

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**OPTIMIZACIJA METODE ZA DOLOČANJE
STRUPENOSTI ONESNAŽEVAL NA ZARODKE ZEBRIC**

DIPLOMSKO DELO

Marta PETRIČ

Mentor: Doc. dr. Tatjana Tišler

Nova Gorica, 2008

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Tatjani Tišler za vso pomoč in namenjen čas. Zahvaljujem se tudi dr. Aniti Jemec in Emilu Meden, za vso pomoč in podporo pri izvajanju laboratorijskega dela.

POVZETEK

Za ugotavljanje strupenosti kemikalij in mešanic kemikalij uporabljamo teste strupenosti z vodnimi organizmi iz različnih trofičnih nivojev. Ribe so ključna taksonomska skupina organizmov v strategiji celostnega določanja strupenosti kemikalij zaradi njihove pomembne vloge v prehranjevalnih verigah v vodah. Določanje akutne strupenosti na ribe je dolga leta temeljilo na določanju preživetja odraslih rib po nekaj dneh izpostavljenosti različnim koncentracijam kemikalij, v zadnjem času pa je velika pozornost posvečena akutnemu strupenostnemu testu na zarodkih rib zebrič (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007), ki je bil tudi osnova našemu diplomskemu delu. Uvedli in optimizirali smo test (vpliv pH, vpliv različnih vrst razredčevalnih voda, starost zarodka ob izpostavitvi), določali strupenost onesnaževal in ugotavljali zanesljivost opazovanih biomarkerjev. Spremljali smo subletalne (gibanje, oči, ušesa, pigmentacijo oči, pigmentacijo telesa, krvni obtok) in letalne (somiti, ločenost repa od rumenjaka, srčni utrip, koaguliran zarodek) biomarkerje po 24h in 48h. Strupenostni test smo izvajali z referenčno kemikalijo (3,4-dikloroanilin), topili (acetone, etanol, metanol) in onesnaževali (imidakloprid, Confidor SL 200, klormefos, izcedna voda iz deponije na vtoku in iztoku čistilne naprave). Sklepamo, da zarodki zebrič niso enako občutljivi na vse vrste kemikalij. Kot najbolj zanesljiva biomarkerja spremljanja sta se pokazala odsotnost somitov in koaguliran zarodek. Pomembna dejavnika v testu sta starost zarodka ob izpostavitvi (do 3h) in temperatura (26 °C) prostora. Najboljšo ponovljivost rezultatov smo ugotovili pri 3,4-dikloroanilinu.

Ključne besede: ribe zebrič, akutni strupenostni test na zarodkih zebrič, optimizacija testa, onesnaževala, topila, 3,4- dikloroanilin, izcedne vode iz deponije

SUMMARY

To evaluate the toxicity of chemicals and their mixtures toxicity tests with aquatic organisms from different trophic levels are performed. Fishes are important taxonomic group of organisms in an integrated strategy of toxicity evaluation of chemicals because of their important role in aquatic food chain. Evaluation of acute toxicity test with fish is based on survival of adult fish after a few days of exposure to different concentrations of chemical. Nowadays attention is focused on the development of zebrafish embryos in acute toxicity testing (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007). The aim of this work was to optimize the zebrafish embryo test by studying the conditions in the test (influence of pH, influence of different kind of dilution water, age of exposed embryo). The repeatability of experiments was investigated and the most reliable biomarkers were identified. We studied the lethal (somites, tail detachment from yolk, coagulation of embryos, heart-beat) and sublethal biomarkers (movement, eyes, ears, pigmentation of eyes, pigmentation of body, blood circulation) after 24 h and 48 h. Reference chemical (3,4-dichloroaniline), solvents (acetone, ethanol, methanol) and pollutants (imidacloprid, Confidor SL 200, chlormefos, landfill leachates) were tested for toxicity. From the results we can conclude that the sensitivity of embryos is dependent on the type of chemical. The most reliable biomarkers were the absence of somites and the coagulation of embryos. The age of exposed embryo (less than 3h) and room temperature (26 °C) were very important in toxicity testing with embryos. The best repeatability was observed in the case of reference chemical.

Keywords: zebrafish, acute toxicity test with zebrafish embryos, test optimization, pollutants, solvents, 3,4-dichloroaniline, landfill leachate

KRATICE IN IZRAZI

Akutni strupenostni test: Kratki strupenostni test, pri katerem spremljamo vplive kemikalij na testne organizme nekaj dni ali nekaj minut.

Biomarker: Merjen biološki odziv na kemikalijo ali več kemikalij, ki je merilo izpostavitve in/ali učinka kemikalije na organizem. Odzivi so merjeni na organizemskem ali suborganizemskem nivoju.

Definitivni test: Druga stopnja akutnega strupenostnega testa, pri kateri natančno določimo EC_x vrednosti.

EC_{50} : (angl. effective concentration) Srednja efektivna koncentracija (EC_{50}) je koncentracija strupene snovi, ki povzroči pri 50% organizmov izpostavljene populacije merjene odgovore organizmov (gibanje, razvoj, srčni utrip, krvni obtok, itd.) v določenem času. Na podlagi spremljanih subletalnih učinkov izračunamo EC_{50} .
24h, 48h EC_{50} - koncentracija kemikalije ali odpadne vode, ki po 24 (48) urah povzroči učinek na 50% testiranih organizmov v določenem času. (Rand, 1995)

LC_{50} : (angl. lethal concentration) Srednja letalna koncentracija (LC_{50}) je koncentracija strupene snovi, ki povzroči 50% smrtnost organizmov izpostavljene populacije v določenem času. Podatke za izračun LC_{50} pridobimo s spremljanjem letalnih učinkov (Tišler, skripta)

Letalni biomarker: Pokazatelj smrtnosti nekega onesnaževala za organizem.

Optimizacija strupenostnega testa: Preučitev morebitnih nevšečnosti pri izvajanju strupenostnega testa. Iskanje najprimernejših pogojev za izvedbo testa.

Ponovljivost: O ponovljivosti govorimo, ko so izpolnjeni naslednji pogoji: test izvajamo v istem laboratoriju, z isto metodo in test opravlja isti izvajalec z isto opremo znotraj kratkega časovnega interval (ISO 5725-1:1994).

Preliminarni test: Prva stopnja akutnega strupenostnega testa, pri kateri določimo koncentracije, pri katerih se pokaže učinek in doseže 100 % učinek. Določimo predvideno območje EC_x vrednosti, v katerem kasneje izvajamo definitivne teste.

Razredčevalna voda: Raztopina, ki jo uporabljamo za pripravo različnih koncentracij testne kemikalije in kot raztopina pri izpostavljenih kontrolnih zarodkih zebrič. Vsebuje vsa potrebna hranila za preživetje zarodka v času izpostavljenosti. Pripravljen je po standardu ISO 15088 (2007).

Subletalni biomarker: Pokazatelj učinka nekega onesnaževala na organizem.

