijih, ki so bili postavljeni v posebnem prostoru z dnevno/nočnim ciklom in stalno temperaturo zraka  $26\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ . Ribe smo 3 x dnevno hranili s komercialno dostopno suho hrano, 1 x tedensko pa so dobile tudi mlade vodne bolhe. Posode z nerjavečo jekleno mrežo in plastičnimi rastlinami za boljše drstenje smo še pred začetkom dnevnega cikla postavili v akvarij in jih po približno 30 minutah po prižigu luči zjutraj odstranili. Vse ikre smo dali v petrijevko, ki je vsebovala vodo iz akvarijev, jo postavili pod lupo in tam prenesli potrebno število oplojenih jajčec s stekleno pipeto v posodo z razredčevalno vodo. Pod stereomikroskopom (Nikon SMZ 1000, Nikon) smo ločevali oplojena od neoplojenih jajčec oz. jajčec z določenimi anomalijami ali poškodovano membrano. Za neoplojena jajčeca je značilno pomanjkanje tvorbe blastomerov, v poznejših stadijih pa jih lahko identificiramo po njihovi netransparentnosti. Standard določa, da lahko za testiranje strupenosti uporabimo samo oplojena jajčeca od 4 - celičnega do 128 - celičnega stadija zarodka (slika 7).

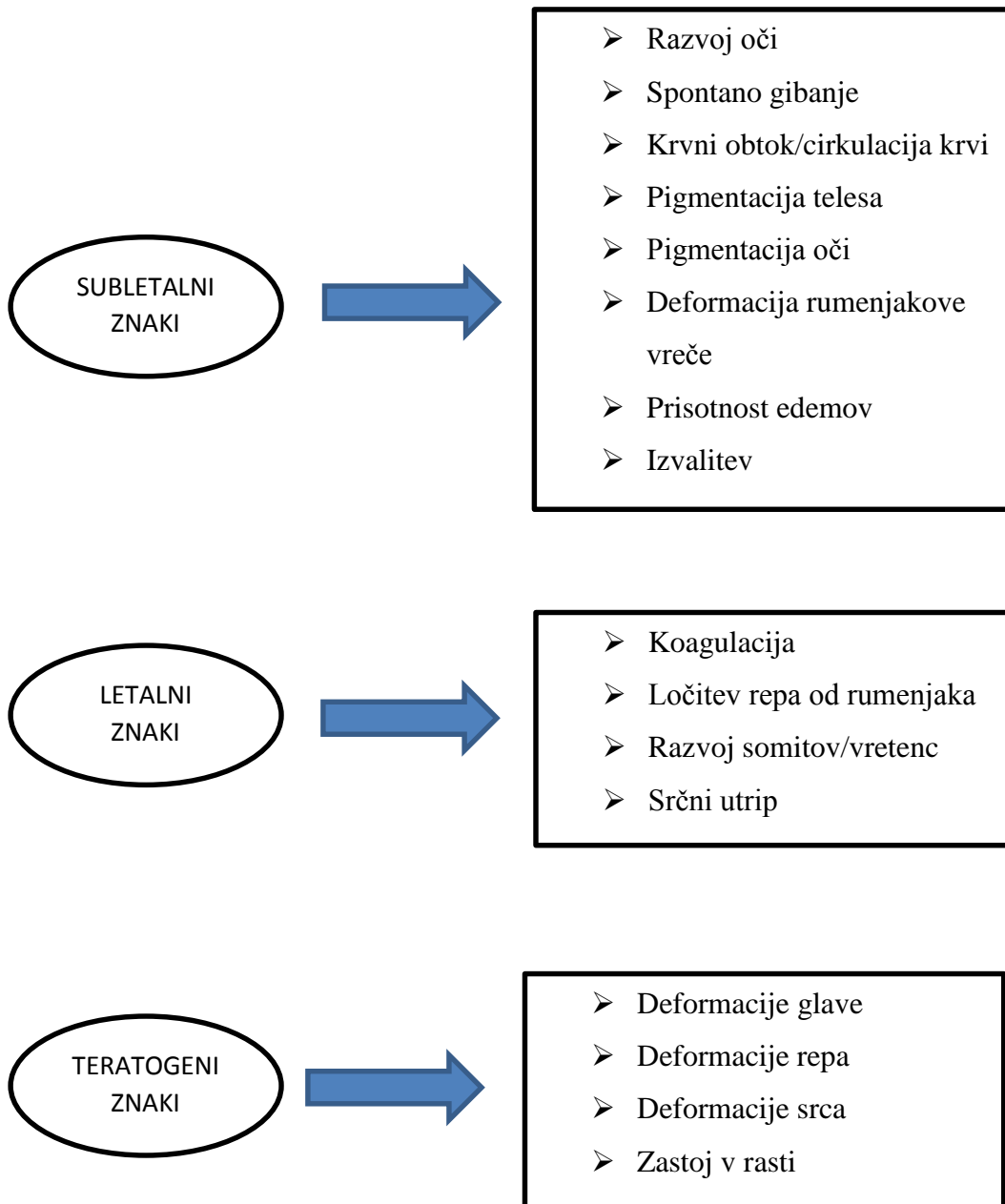


Slika 7: Stadiji (od 4-celičnega do 128-celičnega) razvoja zarodkov rib zebric (*Danio rerio*) (38)

Test smo pričeli tako, da smo v vdolbinice mikroplošč s 24 jamicami odpipetirali 1 mL določene koncentracije pripravljenih raztopin bisfenola A, razredčevalno vodo in pozitivno kontrolo. V vsako vdolbinico smo s pomočjo pipete prenesli po eno oplojeno jajčece iz posode z razredčevalno vodo, pri tem pa smo morali paziti na čim manjši prenos tekočin v testni sistem, saj bi s tem lahko vplivali na rezultate poskusa. Za vsako koncentracijo BPA in raztopino 3,4-dikloroanilina s koncentracijo 3,7 mg/L smo testirali 10 jajčec, preostale vdolbinice pa smo uporabili kot kontrolo. Napolnjene plastične mikroplošče smo prekrili s parafilmom in pokrovom, zato da smo preprečili izhlapevanje, ter jih postavili v prostor s konstantno temperaturo  $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Vsak dan ob istem času smo pod lupo natančno pogledali razvoj zarodkov, jih primerjali s kontrolo in vse anomalije zapisali v pripravljene tabele. Zadnji, četrti dan testa smo pri izvaljenih zarodkih merili tudi dolžino.

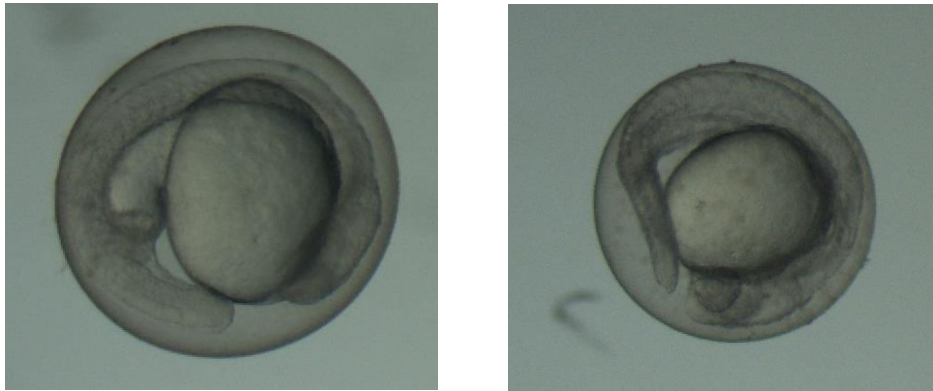
### **Obdelava rezultatov**

S pomočjo številnih že izvedenih študij, kjer so proučevali vpliv bisfenola A na zarodke rib zebric in ISO standarda 15088:2007, smo določili, katere razvojne spremembe bomo opazovali pri testiranih organizmih (23,24). Znake, ki smo jih spremljali, lahko razdelimo v tri skupine:



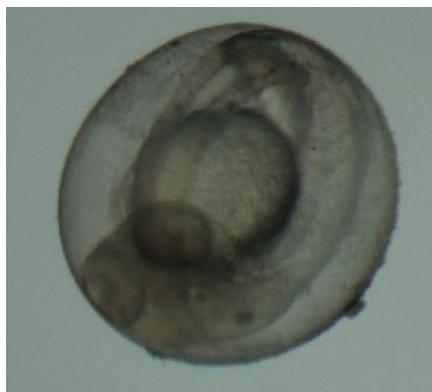
### SUBLETALNI ZNAKI

Subletalni znaki so tisti, ki se lahko pojavijo tekom razvoja zarodka, vendar ne povzročajo njegove smrti. Eden od teh znakov je, da zarodek nima razvitih oči. Že po 24 h lahko namreč pri normalno razvitem zarodku opazimo prisotnost oči (slika 8).



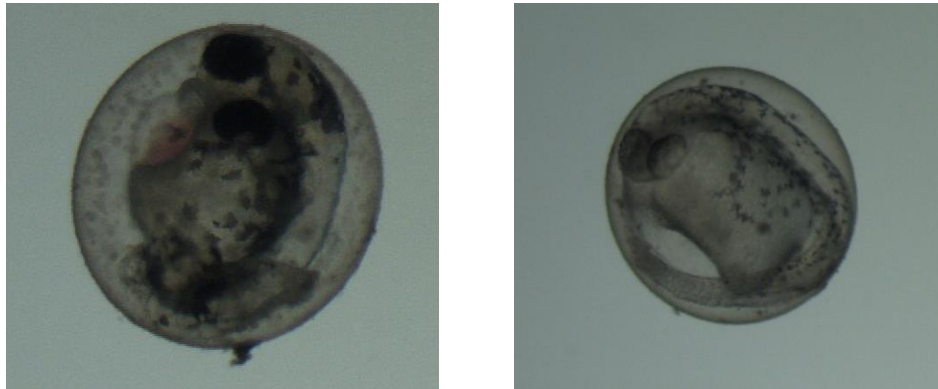
Slika 8: Primerjava med zarodkom zebrič (*Danio rerio*) brez razvitih oči (leva slika) (11,90 µM BPAF) in normalno razvitim zarodkom v kontroli (desna slika) po 24 h

Možno je tudi, da se zarodek kljub majhnim tresljajem mikroplošče ne začne premikati. Tretji znak, ki smo ga uvrstili v to skupino, je krvni obtok. Pogosto smo namreč opazili, da kljub bitju srca kri ne kroži po telesu ali pa sama cirkulacija poteka zelo počasi. Med subletalne znake spada tudi pigmentacija oči in telesa. Pigmentacija pomeni prisotnost črnih lis, ki so razporejene po celotnem telesu, torej jih najdemo na glavi, hrbtu, repu in očeh. Pri določenih koncentracijah posamezne spojine smo po 48 h oz. 72 h ugotovili, da zarodek ni pigmentiran ali pa je pigmentacija precej slabša v primerjavi s kontrolo (slika 9).



Slika 9: Nepigmentiran 72 h star zarodek rib zebrič (*Danio rerio*) (49,94 µM BPF)

Na osnovi dobljenih rezultatov smo v to skupino uvrstili še dva pomembna znaka in sicer deformacija rumenjakeve vreče in prisotnost edemov (slika 10). Ti dve spremembi smo pri zarodkih večkrat opazili, še posebno pri izpostavljenosti bisfenolu AF, vendar kljub hudim razvojnim spremembam nista vedno povzročili smrti zarodka.

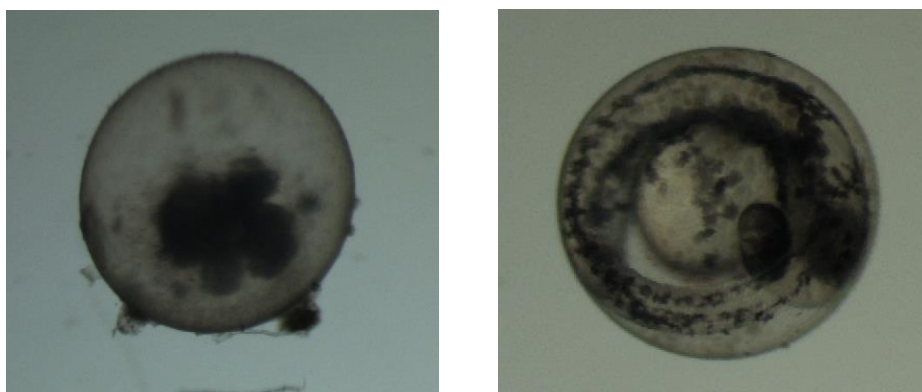


Slika 10: 72 h star zarodek z edemom (leva slika) ( $8,93 \mu\text{M}$  BPAF) in 48 h star zarodek z deformirano rumenjarkovo vrečo (desna slika) ( $8,93 \mu\text{M}$  BPAF)

Zadnji učinek, ki spada v to skupino, pa je zaostanek v valjenju.

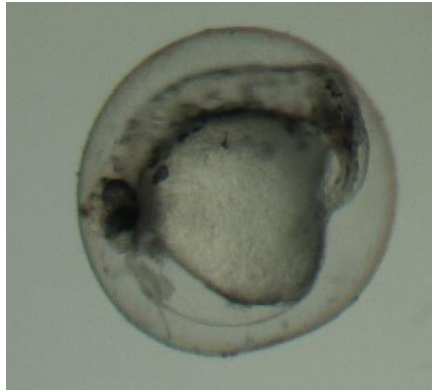
### LETALNI ZNAKI

Letalni znaki so tisti, ki povzročijo ali sčasoma pripeljejo do smrti organizma. Izbrani letalni znaki za opredelitev akutne toksičnosti kemikalij so podobni tistim, ki so opisani v ISO standardu 15088:2007 (23). Na osnovi rezultatov smo se namreč v to skupino odločili uvrstiti tudi nerazvitost somitov, saj je ta znak velikokrat vodil do smrti zarodkov (predvsem pri BPAF). Zarodek se po 48 h opredeli kot mrtev v primeru koagulacije, odsotnosti srčnega utripa, nerazvitih somitov in kadar rep ni vidno ločen od rumenjaka. Koaguliran zarodek je v primerjavi s kontrolo netransparenten in precej temnejše barve, poleg tega pa je popolnoma nerazvit (slika 11).



Slika 11: Primerjava med koaguliranim (leva slika) in normalno razvitim zarodkom (desna slika) po 48 h

Zarodek, ki mu ne bije srce ali nima razvitih somitov, se opredeli za mrtvega. Med letalne znake uvrščamo tudi povezanost repa in rumenjaka. Če je po 48 h rep še na enak način povezan z rumenjarkovo vrečo, kot je bilo to vidno po 24 h, lahko rečemo, da ni ločen od rumenjaka (slika 12).

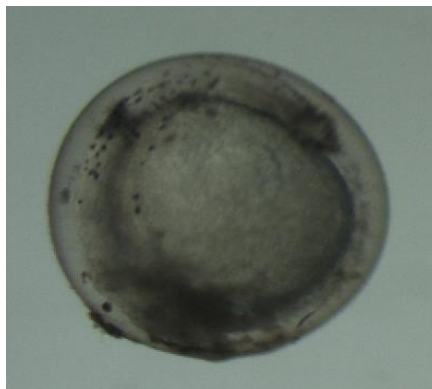


Slika 12: Pri 48 h starem zarodku rep ni ločen od rumenjaka

Že en sam znak, ki smo ga omenili zgoraj, lahko povzroči smrt organizma, najpogosteje pa pride do smrti zarodkov zaradi prisotnosti več znakov hkrati (npr. odsotnost srčnega utripa v povezavi z neločitvijo repa od rumenjarkove vreče).

### TERATOGENI ZNAKI

Med teratogene znake pa smo uvrstili deformacije glave, repa in srca, čeprav nepravilnosti v razvoju srca med opazovanjem zarodkov nismo zaznali. Vzrok za to lahko iščemo v premajhni povečavi stereolupe (Nikon SMZ 1000, Nikon), s katero smo izvajali poskuse. Nasprotno pa smo velikokrat zaznali hujše anomalije glave in zavitje repa (slika 13). Sem pa spada tudi zastoj v rasti.



Slika 13: Huda deformacija 72 h starega zarodka (11,90  $\mu$ M BPAF)



Tako smo letalne, subletalne in teratogene znake spremljali 4 dni zapored in vsakršno spremembo v primerjavi s kontrolo označili v tabelah. Nekateri znaki so bili bolj izraženi po 48 h, medtem ko smo druge opazili šele po 72 h. Poskuse smo z istimi koncentracijami določene spojine ponovili večkrat (vsaj 2 x) in ugotovili, da je treba z organizmi ravnati zelo previdno in paziti na temperaturo v prostoru, kjer poteka test. Nekaterih rezultatov namreč nismo smeli upoštevati pri končnih izračunih zaradi prevelike smrti zarodkov v kontroli, saj smo na začetku poskusov imeli težave z nihanjem temperature v prostoru, kjer so se organizmi nahajali. ISO standard 15088:2007 določa, da je test veljaven, če v negativni kontroli (razredčevalna voda) po 48 h inkubacije preživi vsaj 90 % zarodkov in če so v pozitivni kontroli (3,7 mg/L 3,4-dikloroanilina) rezultati znotraj opredeljenega območja, kar pomeni, da pride do učinka pri več kot 10 % zarodkov (23). Na koncu smo veljavne rezultate združili, jih primerjali med sabo in podali kot delež (v %) pojavljanja določenega učinka. Izračunali smo tudi povprečja in standardne napake, ter s pomočjo posebnega programa Probit analiza ( Probit analizni program Agencije za varstvo okolja v Združenih državah Amerike - USEPA Probit analysis Program, verzija 1.5), določili LC/EC<sub>10</sub>, LC/EC<sub>50</sub>, LC/EC<sub>90</sub> in 95 % interval zaupanja za EC<sub>50</sub> in LC<sub>50</sub> po 48 h oz. 72 h inkubacije.

### **3.2.1.2 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)**

#### **Priprava vzorcev**

Pri delu z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo osnovno raztopino BPA s koncentracijo 87,61 µM pripravili po istem postopku, ki smo ga opisali pod točko 3.2.1. Za testiranje toksičnosti smo uporabili naslednjih 7 koncentracij bisfenola A: 26,28 µM; 30,66 µM; 35,04 µM; 39,42 µM; 43,80 µM; 65,71 µM in 87,61 µM. Priprava redčenih vzorcev se nekoliko razlikuje od tiste, ki smo jo predstavili pri zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*). Koncentracije, s katerimi smo ugotavljali delež (v %) zaviranja gibanja vodnih bolh, smo izbrali s pomočjo preliminarnih testov. Na osnovi teh smo določili interval koncentracij, ki naj bi povzročile določen učinek in si tako postavili območje koncentracij za izvedbo testa. V 100 mL bučkah smo osnovno raztopino BPA redčili z ultra čisto vodo do želenih koncentracij in dodali soli. 100 ml vzorec tako vsebuje naslednje volumne soli:

- 400 µL raztopine 1.1, ki vsebuje 294 mg/L CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O
- 200 µL raztopine 1.2, ki vsebuje 123,3 mg/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

- 200  $\mu\text{L}$  raztopine 1.3, ki vsebuje 5,5 mg/L KCl
- 200  $\mu\text{L}$  raztopine 1.4, ki vsebuje 63,0 mg/L  $\text{NaHCO}_3$ .

Kontrolo je predstavljala razredčevalna voda (RV), katere pripravo smo opisali pri prejšnjem testu v poglavju 3.2.1.1. Pred začetkom izvedbe poskusov smo preverili občutljivost vodnih bolh in usklajenost s postopkom, tako da smo določali 24 h  $\text{EC}_{50}$  za kalijev dikromat. Poskus smo izvedli s 5 različnimi koncentracijami, ki smo jih izbrali glede na prejšnje že izvedene študije z vodnimi bolhami. Uporabljene koncentracije  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  so bile: 0,5 mg/L; 0,7 mg/L; 1,0 mg/L; 1,3 mg/L in 1,7 mg/L. Osnovno že pripravljeno raztopino kalijevega dikromata s koncentracijo 100 mg/L smo z razredčevalno vodo redčili do prej omenjenih koncentracij. Tako smo npr. v 100 mL bučko za dosego koncentracije 1,7 mg/L odpipetirali 1,7 mL osnovne raztopine kalijevega dikromata in do oznake na bučki dopolnili z razredčevalno vodo.

### **Izvedba testa**

Pred začetkom testiranja toksičnosti smo s testom, kjer smo določali 24 h  $\text{EC}_{50}$  za kalijev dikromat, ugotavljali ustrezno občutljivost vodnih bolh za nadaljnje teste. Dobljena vrednost  $\text{EC}_{50}$  ne sme pasti izven območja med 0,6 mg/L in 2,1 mg/L, v nasprotnem primeru moramo preveriti pravilnost izvedbe postopka in način gojenja vodnih bolh. Pri našem eksperimentalnem delu smo za vsako koncentracijo  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  uporabili dvajset 24 h starih vodnih bolh, saj smo naredili dve paralelki s po 10 vodnimi bolhami. Po izračunu deleža (v %) negibnih vodnih bolh s pomočjo linearne regresije (program Microsoft Excel) smo določili 24 h  $\text{EC}_{50}$ , ki je znašal 1,0 mg/L, kar pomeni, da je test uspel in da lahko to kulturo vodnih bolh uporabljamo pri testiranju toksičnosti bisfenola A, bisfenola F in bisfenola AF. Pri BPA preliminarnih testov nismo potrebovali, saj smo si za določitev ustreznih koncentracij pomagali s preteklimi študijami in ugotovili, da je bil pri najnižji izbrani koncentraciji, torej 26,28  $\mu\text{M}$ , delež negibnih vodnih bolh 0 %, kar pomeni, da so se vse vodne bolhe gibale. S pomočjo izbranih koncentracij smo določili tudi 100 % negibnost, s čimer smo dokazali, da smo tudi brez preliminarnih testov in ob pomoči različnih študij določili ustrezno območje koncentracij. Akutne toksične teste z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo pričeli z zbiranjem 24 h starih vodnih bolh iz treh akvarijev v čašo z razredčevalno vodo. Potem smo si pripravili petrijevke, v katerih smo izvajali teste strupenosti. Za vsako koncentracijo BPA smo uporabili 3 petrijevke, v katere smo najprej nalili 30 mL vzorca, nato pa dodali vodne bolhe. Iz čaše z razredčevalno vodo, ki je

kasneje pri izvedbi testov služila tudi kot kontrola, smo 20 vodnih bolh prenesli v prvo petrijevko. Iz te smo nato v ostali dve prenesli po 10 vodnih bolh in s tem preprečili dodatno razredčitev vzorcev zaradi vode in morebitne lažne rezultate. Mlade vodne bolhe smo prenašali s pomočjo kapalke, pri čemer smo morali biti pazljivi, da ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov, saj lahko le-ti povzročijo smrt. Prva petrijevka je torej služila le za prenos vodnih bolh v drugi dve, ki pa smo ju kasneje kot paraleli uporabili pri izvedbi testov. Petrijevke smo pokrili s steklenim pokrovom, zato da ne bi prišlo do izhlapevanja in jih izpostavili dnevno nočnemu ciklu 16 h svetlobe/8 h teme ter jih postavili v termostatisan prostor s temperaturo  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

### **Obdelava rezultatov**

Po 24 h oz. 48 h smo opazovali gibanje vodnih bolh v petrijevkah. Negibna vodna bolha je tista, ki po rahlem tresenju posode v roku 15 s ne splava, čeprav še vedno lahko premika antene. Po koncu testiranja smo rezultate paralelek združili, izračunali povprečja in določili tisto koncentracijo vzorca, ki je po 24 h oz. 48 h povzročila 50 % negibnost vodnih bolh. Označili smo jo z 24 h EC<sub>50</sub> oz. 48 h EC<sub>50</sub>. Pri izračunih smo si pomagali s programom Probit analiza (Probit analizni program Agencije za varstvo okolja v Združenih državah Amerike - USEPA Probit analysis Program, verzija 1.5) in linearno regresijo (program Microsoft Excel) pri narisanih grafih. Določili smo 24 h oz. 48 h EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub>, EC<sub>90</sub> in 95 % interval zaupanja za EC<sub>50</sub> za vsako spojino posebej. ISO standard določa, da je v primeru nezmožnosti določitve EC<sub>50</sub>, zaželeno podati tudi najnižjo testirano koncentracijo, ki nima vpliva na gibljivost vodnih bolh in najvišjo koncentracijo, ki povzroči 100 % negibnost. Rezultati so veljavni, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

- Delež (v %) negibnih vodnih bolh v kontroli je nižji ali enak 10 %
- 24 h EC<sub>50</sub> za kalijev dikromat je v območju med 0,6 mg/L in 2,1 mg/L (39).

### **3.2.1.3 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z LUMINISCENČNIMI BAKTERIJAMI *Vibrio fischeri***

#### **Priprava vzorcev**

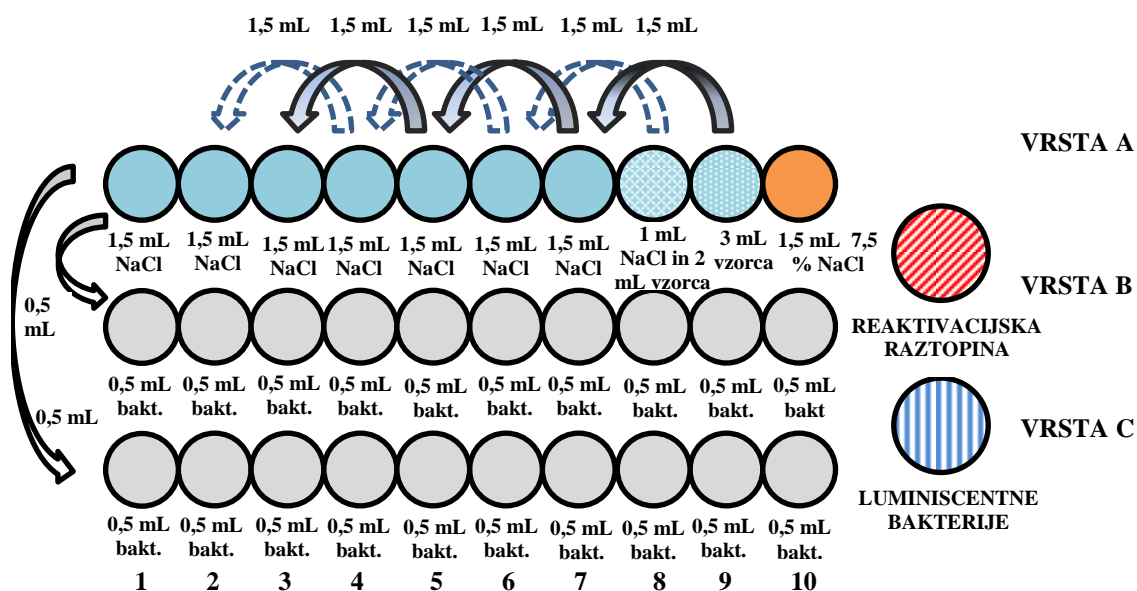
Tako kot pri prejšnjih dveh testih smo tudi pri bakterijah *Vibrio fischeri* uporabili raztopino BPA s koncentracijo 87,61 µM in jo kasneje redčili. Izhodno raztopino bisfenola A, katere pripravo smo opisali že pri testu z zarodki rib zebrič, smo s pomočjo merilnega valja prenesli v 25 mL bučko in dodali 0,5 g soli NaCl z namenom, da bi dobili 2 % raztopino

NaCl. S tem smo dosegli ustrezno slanost vzorcev, saj bi lahko v primeru prenizke (manj kot 1,5 %) ali previsoke (več kot 5 %) koncentracije NaCl prišlo do osmotsko povezanega zaviranja svetlobe in s tem do napak pri izvedbi testa in obravnavi rezultatov. Pri ugotavljanju deleža (v %) zaviranja luminiscence smo uporabili naslednje koncentracije BPA (vrsta A na sliki 14): 7,30  $\mu\text{M}$ ; 10,95  $\mu\text{M}$ ; 14,60  $\mu\text{M}$ ; 21,90  $\mu\text{M}$ ; 29,20  $\mu\text{M}$ ; 43,80  $\mu\text{M}$ ; 58,41  $\mu\text{M}$  in 87,61  $\mu\text{M}$ . Te redčitve smo izvedli v steklenih kivetah s pomočjo 2 % raztopine NaCl (1 g NaCl smo prenesli v 50 mL bučko in do oznake napolnili z ultra čisto vodo), ki smo jo uporabili tudi kot kontrolo. Pripravljene vzorce s prej omenjenimi koncentracijami pa smo pri nadaljnjem delu zopet redčili in sicer z resuspendiranimi luminiscenčnimi bakterijami. Tako smo dobili naslednje končne koncentracije (vrsti B in C na sliki 14)), ki pa smo jih uporabili pri izračunih in risanju grafov: 3,65  $\mu\text{M}$ ; 5,48  $\mu\text{M}$ ; 7,30  $\mu\text{M}$ ; 10,95  $\mu\text{M}$ ; 14,60  $\mu\text{M}$ ; 21,90  $\mu\text{M}$ ; 29,20  $\mu\text{M}$  in 43,80  $\mu\text{M}$ . Potek samega redčenja pa bomo podrobneje opisali pod točko izvedba testa. Pozitivno kontrolo pri testiranju je predstavljala 7,5 % raztopina NaCl.

### **Izvedba testa**

Akutni toksični test z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri* smo izvedli v skladu z ISO standardom, kjer so opisani potrebni reagenti, postopki dela in standardni parametri zagotavljanja kakovosti (40). Za spremljanje in merjenje inhibicije emisije svetlobe pri teh mikroorganizmih smo potrebovali naslednje komponente, ki smo jih dobili v kompletu Dr. Lange: epruvete s pokrovčki z zmrznjenimi luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*, reaktivacijsko raztopino (glukoza / natrijev klorid, pH je naravnano na 7,0), 7,5 % standardno raztopino NaCl in reakcijske epruvete. Poleg tega smo uporabili še steklene kivete, pipete različnih velikosti in ustrezne nastavke. Vsi testni reagenti so bili shranjeni v zamrzovalniku. Pred začetkom izvedbe testa smo najprej izhodni raztopini bisfenola A s koncentracijo 87,61  $\mu\text{M}$ , reaktivacijski raztopini in obema kontrolama izmerili pH vrednost. pH smo določili s pH metrom (827 pH Lab, Metrohm), kateremu smo pred merjenjem preverili ustreznost in točnost delovanja s pomočjo puferne raztopine s  $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$ . ISO standard določa, da mora biti pH vrednost vzorcev v skladu s standardom in sicer  $7,0 \pm 0,2$ . Kadar je prišlo do odstopanj, smo pH uravnali z dodajanjem kisline HCl (če je bil pH previsok) ali baze NaOH (če je bil pH prenizek) ustrezne molarne koncentracije (obe raztopini sta že bili pripravljene v laboratoriju na Kemijskem inštitutu; preverili smo le pH vrednost) in tako preprečili s pH povezano inhibicijo svetlobe. Po uravnavanju in

določitvi ustreznega pH smo najprej steklene kivete postavili v termoblok (LUMIStherm), kjer je bila temperatura nastavljena na 15 °C. Reaktivacijsko raztopino smo vzeli iz hladilnika, odpipetirali 12 mL v reakcijsko epruveto, dobro premešali in postavili na označeno mesto v termobloku. Potem smo v prvi vrsti v kivete od A1 do A7 odpipetirali 1,5 mL 2 % raztopine NaCl, v A8 pa smo dali 1 mL 2 % raztopine NaCl in nato dodali še 2 mL vzorca ( izhodno raztopino BPA). V kiveto A9 smo prenesli 3 mL pripravljenega vzorca, v zadnjo A10 pa smo odpipetirali 1,5 mL 7,5 % raztopine NaCl, ki je služila kot pozitivna kontrola. Po napolnitvi vseh kivet v A vrsti smo pričeli z redčenjem in sicer tako, da smo iz kivete A9 odpipetirali 1,5 mL v A7, iz A8 smo prenesli 1,5 mL v A6, iz A7 v A5 in tako nadaljevali vse do kivete A2. Pri vsakem koraku redčenja smo s pipeto vzorce dobro premešali. Prva in zadnja kiveta sta ostali nedotaknjeni, saj sta pri samem testu služili kot kontroli in ju nismo vključili v postopek redčenja.



Slika 14: Grafični prikaz priprave/redčenja vzorcev pri akutnem testu strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri*

Iz zamrzovalnika smo vzeli luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri* serije 13037 proizvajalca Dr. Lange in jih odtajali z mešanjem v vodni kopeli s sobno temperaturo. Po približno 2 minutah smo v epruveto s suspendiranimi bakterijami odpipetirali 0,5 mL reaktivacijske raztopine in termostatirali 15 minut pri 15 °C v termobloku. Nato smo resuspendirane bakterije zmešali še s preostalo reaktivacijsko raztopino in s pomočjo pipete prenesli po 0,5 mL v kivete od B1 do C10, ter zoper termostatirali 15 minut pri 15

°C (slika 14). Po pripravi vseh redčitev smo odprli program LUMISoft4 (Dr. Lange; program za instrument LUMIStox 300) in vstavili potrebne podatke, kot so:

- 1. okence: ime vzorca, izvajalec testa, datum in številka serije bakterij
- 2. okence: število vzorcev, časovni interval menjavanja kivet (30 s), število kontrolnih raztopin (2) in čas trajanja testa (30 minut)
- 3. okence: število in način redčenja.

Ko smo izpolnili zahtevano, smo pričeli z meritvijo. Najprej smo kiveto B1 vstavili v merilni instrument (LUMIStox 300) in izmerili začetno luminiscenco bakterij. Kiveto smo nato postavili nazaj v termoblok in vanjo odpipetirali 0,5 mL raztopine iz A1, ter dobro premešali. Nato smo v merilnik vstavili kiveto C1, izmerili luminiscenco in zopet dodali 0,5 mL raztopine iz A1. Postopek smo ponovili še z ostalimi kivetami, pri čemer smo vedno dodali isti volumen ustreznega vzorca iz vrste A. Po 30 minutah inkubacijske periode smo v merilnik zopet vstavili kiveto B1 in nato C1, ter izmerili končno luminiscenco. Isto smo naredili še z ostalimi kivetami in po koncu merjenja so se nam na monitorju izpisali rezultati, s pomočjo katerih smo kasneje narisali grafe in na osnovi vrednosti  $IC_{50}$  primerjali toksičnost treh testiranih hormonskih motilcev.

### **Obdelava rezultatov**

Pri naši raziskavi smo želeli ugotoviti akutno strupenost endokrinih motilcev na luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*. Spremljali smo zaviranje naravne emisije svetlobe pri teh mikroorganizmih v prisotnosti strupenih snovi in rezultate podali glede na kontrolo, katera ni vsebovala toksičnih snovi. Program Dr. Lange LUMISsoft 4 nam je s pomočjo izmerjene začetne in končne luminiscence kontrole izračunal korekcijski faktor, katerega je kasneje upošteval pri določanju deleža (v %) zaviranja luminiscence pri vsakem redčenem vzorcu posebej:

Enačba 1:

$$fK = \frac{I_t}{I_o}$$

fK: korekcijski faktor

$I_t$ : končna luminiscenca kontrole;  $I_o$ : začetna luminiscenca kontrole

Enačba 2:

$$I_{ct} = I_o \times fKp$$

I<sub>ct</sub>: popravljena začetna luminiscenca vzorca  
I<sub>o</sub>: nepopravljena začetna luminiscenca vzorca  
f<sub>Kp</sub>: povprečna vrednost korekcijskih faktorjev obeh kontrol

Enačba 3:

$$\% \text{ inhibicije luminiscence} = \frac{(I_{ct} - I_t) \times 100}{I_{ct}}$$

I<sub>t</sub>: končna luminiscenca vzorca

Po izračunih smo narisali grafe odvisnosti zaviranja luminiscence od koncentracije vzorca in s pomočjo linearne regresije določili 30 min IC<sub>50</sub> (program Microsoft Excel). Teste smo ponovili večkrat (vsaj 2 x, odvisno od same ponovljivosti), saj smo skušali dobiti čim bolj ponovljive rezultate. Na spodnjih slikah so predstavljene aparature, s pomočjo katerih smo izvedli akutni test strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*.



Slika 15: Aparature za delo z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*; desno zgoraj vidimo merilni instrument (LUMIStox 300), pod njim pa termoblok (LUMIStherm)

### 3.2.2 BPF

Kot pri bisfenolu A smo tudi pri njegovem analogu ugotavljali strupenost na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*. Študij o lastnostih in toksičnemu vplivu bisfenola F na omenjene organizme je precej manj v primerjavi z bisfenolom A, zato smo se pri samem delu bolj osredotočili na

podatke iz lastnih preliminarnih testov, poleg tega pa smo si pomagali tudi z rezultati, do katerih smo prišli pri testiranju toksičnosti BPA.

### **Priprava osnovne raztopine BPF**

Osnovno raztopino bisfenola F s koncentracijo 99,89  $\mu\text{M}$  smo pripravili tako, da smo natehtali 40 mg trdnega BPF, ga prenesli v 2 L bučo in jo napolnili z ultra čisto vodo (mQ), ter postavili na mešalo. Bisfenol F se je popolnoma raztopil že v nekaj urah in iz tega lahko sklepamo, da je njegova topnost precej boljša kot pri BPA. Tudi pri BPF smo izhodno raztopino testirali na vsebnost s HPLC in ugotovili, da razlika med nominalno in izmerjeno koncentracijo ni večja od 10 %, zato smo pri nadaljnjem redčenju izhajali iz koncentracije 99,98  $\mu\text{M}$ .

#### **3.2.2.1 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z ZARODKI RIB ZEBRIC (*Danio rerio*)**

V primerjavi s prejšnjim hormonskim motilcem je bil postopek dela enak, bolj podrobno bomo opisali le pripravo samih redčitev in interval koncentracij, ki smo si jih izbrali za delo.

### **Priprava vzorcev**

Pri akutnem testu strupenosti z zarodki rib zebric smo uporabili naslednje koncentracije bisfenola F: 9,99  $\mu\text{M}$ ; 19,98  $\mu\text{M}$ ; 29,97  $\mu\text{M}$ ; 39,95  $\mu\text{M}$ ; 43,80  $\mu\text{M}$ ; 49,94  $\mu\text{M}$ ; 64,93  $\mu\text{M}$ ; 79,91  $\mu\text{M}$ ; 89,90  $\mu\text{M}$  in 99,89  $\mu\text{M}$ . Izbrane koncentracije smo pripravili tako, da smo osnovni raztopini dodali potreben delež razredčevalne vode, pri najvišji koncentraciji pa smo dodali preračunane volumne soli (postopek redčenja oz. način priprave redčitev je enak kot pri bisfenolu A – poglavje 3.2.1.1 - priprava vzorcev). Interval želenih koncentracij za delo smo izbrali na osnovi preliminarnih testov in ugotovili, da smo se pri BPF gibali v enakem območju kot pri prejšnji spojini.