(Povzeto po Jemec, 2003)

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|------------|
| POVZETEK | iii |
| SUMMARY | iii |
| KRATICE IN IZRAZI | iv |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 Opredelitev problema | 1 |
| 1.2 Namen naloge | 1 |
| 1.2.1 Optimizirati strupenostni test na zarodkih zebrič | 1 |
| 1.2.2 Določiti, kateri opazovani učinki na zarodkih so najboljši pokazatelji stresa..... | 2 |
| 1.2.3 Določiti primernost uvedenega testa za različna onesnaževala | 2 |
| 1.2.4 Ugotoviti, primernost uvedenega testa kot nadomestilo testa z odraslimi ribami | 2 |
| 2 TEORETIČNE OSNOVE | 3 |
| 2.1. Strupenostni testi..... | 3 |
| 2.2. Ribe kot testni organizem | 4 |
| 2.3 Testni organizem zebriča (<i>Danio rerio</i>) | 4 |
| 2.3.1 Embrionalni razvoj..... | 5 |
| 2.3.2 Uporaba zebrič v vodni toksikologiji..... | 11 |
| 2.3.3 Raziskave z zebričami v znanosti | 11 |
| 2.4 Strupenostni test z zarodki rib zebrič..... | 12 |
| 2.4.1 Pregled pogojev v testih | 12 |
| 2.4.1.1 Temperatura..... | 12 |
| 2.4.1.2 Kisik..... | 13 |
| 2.4.1.3 Svetloba | 14 |
| 2.4.1.4 Potreben volumen pripravljene razredčevalne vode za razvoj zarodka zebriče | 14 |
| 2.4.1.5 Vpliv pH | 15 |
| 2.4.1.6 Starost zarodkov ob izpostavitvi | 15 |
| 2.5 Testirane kemikalije / onesnaževala | 15 |
| 2.5.1 Insekticidi | 15 |
| 2.5.1.1 Neonikotinoidi | 16 |
| 2.5.1.1.1 Imidakloprid | 16 |
| 2.5.1.1.2 Confidor SL 200 | 17 |
| 2.5.1.2 Organofosforni insekticidi..... | 18 |
| 2.5.1.2.1 Klormefos | 19 |
| 2.5.2 Izcedne vode iz deponije na vtoku in iztoku čistilne naprave | 19 |
| 2.5.3 Topila | 20 |
| 2.5.3.1 Aceton..... | 20 |
| 2.5.3.2 Etanol..... | 20 |
| 2.5.3.3 Metanol..... | 21 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1 Gojenje rib zebrić..... | 23 |
| 3.2 Drstenje in priprava iker za test | 23 |
| 3.2.1 Zbiranje iker | 23 |
| 3.2.2 Priprava iker za test (ločevanje)..... | 24 |
| 3.3 Izvedba testa | 25 |
| 3.3.1 Priprava testnih plošč | 25 |
| 3.3.2 Priprava razredčevalne vode | 26 |
| 3.3.3 Optimizacija izvedbe testa | 26 |
| 3.3.4 Priprava kemikalij za strupenostni test | 26 |
| 3.3.4.1 Priprava referenčne kemikalije (3,4-dikloroanilin) | 26 |
| 3.3.4.2 Priprava topil (acetón, etanol, metanol) | 27 |
| 3.3.4.3 Priprava izhodnih raztopin onesnaževal | 28 |
| 3.3.4.3.1 Imidakloprid | 28 |
| 3.3.4.3.2 Confidor SL 200 | 29 |
| 3.3.4.3.3 Klormefos | 29 |
| 3.3.4.3.4 Izcedne vode iz deponije | 30 |
| 3.4 Opazovanje biomarkerjev | 31 |
| 3.4.1 Letalni biomarkerji..... | 32 |
| 3.4.2 Subletalni biomarkerji..... | 33 |
| 3.5 Vrednotenje rezultatov..... | 34 |
| 3.5.1 EC ₅₀ / LC ₅₀ | 34 |
| 3.5.2 Koeficient variacije | 34 |
| 4 REZULTATI Z DISKUSIJO | 35 |
| 4.1 Optimizacija strupenostnih testov..... | 35 |
| 4.1.1 Vpliv različnih vrst razredčevalnih vod na razvoj zarodka | 35 |
| 4.1.3 Vpliv različnih starosti zarodkov ob izpostavitvi | 37 |
| 4.2 Strupenostni test..... | 38 |
| 4.2.1 Testiranje strupenosti 3,4 – dikloroanilina (referenčna kemikalija) | 38 |
| 4.2.2 Testiranje strupenosti topil..... | 40 |
| 4.2.2.1 Aceton..... | 40 |
| 4.2.2.2 Etanol..... | 41 |
| 4.2.2.3 Metanol..... | 42 |
| 4.2.3 Testiranje strupenosti onesnaževal..... | 43 |
| 4.2.3.1 Imidakloprid | 43 |
| 4.2.3.2 Confidor SL 200 | 43 |
| 4.2.3.3 Klormefos | 44 |
| 4.2.3.4 Izcedna voda iz deponije na vtoku čistilne naprave | 45 |
| 4.2.3.5 Izcedna voda iz deponije na iztoku čistilne naprave | 46 |
| 4.3 Ponovljivost testov in izračunane EC ₅₀ in LC ₅₀ za onesnaževala..... | 47 |
| 4.3.1 3,4-dikloroanilin (referenčna kemikalija) | 47 |
| 4.3.2 Topila | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3.2.1 Aceton..... | 48 |
| 4.3.2.2 Etanol..... | 49 |
| 4.3.2.3 Metanol..... | 50 |
| 4.3.3 Onesnaževala..... | 50 |
| 4.3.3.1 Imidakloprid in klormefos..... | 50 |
| 4.3.3.2 Confidor SL 200..... | 51 |
| 4.3.3.3 Izcedna voda iz deponije na vtoku čistilne naprave..... | 52 |
| 4.3.3.4 Izcedna voda iz deponije na iztoku čistilne naprave..... | 53 |
| 4.4 Koeficienti variacije za opazovane biomarkerje..... | 54 |
| 5 SKUPNA RAZPRAVA | 56 |
| 5.1 Zanesljivost spremljanih odzivov in morebitne nevšečnosti..... | 56 |
| 5.1.2 Somiti..... | 56 |
| 5.1.3 Ločen rep..... | 56 |
| 5.1.4 Koaguliran zarodek..... | 56 |
| 5.1.5 Srčni utrip..... | 57 |
| 5.1.6 Oči..... | 57 |
| 5.1.7 Uho..... | 57 |
| 5.1.8.Krvni obtok..... | 57 |
| 5.1.9 Pigmentacija v očeh..... | 57 |
| 5.1.10 Pigmentacija telesa..... | 57 |
| 5.1.11 Deformacija..... | 58 |
| 6 ZAKLJUČKI | 59 |
| 7 VIRI | 61 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Odrasle Zebrice (Braunbeck in Lammer, 2006)..... | 5 |
| Slika 2: Stadiji zgodnjega razvoja zebrice (Danio rerio): 0.2 – 3.3 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)..... | 7 |
| Slika 3: Stadiji vmesnega razvoja zebrice (Danio rerio): 3.7 - 10 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)..... | 8 |
| Slika 4: Stadiji vmesnega razvoja zebrice (Danio rerio): 11–19.5 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)..... | 9 |
| Slika 5: Stadiji poznega razvoja zebrice (Danio rerio): 22 – 48 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)..... | 10 |
| Slika 6: Število objav v zadnjih 25 letih, ki vključujejo zebrice (Danio rerio) kot raziskovalni organizem (podatki iz elektronske baze PubMed, pod ključno besedo »zebrafish«; Craig, 2006)..... | 12 |
| Slika 7: Potreben čas za doseg določenega stadija razvoja pri določeni temperaturi (Schirone in Gross, 1968)..... | 13 |
| Slika 8: Razmerje med porabo kisika in koncentracijo kisika v razredčevalni vodi (Braunbeck in Lammer 2006)..... | 14 |
| Slika 9: Strupenost 3,4-dikloroanilina na zarodke zebric pri različnih volumnih razredčevalne vode (Braunbeck in Lammer, 2006)..... | 15 |
| Slika 10: Strukturna formula imidakloprida..... | 16 |
| Slika 11 : Strukturna formula organofosfatov..... | 18 |
| Slika 12: Splošne formule organofosforinih podskupin: fosfat (a), fosforotioati (b), fosforoditionati (c) (Baird, 2001)..... | 19 |
| Slika 13: Strukturna formula klormefosa..... | 19 |
| Slika 14: Izvajanje strupenostnih testov z zarodki zebric..... | 22 |
| Slika 15: Akvarij z zebricami (Danio rerio) in valilnikom v levem in desnem kotu.... | 23 |
| Slika 16: Normalno oplojene ikre zebrice (Danio rerio): (1) 0,75 h; (2) 1 h; (3) 1,2 h; (4) 1,5 h (Braunbeck & Lammer, 2006)..... | 24 |
| Slika 17: Testne plošče TPP 92421..... | 25 |
| Slika 18: Različno stari zarodki zebric: (a) 2.5 h, (b) 25h in (c) 40 h (Bachmann, 2002)..... | 32 |
| Slika 19: Primera deformiranih zarodkov po 48h (a) in 24h (b) (Bachmann, 2002)..... | 33 |
| Slika 20: Formula koeficienta variacije..... | 34 |
| Slika 21: Vpliv različnih vrst vod na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 36 |
| Slika 22: Vpliv pH-ja na razvoj zarodka po 24h (a) in 48h (b)..... | 37 |
| Slika 23: Vpliv različnih starosti zarodkov na razvoj zarodkov ob 24h (a) in 48h (b) izpostavitvi pripravljeni razredčevalni vodi..... | 38 |
| Slika 24: Vpliv 3,4-dikloroanilina na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 40 |
| Slika 25: Vpliv acetona na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 41 |
| Slika 26: Vpliv etanola na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 42 |
| Slika 27: Vpliv metanola na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 43 |
| Slika 28: Vpliv Confidorja SL 200 na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 44 |
| Slika 29: Vpliv izcedne vode iz deponije na vtoku čistilne naprave na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 46 |
| Slika 30: Vpliv izcedne vode iz deponije na iztoku čistilne naprave na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Slika 31: Koeficienti variacije za posamezno onesnaževalo/kemikalijo po 24h (a) in 48h | |
| | 54 |
| (b) | 54 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Stadiji embrionalnega razvoja zebrice pri 26+1 °C..... | 6 |
| Preglednica 2: Seznam fitofarmaceutskih sredstev, registriranih v RS, ki vsebujejo imidakloprid. | 17 |
| Preglednica 3: Vsebnost hranil v razredčevalni vodi (ISO 15088;2007)..... | 26 |
| Preglednica 4: Priprava testnih koncentracij acetona | 27 |
| Preglednica 5: Priprava testnih koncentracij etanola | 27 |
| Preglednica 6: Priprava testnih koncentracij metanola | 28 |
| Preglednica 7: Priprava testnih koncentracij imidakloprida | 29 |
| Preglednica 8: Priprava testnih koncentracij Confidorja SL 200..... | 29 |
| Preglednica 9: Priprava testnih koncentracij klormefosa..... | 30 |
| Preglednica 10: Priprava testnih koncentracij izcedne vode na vtoku čistilne naprave | 31 |
| Preglednica 11: Priprava testnih koncentracij izcedne vode na iztoku čistilne naprave | 31 |
| Preglednica 12: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za 3,4-dikloroanilin..... | 48 |
| Preglednica 14: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za etanol | 49 |
| Preglednica 15: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za metanol..... | 50 |
| Preglednica 16: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za klormefos..... | 51 |
| Preglednica 17: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za Confidor SL 200..... | 51 |
| Preglednica 18: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za izcedno vodo iz deponije na vtoku čistilne naprave | 52 |
| Preglednica 19: Vrednosti 24h EC ₅₀ /LC ₅₀ in 48h EC ₅₀ /LC ₅₀ za izcedno vodo iz deponije na iztoku čistilne naprave | 53 |

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Fizikalno-kemijske analize voda ne zadostujejo za oceno onesnaženosti odpadnih vod in sedimentov, saj zajemajo le točno določene parametre in meritve specifičnih snovi, značilnih za raziskovano industrijo, proizvodnjo, ali drugo dejavnost. Zaradi vplivov človekovih dejavnosti lahko v okolju zaznamo katerokoli drugo snov, ki jo s kemijskimi analizami ne bomo odkrili, čeprav je za okolje lahko zelo strupena. Problematično je tudi medsebojno delovanje snovi. Določene organske snovi ali kovine, ki so v okolju sicer prisotne v dovoljenih koncentracijah, so lahko v medsebojni kombinaciji izredno strupene, česar s kemijskimi analizami ne moremo ugotoviti. Takšne težave rešujemo z uporabo ekotoksikoloških oziroma strupenostnih testov. Strupenostni testi so biološki testi in nam omogočajo ugotoviti, ali je določeno okolje strupeno za žive organizme. Šele ko ugotovimo strupenost, nadaljujemo s fizikalno-kemijskimi analizami in poiščemo snovi, ki so strupenost povzročile. Poleg tega, da nam tak celosten pristop prihrani veliko časa in denarja, je nujno potreben za določitev dejanskega stanja okolja.

Poznavanje škodljivih vplivov okolju nevarnih kemikalij in njihovih mešanic (npr. odpadnih voda) na vodne organizme je ključnega pomena pri varovanju in zaščiti voda. Vodni ekosistemi velikokrat delujejo kot »zbiratelji« strupenih snovi, ki prihajajo v okolje iz različnih dejavnosti (industrija, kmetijstvo, itd.). Strupene snovi vstopajo v vodno okolje preko različnih točkovnih in netočkovnih virov, kar otežuje njihov nadzor. Za ugotavljanje strupenosti kemikalij in mešanic kemikalij uporabljamo teste strupenosti z vodnimi organizmi iz različnih trofičnih nivojev, npr. bakterije (razgrajevalci), alge (proizvajalci), rake in ribe (potrošniki). Testi strupenosti temeljijo na merjenju odzivov organizmov na strupeno snov s ciljem poiskati zvezo med koncentracijo kemikalije in odzivom organizma. Strupenost vrednotimo kot določanje smrtnosti (letalnost) in določanje subletalnih učinkov na vseh nivojih biološke organizacije (biokemijski, fiziološki učinki, vplivi na razmnoževanje, obnašanje, itd.) (Rand, 1995).

Ribe so ključna taksonomska skupina organizmov v strategiji celostnega določanja strupenosti kemikalij zaradi njihove pomembne vloge v prehranjevalnih verigah v vodah. Določanje akutne strupenosti na ribe je dolga leta temeljilo na določanju preživetja odraslih rib po nekaj dneh izpostavljenosti različnim koncentracijam kemikalij. Smernice Evropske Unije so, da se v ekotoksikoloških raziskavah uporabi nadomestne, manj invazivne in etično sporne metode za določitev strupenosti vodnih vzorcev, kot je npr. uporaba celičnih linij, spremljanje embrionalnega razvoja rib, itd. (Craig, 2006; Schulte in Nagel, 1994). Kot rezultat teh prizadevanj so razvili metode za določanje akutne strupenosti na zarodkih različnih vrst rib.

1.2 Namen naloge

Namen diplomskega dela je uvesti metodo strupenostnega testa na zarodkih rib zebrič (ISO 15088:2007), jo optimizirati in z uvedeno metodo določiti strupenost izbranih onesnaževal. V diplomskem delu smo se osredotočili na naslednje cilje:

1.2.1 Optimizirati strupenostni test na zarodkih zebrič

Preverili smo vpliv dejavnikov, ki niso jasno definirani v standardu in lahko vplivajo na rezultate. Optimizacijo strupenostnega testa na zarodkih zebrič smo naredili na podlagi testiranja vpliva različnih razredčevalnih vod (vodovodna voda, postana vodovodna voda in priporočena razredčevalna voda (ISO 15088:2007)) na razvoj zarodkov zebrič, vpliva pH in vpliva različnih starosti zarodkov ob izpostavitvi onesnaževalu. Zanimalo nas je tudi, zakaj je bila za referenčno kemikalijo izbrana kemikalija 3,4-dikloroanilin.

1.2.2 Določiti, kateri opazovani učinki na zarodkih so najboljši pokazatelji stresa

Na podlagi opazovanja letalnih in subletalnih sprememb po 24h in 48h izpostavljenosti zarodkov zebrič onesnaževalu smo poskušali ugotoviti, kateri biomarker je najbolj občutljiv in zanesljiv pokazatelj stresa oz. učinka onesnaževala.