#### **3.2.2.2 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)**

### **Priprava vzorcev**

Pri ugotavljanju strupenosti na vodne bolhe smo uporabili naslednje koncentracije bisfenola F: 27,47  $\mu\text{M}$ ; 29,97  $\mu\text{M}$ ; 32,46  $\mu\text{M}$ ; 34,96  $\mu\text{M}$ ; 37,46  $\mu\text{M}$ ; 39,95  $\mu\text{M}$ ; 43,80  $\mu\text{M}$ ; 49,94  $\mu\text{M}$ ; 74,91  $\mu\text{M}$  in 99,89  $\mu\text{M}$ . Koncentracije smo izbrali s pomočjo preliminarnih



testov, kjer smo skušali določiti interval oz. območje, v katerem pride do določenih učinkov. Vse redčitve smo pripravljali v 100 mL bučkah in sicer tako, da smo izhodno že pripravljeno raztopino BPF s koncentracijo 99,89  $\mu\text{M}$  redčili z ultra čisto vodo do želenih koncentracij, potem pa smo dodali še potrebne volumne soli, kot pri BPA.

### **3.2.2.3 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z LUMINISCENČNIMI BAKTERIJAMI *Vibrio fischeri***

#### **Priprava vzorcev**

Tudi pri testu strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami smo uporabili izhodno raztopino bisfenola F s koncentracijo 99,89  $\mu\text{M}$ , ki smo jo prenesli v 25 mL bučko in dodali 0,5 g soli, tako da smo dobili 2 % raztopino NaCl. V vrsti A v termobloku smo po redčenju imeli naslednje koncentracije BPF: 8,32  $\mu\text{M}$ ; 12,49  $\mu\text{M}$ ; 16,65  $\mu\text{M}$ ; 24,97  $\mu\text{M}$ ; 33,30  $\mu\text{M}$ ; 49,94  $\mu\text{M}$ ; 66,59  $\mu\text{M}$  in 99,89  $\mu\text{M}$ . Kot smo že opisali pri bisfenolu A, pride v vrsti B oz. C zopet do redčenja, saj smo v vsako epruveto odpipetirali še 0,5 ml resuspendiranih luminiscenčnih bakterij. Za vrednotenje rezultatov pridejo tako v poštev naslednje koncentracije BPF: 4,16  $\mu\text{M}$ ; 6,24  $\mu\text{M}$ ; 8,32  $\mu\text{M}$ ; 12,49  $\mu\text{M}$ ; 16,65  $\mu\text{M}$ ; 24,97  $\mu\text{M}$ ; 33,30  $\mu\text{M}$  in 49,94  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.3 BPAF**

Po izvedbi testov z bisfenolom A in bisfenolom F smo se odločili testirati tudi strupenost tretjega analoga BPA, in sicer bisfenola AF. Tudi o BPAF je zelo malo raziskav glede njegovega vpliva na vodne organizme, zato smo se zanašali na lastne predhodne teste, s pomočjo katerih smo lažje določili ustrezne koncentracije za delo. Za lažjo primerjavo z BPA smo koncentracijo izhodne raztopine BPAF določili preko računanja množin in prišli do koncentracije 44,61  $\mu\text{M}$ . Ta koncentracije je namreč na osnovi množin primerljiva s koncentracijo 43,80  $\mu\text{M}$  BPA. Že na osnovi prvih rezultatov smo videli, da ne bi imelo smisla posegati po višjih koncentracijah, saj je bil BPAF precej bolj strupen za organizme, kot ostali dve spojini.

#### **Priprava osnovne raztopine BPAF**

Osnovno raztopino BPAF s koncentracijo 44,61  $\mu\text{M}$  smo pripravili tako, da smo natehtali 30 mg trdnega BPAF in ga z ultra čisto vodo raztopili v 2 L bučki. Tudi tukaj nam je

HPLC pokazal, da ni bistvene razlike med nominalno in realno koncentracijo, zato smo za nadaljnje delo uporabili raztopino s koncentracijo 44,61  $\mu\text{M}$ .

### **3.2.3.1 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z ZARODKI RIB ZEBRIC (*Danio rerio*)**

#### **Priprava vzorcev**

Za izvedbo akutnega testa strupenosti z zarodki rib zebrić smo uporabili naslednje koncentracije BPAF: 2,97  $\mu\text{M}$ ; 5,95  $\mu\text{M}$ ; 8,92  $\mu\text{M}$ ; 11,90  $\mu\text{M}$ ; 14,87  $\mu\text{M}$  in 17,84  $\mu\text{M}$ . Že pri izbiri ustreznih koncentracij lahko vidimo, da izhodne raztopine s koncentracijo 44,61  $\mu\text{M}$  sploh nismo uporabili pri ugotavljanju toksičnosti, ker smo morali poseči po precej nižjih koncentracijah za določitev subletalnih, letalnih in teratogenih znakov.

### **3.2.3.2 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)**

#### **Priprava vzorcev**

Pri delu z vodnimi bolhami smo na osnovi preliminarnih testov prišli do naslednjih koncentracij BPAF, ki smo jih uporabili pri določanju deleža (v %) negibnosti: 2,97  $\mu\text{M}$ ; 5,95  $\mu\text{M}$ ; 8,92  $\mu\text{M}$ ; 11,90  $\mu\text{M}$ ; 14,87 in 23,79  $\mu\text{M}$ . Kot pri delu z zebrićami smo morali tudi pri vodnih bolhah poseči po precej nižjih koncentracijah v primerjavi z BPA in BPF, kar nakazuje večjo strupenost oz. toksičnost s strani BPAF.

### **3.2.3.3 AKUTNI STRUPENOSTNI TEST Z LUMINISCENČNIMI BAKTERIJAMI *Vibrio fischeri***

#### **Priprava vzorcev**

Test z luminiscenčnimi bakterijami je potekal na enak način, kot pri prejšnjih dveh hormonskih motilcih, uporabili pa smo naslednje koncentracije BPAF: 3,72  $\mu\text{M}$ ; 5,58  $\mu\text{M}$ ; 7,44  $\mu\text{M}$ ; 11,15  $\mu\text{M}$ ; 14,87  $\mu\text{M}$ ; 22,31  $\mu\text{M}$ ; 29,74  $\mu\text{M}$  in 44,61  $\mu\text{M}$ . V vrsti B oz. C smo v vsako epruveto dodali 0,5 ml resuspendiranih luminiscenčnih bakterij, kar pomeni, da smo vzorce razredčili in zato so končne koncentracije, ki smo jih uporabili pri risanju grafov, naslednje: 1,86  $\mu\text{M}$ ; 2,79  $\mu\text{M}$ ; 3,72  $\mu\text{M}$ ; 5,58  $\mu\text{M}$ ; 7,44  $\mu\text{M}$ ; 11,15  $\mu\text{M}$ ; 14,87  $\mu\text{M}$  in 22,31  $\mu\text{M}$ .

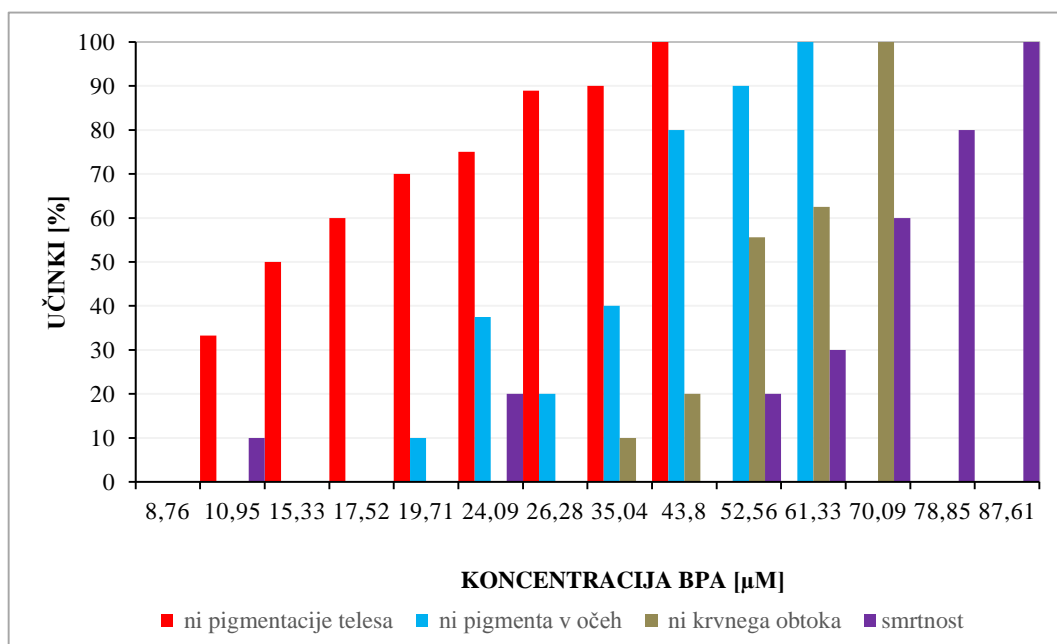
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 BISFENOL A

#### 4.1.1 Strupenost BPA za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*)

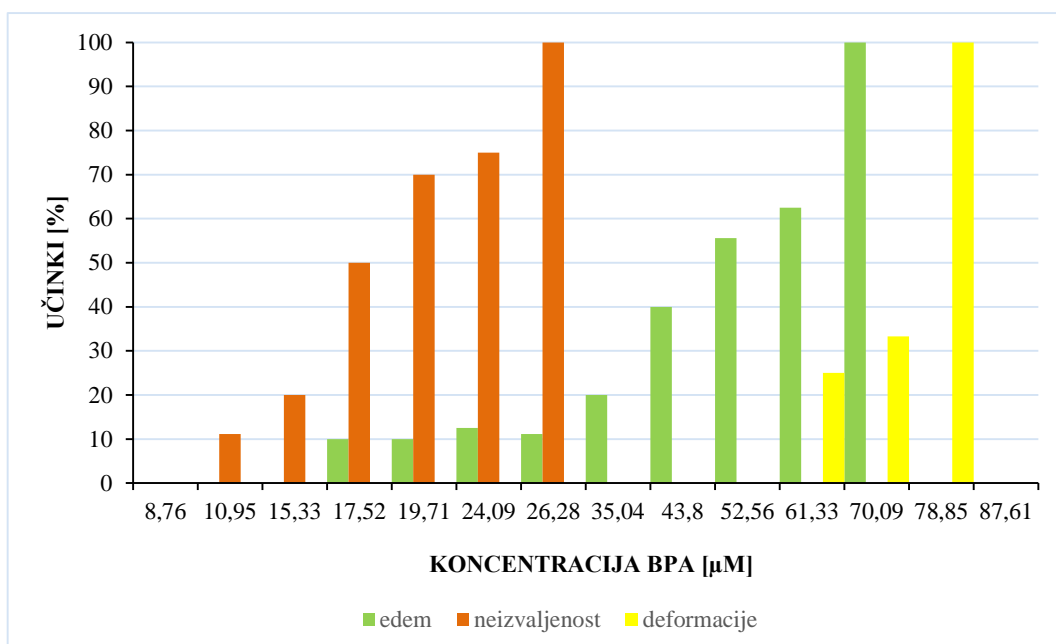
Strupenost smo ugotavljali preko določitve deleža (v %) oz. števila posameznih subletalnih, letalnih in teratogenih učinkov na zarodke rib zebrič. Pri opazovanju pod lupo smo nekatere znake zaznali že po 48 h, medtem ko so se drugi bolj izrazito pokazali šele po 3 dneh izpostavitve različnim koncentracijam BPA. Eden izmed najbolj občutljivih subletalnih znakov, ki smo ga opazili po 48 h, je bil pigmentacija telesa. Pri najnižji testirani koncentraciji (8,76  $\mu\text{M}$ ) se pigmentiranost zarodkov ni razlikovala od kontrole, že pri koncentraciji 10,95  $\mu\text{M}$  pa je bilo 33,3 % zarodkov slabše pigmentiranih oz. brez pigmentacije, 48 h  $\text{EC}_{50}$  znaša 14,01  $\mu\text{M}$ . 100 % nepigmentiranost smo dosegli pri izpostavitvi zarodkov vzorcu s koncentracijo 43,80  $\mu\text{M}$ . Drugi subletalni znak, ki smo ga spremljali, je bil pigmentacija oči. V primerjavi s pigmentacijo telesa se je odsotnost pigmenta v očeh pojavila šele pri koncentraciji 19,71  $\mu\text{M}$  in sicer pri 10 % zarodkov. Pri koncentraciji 61,33  $\mu\text{M}$  pa pigmenta v očeh nismo več opazili. Po 48 h smo v vzorcu s koncentracijo 35,04  $\mu\text{M}$  zaznali 10 % zarodkov brez krvnega obtoka (ni kroženja krvi po telesu), čeprav je bil srčni utrip prisoten. Z višanjem koncentracij bisfenola A je eksponentno naraščalo število zarodkov, pri katerih nismo opazili cirkulacije krvi. 48 h  $\text{EC}_{50}$  znaša 53,18  $\mu\text{M}$ , pri koncentraciji 70,09  $\mu\text{M}$  pa so bili vsi zarodki brez krvnega obtoka. Poleg subletalnih znakov, ki smo jih opazili po 48 h, je imel BPA velik vpliv tudi na smrtnost zarodkov, kjer je prevladovala koagulacija. Drugi najpogostejši vzrok, ki je pripeljal do smrti, je bil odsotnost srčnega utripa, ki pa smo ga zaznali šele pri izpostavitvi višjim koncentracijam. Tako je bilo v vzorcu s koncentracijo 70,09  $\mu\text{M}$  10 % zarodkov brez srčnega utripa, pri koncentraciji 78,85  $\mu\text{M}$  pa je bilo takšnih zarodkov 20 %. Nerazvitost somitov oz. vretenc pa pri opazovanju nismo zaznali. Nekateri zarodki so bili mrtvi že pri nekoliko nižjih koncentracijah (nižje od 26,28  $\mu\text{M}$  - možnost napak pri delu, kot npr. prisotnost mehurčkov, nepazljivost pri prenašanju iz ene posodice v drugo ali pa zgolj slučajna izbira zarodkov), saj lahko iz diagrama razberemo, da je začel delež smrtnosti vidno naraščati od koncentracije 52,56  $\mu\text{M}$  naprej in ta vzorec smo opazili tudi pri ponovitvi testa. Koncentracija, pri kateri je bilo mrtvih 50 % zarodkov, znaša 66,58  $\mu\text{M}$ , vsi zarodki pa so bili mrtvi ob izpostavitvi vzorcu s koncentracijo 87,61  $\mu\text{M}$ . Vse

subletalne in letalne učinke, ki smo jih pri zarodkih opazili po 48 h, smo v obliki deležev (v %) prikazali v spodnjem diagramu (slika 16).



Slika 16: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebrec (*Danio rerio*) po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA

Po 72 h pa smo pri zarodkih opazili prisotnost edemov, zaostanek v valjenju in nekatere deformacije, med katerimi je prevladovala predvsem deformacija repa. V vzorcu s koncentracijo 17,52 µM smo zaznali edem pri 10 % zarodkov, s programom Probit analiza smo izračunali 72 h EC<sub>50</sub>, ki znaša 51,96 µM, pri koncentraciji 70,09 µM pa smo pri vseh izpostavljenih zarodkih opazili prisotnost edema. K subletalnim znakom smo uvrstili tudi izvalitev, saj se je z višanjem koncentracij BPA zmanjševalo število izvaljenih zarodkov po 72 h. 50 % neizvalitev smo tako dosegli pri koncentraciji 17,81 µM. Pri koncentracijah nad 61,33 µM pa so se začele pojavljati deformacije repa (zavitost), hrbtenice in rumenjaka. Najnižja testirana koncentracija, pri kateri nismo opazili nobenih sprememb oz. učinkov, pa je bila 8,76 µM. Spodnji diagram prikazuje nekatere subletalne (prisotnost edemov in neizvaljenost) in teratogene (deformacije repa, hrbtenice) učinke, ki smo jih opazili pri zarodkih po 72 h izpostavitvi vzorcem z določenimi koncentracijami BPA (slika 17).



Slika 17: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in teratogenih učinkov na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*) po 72 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPA

V preglednici II so predstavljene vrednosti EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> in EC<sub>90</sub>, ki smo jih izračunali s pomočjo programa Probit analiza, za vsak opažen subletalni oz. letalni učinek posebej, tabela II v prilogi B pa prikazuje razvojne spremembe, ki smo jih opazili pri desetih zarodkih rib zebrič ob izpostavitvi vzorcu s koncentracijo 70,09 µM BPA.

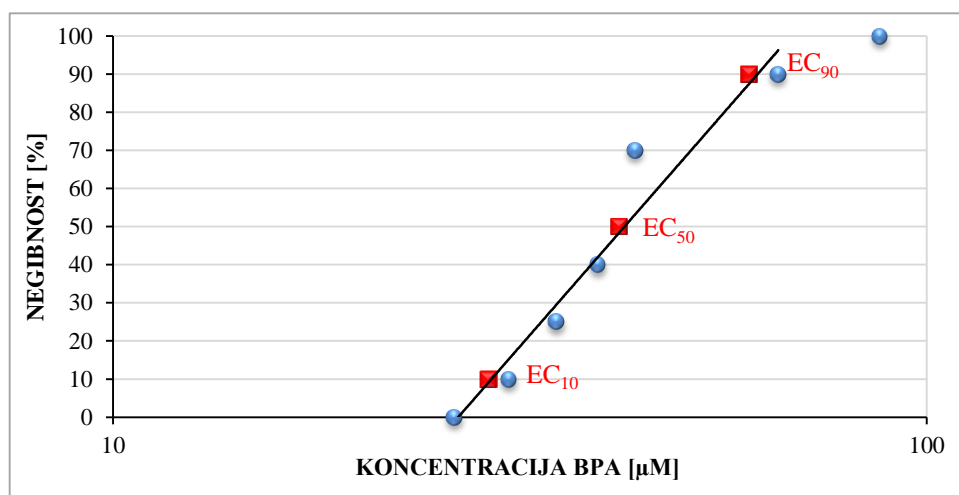
Preglednica II: Izračunane 48 h oz. 72 h EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> in EC<sub>90</sub> vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebričah ob izpostavitvi BPA

OPAŽENI SUBLETALNI UČINKI	BISFENOL A		
	EC <sub>10</sub> [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	EC <sub>90</sub> [µM]
Nepigmentacija telesa	5,73	14,01	34,25
Nepigmentacija oči	18,61	35,13	51,65
Ni krvnega obtoka	34,24	53,18	82,59
Prisotnost edemov	21,95	51,96	123,02
Neizvalitev	11,24	17,81	28,22
OPAŽENI LETALNI UČINKI			
Smrtnost	15,19	66,58	291,79

Rezultate našega raziskovalnega dela smo primerjali z objavljenimi študijami, kjer so na podoben način testirali strupenost bisfenola A in drugih substanc za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*). V enem izmed objavljenih člankov so na osnovi rezultatov določili, da je pigmentacija telesa najbolj občutljiv razvojni znak in izračunali 48 h EC<sub>50</sub>, ki znaša 32,85 μM (95 % interval zaupanja: 21,90 μM-50,37 μM). Koncentracija, ki je povzročila smrt po 48 h pri 50 % zarodkov, pa znaša 79,72 μM (95 % interval zaupanja: 74,03 μM-88,48 μM) (41). V drugem članku pa 24 h LC<sub>50</sub> znaša 73,37 μM, poleg tega pa so ugotovili, da so bili vsi zarodki mrtvi ob izpostavitvi vzorcu BPA s koncentracijo 109,51 μM. Pri koncentraciji 8,76 μM nismo opazili nobenih učinkov, ki bi bili povezani z opazovanimi subletalnimi znaki. Po 72 h so spremljali tudi število izvaljenih zarodkov in izračunali EC<sub>50</sub>, ki znaša 60,49 μM, ugotovili pa so tudi, da so se pri zarodkih v vzorcih z višjimi koncentracijami BPA (> 65,71 μM) začele pojavljati številne deformacije, med katerimi so prevladovale nepravilnosti v razvoju/obliki repa (42). V tretji objavljeni raziskavi so pri zarodkih v vzorcih BPA s koncentracijami med 30 μM in 70 μM najpogosteje opazili naslednje morfološke spremembe: edem rumenjakeve vreče, perikardialni edem, nepravilnosti pri oblikovanju glave in zaostanek v valjenju. Po 120 h od oploditve so določili LC<sub>50</sub>, ki naj bi bil višji od 70 μM (43). Če primerjamo literaturne vrednosti z rezultati, do katerih smo prišli pri našem raziskovanju, lahko vidimo, da se nekateri opaženi učinki in izračunane EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> vrednosti dobro ujemajo s tistimi v objavljenih študijah (pri koncentraciji 8,76 μM pri zarodkih ni prišlo do sprememb v razvoju; v študijah so se začele deformacije pojavljati pri koncentracijah nad 65,71 μM, v našem primeru smo prisotnost deformacij pri zarodkih zaznali pri koncentracijah nad 61,33 μM; odsotnost pigmenta se je izkazal kot najbolj občutljiv razvojni znak; študije navajajo tudi prisotnost edemov in zaostanek v valjenju, kar smo opazili tudi pri naših testih; literaturna 48 h LC<sub>50</sub> znaša 79,72 μM, 50 % smrtnost pa smo v naši raziskavi določili pri koncentraciji 66,58 μM). Pri drugih opaženih učinkih (pigmentacija, izvalitev) pa je prišlo do manjših odstopanj pri izračunanih EC<sub>50</sub> vrednostih (literaturni 48 h EC<sub>50</sub> za nepigmentiranost znaša 32,85 μM, v našem primeru smo določili EC<sub>50</sub> pri 14,01 μM; literaturni 72 h EC<sub>50</sub> za neizvalitev znaša 60,49 μM, 50 % neizvalitev pa smo mi dosegli že pri koncentraciji 17,81 μM), kar lahko pripišemo sami občutljivosti vodnih organizmov.