1.2.3 Določiti primernost uvedenega testa za različna onesnaževala

Določali smo strupenost referenčne kemikalije, okoljskih vzorcev in različnih onesnaževal. Zaradi netopnosti nekaterih onesnaževal smo določili tudi strupenost organskih topil, ki se uporabljajo za pripravo onesnaževal. Poskušali smo ugotoviti, če je test splošno uporaben za vsa onesnaževala ali le za določene tipe topil ali onesnaževal.

1.2.4 Ugotoviti, primernost uvedenega testa kot nadomestilo testa z odraslimi ribami

Na podlagi že znanih rezultatov za določena onesnaževala in topila na odraslih zebričah, smo primerjali občutljivosti odraslih zebrič z zarodki zebrič. Pri testu z odraslimi zebričami se opazuje le smrtnost, pri testu z zarodki zebrič pa subletalne in letalne biomarkerje.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1. Strupenostni testi

V nadaljevanju opisujemo principe strupenostnih testov, ki smo jih povzeli po avtorju Rand (1995). Strupenostni testi so dobili veljavo v obdobju 1940 – 1950, saj se je povečala zaskrbljenost glede škodljivih učinkov onesnaževal na okolje, standardizirali so tehnike za akutne strupenostne teste, težili k uporabi različnih vrst organizmov v strupenostnih testih in ustanavljali laboratorije za izvajanje strupenostnih testov. Akutni strupenostni testi z ribami so v tem obdobju dosegli hiter razvoj in pospešeno uporabo, služili pa so kot osnova za prve metode strupenostnih testov opisane v »American society for testing and materials (ASTM)«. V 60-ih letih prejšnjega stoletja usmerijo pozornost tudi na onesnaževanje iz industrijskih objektov v vodno okolje (potoke, reke, itd.), merjenje koncentracij izpostavljenosti in kontroliranje kvalitete vod. V 70-ih letih je akutni strupenostni test na ribah sprejet kot veljaven parameter v zakonodaji in služi kot vodilo za kontroliranje onesnaženosti vod (ocene tveganja, itd.). V 90-ih letih je bil velik porast študij vpliva na zdravje človeka s spremljanjem biomarkerjev in razvijali so avtomatizacijske tehnike za določanje akutne strupenosti. Danes se na področju vodne toksikologije uveljavljajo manj invazivni in etično sprejemljivejši načini testiranja, zato prihaja do uporabe zarodkov rib in mladostnih stadijev organizmov.

Strupenostne teste ločujemo glede na trajanje testov, dodajanje raztopin in namen. Po trajanju delimo teste na kratkotrajne (akutne), srednjedolge in dolgotrajne (kronične). Z akutnim testom ugotavljamo relativno strupenost kemikalije oziroma onesnaževala na izbrani vodni organizem v kratkem izpostavitvenem časovnem obdobju (od nekaj minut do 4 dni, odvisno od organizma). S kroničnim testom strupenosti ocenjujemo možen škodljiv vpliv kemikalije ob dolgotrajni izpostavitvi (nekaj tednov do let, odvisno od organizma) subletalnim koncentracijam in ugotavljamo ne le preživetje, temveč tudi razvoj, razmnoževanje, itd. Običajno imamo pri kroničnih strupenostih testih opravka z manj intenzivnim, ponavljajočim se dražljajem, ki da tudi manj intenziven odgovor, vendar to ne pomeni, da ni nevaren. Spremljani parametri pri strupenostnih testih se od vrste do vrste razlikujejo npr: pri ribah se ponavadi spremlja smrtnost, pri algah pa rast. Učinki kemikalij so letalni (smrtni) in subletalni, na podlagi teh kasneje podajamo rezultate akutnih testov LC_{50} in EC_{50} vrednosti.

Strupenostni testi obsegajo različne sladkovodne in morske teste, največkrat se uporabljajo testni organizmi kot npr.: ribe, alge, bakterije in nevretenčarji. Te skupine organizmov se uporabljajo zaradi obstoječih informacij o strupenosti na organizem, njihove občutljivosti in ekološke pomembnosti. Za pridobitev dobrih rezultatov ni pomembna samo prava izbira testa, temveč mora biti tudi prava izbira organizma. Testne organizme lahko dobimo iz populacije v neonesnaženem območju, kupimo pri dobaviteljih oziroma jih vzgojimo v laboratoriju. Vse vrste v določenem testu morajo biti iz istega vira. Pri izbiranju vrst organizmov, primernih za strupenostni test, se poslužujemo kriterijev kot so:

- Občutljivost vrste
- Komercialno, ekološko pomembna vrsta
- Enostavno gojenje v laboratoriju
- Poznana fiziologija, genetika, obnašanje
- Splošno razširjena vrsta, pogostost
- Reprezentativna za ekosistem

Vendar je upoštevanje vseh naštetih kriterijev praktično nemogoče. Na izbiro vrste ima pomembno vlogo tudi namen preiskave strupenosti.

2.2. Ribe kot testni organizem

Ribe, kot vodni vretenčarji, zaslužijo posebno pozornost kot opozorilni sistem v monitoringu kakovosti vodnega ekosistema. Številne vrste rib so predlagane kot testni organizem v standardiziranih testih strupenosti okoljskih vzorcev ali kemikalij. Za izvedbo sladkovodnih strupenostnih testov z vretenčarji uporabljajo različne vrste rib (potočna zlatovčica (*Salvelinus fontinalis*), pacifiški losos (*Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus tshawytscha*), šarenka (*Oncorhynchus mykiss*), zlata ribica (*Carassius auratus*), krap (*Cyprinus carpio*), črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*), somiči (*Ictalurus punctatus*), ostriž (*Lepomis macrochirus*), navadna ščuka (*Esox lucius*), zet (*Gasterosteus aculeatus*), zebrica (*Danio rerio*), gupi (*Poecilia reticulata*), itd.). Navedene vrste rib so bile izbrane na podlagi njihove dostopnosti, ekološkega pomena, preteklih raziskav (poznavanje samega organizma) in preprostosti vzdrževanja v laboratoriju. Navedene vrste rib se uporabljajo v akutnih in kroničnih testih (Rand, 1995).

V diplomskem delu smo uporabljali zarodke rib zebric kot testni organizem. Zebrice imajo posebne lastnosti (glej poglavje 2.1), ki omogočajo njihovo uporabo kot testni organizem (Bopp in sod., 2006).

2.3 Testni organizem zebrica (*Danio rerio*)

Zebrica (Slika 1) je majhna tropska sladkovodna riba z izvorom v reki Ganges na jugovzhodu Azije in njenih pritokih, Burmi, Sumatri in polotoku Malakka (Braunbeck in Lammer, 2006). Spada v družino krapov (*Cyprinidae*). Odrasle zebrice merijo približno 3-5 cm v dolžino in uspevajo v mehki kot tudi trdi vodi, kar pomeni, da so relativno neobčutljive na trdoto vode in jih je zato lažje vzdrževati in vzgajati (Laale, 1977).

Njihova majhnost nam omogoča lažje vzdrževanje večjega števila zebric v laboratoriju. Pri temperaturi 26°C zebrice hitreje rastejo kot pri nižjih temperaturah in v starosti od 4 do 15 mesecev so samice v najugodnejši fazi drstenja. Primerne razmere so pogoj za proizvodbo velikega števila nelepljivih in prozornih zarodkov (jajčec, iker), kar omogoča lažjo detekcijo letalnih in subletalnih biomarkerjev. Ena samica izleže od 50 do 200 iker na dan. Zebrice so lahko dosegljive in relativno poceni, po načinu preživetja so r-strategisti (Brust, 2001) – zgodnja spolna zrelost, hiter razvoj, kratka življenjska doba, majhna telesna velikost, veliko število potomcev, populacije imajo težnjo po eksponentni rasti ($r =$ hitrost rasti), viri niso omejujoči dejavnik, najdemo jih v neuravnoteženih ali variabilnih okoljih (Predavanje ekologija..., 2007/2008).



Slika 1: Odrasle Zebrice (Braunbeck in Lammer, 2006)

Razvoj zebrič je zelo podoben embriogenezi višjih vretenčarjev, vključno s človekom, vendar v nasprotju s sesalci razvoj zebrič od oplojenega jajca do odraslega osebk poteka izven osebka ženskega spola v prozornih zarodkih oz. jajčecih (Bopp in sod., 2006). Zarodek zebrič je prozoren prvih nekaj dni njihovega življenja, potem se prične pigmentacija.

2.3.1 Embrionalni razvoj

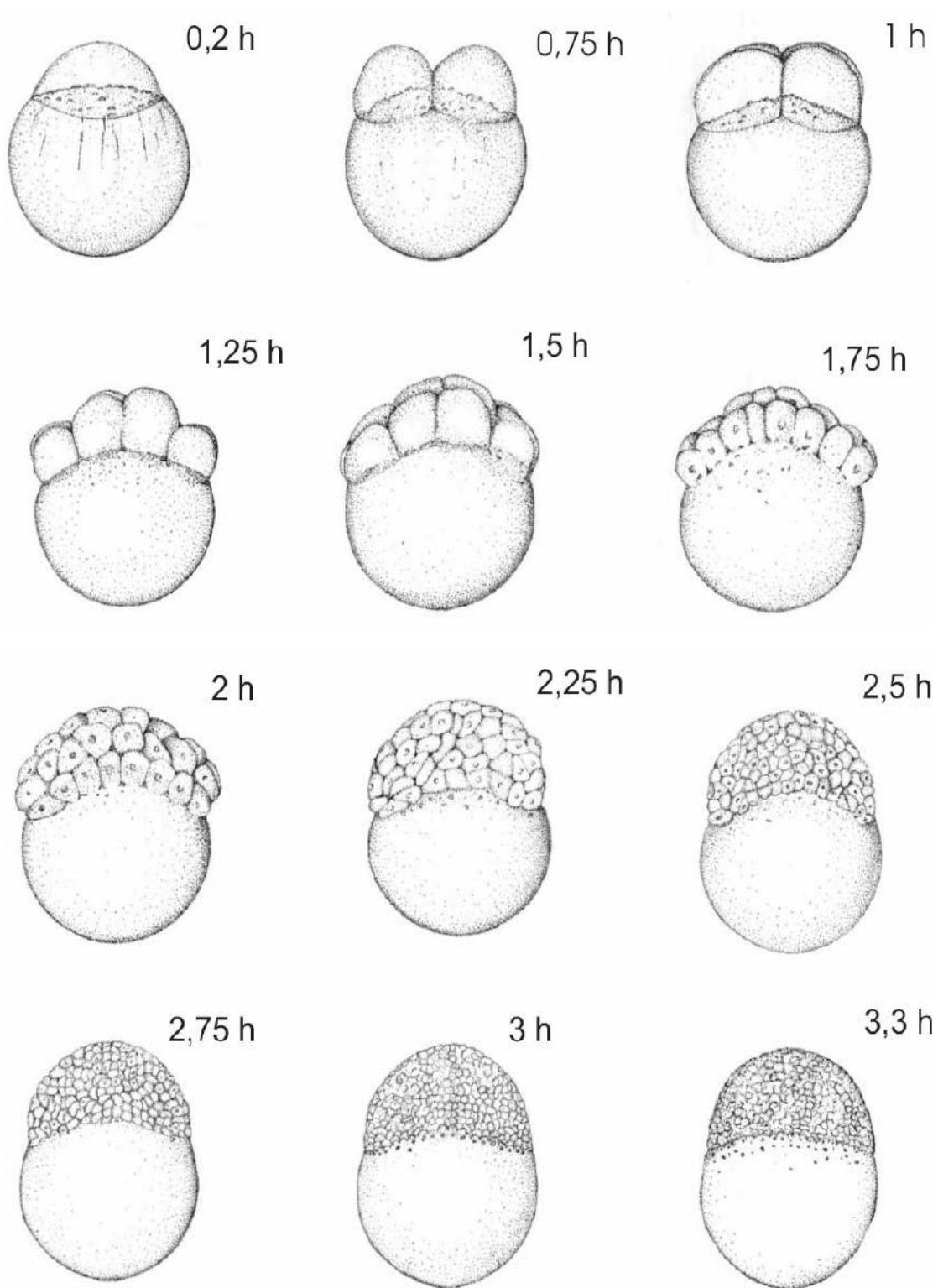
Cepitev zarodka je meroblastična (zigota z veliko akumulacijo rumenjaka) in diskoidna (nepopolna delitev blastodiskov, prostor rumenjaka je prost in citoplazma je aktivna). Kmalu po oploditvi se citoplazma zarodka akumulira na enega od polov, kjer ovije jedro zigote. Blastodisk (del citoplazme, ki ovije jedro zigote) preneha cepitev, medtem ko je del bogat z rumenjaki izključen in faze cepitve (Brust, 2001).

Embrionalni razvoj zebrič je zelo hiter: 24 h po oploditvi so vsi glavni organi že razviti in po treh dneh je že opaziti prve izvalitve. V starosti od treh do pet mesecev so zebrič že spolno dozorele in dobimo nove generacije zebrič. Njihovo morfologijo lahko preprosto opazujemo v študijah strupenosti.

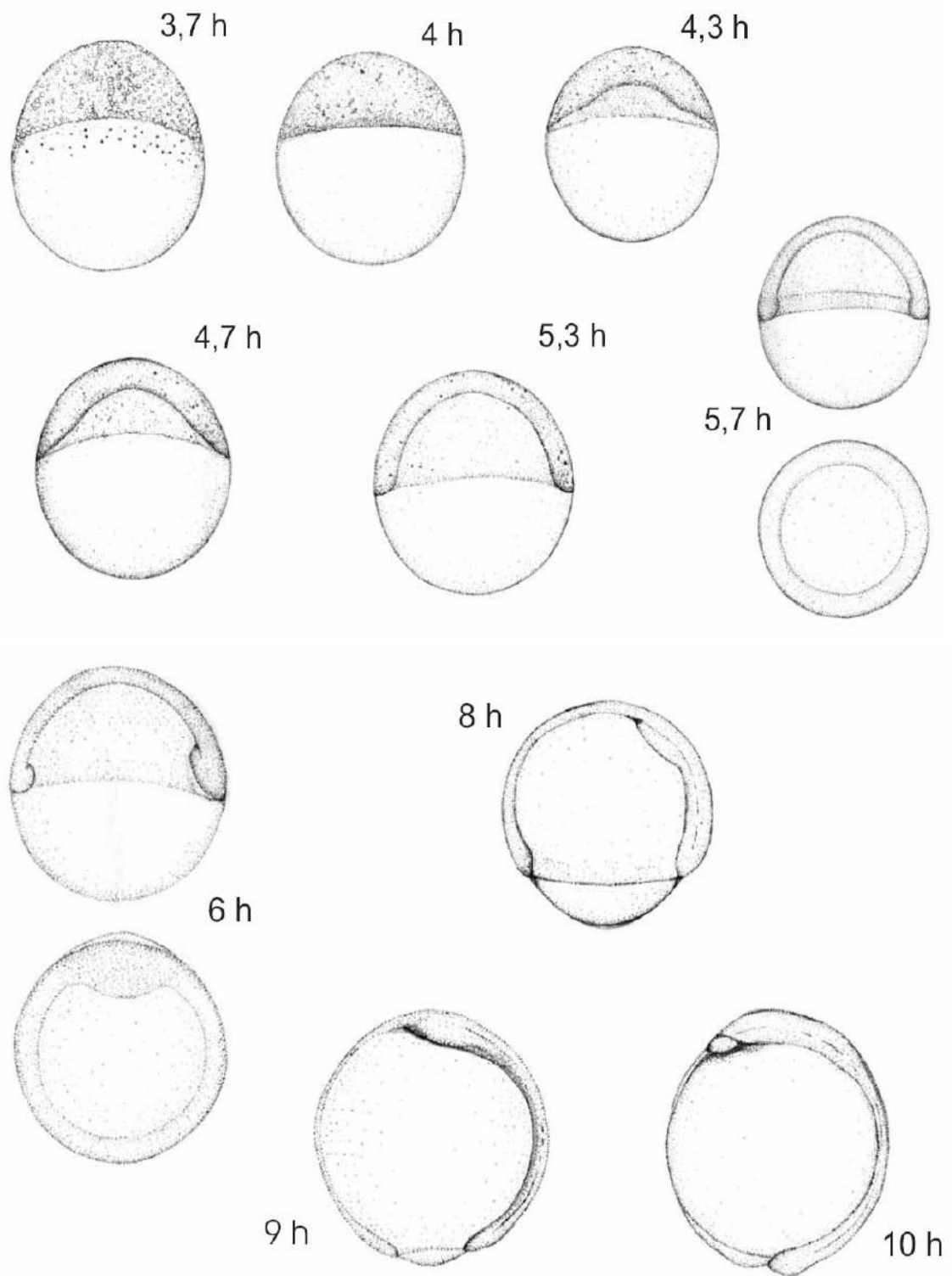
Embrionalni razvoj poteka v naslednjih stadijih: oplojevanje, cepitev, blastula, gastrulacija, segmentacija, faringula, izvalitev. Časovna razporeditev stadijev embrionalnega razvoja zebrič pri $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ je opisana v preglednici (Preglednica 1), skice razvoja zarodka po času, pa so podane na štirih slikah (Slika 2, slika 3, slika 4, slika 5).