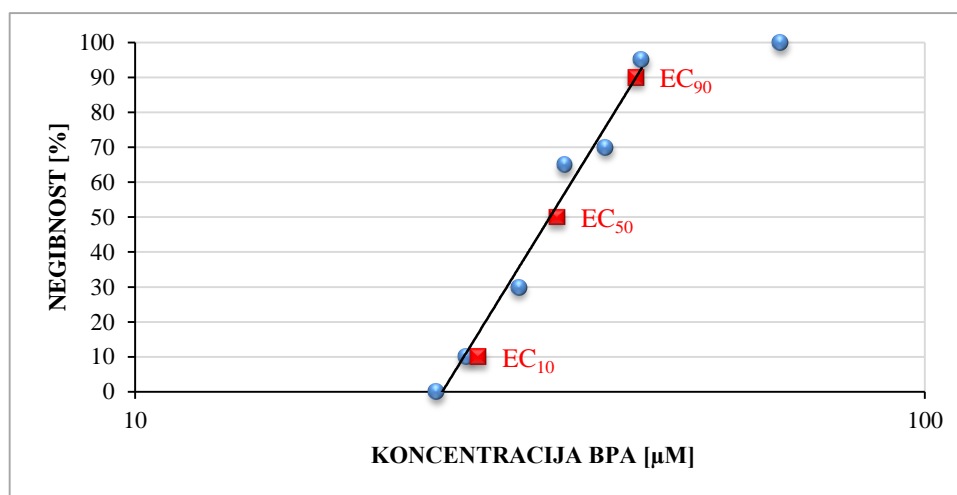
#### 4.1.2 Strupenost BPA za vodne bolhe (*Daphnia magna*)

Odziv 24 h starih vodnih bolh na različne koncentracije bisfenola A smo določali preko spremljanja zaviranja gibanja vodnih organizmov v petrijevkah. Delež (v %) negibnih vodnih bolh se je po 24 h oz. 48 h z naraščanjem koncentracij BPA sorazmerno povečeval. Po 24 h izpostavitve so bile vse vodne bolhe v vzorcu s koncentracijo 26,28  $\mu\text{M}$  normalno gibljive, kar pomeni, da je bila ta koncentracija za testne organizme nestrupena. Najnižja testirana koncentracija, pri kateri smo prvič opazili prisotnost negibnih vodnih bolh, pa je bila 30,66  $\mu\text{M}$ . S pomočjo programa Probit analiza smo izračunali 24 h  $\text{EC}_{50}$ , ki znaša 41,86  $\mu\text{M}$ , 100 % negibnost pa smo dosegli pri izbrani najvišji koncentraciji BPA in sicer 87,61  $\mu\text{M}$ . Poleg koncentracije, ki je povzročila 50 % negibnost, pa smo izračunali še  $\text{EC}_{10}$ , ki znaša 28,96  $\mu\text{M}$  in  $\text{EC}_{90}$ , ki smo ga določili pri 60,51  $\mu\text{M}$ , ter vse označili na grafu deleža negibnih vodnih bolh po 24 h v odvisnosti od koncentracije BPA (slika 18).



Slika 18: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPA

Opazovanje gibljivosti vodnih bolh je potekalo tudi po 48 h, kjer smo ugotovili večjo smrtnost oz. negibnost v primerjavi z rezultati po 24 h. Vse vodne bolhe so bile gibljive pri koncentraciji 24,09  $\mu\text{M}$ , izračunan 48 h  $\text{EC}_{50}$  pa znaša 34,25  $\mu\text{M}$ . 100 % negibnost smo dosegli pri koncentraciji 65,71  $\mu\text{M}$  in iz tega lahko vidimo, da z daljšanjem časa inkubacije oz. izpostavitve narašča število negibnih vodnih bolh in s tem strupenost. Tudi po 48 h smo s Probit analizo izračunali  $\text{EC}_{10}$  in  $\text{EC}_{90}$ , ki znašata 27,22  $\mu\text{M}$  in 43,08  $\mu\text{M}$  (slika 19). V tabelah III in IV v prilogi B smo predstavili števila in deleže negibnih vodnih bolh po 24 urni oz. 48 urni izpostavitvi posameznim vzorcem BPA.



Slika 19: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPA

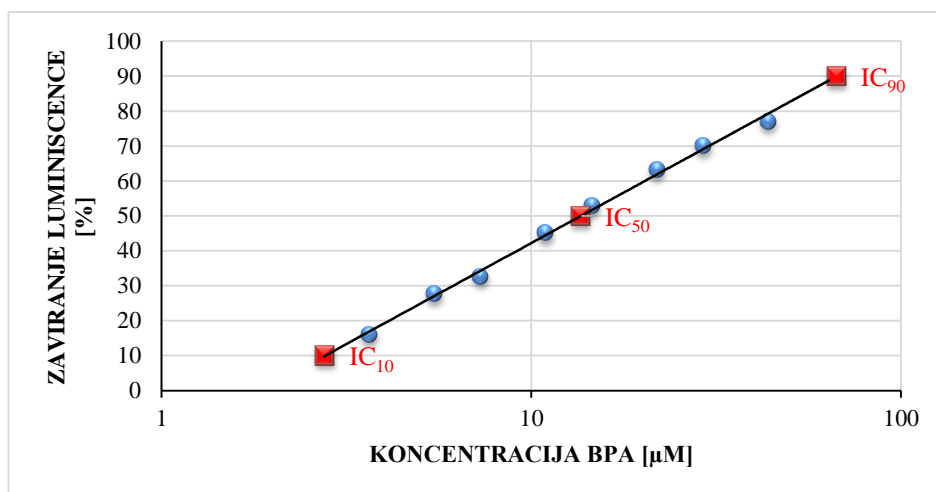
Rezultate našega akutnega testa strupenosti z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo primerjali z izsledki že objavljenih študij. V treh člankih smo opazili naslednje vrednosti  $EC_{50}$  po 24 h: 54,75  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 49,50  $\mu\text{M}$ -61,76  $\mu\text{M}$ ) (41); 37,54  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 36,27  $\mu\text{M}$ -38,81  $\mu\text{M}$ ) (25) in 60,45  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 54,75  $\mu\text{M}$ -68,77  $\mu\text{M}$ ) (44). Poleg rezultatov po 24 h pa smo spremljali gibljivost vodnih bolh tudi po 48 h in naše ugotovitve primerjali s članki, kjer so bile objavljene naslednje vrednosti 48 h  $EC_{50}$ : 43,80  $\mu\text{M}$  (45); 33,95  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 33,51  $\mu\text{M}$ -34,39  $\mu\text{M}$ ) (25); 70,09  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 69,65  $\mu\text{M}$ -71,84  $\mu\text{M}$ ) (46); 56,07  $\mu\text{M}$  (95 % interval zaupanja: 50,68  $\mu\text{M}$ -62,95  $\mu\text{M}$ ) (47). Rezultati naših akutnih testov strupenosti z vodnimi bolhami kažejo na splošno dobro ujemanje z literaturnimi vrednostmi, tako po 24 h, kot tudi po 48 h izpostavitve vodnih organizmov izbranim koncentracijam BPA. Ob pregledu literaturnih vrednosti  $EC_{50}$ , vidimo, da obstajajo razlike tudi med rezultati posameznih študij, kar pomeni, da na potek dela vpliva veliko dejavnikov (gojenje vodnih bolh in njihova občutljivost, prenos vodnih bolh iz ene posode v drugo, temperatura).

#### 4.1.3 Strupenost BPA za luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*

Strupenost različnih koncentracij BPA za bakterije *Vibrio fischeri* smo določali z merjenjem zaviranja luminiscence pri teh mikroorganizmih. Rezultati testov kažejo, da se z višanjem koncentracij pripravljenih vzorcev bisfenola A povečuje delež zaviranja in s tem strupenost (tabela V v prilogi B). Pri najnižji testirani koncentraciji 3,65  $\mu\text{M}$  je znašal delež zaviranja luminiscence 16,1 %, pri najvišji uporabljeni koncentraciji (43,80  $\mu\text{M}$ ) pa je test akutne strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami pokazal 77 % zaviranje.



Bioluminiscenco smo pred in po dodatku pripravljenega vzorca BPA merili s pomočjo luminometra in tako na koncu z linearno regresijo izračunali 30 min  $IC_{50}$ , ki znaša 13,63  $\mu M$ , poleg tega pa smo na spodnjem grafu predstavili še koncentraciji, ki sta povzročili 10 % ( $IC_{10} = 2,77 \mu M$ ) in 90 % ( $IC_{90} = 67,02 \mu M$ ) zaviranje luminiscence bakterij (slika 20).



Slika 20: Deleži zaviranja luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPA

Raziskav o vplivu strupenosti endokrinega motilca BPA na bakterije *Vibrio fischeri* je zelo malo, a smo kljub temu v enem izmed člankov našli vrednost za 30 min  $IC_{50}$ , ki znaša 10,51  $\mu M$  (95 % interval zaupanja: 10,51  $\mu M$  - 10,95  $\mu M$ ) in vidimo, da ta vrednost dobro sovпада z našimi ugotovitvami (30 min  $IC_{50} = 13,63 \mu M$ ; 95 % interval zaupanja: 11,26  $\mu M$  - 16,00  $\mu M$ ) (41).

#### 4.1.4 Odziv testnih organizmov na strupenost BPA

S pomočjo izračunanih LC, EC in IC vrednosti smo primerjali strupenost BPA za izbrane organizme in skušali ugotoviti, kateri testni sistem se je izkazal kot najbolj občutljiv. Poleg tega smo za  $LC_{50}$  /  $EC_{50}$  /  $IC_{50}$  podali tudi 95 % interval zaupanja (preglednica III in tabela XIV v prilogi E).

Preglednica III: Primerjava izračunanih 48 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPA na posamezne testne organizme

	ORGANIZMI			
	Ribe zebrice ( <i>Danio rerio</i> )		Vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> )	Bakterije ( <i>Vibrio fischeri</i> )
Čas izpostavitve	48 h LC	48 h EC	48 h EC	30 min IC

Vrednosti [ $\mu\text{M}$ ]				
LC <sub>10</sub> / EC <sub>10</sub> / IC <sub>10</sub>	15,19	5,73	27,22	2,77
LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub>	66,58	14,01	34,25	13,63
95 % interval zaupanja	63,53 - 69,63	/*	32,83 - 35,66	11,26 – 16,00
LC <sub>90</sub> / EC <sub>90</sub> / IC <sub>90</sub>	291,79	34,25	43,08	67,02

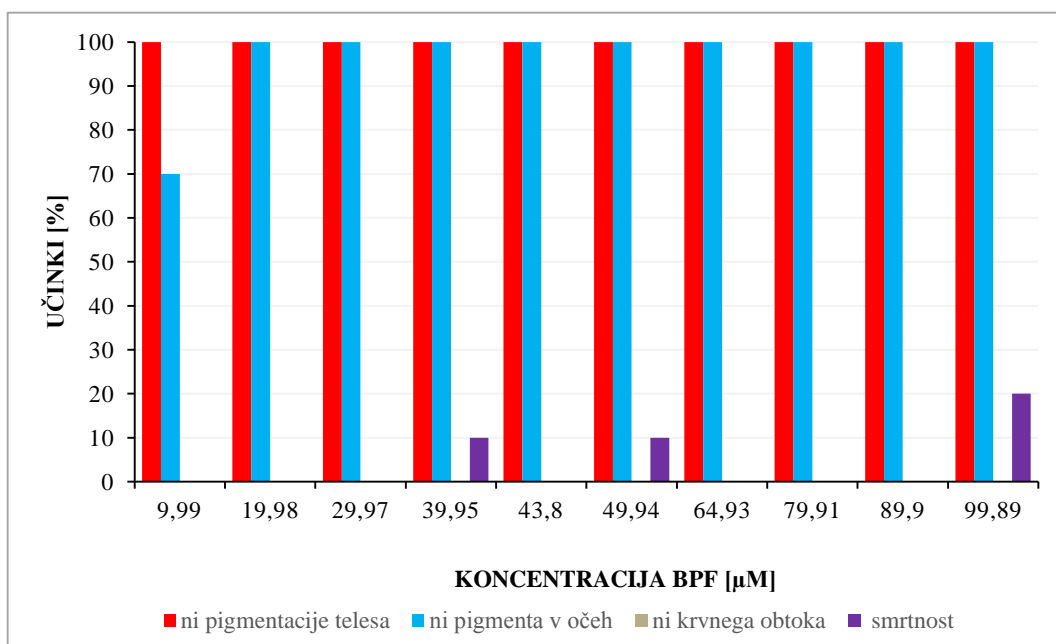
\* 95 % intervala zaupanja nismo mogli izračunati zaradi pomanjkanja podatkov

V zgornji tabeli vidimo, da smo pri testu z zarodki rib zebrič izračunali koncentracijo, pri kateri je bilo mrtvih 50 % zarodkov (48 h LC<sub>50</sub> = 66,58  $\mu\text{M}$ ), poleg tega pa smo podali tudi 48 h EC<sub>50</sub> vrednost (14,01  $\mu\text{M}$ ), ki se nanaša na pigmentacijo telesa pri zarodkih, saj se je ta subletalni znak izrazil že pri koncentraciji 10,95  $\mu\text{M}$  in se zato smatra kot najbolj občutljiv. Na osnovi izračunanih EC in IC vrednosti lahko trdimo, da je strupeni učinek BPA primerljiv pri ribah zebričah in luminiscenčnih bakterijah, vendar se je kljub temu akutni strupenostni testni sistem, ki je potekal z bakterijami *Vibrio fischeri*, izkazal kot najbolj občutljiv za vplive BPA, saj znaša 30 min IC<sub>50</sub> 13,63  $\mu\text{M}$ . Nekoliko manjši vpliv strupenosti BPA smo opazili pri zarodkih rib zebrič, saj znaša 48 h EC<sub>50</sub>, vezan na nepigmentiranost telesa, 14,01  $\mu\text{M}$ , 95 % intervala zaupanja pa zaradi premajhnega števila podatkov nismo mogli izračunati. Pri delu z vodnimi bolhami (*Daphnia magna*) smo po 48 h dosegli 50 % negibnost pri koncentraciji 34,25  $\mu\text{M}$  in na osnovi tega lahko sklepamo, da ima akutna izpostavitvev teh organizmov različnim vzorcem BPA najmanjši vpliv na omenjen testni sistem oz. so ti vodni organizmi manj občutljivi kot smo to opazili pri luminiscenčnih bakterijah in zarodkih rib zebrič. EC vrednosti torej kažejo, da je testni sistem z vodnimi bolhami najmanj občutljiv za strupene učinke BPA, na osnovi izračunanih LC vrednosti pa smo najmanjšo občutljivost opazili pri akutnem testu z zarodki rib zebrič, saj znaša LC<sub>50</sub> 66,58  $\mu\text{M}$ . Ob primerjavi naših rezultatov z objavljeno študijo, kjer so naredili primerjavo strupenosti BPA za omenjene organizme, lahko vidimo, da so tudi pri tej raziskavi na osnovi EC vrednosti ugotovili, da je testni sistem z luminiscenčnimi bakterijami najbolj občutljiv (30 min IC<sub>50</sub> = 10,51  $\mu\text{M}$ , medtem ko je imel BPA pri vodnih bolhah najmanjši vpliv strupenosti (24 h EC<sub>50</sub> = 54,75  $\mu\text{M}$ ). LC vrednosti pa so pokazale najmanjšo občutljivost pri ribah zebričah (LC<sub>50</sub> = 79,72  $\mu\text{M}$ ) (41). S pomočjo izračunanih vrednosti in narisanih grafov lahko trdimo, da gre za koncentracijsko odvisnost, saj se je z naraščanjem koncentracij jakost učinkov povečevala.

## 4.2 BISFENOL F

### 4.2.1 Strupenost bisfenola F za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*)

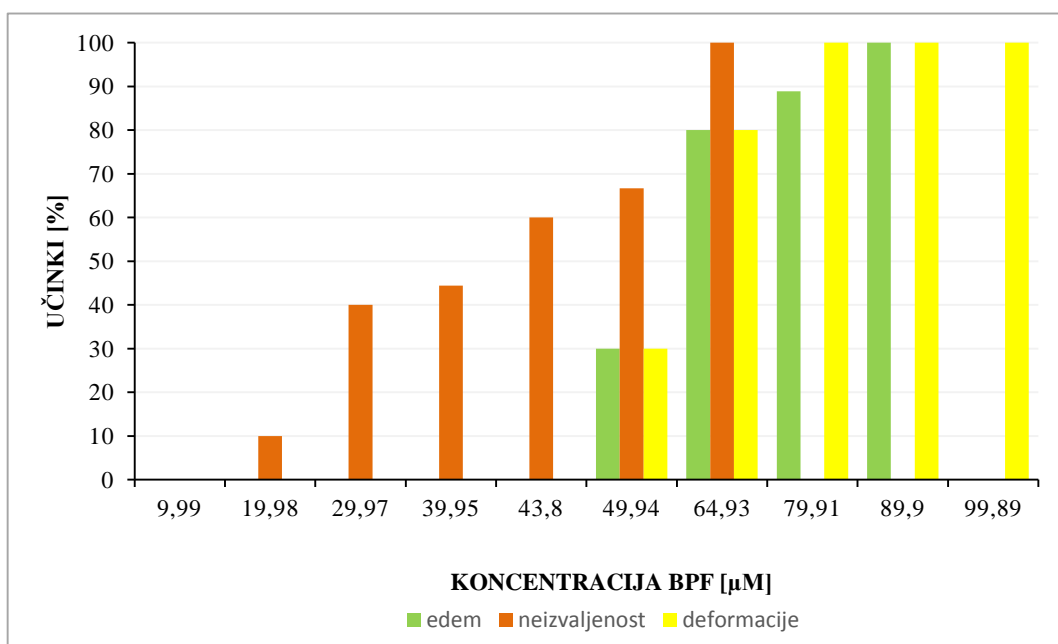
Bisfenol F je analog BPA, ki ima namesto metilnih skupin v strukturi prisotne vodikove atome. Kot pri BPA smo tudi pri bisfenolu F ugotavljali strupenost na zarodke rib zebrič s spremljanjem subletalnih, letalnih in teratogenih učinkov v odvisnosti od izbranih koncentracij BPF. Glede na podobno strukturo z BPA bi lahko sklepali na primerljivo strupenost, vendar se je izkazalo, da je bil bisfenol F pri nekaterih subletalnih znakih bistveno bolj strupen za organizme kot BPA, medtem ko je pri letalnih učinkih izkazoval manjšo toksičnost. Tudi pri bisfenolu F smo nekatere znake opazili že po 48 h, medtem ko so bili drugi bolj izraženi šele po 72 h izpostavitve. Dva subletalna znaka, ki smo ju detektirali po 48 h, sta bila pigmentacija telesa in oči. Ta razvojna znaka sta bila med subletalnimi najbolj občutljiva, saj smo spremembe v primerjavi s kontrolo zaznali že pri najnižji testirani koncentraciji BPF in sicer  $9,99 \mu\text{M}$ . Pri tej koncentraciji so bili namreč vsi zarodki popolnoma nepigmentirani po telesu, medtem ko se je pigmentiranost oči ohranila pri 30 % zarodkov. 100 % odsotnost pigmenta v očeh pa smo dosegli že pri koncentraciji  $19,98 \mu\text{M}$ . Zanimivo je dejstvo, da se je pigmentacija telesa in oči izboljšala po 72 h, vendar je bila le-ta v primerjavi z BPA še vedno precej slabša. Sprememb v cirkulaciji krvi nismo zaznali, saj so imeli zarodki tudi pri najvišjih koncentracijah normalen krvni obtok. Po 48 h smo opazovali tudi letalne učinke. V primerjavi z BPA, kjer smo pri najvišji izbrani koncentraciji dosegli 100 % smrtnost, lahko zaključimo, da je bil BPF s tega vidika manj strupen. Pri zarodkih namreč z izbranimi koncentracijami nismo opazili trenda naraščanja deleža smrtnosti v odvisnosti od koncentracij, zato tudi nismo mogli izračunati  $\text{LC}_{50}$ . Ob izpostavitvi zarodkov vzorcu z najvišjo koncentracijo BPF ( $99,89 \mu\text{M}$ ) smo dosegli 20 % smrtnost in menimo, da bi bilo smiselno razširiti interval koncentracij, saj bi le tako lahko bolje opredelili njegov vpliv na letalne učinke. Somiti so bili pri zarodkih dobro razviti, prav tako pa so imeli vsi zarodki rep po 48 h vidno ločen od rumenjaka. S spodnjim diagramom smo želeli grafično predstaviti subletalne (ni pigmentacije telesa, oči, krvnega obtoka) in letalne (smrtnost) razvojne spremembe, ki smo jih opazili pri zarodkih po 48 h izpostavitve vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF (slika 21).



Slika 21: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*) po 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPF

Nekateri razvojni znaki pa so se bolj izrazito pokazali po 72 h inkubacije in sem spadajo prisotnost edemov, izvalitev in deformacije (slika 22). Edemi so se prvič pojavili pri koncentraciji 49,94 µM in sicer pri 30 % zarodkov, 72 h EC<sub>50</sub> pa smo dosegli pri koncentraciji 55,70 µM BPF. Kot pri BPA smo tudi pri izpostavitvi zarodkov različnim koncentracijam BPF opazili zaostanek v valjenju, saj se pri koncentraciji 19,98 µM 10 % zarodkov ni izvalilo, 100 % neizvalitev pa smo dosegli pri koncentraciji 64,93 µM. Izračunan 72 h EC<sub>50</sub> znaša 38,92 µM. Številne deformacije, med katerimi so prevladovale nepravilnosti v razvoju/obliki repa, glave in hrbtenice, so se začele pojavljati pri koncentracijah nad 49,95 µM.

V spodnjem diagramu smo v obliki stolpcev prikazali prisotnost subletalnih (edemi in neizvalitev) in teratogenih (deformacije repa, glave in hrbtenice) razvojnih sprememb pri zarodkih po 72 h izpostavitve izbranim koncentracijam BPF, medtem ko vidimo v preglednici IV izračunane vrednosti EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> in EC<sub>90</sub> po 72 h za vsak opažen razvojni učinek posebej. V tabeli VI v prilogi C pa smo prikazali opažene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*) v vzorcu s koncentracijo 79,91 µM BPF.



Slika 22: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in teratogenih učinkov na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*) po 72 urni izpostavitvi različnim koncentracijam BPF

Preglednica IV: Izračunane 72 h  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$  in  $EC_{90}$  vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebričah ob izpostavitvi BPF

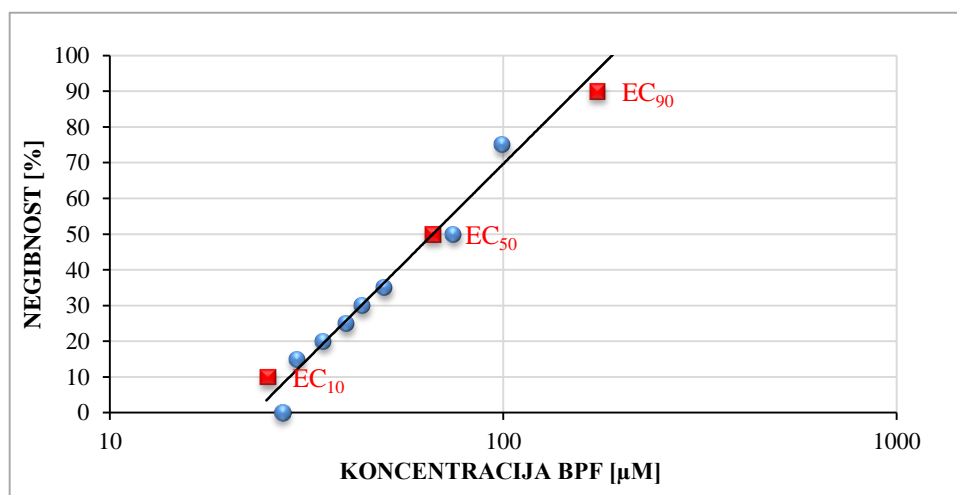
OPAŽENI SUBLETALNI UČINKI	BISFENOL F		
	$EC_{10}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$EC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$EC_{90}$ [ $\mu\text{M}$ ]
Nepigmentacija telesa	/*	/*	/*
Nepigmentacija oči	/*	/*	/*
Ni krvnega obtoka	/*	/*	/*
Prisotnost edemov	40,38	55,70	76,82
Neizvalitev	18,53	38,92	81,73
OPAŽENI LETALNI UČINKI			
Smrtnost	/*	/*	/*

\* Označenih vrednosti nismo izračunali, ker se določeni učinki pri zarodkih niso pojavili

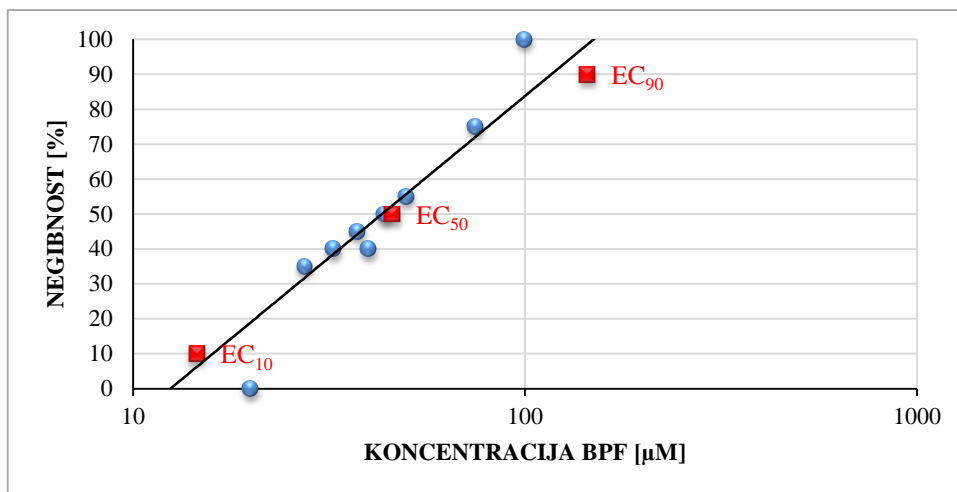
#### 4.2.2 Strupenost bisfenola F za vodne bolhe (*Daphnia magna*)

Kot pri BPA smo se tudi pri njegovem analogu ukvarjali s testiranjem strupenosti preko spremljanja gibljivosti vodnih bolh ob izpostavitvi različnim koncentracijam bisfenola F. Delež negibnih vodnih bolh se je kot pri BPA z višanjem koncentracij sorazmerno povečeval, do manjših odstopanj je prišlo le pri najnižji oz. najvišji testirani koncentraciji

po 48 h opazovanja. Po 24 h smo v vzorcu s koncentracijo 27,47  $\mu\text{M}$  ugotovili dobro gibljivost vseh izpostavljenih vodnih bolh, kar pomeni, da je bila uporabljena koncentracija za testirane organizme nestrupena. Pri koncentraciji 29,97  $\mu\text{M}$  pa smo opazili negibnost pri treh od izpostavljenih 20 vodnih bolh, torej je bil delež negibnosti 15 %. S programom Probit analiza smo izračunali 24 h  $\text{EC}_{50}$ , ki znaša 66,43  $\mu\text{M}$ , poleg tega pa smo določili tudi koncentraciji, ki sta povzročili 10 % (25,34  $\mu\text{M}$ ) oz. 90 % (174,18  $\mu\text{M}$ ) negibnost (slika 23). V primerjavi z BPA, kjer smo po 24 h dosegli 100 % negibnost, pa bi morali pri bisfenolu F razširiti interval koncentracij, saj smo v vzorcu z najvišjo testirano koncentracijo (99,89  $\mu\text{M}$ ) dosegli samo 75 % zaviranje gibanja. Po 48 h inkubacije smo ugotovili večjo smrtnost oz. negibnost vodnih bolh kot po 24 h in se tako prepričali, da ima poleg koncentracij močan vpliv na potek dela in rezultate tudi čas izpostavitve. Najnižja testirana koncentracija, kjer smo določili normalno gibljivost vseh vodnih bolh, je znašala 19,98  $\mu\text{M}$  in vidimo, da je v primerjavi z nestrupeno koncentracijo, ki smo jo določili po 24 h, nižja. Izračunan 48 h  $\text{EC}_{50}$  znaša 45,87  $\mu\text{M}$ , na grafu pa smo označili tudi  $\text{EC}_{10}$  (14,56  $\mu\text{M}$ ) in  $\text{EC}_{90}$  (144,46  $\mu\text{M}$ ) (slika 24). Z akutnim testom strupenosti za vodne bolhe (*Daphnia magna*) smo po 48 h dosegli 100 % zaviranje gibanja in sicer pri koncentraciji 99,89  $\mu\text{M}$ . V tabelah VII in VIII v prilogi C smo predstavili števila in deleže negibnih vodnih bolh po 24 urni oz. 48 urni izpostavitvi posameznim vzorcem BPF.



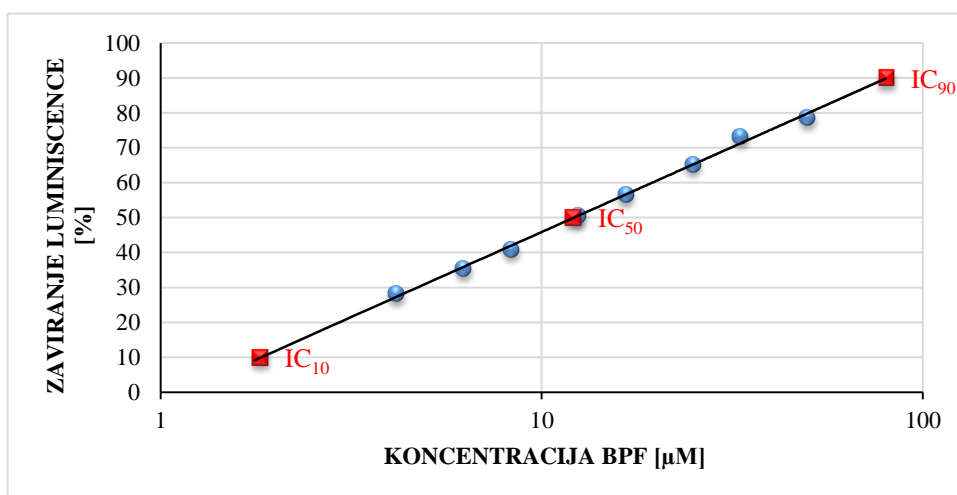
Slika 23: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPF



Slika 24: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPF

#### 4.2.3 Strupenost bisfenola F za luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*

Test akutne strupenosti z luminiscenčnimi bakterijami je pokazal, da se z višanjem koncentracij BPF sorazmerno povečuje delež zaviranja luminiscence (tabela IX v prilogi C). Pri najnižji testirani koncentraciji 4,16 µM smo dosegli 28,2 % zaviranje naravne emisije svetlobe izbranih mikroorganizmov, medtem ko smo koncentracijo, ki je po 30 minutah povzročila 50 % zaviranje luminiscence, določili s pomočjo linearne regresije in znaša 12,15 µM. Poleg IC<sub>50</sub> smo na grafu prikazali tudi koncentraciji, kjer smo zaznali 10 % (IC<sub>10</sub> = 1,83 µM) oz. 90 % (IC<sub>90</sub> = 80,58 µM) zaviranje luminiscence. Pri izpostavitvi bakterij *Vibrio fischeri* vzorcu z najvišjo testirano koncentracijo (49,94 µM) pa smo dosegli 78,7 % zaviranje luminiscence (slika 25).



Slika 25 Deleži zaviranja luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPF

#### 4.2.4 Odziv testnih organizmov na strupenost BPF

Tako kot pri prejšnjem hormonskem motilcu smo tudi pri bisfenolu F med seboj primerjali 48 h oz. 30 min vrednosti LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> in IC<sub>50</sub> in na osnovi tega skušali določiti, pri katerem testnem sistemu je bil strupeni učinek BPF najbolj izražen in pri katerem testiranem organizmu je bila občutljivost največja (preglednica V). Za 48 h EC<sub>50</sub> in 30 min IC<sub>50</sub> smo podali tudi 95 % interval zaupanja (tabela XV v prilogi E).

Preglednica V: Primerjava izračunanih 48 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPF na testne organizme

	ORGANIZMI			
	Ribe zebriče ( <i>Danio rerio</i> )		Vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> )	Bakterije ( <i>Vibrio fischeri</i> )
Čas izpostavitve	48 h LC	48 h EC	48 h EC	30 min IC
<b>VREDNOSTI [μM]</b>				
LC <sub>10</sub> / EC <sub>10</sub> / IC <sub>10</sub>	/*	/*	14,56	1,83
LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> / IC <sub>50</sub>	/*	/*	45,87	12,15
<b>95 % interval zaupanja</b>	/*	/*	44,23 – 47,52	10,68 – 13,63
LC <sub>90</sub> / EC <sub>90</sub> / IC <sub>90</sub>	/*	/*	144,46	80,58

\* Vrednosti nismo izračunali zaradi pomanjkanja podatkov (npr. smrtnost se je pojavila pri višjih koncentracijah)

V preglednici V lahko vidimo, da pri ribah zebričah 48 h LC oz. EC vrednosti nismo mogli izračunati zaradi premajhnega števila podatkov, vendar bomo kljub temu na osnovi opaženih učinkov skušali primerjati strupenost BPF za testirane organizme. Kot pri BPA, smo tudi pri njegovem analogu ugotovili, da je pigmentacija telesa najbolj občutljiv opazovani parameter, saj so bili vsi zarodki nepigmentirani že pri najnižji izbrani koncentraciji (9,99 μM) in iz tega lahko sklepamo, da bi 50 % nepigmentiranost dosegli pri nižjih koncentracijah, kot smo 50 % zaviranje luminiscence pri bakterijah *Vibrio fischeri*, zato lahko rečemo, da se je testni sistem z zarodki rib zebrič na osnovi EC<sub>50</sub> vrednosti izkazal kot najbolj občutljiv. Manjši vpliv strupenosti BPF oz. manjšo občutljivost v primerjavi z zarodki rib zebrič smo opazili pri delu z luminiscenčnimi bakterijami, saj znaša izračunana IC<sub>50</sub>, ki smo jo določili po 30 minutnem postopku, 12,15 μM. Najmanjšo občutljivost smo zaznali pri ugotavljanju deleža negibnih vodnih bolh, saj je 48 h EC<sub>50</sub> 45,87 μM. Medtem ko smo pri BPA lahko podali LC vrednosti za zarodke rib zebrič, pa pri BPF nismo mogli izračunati vrednosti za letalne učinke, ker se je smrtnost pojavila šele v vzorcih z višjimi koncentracijami BPF. Za izračun 48 h LC<sub>50</sub> bi namreč morali zarodke



zebric izpostaviti še višjim koncentracijam BPF, vendar glede na to, da je smrtnost pri najvišji uporabljeni koncentraciji znašala 20 %, lahko trdimo, da bi 50 % smrtnost zanesljivo dosegli pri višji koncentraciji, kot smo 50 % učinek zaznali pri vodnih bolhah, kar na osnovi LC vrednosti kaže na manjšo občutljivost testnega sistema z zarodki rib zebric v primerjavi z vodnimi bolhami.