Preglednica 1: Stadiji embrionalnega razvoja zebrice pri 26±1 °C

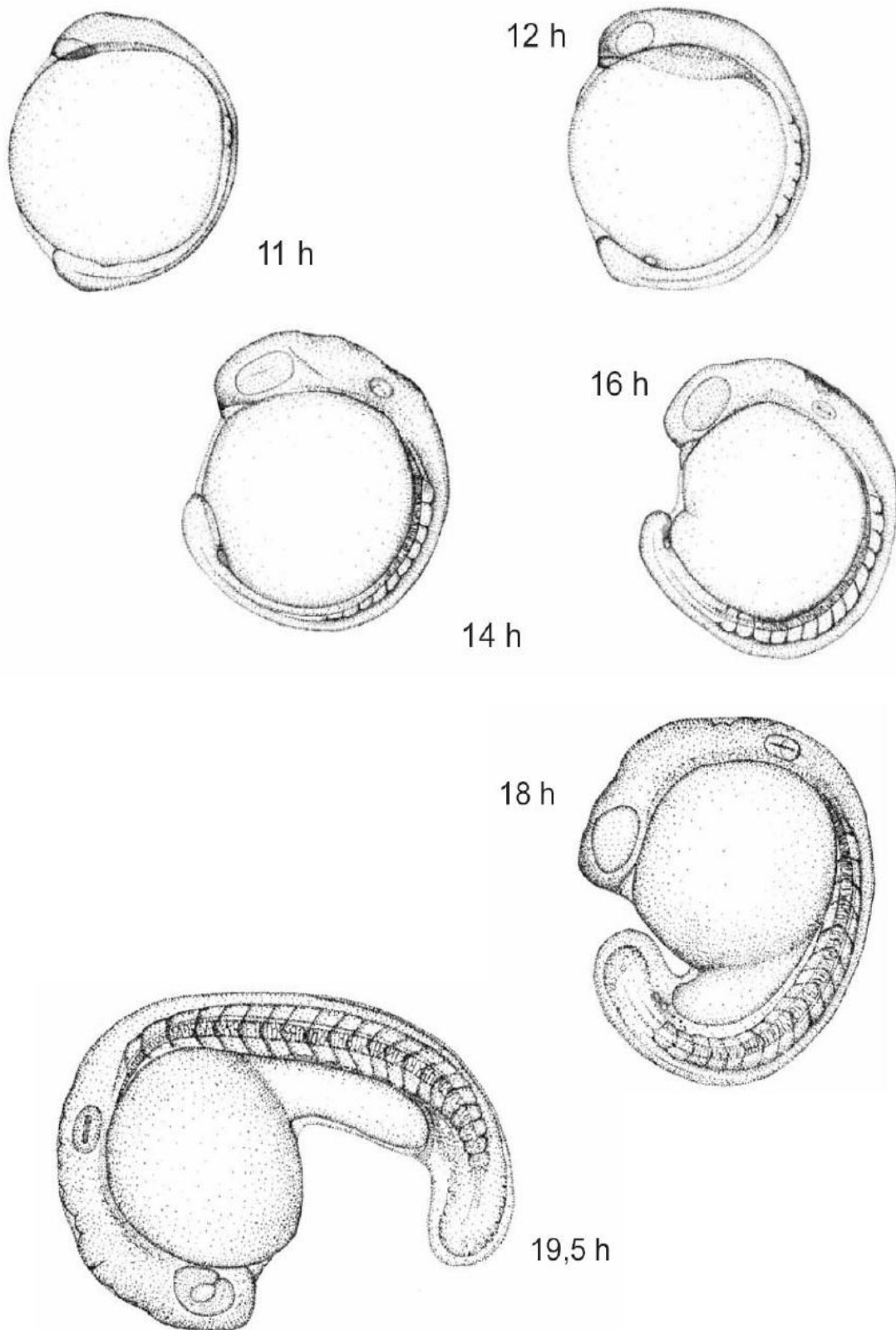
| Čas (h) | Stadij (Kimmel in sod., 1995) | Karakterizacija (Kos in Bulog, 1997) |
|---------|-------------------------------|--|
| 0 | Oplojevanje | |
| 0.75 | Cepitev | |
| 2 | Blastulacija (brazdanje) | V blastulaciji z meroblastičnim diskoidnim brazdanjem nastane diskoblastula. Končna blastula je zgrajena iz dveh plasti (blastoderm, blastocel). |
| 5.25 | Gastrulacija | Proces, v katerem se s pomočjo usklajenih potovanj celic in celičnih slojev oblikujejo tri zarodne plasti zarodka (zunani ektoderm, notranji endoderm in vmesni mezoderm). Celice blastoderma potujejo ob robovih blastoderma v notranjost zarodka kot endomezoderm (poteka involucija celic). |
| 10.5 | Segmentacija | Prva vretena somitov. |
| 24 | Faringula | Spontano gibanje, ločen rep od rumenjaka, zgodnja pigmentacija. |
| 24-72 | | Zaviranje gibanja, pigmentacija repa, močan krvni obtok, srčni utrip, itd. |
| 72-96 | Izvalitev | Regulirano bitje srca, izrabljanje rumenjaka, dorzalna in vertikalna pigmentacija prideta skupaj na repu, itd. |