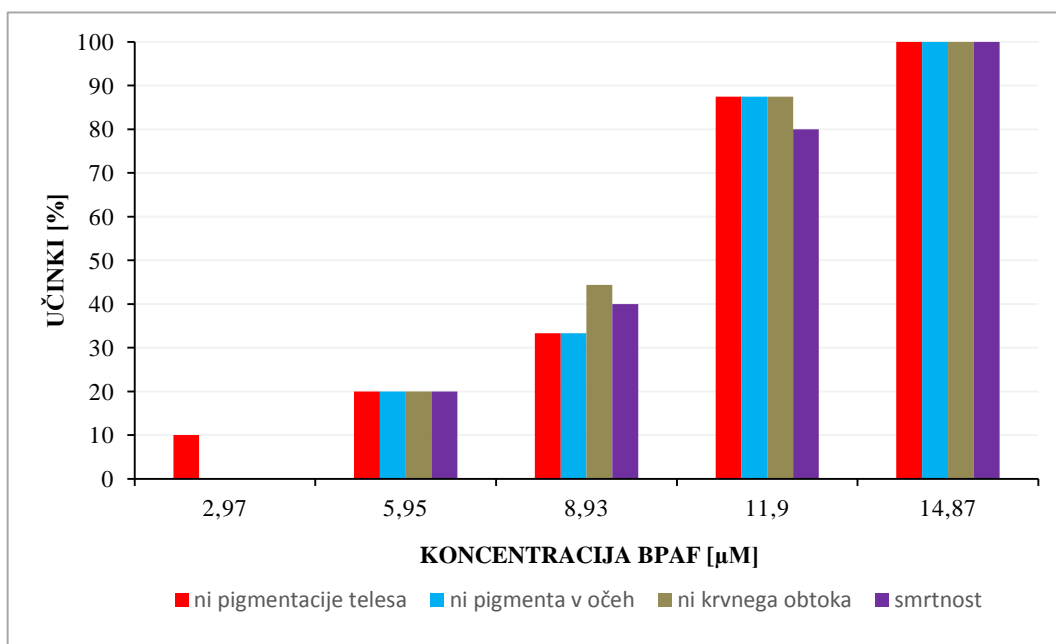
### **4.3 BISFENOL AF**

#### **4.3.1 Strupenost bisfenola AF za zarodke rib zebric (*Danio rerio*)**

Bisfenol AF je drugi analog BPA, s katerim smo želeli z opisanimi metodami dela ugotoviti vpliv na izbrane organizme in njegovo morebitno strupenost primerjati z rezultati, do katerih smo prišli pri prejšnjih dveh endokrinih motilcih. V primerjavi z BPA je BPAF fluorirana organska spojina, ki ima v svoji strukturi namesto dveh metilnih skupin trifluorometilni skupini. Pri ugotavljanju strupenosti za testirane organizme nas je zanimalo predvsem dejstvo, kakšen vpliv ima prisotnost halogenih atomov v molekuli spojine in ali je strupenost zaradi tega bolj izražena. Tudi pri BPAF smo najprej spremljali razvoj zarodkov ob izpostavitvi različnim vzorcem določenih koncentracij in vse opažene znake kasneje predstavili v obliki stolpčnih diagramov. S pomočjo preliminarnih testov, kjer smo izbrali interval koncentracij do 44,61  $\mu\text{M}$ , smo ugotovili, da bomo morali za določitev subletalnih učinkov uporabiti nižje koncentracije kot pri BPA oz. BPF. Dva najbolj občutljiva subletalna znaka, ki smo ju opazili po 48 h, sta bila pigmentacija telesa in oči, saj smo odsotnost črnih lis po telesu zaznali že pri najnižji izbrani koncentraciji (2,97  $\mu\text{M}$ ) in sicer pri 10 % zarodkov. Pri tej koncentraciji so imeli vsi zarodki normalno pigmentirane oči, odsotnost pigmenta v očeh se je prvič pojavila pri koncentraciji 5,95  $\mu\text{M}$  (20 % zarodkov). 100 % nepigmentiranost tako telesa kot tudi oči pa smo dosegli pri koncentraciji 14,87  $\mu\text{M}$ . S pomočjo programa Probit analiza smo na osnovi dobljenih rezultatov v obliki odstotka nepigmentiranih zarodkov izračunali tudi 48 h  $\text{EC}_{50}$ , ki za odsotnost pigmenta po telesu znaša 8,81  $\mu\text{M}$ , za nepigmentiranost oči pa 9,19  $\mu\text{M}$ . Pri testu strupenosti smo opazili tudi vpliv različnih koncentracij BPAF na cirkulacijo krvi. Pri najnižji testirani koncentraciji (2,97  $\mu\text{M}$ ) pri zarodkih nismo zaznali sprememb v krvnem obtoku, saj je bila njihova cirkulacija primerljiva s tisto, ki so jo imeli zarodki izpostavljeni razredčevalni vodi (kontrola). 20 % zarodkov ni imelo krvnega obtoka v vzorcu s koncentracijo 5,95  $\mu\text{M}$ , 100 % odsotnost cirkulacije krvi pa smo opazili pri koncentraciji 14,87  $\mu\text{M}$ . Izračunan 48 h  $\text{EC}_{50}$  znaša 8,54  $\mu\text{M}$ . Poleg subletalnih znakov smo po 48 h

opazovali tudi smrtnost zarodkov v odvisnosti od izbranih koncentracij BPAF. Med vzroki, ki so pripeljali do letalnega učinka, je prevladovala koagulacija, medtem ko je bila odsotnost srčnega utripa na drugem mestu. V vzorcih s koncentracijami nad 8,92  $\mu\text{M}$  pa smo opazili, da so bili somiti pri nekaterih zarodkih slabše razviti oz. bolj raztreseni vzdolž hrbtenice kot pri zarodkih v kontroli, kjer so bili le-ti enakomerno razporejeni. Pri najnižji izbrani koncentraciji (2,97  $\mu\text{M}$ ) so preživelii vsi zarodki rib zebrič (*Danio rerio*), že pri koncentraciji 5,95  $\mu\text{M}$  pa je bila smrtnost 20 %. Vsi zarodki so bili mrtvi ob izpostavitvi vzorcu s koncentracijo 14,87  $\mu\text{M}$ , medtem ko smo 50 % smrtnost po 48 urni izpostavitvi dosegli pri koncentraciji 8,97  $\mu\text{M}$ , kar pa je v primerjavi z rezultati, do katerih smo prišli pri testiranju strupenosti BPA, precej nižje.

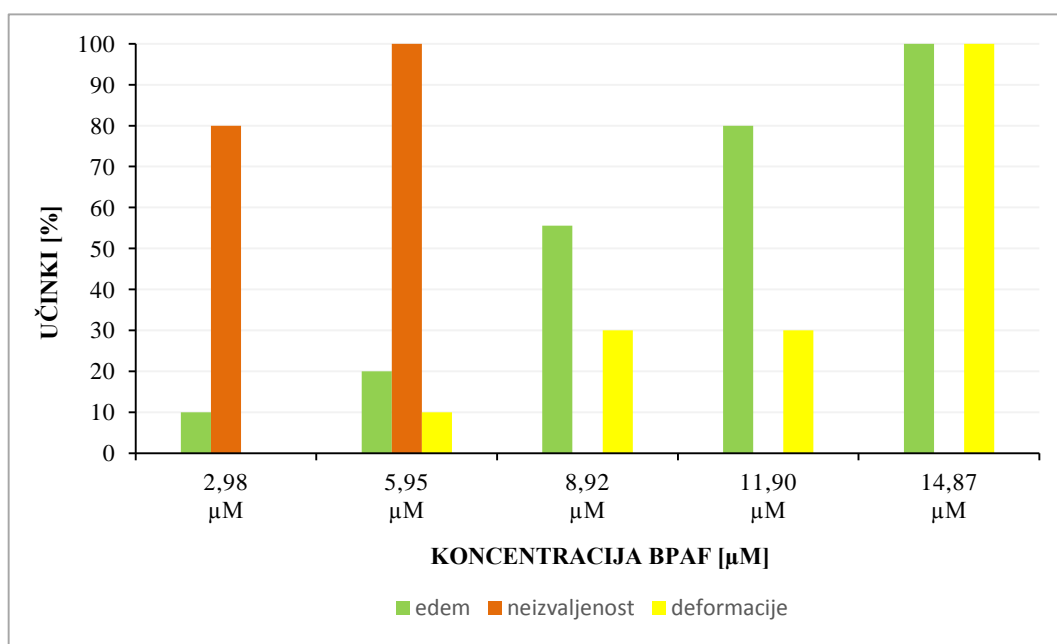
Po vzoru prejšnjih dveh endokrinih motilcev smo tudi pri BPAF v obliki stolpčnega diagrama prikazali opažene subletalne in letalne razvojne spremembe (v %) pri zarodkih po 48 h inkubacije v vzorcih z izbranimi koncentracijami BPAF (slika 26).



Slika 26: V obliki stolpcev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebrič (*Danio rerio*) po 48 urni izpostavitvi BPAF

Nekatere subletalne in teratogene znake pa smo opazili šele po 72 h inkubacije oz. so se tedaj bolj izrazito pokazali. Mednje spadajo edemi, izvalitev in številne deformacije, ki smo jih v obliki deležev (v %) prikazali v spodnjem diagramu (slika 27). Prisotnost edemov smo opazili že pri najnižji testirani koncentraciji (2,97  $\mu\text{M}$ ) in sicer pri 10 % zarodkov, izračunan 72 h  $\text{EC}_{50}$  pa znaša 8,29  $\mu\text{M}$ . V vzorcu s koncentracijo 14,87  $\mu\text{M}$  pa so bili edemi prisotni pri vseh izpostavljenih zarodkih. Poleg edemov smo po 3 dneh

spremljali tudi izvalitev zarodkov in rezultate podali kot delež neizvalitve. Pri koncentraciji 2,97  $\mu\text{M}$  smo imeli opravka z visokim številom neizvaljenih zarodkov, saj je znašal delež neizvalitve 80 %, v raztopini BPAF s koncentracijo 5,95  $\mu\text{M}$  pa se nobeden od izpostavljenih 10 zarodkov ni izvalil. Glede na to, da je bil delež neizvalitve po 72 h že pri nižjih koncentracijah zelo visok, smo se odločili, da bomo podali tudi število neizvaljenih zarodkov po 96 h inkubacije in ugotovili, da je pri nekaterih zarodkih prišlo do valjenja šele po 4 dneh opazovanja. Pri koncentraciji 2,97  $\mu\text{M}$  je bil namreč delež neizvalitve 30 %, 100 % neizvalitev pa smo dosegli pri koncentraciji 11,90  $\mu\text{M}$ . Deformacije so se pri zarodkih začele pojavljati pri koncentraciji 5,95  $\mu\text{M}$  in njihovo število se je z višanjem koncentracij BPAF samo povečevalo. Najpogosteje je prišlo do sprememb v razvoju glave, ki je bila v primerjavi s kontrolo precej manjša in čudno oblikovana, poleg tega pa smo pri nekaterih zarodkih po 24 h opazili, da oči še niso bile razvite. Med deformacije, ki smo jih zaznali pri zarodkih rib, smo uvrstili tudi nepravilnosti v razvoju repa, hrbtenice (nenormalno razvita hrbtna struna) in rumenjaka. Z izbranimi intervali koncentracij nismo mogli določiti koncentracije, ki bi bila za organizem nestrupena, zato menimo, da bi bilo v nadaljnjih študijah smiselno preizkusiti učinke na organizme pri nižjih koncentracijah BPAF. V preglednici VI so izračunane 48 h oz. 72 h  $\text{EC}_{10}$ ,  $\text{EC}_{50}$  in  $\text{EC}_{90}$  vrednosti za opažene subletalne in letalne učinke pri zebrih ob izpostavitvi BPAF, medtem ko so v tabeli X v prilogi D predstavljene razvojne spremembe pri desetih zarodkih ob izpostavitvi vzorcu s koncentracijo 11,90  $\mu\text{M}$  BPAF.



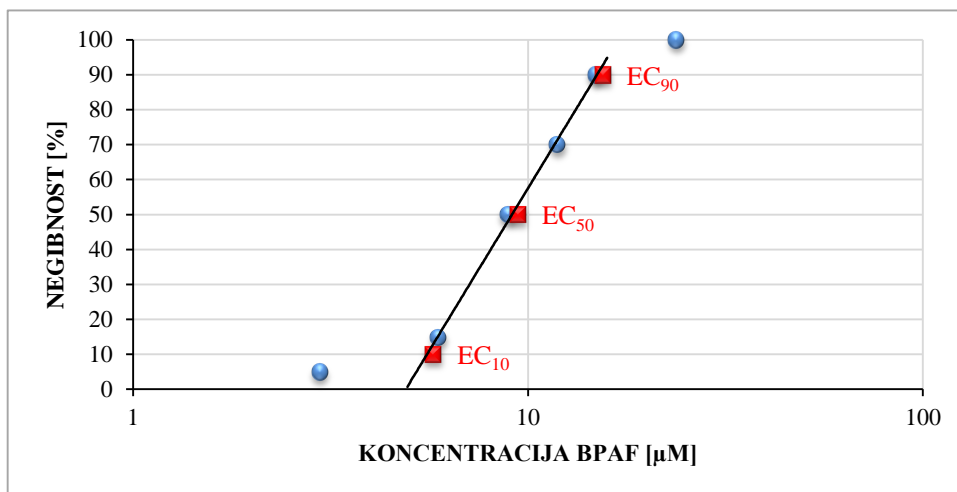
Slika 27: V obliki stolpcjev prikazani deleži opaženih subletalnih in letalnih učinkov na zarodke rib zebrih (*Danio rerio*) po 72 urni izpostavitvi BPAF

Preglednica VI: Izračunane 48 h oz. 72 h EC<sub>10</sub>, EC<sub>50</sub> in EC<sub>90</sub> vrednosti za posamezne subletalne in letalne učinke pri zebrih ob izpostavitvi BPAF

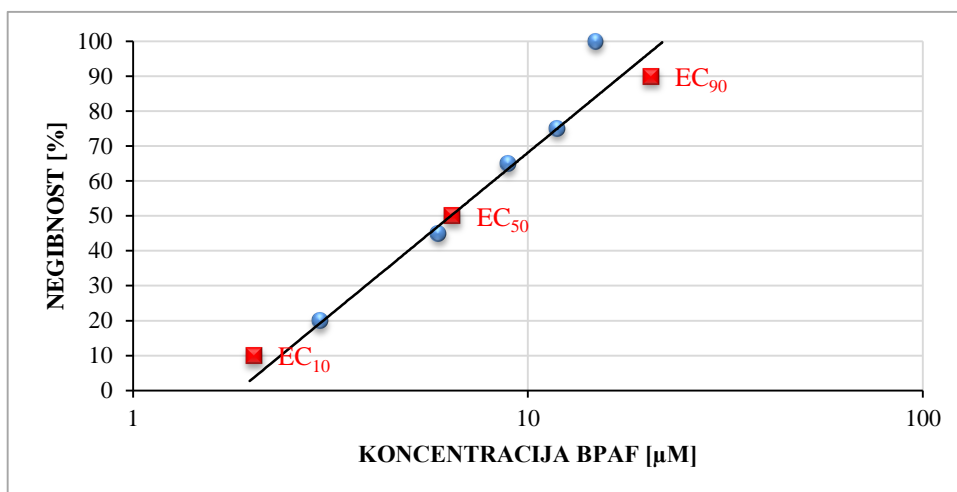
	<b>BISFENOL AF</b>		
<b>OPAŽENI SUBLETALNI UČINKI</b>	<b>EC<sub>10</sub> [μM]</b>	<b>EC<sub>50</sub> [μM]</b>	<b>EC<sub>90</sub> [μM]</b>
Nepigmentacija telesa	3,82	8,81	20,34
Nepigmentacija oči	5,67	9,19	12,72
Ni krvnega obtoka	5,30	8,54	13,75
Prisotnost edemov	3,57	8,29	19,26
Neizvalitev	/*	/*	/*
<b>OPAŽENI LETALNI UČINKI</b>			
Smrtnost	5,22	8,97	15,42

#### 4.3.2 Strupenost bisfenola AF za vodne bolhe (*Daphnia magna*)

Z akutnim testom strupenosti smo želeli ugotoviti še vpliv drugega analoga BPA na gibljivost vodnih bolh v petrijevkah in kasneje s pomočjo vseh dobljenih rezultatov določiti, katera izmed treh snovi je najbolj strupena za testirane organizme. Kot pri testu z zarodki rib zebrih smo morali tudi pri vodnih bolhah za določitev učinkov uporabiti nižje koncentracije kot pri BPA oz. BPF. Delež negibnosti se je z višanjem koncentracij sorazmerno povečeval in kot vidimo na spodnjih grafih, smo 100 % negibnost vodnih bolh po 24 h in 48 h dosegli mnogo prej oz. pri nižji koncentraciji kot pri BPA oz. BPF. Po 24 h smo izračunali EC<sub>50</sub>, ki znaša 9,45 μM, poleg tega pa smo na grafu deleža negibnih vodnih bolh v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF označili tudi EC<sub>10</sub> (5,76 μM) in EC<sub>90</sub> (15,49 μM) (slika 28). Vse vodne bolhe pa so bile negibne v vzorcu s koncentracijo 23,80 μM. Gibljivost vodnih bolh smo spremljali tudi po 48 h izpostavitve in kot pri BPA oz. BPF ugotovili večjo smrtnost oz. negibnost v primerjavi z rezultati po 24 h inkubacije. Pri koncentraciji 2,97 μM, kjer smo po 24 h dosegli 5 % negibnost, smo po 48 h zaznali negibnost pri štirih od 20 izpostavljenih vodnih bolh, kar pomeni, da delež negibnosti s časom izpostavljenosti narašča, saj je bil po 48 h pri omenjeni koncentraciji 4 krat večji. Izračunan 48 h EC<sub>50</sub> znaša 6,45 μM, hkrati pa smo določili tudi EC<sub>10</sub> (2,03 μM) in EC<sub>90</sub> (20,53 μM), kar smo grafično prikazali na spodnji krivulji (slika 29). V tabelah XI in XII v prilogi D so predstavljena števila in deleži negibnih vodnih bolh po 24 urni oz. 48 urni izpostavitvi različnim koncentracijah BPAF.



Slika 28: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 24 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF

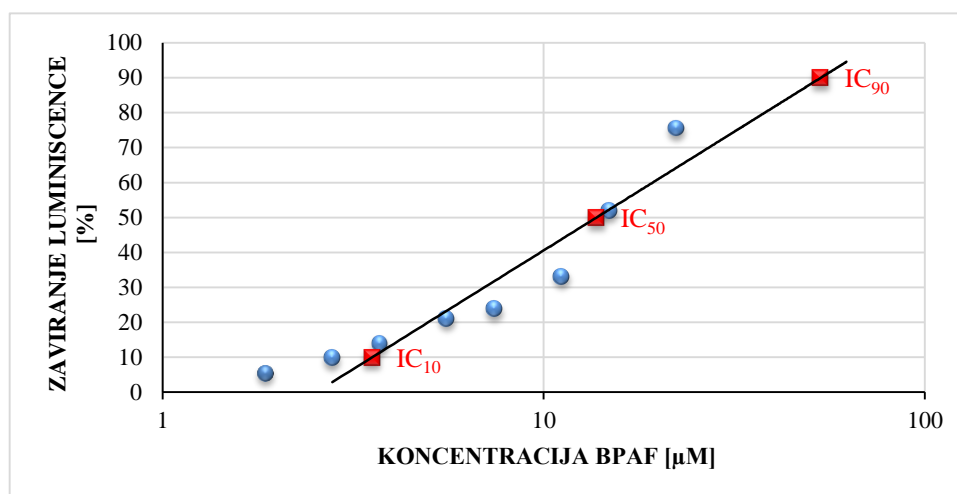


Slika 29: Deleži negibnih vodnih bolh (*Daphnia magna*) po 48 h v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF

#### 4.3.3 Strupenost bisfenola AF za luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*

Bisfenol AF je bil zadnji hormonski motilec, katerega smo uporabili za akutni toksični test, s katerim smo želeli dobiti informacije o sami strupenosti BPAF za luminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri*. Na spodnjem grafu in v tabeli XIII v prilogi D lahko vidimo, da delež zaviranja luminiscence z višanjem koncentracij BPAF sorazmerno narašča, čeprav lahko opazimo večja odstopanja od logaritemske trendne črte kot pri BPA oz. BPF (slika 30). V vzorcu z najnižjo testirano koncentracijo 1,86 µM je prišlo do 5,5 % zaviranja luminiscence, pri koncentraciji 2,79 µM smo dosegli 9,9 % zaviranje in ob izpostavitvi vzorcu s koncentracijo 3,72 µM 14,0 %. Test akutne strupenosti za luminiscenčne bakterije

je pokazal 75,6 % zaviranje pri najvišji testirani koncentraciji (22,31  $\mu\text{M}$ ). S pomočjo linearne regresije smo izračunali 30 min  $\text{IC}_{50}$ , ki znaša 13,76  $\mu\text{M}$ , po vzoru ostalih dveh endokrinih motilcev smo na grafu označili tudi vrednosti, ki sta povzročili 10 % ( $\text{IC}_{10} = 3,55 \mu\text{M}$ ) oz. 90 % ( $\text{IC}_{90} = 53,35 \mu\text{M}$ ) zaviranje naravne emisije svetlobe.



Slika 30: Deleži zaviranja luminescence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min v odvisnosti od različnih koncentracij BPAF

#### 4.3.4 Odziv testnih organizmov na strupenost BPAF

Odgovor testnih organizmov na strupenost BPAF smo primerjali s pomočjo izračunanih LC, EC in IC vrednosti, ki so predstavljene v spodnji tabeli (preglednica VII). Za 48 h  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{EC}_{50}$  in 30 min  $\text{IC}_{50}$  vrednosti smo podali tudi 95 % interval zaupanja (tabela XVI v prilogi E).

Preglednica VII: Primerjava izračunanih 48 h, 72 h oz. 30 min LC / EC / IC vrednosti vpliva BPAF na testne organizme

	ORGANIZMI			
	Ribe zebrice ( <i>Danio rerio</i> )		Vodne bolhe ( <i>Daphnia magna</i> )	Bakterije ( <i>Vibrio fischeri</i> )
Čas izpostavitve	48 h LC	72 h EC	48 h EC	30 min IC
<b>VREDNOSTI [<math>\mu\text{M}</math>]</b>				
$\text{LC}_{10} / \text{EC}_{10} / \text{IC}_{10}$	5,22	/*	2,03	3,55
$\text{LC}_{50} / \text{EC}_{50} / \text{IC}_{50}$	8,97	/*	6,45	13,76
<b>95 % interval zaupanja</b>	7,93 – 10,02	/*	6,01 – 6,89	12,79 – 14,73
$\text{LC}_{90} / \text{EC}_{90} / \text{IC}_{90}$	15,42	/*	20,53	53,35

V preglednici VII lahko vidimo, da smo za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*) lahko izračunali LC<sub>50</sub>, ki se navezuje na smrtnost zarodkov po 48 h, vendar zaradi pomanjkanja podatkov nismo mogli prikazati 72 h EC vrednosti, ki so vezane na najbolj občutljiv subletalni znak (neizvalitev zarodkov), katerega smo opazili ob izpostavitvi zarodkov BPAF. Že pri najnižji testirani koncentraciji 2,97 µM je namreč po 72 h neizvaljenost zarodkov dosegla 80 %, kar kaže na visoko občutljivost omenjenih organizmov na BPAF. Za lažjo primerjavo odzivov organizmov na strupenost BPAF, bi morali pri zarodkih rib zebrič poseči po nižjih koncentracijah, vendar lahko na osnovi visokega % neizvalitve pri najnižjih izbranih koncentracijah BPAF rečemo, da se je testni sistem z zarodki rib zebrič izkazal kot najbolj občutljiv. V primerjavi z zarodki rib zebrič smo pri delu z vodnimi bolhami opazili manjši vpliv strupenosti izbranih koncentracij BPAF, saj znaša 48 h EC<sub>50</sub> 6,45 µM. Najšibkejši vpliv strupenosti vzorcev BPAF pa smo ugotovili pri akutnem testu z luminiscenčnimi bakterijami, saj znaša 30 min IC<sub>50</sub> 13,76 µM. S pomočjo izračunanih vrednosti lahko zanesljivo trdimo, da se je testni sistem z bakterijami *Vibrio fischeri* izkazal kot najmanj občutljiv.

#### **4.4 PRIMERJAVA STRUPENOSTI BISFENOLOV A, F in AF ZA TESTNE ORGANIZME**

V tem poglavju se bomo nekoliko bolj posvetili sami primerjavi strupenosti bisfenolov A, F in AF za zarodke rib zebrič (*Danio rerio*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in bakterije *Vibrio fischeri*. S pomočjo tega bomo dobili širši vpogled v to, katera izmed testiranih substanc je povzročila največ sprememb v razvoju, gibanju in samem obnašanju organizmov, ter pri kateri je bil vpliv strupenosti najmanj izražen. Pri akutnem testu, ki smo ga izvedli z zarodki rib zebrič, smo primerjali strupenost testiranih substanc na osnovi opaženih subletalnih, letalnih in teratogenih razvojnih sprememb ter določenih LC in EC vrednosti. Zanesljivo lahko potrdimo, da je bil pri BPAF vpliv strupenosti na razvoj zarodkov najbolj izrazit, saj so se razvojni učinki na organizme pokazali pri bistveno nižjih koncentracijah kot pri BPA in BPF. Pri večini subletalnih znakov (krvni obtok, prisotnost edemov in izvalitev) smo opazili, da je bila strupenost BPAF v primerjavi z ostalima spojinama precej večja, saj smo EC<sub>50</sub> vrednosti za prej omenjene razvojne spremembe dosegli pri koncentracijah, ki so bile nižje od 10 µM. V primerjavi z BPAF smo namreč pri BPA in BPF določili 50 % učinke pri višjih koncentracijah (~ 50 µM, izjema je samo 50 % neizvalitev, ki smo jo pri BPA dosegli pri koncentraciji 17.81 µM, pri BPF pa pri 38,92

$\mu\text{M}$ ). Glede pigmentacije telesa in oči, ki sta bila pri BPA in BPF določena kot najbolj občutljiva subletalna znaka, pa se je izkazalo, da je bila nepigmentiranost najbolj očitna pri izpostavitvi zarodkov vzorcem, ki so vsebovali BPF, saj so bili vsi zarodki popolnoma nepigmentirani že pri koncentraciji  $9,99 \mu\text{M}$ . Pri letalnih znakih (smrtnost) pa se je BPAF zopet izkazal kot najbolj strupen ( $\text{LC}_{50} = 8,97 \mu\text{M}$ ), sledil mu je BPA ( $\text{LC}_{50} = 66,58 \mu\text{M}$ ), medtem ko pri BPF  $\text{LC}_{50}$  vrednosti sploh nismo mogli izračunati, saj so se šele pri najvišji testirani koncentraciji ( $99,89 \mu\text{M}$ ) začeli pojavljati mrtvi zarodki (preglednice II, IV in VI). Iz tega lahko sklepamo, da ima BPF precej manjši vpliv na število mrtvih zarodkov kot ostala dva endokrina motilca, vendar je bil pri pigmentaciji njegov učinek najbolj izrazit. Teratogene razvojne spremembe (deformacije glave, repa, hrbtenice) so se najprej pojavile pri zarodkih, ki so bili izpostavljeni pripravljenim raztopinam BPAF (prvi znaki so bili prisotni že pri koncentraciji  $5,95 \mu\text{M}$ ), na drugo mesto glede strupenosti smo uvrstili BPF (prvi znaki so se začeli pojavljati pri koncentraciji  $49,95 \mu\text{M}$ ), najkasneje pa smo teratogene znake opazili ob izpostavitvi zarodkov BPA (pojav prvih znakov pri koncentraciji  $61,33 \mu\text{M}$ ).  $\text{EC}_{50}$  vrednosti pa nismo mogli izračunati zaradi premajhnega števila podatkov.

Poleg spremljanja razvoja zarodkov rib zebrič, smo primerjali tudi učinke bisfenolov na gibljivost vodnih bolh. Na osnovi izračunanih 48 h  $\text{EC}_{50}$  vrednosti lahko trdimo, da se je BPAF tudi pri akutnem testu strupenosti z vodnimi bolhami izkazal kot najbolj strupen od testiranih spojin, saj smo 50 % negibnosti dosegli pri koncentraciji  $6,45 \mu\text{M}$ . Na drugo mesto smo uvrstili BPA ( $\text{EC}_{50} = 34,25 \mu\text{M}$ ), najmanjši vpliv strupenosti pri izvedbi testiranja pa smo ugotovili pri BPF, kjer znaša  $\text{EC}_{50}$   $45,87 \mu\text{M}$  (preglednice III, V in VII). Poleg tega je pri BPF delež negibnih vodnih bolh naraščal počasneje kot pri BPA, kar lahko vidimo tudi po naklonu trendne črte na grafih deleža negibnosti v odvisnosti od koncentracije določene spojine (slika 19 in 24). Na manjšo strupenost kaže tudi dejstvo, da smo pri BPA in BPAF z izbranim intervalom koncentracij dosegli 100 % negibnost, pri BPF pa je bila pri najvišji koncentraciji negibnost 75 %.

Primerjavo strupenosti izbranih bisfenolov smo izvedli tudi pri akutnem testu z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*. Medtem ko smo pri zarodkih rib zebrič in vodnih bolhah na osnovi dobljenih rezultatov zlahka določili najbolj oz. najmanj strupeno spojino, pa pri bakterijah izračunane  $\text{IC}_{50}$  vrednosti v zgornjih tabelah nakazujejo na podobno strupenost treh testiranih hormonskih motilcev. Na osnovi teh izračunov lahko vidimo, da ni bistvene razlike v sami strupenosti med BPA in BPAF, saj znaša  $\text{IC}_{50}$  za BPA



13,63  $\mu\text{M}$ , za BPAF pa 13,76  $\mu\text{M}$ . Nekoliko večjo strupenost smo opazili pri izvedbi poskusov z BPF, kjer smo 50 % zaviranje luminiscence dosegli pri koncentraciji 12,15  $\mu\text{M}$  (preglednice III, V in VII).

Na osnovi napisanega lahko zaključimo, da je bil vpliv strupenosti BPAF na zarodke rib zebrič in vodne bolhe precej večji kot pri ostalih dveh hormonskih motilcih, medtem ko so pri luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* BPA, BPF in BPAF izkazovali podobno strupenost. Vzrok za večjo strupenost BPAF v primerjavi z BPA in BPF lahko iščemo v sami strukturi omenjene substance. Vključitev fluorovih atomov v molekulo spojine lahko namreč spremeni številne sterične, elektronske in lipofilne parametre in posledično vpliva na farmakokinetiko in farmakodinamiko določene spojine. Poleg tega so C-F vezi (116 kcal/mol) močnejše kot C-H (99 kcal/mol) vezi, kar zagotavlja večjo oksidativno in toplotno stabilnost spojin s C-F skupinami, poleg tega pa imajo fluorove komponente sposobnost podaljšanja biološke razpolovne dobe in posledično potencial za izboljšanje presnovne stabilnosti molekul. Fluorovi atomi povzročijo povečanje lipofilnosti, saj je  $\text{CF}_3$  skupina, ki jo najdemo v strukturi BPAF, ena izmed najbolj lipofilnih skupin. Povečanje lipofilnosti vodi do izboljšanja pasivne difuzije spojin preko membran, kar vpliva na večjo biorazpoložljivost in kopičenje snovi v organizmih (48). To v večini primerov pomeni tudi več negativnih učinkov takšnih spojin na organizme. Na osnovi te razlage in naših spoznanj lahko zaključimo, da je verjetno bisfenol AF pri vodnih bolhah in ribah zebričah lažje in hitreje prehajal v organizem kot pri luminiscenčnih bakterijah in posledično povzročil več strupenih učinkov. Moramo pa poudariti, da so testi akutne strupenosti, ki jih izvajamo v laboratorijih zelo pomembni, saj ponazarjajo realne pogoje, v katerih živijo prostoživeči proučevani organizmi, vendar je kljub temu težko predpostaviti odziv organizmov v naravi na okoljsko prisotne koncentracije hormonskih motilcev, saj so le-te v primerjavi z uporabljenimi v laboratorijskih raziskavah precej nižje (BPA, BPF in BPAF prisotni v okolju v  $\mu\text{g/L}$  oz.  $\text{ng/L}$ ; npr. okoljske koncentracije BPA (površinske vode, sediment) znašajo okoli 12  $\mu\text{g/L}$  ali manj, izjema so izcedne vode, kjer so zaznali koncentracije tudi do 17  $\text{mg/L}$ ), poleg tega pa spojin v naravi skoraj ne najdemo v čisti obliki, saj so večinoma prisotne kot zmesi različnih snovi, kar še dodatno otežuje ocenjevanje vpliva strupenosti (4).

## 5 SKLEP

Izpostavljenost zarodkov rib zebrič (*Danio rerio*), vodnih bolh (*Daphnia magna*) in luminiscenčnih bakterij *Vibrio fischeri* izbranim koncentracijam motilcev endokrinega sistema (BPA, BPF in BPAF) je povzročila številne spremembe v razvoju in obnašanju testnih organizmov. S pomočjo akutnih testov strupenosti smo spremljali pojav različnih subletalnih (pigmentacija telesa in oči, krvni obtok, izvalitev, prisotnost edemov), letalnih (koaguliranost, odsotnost ločenega repa od rumenjaka) in teratogenih (deformacije glave, repa in srca) učinkov na zarodke rib zebrič, ugotavljali delež negibnih vodnih bolh ter merili zaviranje naravne emisije svetlobe luminiscenčnih bakterij *Vibrio fischeri*. Rezultati kažejo, da so vse tri testirane substance izkazovale strupenost za izbrane organizme, vendar smo skušali s pomočjo izračunov in primerjave vrstno-specifičnih vplivov določiti organsko spojino, pri kateri je bila jakost izraženih učinkov največja oz. je bil vpliv strupenosti najbolj izražen. Pri testu z zarodki rib zebrič (*Danio rerio*) je bila pigmentacija telesa pri BPA in BPF najbolj občutljiv razvojni znak, največjo strupenost pri tem subletalnem znaku smo opazili pri delu z vzorci BPF, saj se je 100 % nepigmentiranost pojavila že pri najnižji izpostavljeni koncentraciji (9,99  $\mu\text{M}$ ). Pri ostalih subletalnih učinkih (krvni obtok, edemi, izvalitev) in glede smrtnosti lahko zanesljivo potrdimo največji vpliv strupenosti s strani BPAF, saj so izračunane  $\text{EC}_{50}$  in  $\text{LC}_{50}$  vrednosti nižje v primerjavi z rezultati pri BPA in BPF (preglednice II, IV in VI). Vodne bolhe (*Daphnia magna*) so bile najbolj občutljive na strupeni vpliv BPAF, saj znaša izračunan 48 h  $\text{EC}_{50}$  6,45  $\mu\text{M}$ , pri luminiscenčnih bakterijah pa smo ugotovili primerljivo strupenost BPA, BPF in BPAF. Na osnovi opaženih razvojnih sprememb in izračunov lahko tako hipotezo, da je BPAF zaradi prisotnih fluorovih atomov v strukturi bolj strupen od BPA in BPF, le delno potrdimo.

Kot smo že omenili v poglavju številka 4.4, kjer smo primerjali strupenost hormonskih motilcev, je BPA največjo strupenost pokazal pri akutnem testu z zebričami in bakterijami, BPF in BPAF pa zanesljivo pri ribah zebričah. Zanimivo pa je dejstvo, da sta imela tako BPA kot BPF najmanjši vpliv strupenosti na gibljivost vodnih bolh, medtem ko je BPAF najmanjšo strupenost pokazal pri testu z luminiscenčnimi bakterijami. S pomočjo teh ugotovitev lahko drugo postavljeno hipotezo, da pri vseh treh testnih organizmih strupenost pada v istem vrstnem redu (BPAF>BPA>BPF), zavrnamo.

Tretjo postavljeno domnevo, ki pravi, da z naraščanjem koncentracij spojin, ki so jim preučevani organizmi izpostavljeni, narašča tudi jakost učinkov, lahko zanesljivo potrdimo. Pri najvišjih testiranih koncentracijah vseh treh hormonskih motilcev (pri BPA in BPF nad 50  $\mu\text{M}$ , pri BPAF nad 10  $\mu\text{M}$ ) smo namreč pri ribah zebrih opazili več razvojnih nepravilnosti kot v vzorcih z nižjimi koncentracijami, pri vodnih bolhah se je z naraščanjem koncentracij delež negibnosti povečeval, pri bakterijah pa smo pri višjih koncentracijah (pri BPA in BPF nad 30  $\mu\text{M}$ , pri BPAF nad 10  $\mu\text{M}$ ) opazili večji odziv omenjenih mikroorganizmov in s tem močnejše zaviranje luminiscence.

Zadnjo postavljeno hipotezo, ki pravi, da so koncentracije izbranih hormonskih motilcev, ki so povzročile signifikantne učinke pri obravnavanih organizmih, prisotne tudi v okolju, lahko delno potrdimo. BPA in njegovi analogi so v okolju ponavadi prisotni pri precej nižjih koncentracijah (npr. BPA  $\leq 12 \mu\text{g/L}$ ), kot smo jih mi uporabili pri testih akutne strupenosti, vendar so številne študije pokazale, da so spojine lahko škodljive tudi pri takšnih koncentracijah. Kljub temu pa so v eni izmed študij ugotovili visoko vsebnost BPA v izcednih vodah iz komunalnih odlagališč in industrijskih odpadkov (npr. na Japonskem do 17,2 mg/L; v Severni Italiji pa celo 33,5 mg/L BPA), kar pa je dober približek koncentracijam, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju strupenosti (44). Treba pa je poudariti, da je večina toksikoloških študij izvedena na laboratorijskih živalih in to povečuje težavnost za natančno opredelitev odziva prostoživečih živali na okoljsko prisotne koncentracije BPA in njegovih analogov.

Zaključimo lahko, da so bili organizmi dobro odzivni na izbrane koncentracije hormonskih motilcev, največ težav pa smo imeli na začetku pri delu z zarodki rib zebrih, saj je v prostoru za inkubacijo temperatura ozračja in akvarija nihala, kar je močno vplivalo na samo brstenje, smrtnost, razvoj zarodkov in na delo v laboratoriju, saj teh zarodkov nismo mogli uporabiti za teste akutne strupenosti.

Dokazano je, da lahko pride do motenj endokrinega sistema pri prostoživečih živalih, večinoma pri vodnih vrstah, vendar je danes glavno vprašanje, pri katerih koncentracijah se zgodi motnja, kateri mehanizmi so vključeni in ali bo motnja v endokrinem sistemu vodila do ekološko pomembnih učinkov. Do sedaj je bilo objavljenih že veliko študij, ki so se ukvarjale z vprašanjem ali so snovi s sposobnostjo motnje endokrinega sistema v vretenčarjih aktivne tudi v nevretenčarskih organizmih in še danes je na tem področju veliko nejasnosti, vendar lahko na osnovi lastnih rezultatov trdimo, da so BPA, BPF in BPAF povzročili številne razvojne spremembe pri vretenčarjih, poleg tega pa se je pokazal

strupeni vpliv le teh tudi pri nevretenčarjih (vodne bolhe). Testi akutne strupenosti predstavljajo dober temelj za odkritje določenih učinkov endokrinih motilcev, saj omogočajo hiter in intenziven odgovor testnih organizmov, vendar se zavedamo, da bi bili za razumevanje in razlago mehanizmov, preko katerih pride do škodljivih učinkov snovi (motnje v razvoju, rasti, obnašanju, razmnoževanju) na organizme, potrebni širši vidiki testiranja v obliki kroničnih testov.