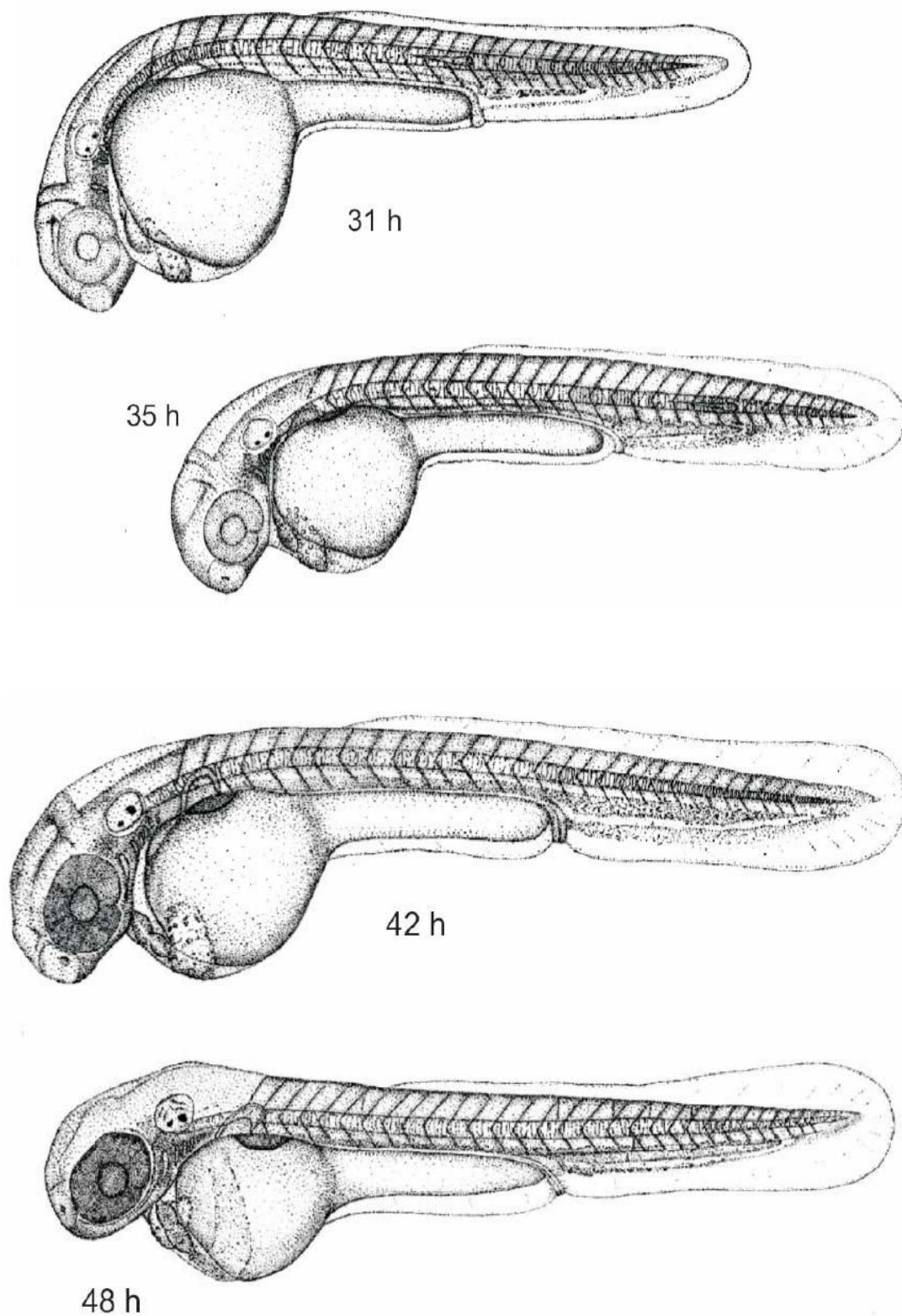
Slika 2: Stadiji zgodnjega razvoja zebrice (*Danio rerio*): 0.2 – 3.3 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)



Slika 3: Stadiji vmesnega razvoja zebrice (*Danio rerio*): 3.7 - 10 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)



Slika 4: Stadiji vmesnega razvoja zebrice (*Danio rerio*): 11–19.5 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)



Slika 5: Stadiji poznega razvoja zebrice (*Danio rerio*): 22 – 48 h po oploditvi (Kimmel in sod., 1995)

2.3.2 Uporaba zebric v vodni toksikologiji

Za odpadne vode in testiranje kemikalij sta v uporabi dva standardna strupenostna akutna testa, eden za odrasle zebrice (ISO 7346-1,2,3:1996), drugi pa za zarodke zebric (ISO 15088:2007), ki smo ga uvedli.

Zebrice, *Danio rerio*, kupimo pri komercialnih dobaviteljih (npr.: akvaristi, trgovine z živalmi). Potrebno jih je prilagoditi na testno temperaturo vsaj en teden pred pričetkom izvajanja testa v vodi iz neonesnaženega potoka (pH 8.4, trdota 140 mg CaO/l, alkalnost 131 mg CaO/l) (ISO 7346-1:1996). Med prilagajanjem ribe dnevno hranimo s komercialno ribjo hrano in osvetljujemo po 12h dnevno s fluorescentno žarnico.

V akutnem strupenostnem testu z odraslimi ribami (*Danio rerio*) izpostavimo ribe v statičnem sistemu pri temperaturi $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Ribe so izpostavljene v 3 literskih akvarijskih posodah po 2,5 l vodnega vzorca s stalnim prezračevanjem. Mrtve ribe preštujemo in odstranimo iz posode vsak dan do 96h obdobja izpostavljenosti, odstotek smrtnosti izračunamo za vsako koncentracijo 24, 48, 72, in 96h (ISO 7346-1:1996).

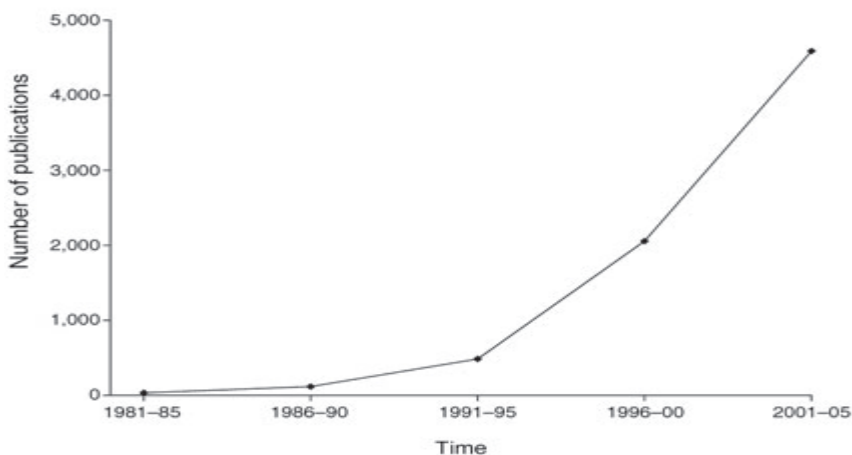
Akutni strupenostni test na zarodkih rib (*Danio rerio*) opravljamo po standardu ISO 15088 (2007). Za razliko od standardnega strupenostnega akutnega testa z ribami, izpostavimo in gojimo ribe pri temperaturi $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Ribe imamo v akvariju v termostatanem prostoru na $26 \pm 1^\circ\text{C}$, vanj pa postavljamo valilnik, kjer zbiramo ikre. Opazujemo letalne in subletalne spremembe (biomarkerje) razvoja zarodka po 48h.

2.3.3 Raziskave z zebricami v znanosti

Zebrica, *Danio rerio*, je postala pomembna v znanosti pred 25 leti (Slika 6), ker predstavlja pogosto uporabljen vretenčarski model v študijah genetskih osnov razvoja (Craig, 2006).

Zebrice uporabljajo kot model v številnih študijah na področju molekularne genetike, fiziologije, anatomije, ekotoksikologije (testiranje kemikalij, odpadnih vod, itd.), toksikogenomike (Bopp in sod., 2006), nevrologije in genetične raziskave. Zebrica je nedvomno zelo pomemben model v razvojni biologiji vretenčarjev. Zarodki zebric pa so postali pomembni za izvajanje strupenostnih testov v ekotoksikologiji (Nagel, 2002).

Zaradi majhnosti organizma, hitrega zunanega razvoja in lepo opazne morfologije je zebrica široko uporabna v raziskavah. Poleg tega se zebrice uporabljajo tudi za razumevanje mehanizmov delovanja različnih človeških bolezni, kot so rak, diabetes, ledvične bolezni, srčne bolezni, mišična distrofija, ipd. Hitri porast objavljenih znanstvenih študij z uporabo zebric za testni model, tudi nakazuje na vse večje zanimanje v modernih biomedicinskih raziskavah za delo z zebricami (Slika 6) (Craig, 2006).