## 6 LITERATURA

- 1.) Swedenborg Elin, Rüegg Joëlle, Mäkelä Sari, Pongratz Ingemar: Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol* 2009; 43: 1-10
- 2.) National Institute of Environmental Health Science; Internetni vir: [http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine\\_disruptors\\_508.pdf](http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf) (datum dostopa: 8.9.2015)
- 3.) Segner Helmut: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comp Biochem Physiol* 2009; Part C 149: 187-195
- 4.) Flint Shelby, Markle Tricia, Thompson Sarah, Wallace Elizabeth: Bisphenol A exposure, effects and policy: A wildlife perspective. *J Environ Manag* 2012; 104: 19-34
- 5.) Diamanti-Kandarakis Evanthia, Bourguignon Jean-Pierre, Giudice C. Linda, Hauser Russ, Prins S. Gail, Soto M. Ana, Zoeller R. Thomas, Gore C. Andrea: Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Rev Endocr* 2009; 30: 293-342
- 6.) Michałowicz Jaromir: Bisphenol A-Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37: 738-758
- 7.) Teeguarden G. Justin, Hanson-Drury Sessa: A systematic review of Bisphenol A "low dose" studies in the context of human exposure: A case for establishing standards for reporting "low-dose" effects of chemicals. *Food Chem Toxicol* 2013; 62: 935-948
- 8.) World Health Organization ; INFOSAN; Internetni vir : [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf) (datum dostopa: 8.9.2015)
- 9.) Wetherill B. Yelena, Akingbemi T. Benson, Kanno Jun, McLachlan A. John, Nadal Angel, Sonnenschein Carlos, Watson S. Cheryl, Zoeller R. Thomas, Belcher M. Scott: In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 2007; 24: 178-198
- 10.) Bhandari K. Ramji, Deem L. Sharon, Holliday K. Dawn, Jandegian M. Caitlin, Kassotis D. Christopher, Nagel C. Susan, Tillitt E. Donald, Vom Saal S. Frederick, Rosenfeld S. Cheryl: Effects of the environmental estrogenic contaminants

- bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen Comp Endocrinol* 2014
- 11.) Rubin S. Beverly: Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127: 27-34
  - 12.) Suman K. Jana, Okamoto Takeshi, Kugita Tsuyoshi, Namba Seitaro: Selective synthesis of bisphenol F catalyzed by microporous H-beta zeolite. *Appl Catal A: General* 2005; 288: 80-85
  - 13.) Yang Jichun, Wang Xin, Zhang Danfeng, Wang Lingling, Li Qi, Zhang Lei: Simultaneous determination of endocrine disrupting compounds bisphenol F and bisphenol AF using carboxyl functionalized multi-walled carbon nanotubes modified electrode. *Tlnta* 2014; 130: 207-212
  - 14.) Cabaton Nicolas, Dumont Coralie, Severin Isabelle, Perdu Elisabeth, Zalko Daniel, Malki-Cherkaoui Mustapha, Chagnon Marie-Christine: Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicol* 2009; 255: 15-24
  - 15.) Cabaton Nicolas, Zalko Daniel, Rathahao Estelle, Canlet Cécile, Delous Georges, Chagnon Marie-Christine, Cravedi Jean-Pierre, Perdu Elisabeth: Biotransformation of bisphenol F by human and rat liver subcellular fractions. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1697-1704
  - 16.) Zhou Xiaoliu, Kramer P. Joshua, Calafat M. Antonia, Ye Xiaoyun: Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. *J Chromatogr B* 2014; 944: 152-156
  - 17.) Fromme Hermann, Kuchler Thomas, Otto Thomas, Pilz Konstanze, Müller Josef, Wenzel Andrea: Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res* 2002; 36: 1429-1438
  - 18.) Yang Yunjia, Yin Jie, Yang Yi, Zhou Naiyuan, Zhang Jing, Shao Bing, Wu Yongning: 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: 93-97
  - 19.) Feng Yixing, Yin Jie, Jiao Zhihao, Shi Jiachen, Li Ming, Shao Bing: Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol Lett* 2012; 211: 201-209

- 20.) Steele L. Shelby, Prykhozhiy V. Sergey, Berman N. Jason: Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases. *Transl Res* 2014; 163: 79-98
- 21.) Nagel Roland: DarT: The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* - a General Model in Ecotoxicology and Toxicology. *Alt* 19 2002; 38-48
- 22.) ZF - Health; Internetni vir: <http://zf-health.org/information/factsheet.html> (datum dostopa: 8.9.2015)
- 23.) International Organization for Standardization- ISO 15088. Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*), 2007, strani od 1 do 12
- 24.) Lammer E., Carr G.J., Wendler K., Rawlings J.M., Belanger S.E., Braunbeck Th.: Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp Biochem Physiol, Part C* 2009; 149: 196-209
- 25.) Brennan J. Sarah, Brougham A. Concepta, Roche J. James, Fogarty M. Andrew: Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2006; 64: 49-55
- 26.) Animal Diversity Web; Internetni vir: [http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/) (datum dostopa: 8.9.2015)
- 27.) Zoologisches Institut – Evolutionary Biology; The Ebert Group; Internetni vir: <http://www.evolution.unibas.ch/ebert/publications/parasitismdaphnia/ch2f3.htm> (datum dostopa: 8.9.2015)
- 28.) Shaw R. Joseph, Pfrender E. Michael, Eads D. Brian, Klaper Rebecca, Callaghan Amanda, Sibly M. Richard, Colson Isabelle, Jansen Bastiaan, Gilbert Donald, Colbourne K. John: *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. *Adv Exp Biol* 2008; 02: 165-219
- 29.) Qu R.-J., Wang X.-H., Feng M.-B., Li Y., Liu H.-X., Wang L.-S., Wang Z.-Y.: The toxicity of cadmium to three aquatic organisms (*Photobacterium phosphoreum*, *Daphna magna* and *Carassius auratus*) under different pH levels. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; 95: 83-90
- 30.) Seda Jaromir, Petrussek Adam: *Daphnia* as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *Special Insert* 2011; 70(2): 337-344

- 31.) Clubbs L. Rebekah, Brooks W. Bryan: *Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study. *Ecotoxicol Environ Saf* 2007; 67: 385-398
- 32.) MicrobeWiki; Internetni vir:  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri\\_NEU2011](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri_NEU2011) (8.9.2015)
- 33.) BacMap: An Interactive Atlas for Exploring Bacterial Genoms; Internetni vir:  
[http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC\\_006840&ref=index\\_21.html](http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/cgi/getSpeciesCard.cgi?accession=NC_006840&ref=index_21.html) (datum dostopa: 8.9.2015)
- 34.) MicrobeWiki: Internetni vir:  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri) (datum dostopa: 8.9.2015)
- 35.) Ma Y. Xiaoyan, Wang C. Xiaochang, Ngo Hao Huu, Guo Wenshan, Wu N. Maoni, Wang Na: Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Sci Total Environ* 2014; 468-469: 1-11
- 36.) Menz J., Schneider M., Kümmerer K.: Toxicity testing with luminescent bacteria- Characterization of an automated method for the combined assessment of acute and chronic effects. *Chemosphere* 2013; 93: 990-996
- 37.) Costa P.F. Susana, Pinto C.A.G. Paula, Lapa A.S. Rui, M.F.S. Saraiva M. Lúcia: Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative fully automated methodology. *J Hazard Mater* 2015; 284: 136-142
- 38.) Kimmel B. Charles, Ballard W. William, Kimmel R. Seth, Ullmann Bonnie in Schilling F. Thomas: Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203: 253-310
- 39.) International Organization for Standardization- ISO 6341. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test, 2012, strani od 1 do 22
- 40.) International Organization for Standardization- ISO 11348-2. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria, 2007, strani od 1 do 21
- 41.) Plahuta Maja, Tišler Tatjana, Toman Jožef Mihael, Pintar Albin: Efficiency of advanced oxidation processes in lowering bisphenol A toxicity and oestrogenic activity in aqueous samples. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014; 65: 77-87



- 42.) Duan Zhenghua, Zhu Lin, Zhu Lingyan, Yao Kun, Zhu Xiaoshan: Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 71: 774-780
- 43.) Saili S. Katherine, Corvi M. Margaret, Weber N. Daniel, Patel U. Ami, Das R. Siba, Przybyla Jennifer, Anderson A. Kim, Tanguay L. Robert: Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicol* 2012; 291: 83-92
- 44.) Jemec Anita, Tišler Tatjana, Erjavec Boštjan, Pintar Albin: Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 86: 213-218
- 45.) Chen Min-Yu, Ike Michihiko, Fujita Masanori: Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environ Toxicol* 2002; 17: 80-86
- 46.) Mu Xueyan, Rider V. Cynthia, Hwang Soo Gap, Hoy Heather, LeBlanc A. Gerald: Covert signal disruption: Anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24: 146-152
- 47.) Hirano Masashi, Ishibashi Hiroshi, Matsumura Naomi, Nagao Yukiko, Watanabe Naoko, Watanabe Akiko, Onikura Norio, Kishi Katsuyuki, Arizono Koji: Acute toxicity responses of two Crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *J Health Sci* 2004; 50(1): 97-100
- 48.) Khetan K. Sushil, Collins J. Terrence: Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chem Rev* 2007; 107: 2319-2364

## 7 PRILOGE

### Priloga A: Načini delovanja proučevanih bisfenolov

Tabela I: Učinki bisfenolov A, F in AF (6,10,11,15,16,18,19)

TESTIRANE SPOJINE	UČINKI
<b>BPA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ kombinirana agonistična/antagonistična aktivnost (antagonistično delovanje na aktivnost estrogena v možganih in maternici)</li> <li>➤ sposobnost vezave na klasične in neklasične membranske estrogenske receptorje, na receptorje povezane z G-proteinom, na androgeni receptor, arilni OH receptor, na PPAR</li> <li>➤ sposobnost motnje endokrinega sistema, hipometilacije DNA, oksidativno in možnost mutagenega delovanja; posledica so večsmerni toksični učinki pri živalih in verjetno tudi pri ljudeh</li> <li>➤ sposobnost motnje delovanja številnih hormonov, kot so: spolni hormoni, leptin, inzulin in tiroksin; posledica so hepatotoksični in imunotoksični učinki</li> </ul>
<b>BPF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ agonistični učinki na estrogen</li> <li>➤ izraža rahlo do zmerno akutno strupenost in šibko estrogenost</li> </ul>
<b>BPAF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ na estrogenski receptor <math>\alpha</math> (ER<math>\alpha</math>) se veže s pribl. 20 x večjo jakostjo kot BPA, na estrogenski receptor <math>\beta</math> (ER<math>\beta</math>) pa skoraj s 50 x večjo jakostjo kot BPA</li> <li>➤ motnja endokrinega sistema preko vezave na jedrne steroidne receptorje (ER<math>\alpha</math>, ER<math>\beta</math> in androgeni receptor)</li> <li>➤ visoka estrogenska (zaradi fluorovih atomov) in antiandrogena aktivnost</li> </ul>

## Priloga B: Rezultati akutnih testov strupenosti BPA za izbrane testne organizme

Tabela II: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*) v vzorcu s koncentracijo 70,09 µM BPA

SUBLETALNI ZNAKI	ŠTEVILO ZARODKOV									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Razvoj oči	✓	✗	✓	✓		✓				
Spontano gibanje	✓	✓	✓	✓		✗				
Krvni obtok	✗	✗	✗	✗		✗				
Pigmentacija telesa	✗	✗	✗	✗		✗				
Pigmentacija oči	✗	✗	✗	✗		✗				
Deformacija rumenjake vreče	✗	✓	✗	✓		✓				
Prisotnost edemov-72 h	✓	✓	✓	✓		✓				
Izvalitev -72 h	✗	✗	✗	✗		✗				
<b>LETALNI ZNAKI</b>										
Koagulacija	✗	✗	✗	✗	✓	✗	✓	✓	✓	✓
Ločitev repa od rumenjaka	✓	✗	✓	✓		✓				
Razvoj somitov/vretenc	✓	✗	✓	✓		✓				
Srčni utrip	✓	✗	✓	✓		✓				
<b>TERATOGENI ZNAKI-72 h</b>										
Deformacije glave	✗		✗	✗						
Deformacije repa	✓		✓	✗						
Deformacije hrbtenice	✗		✓	✗						
Zastoj v rasti	✗		✗	✗						

Tabela III: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 24 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA

Koncentracija BPA [µM]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 24 h
26,28	0/20	0
30,66	2/20	10
35,04	5/20	25
39,42	8/20	40
43,80	14/20	70
65,71	18/20	90
87,61	20/20	100

Tabela IV: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 48 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA

Koncentracija BPA [ $\mu\text{M}$ ]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 48 h
24,09	0/20	0
26,28	2/20	10
30,66	6/20	30
35,04	13/20	65
39,42	14/20	70
43,80	19/20	95
65,71	20/20	100

Tabela V: Zaviranje luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPA

Koncentracija BPA [ $\mu\text{M}$ ]	% zaviranja luminiscence
3,65	16,14
5,48	27,77
7,30	32,69
10,95	45,11
14,60	52,93
21,90	63,23
29,20	70,08
43,80	76,99

## Priloga C: Rezultati akutnih testov strupenosti BPF za izbrane testne organizme

Tabela VI: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*) v vzorcu s koncentracijo 79,91  $\mu\text{M}$  BPF

SUBLETALNI ZNAKI	ŠTEVILO ZARODKOV									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Razvoj oči	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Spontano gibanje	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
Krvni obtok	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Pigmentacija telesa	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Pigmentacija oči	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Deformacija rumenjake vreče	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Prisotnost edemov-72 h	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓
Izvalitev-72 h	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<b>LETALNI ZNAKI</b>										
Koagulacija	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
Ločitev repa od rumenjaka	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Razvoj somitov/vretenc	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Srčni utrip	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>TERATOGENI ZNAKI- 72 h</b>										
Deformacije glave	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓
Deformacije repa	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗
Deformacije hrbtenice	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓
Zastoj v rasti	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

Tabela VII: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 24 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF

Koncentracija BPF [ $\mu\text{M}$ ]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 24 h
27,47	0/20	0
29,97	3/20	15
34,96	4/20	20
39,95	5/20	25
43,80	6/20	30
49,94	7/20	35
74,91	10/20	50
99,89	15/20	75

Tabela VIII: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 48 urni izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF

Koncentracija BPF [ $\mu\text{M}$ ]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 48 h
19,98	0/20	0
27,47	7/20	35
32,46	8/20	40
37,46	9/20	45
39,95	8/20	40
43,80	10/20	50
49,94	11/20	55
74,91	15/20	75
99,89	20/20	100

Tabela IX: Zaviranje luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPF

Koncentracija BPF [ $\mu\text{M}$ ]	% zaviranja luminiscence
4,16	28,21
6,24	35,41
8,32	40,95
12,49	50,58
16,65	56,57
24,97	65,27
33,30	73,21
49,94	78,67

## Priloga D: Rezultati akutnih testov strupenosti BPAF za izbrane testne organizme

Tabela X: Opažene subletalne, letalne in teratogene razvojne spremembe pri desetih zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*) v vzorcu s koncentracijo 11,90  $\mu\text{M}$  BPAF

SUBLETALNI ZNAKI	ŠTEVILO ZARODKOV									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Razvoj oči	✘		✘	✓		✘	✓	✘	✘	✓
Spontano gibanje	✓		✓	✘		✘	✓	✘	✓	✓
Krvni obtok	✘		✘	✓		✘	✘	✘	✘	✘
Pigmentacija telesa	✘		✘	✓		✘	✘	✘	✘	✘
Pigmentacija oči	✘		✘	✓		✘	✘	✘	✘	✘
Deformacija rumenjake vreče	✓		✓	✘		✘	✘	✓	✓	✘
Prisotnost edemov-72 h			✓	✘			✓	✓		✓
Izvalitev-72 h			✘	✘			✘	✘		✘
LETALNI ZNAKI										

Koagulacija		*			*					
Ločitev repa od rumenjaka	*		*	✓		*	✓	*	*	✓
Razvoj somitov/vretenc	*		*	✓		*	✓	✓	*	✓
Srčni utrip	*		*	✓		*	✓	✓	✓	*
<b>TERATOGENI ZNAKI- 72 h</b>										
Deformacije glave			✓	*			*	✓		*
Deformacije repa			✓	✓			*	✓		*
Deformacije hrbtenice			✓	*			*	✓		*
Zastoj v rasti			✓	*			*	*		*

Tabela XI: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 24 h izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF

Koncentracija BPAF [µM]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 24 h
2,97	1/20	5
5,95	3/20	15
8,92	10/20	50
11,90	14/20	70
14,87	18/20	90
23,79	20/20	100

Tabela XII: Negibne vodne bolhe (*Daphnia magna*) po 48 h izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF

Koncentracija BPAF [µM]	Št. negibnih vodnih bolh / št. izpostavljenih vodnih bolh	% negibnih vodnih bolh – 48 h
2,97	4/20	20
5,95	9/20	45
8,92	13/20	65
11,90	15/20	75
14,87	20/20	100

Tabela XIII: Zaviranje luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* po 30 min izpostavitvi vzorcem z izbranimi koncentracijami BPAF

Koncentracija BPAF [µM]	% zaviranja luminiscence
1,86	5,45
2,79	9,87
3,72	13,99
5,58	21,14
7,44	23,81
11,15	33,24
14,87	52,10
22,31	75,60

## Priloga E: Izračuni standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja

Tabela XIV: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za LC50, EC50 in IC50 vrednosti pri BPA

RIBE ZEBRICE	Povprečje ( $\bar{x}$ )	Stand. deviacija (s)	Vrednost zaupanja (Confidence)	95 % interval zaupanja
<b>LC<sub>50</sub> [μM]</b>				
66,58	65,03	2,20	3,05	63,53
63,47				69,63
<b>VODNE BOLHE</b>				
<b>EC<sub>50</sub> [μM]</b>				
34,25	34,97	1,02	1,42	32,83
35,69				35,66
<b>BAKTERIJE</b>				
<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>				
13,63	13,42	2,09	2,37	11,26
11,23				16,00
15,40				

Tabela XV: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za EC50 in IC50 vrednosti pri BPF

RIBE ZEBRICE	Povprečje ( $\bar{x}$ )	Stand. deviacija (s)	Vrednost zaupanja (Confidence)	95 % interval zaupanja
<b>EC<sub>50</sub>. PIGMENTACIJA [μM]</b>				
/*	/*	/*	/*	/*
/*				/*
<b>VODNE BOLHE</b>				
<b>EC<sub>50</sub> [μM]</b>				
45,87	45,03	1,19	1,64	44,23
44,19				47,52
<b>BAKTERIJE</b>				
<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>				
12,15	11,40	1,06	1,48	10,68
10,65				13,63

\* vrednosti nismo izračunali zaradi pomanjkanja podatkov



Tabela XVI: Izračun standardnih deviacij in 95 % intervala zaupanja za LC50, EC50 in IC50 vrednosti pri BPAF

<b>RIBE ZEBRICE</b>	<b>Povprečje (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Stand. deviacija (s)</b>	<b>Vrednost zaupanja (Confidence)</b>	<b>95 % interval zaupanja</b>
<b>LC<sub>50</sub> [μM]</b>				
8,97	9,50	0,75	1,04	7,93
10,04				10,02
<b>EC<sub>50</sub>. NEIZVALITEV [μM]</b>				
/*	/*	/*	/*	/*
/*				/*
<b>VODNE BOLHE</b>				
<b>EC<sub>50</sub> [μM]</b>				
6,45	6,68	0,32	0,44	6,01
6,90				6,89
<b>BAKTERIJE</b>				
<b>IC<sub>50</sub> [μM]</b>				
13,76	14,38	0,85	0,97	12,79
15,36				14,73
14,02				

\* vrednosti nismo izračunali zaradi pomanjkanja podatkov