Slika 6: Število objav v zadnjih 25 letih, ki vključujejo zebriice (*Danio rerio*) kot raziskovalni organizem (podatki iz elektronske baze PubMed, pod ključno besedo »zebrafish«; Craig, 2006)

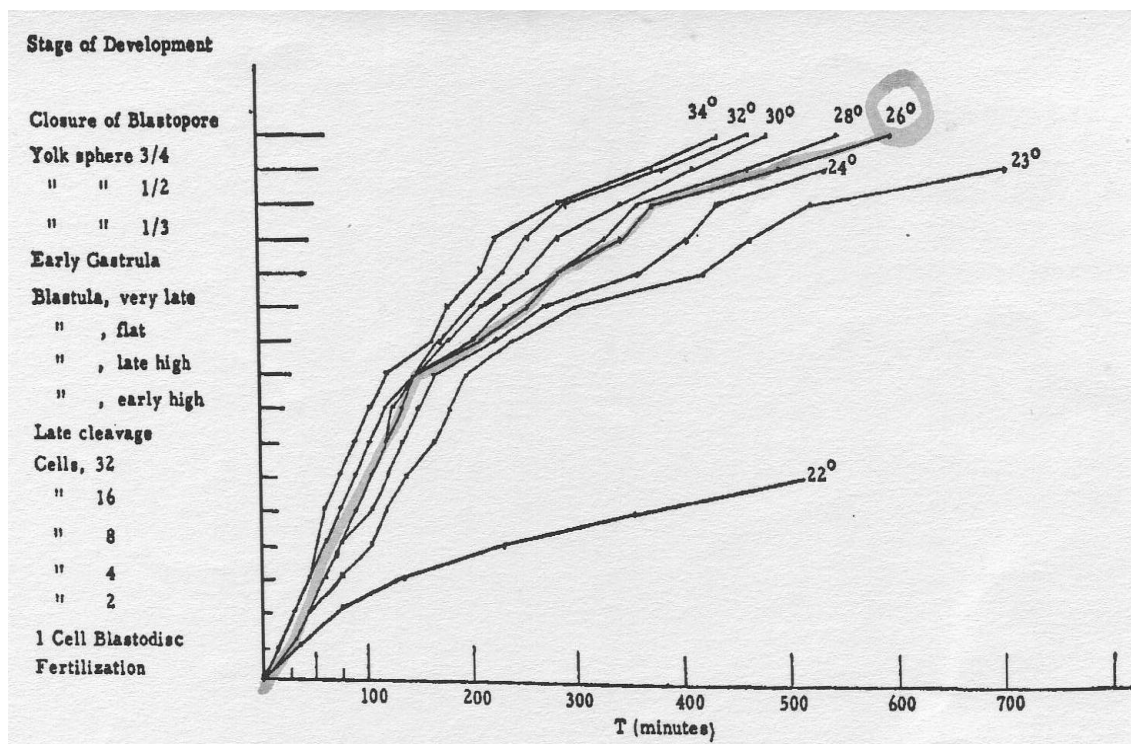
2.4 Strupenostni test z zarodki rib zebriic

S strupenostnim testom na zarodkih zebriic določamo akutno strupenost odpadnih vod in tudi kemikalij na zarodke zebriic (Brust (2001, alifatski amini), Kammann in sod. (2005, brominirani indoli in fenoli), Nagel (2002), itd.). Testiranih je bilo že veliko kemikalij, povzetek je objavljen v poročilu pripravljemem za nemško okoljevarstveno agencijo (Braunbeck in Lammer, 2006). Strupenost lahko določamo s pomočjo spremljanja letalnih (smrtnih) in subletalnih biomarkerjev (razmnoževanje, razvoj, gibanje, utrip, itd.). S pomočjo odziva na testno substanco pa določimo koncentracijo, ki povzroči 50% smrtnost opazovanih organizmov (LC_{50}) in koncentracijo, ki povzroči 50% učinek na opazovanih organizmih (EC_{50}).

2.4.1 Pregled pogojev v testih

2.4.1.1 Temperatura

Temperatura ima velik vpliv na zgodnje stopnje razvoja in s tem posledično na samo izvajanje akutnega strupenostnega testa na zarodkih zebriic. Schirone in Gross (1968) sta objavila članek, ki opisuje vpliv temperature na zgodnji embrionalni razvoj. Temperaturno območje je bilo med 13°C in 35°C . Po njunih ugotovitvah je v temperaturnem območju med 23°C in 34°C opaziti pravilno in uspešno delitev in razločen morfološki razvoj. Normalen in hiter pa je razvoj med 26°C in 30°C , zato je racionalnejše vzdrževanje nižje temperature (26°C), s podobnim učinkom kot pri 30°C . Odvisnost med temperaturo in potrebnim časom za doseg določenega stadija razvoja pa je prikazano na spodnji sliki (Slika 7).

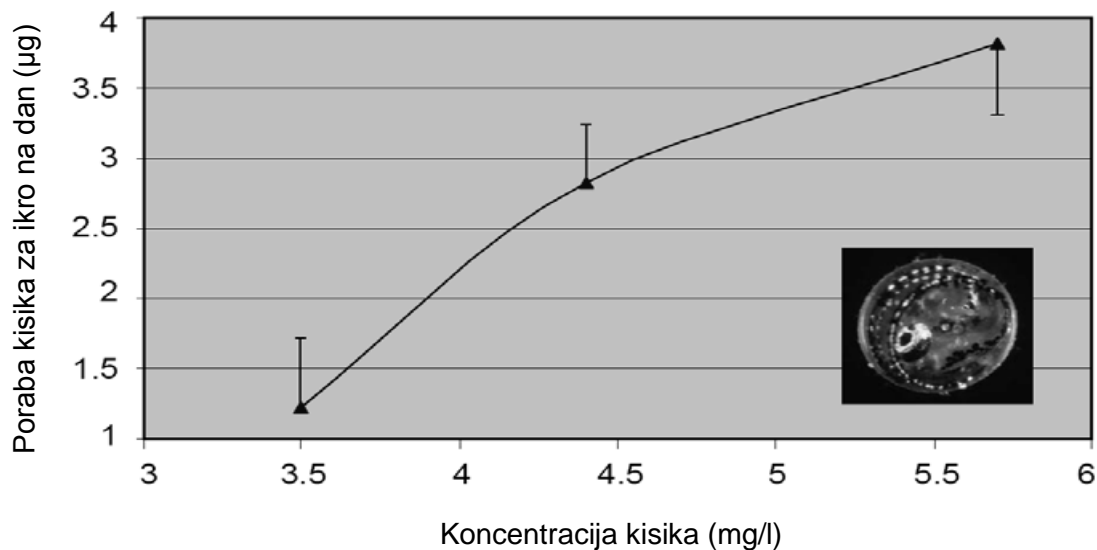


Slika 7: Potreben čas za dosego določenega stadija razvoja pri določeni temperaturi (Schirone in Gross, 1968)

2.4.1.2 Kisik

Inkubacija zarodkov zebrec pri različnih koncentracijah kisika v mediju je zaradi njihove sposobnosti adaptacije možna tudi pri nizkih vrednostih kisika. Več kisika kot dovajamo v medij, več kisika zarodki porabljajo, potem pa se poraba umiri (Slika 8). Zarodki zebrec niso pokazali simptomov poškodb (malformacij) pri koncentraciji 2 mg O₂/l, čeprav je koncentracija kisika v večini primerov za odrasle ribe družine krapov smrtna (Braunbeck in Lammer, 2006).

To odkritje je pomembno za testiranje strupenosti organskih snovi in odpadnih vod, saj se v njih kisik zaradi prisotnosti bakterij porablja. Pripravljene plošče z zarodki morajo imeti dovolj kisika, zato plošč ne pokrivamo z njihovim pokrovom, temveč le s folijo, ki preprečuje izhlapevanja iz plošč.



Slika 8: Razmerje med porabo kisika in koncentracijo kisika v razredčevalni vodi (Braunbeck in Lammer 2006)

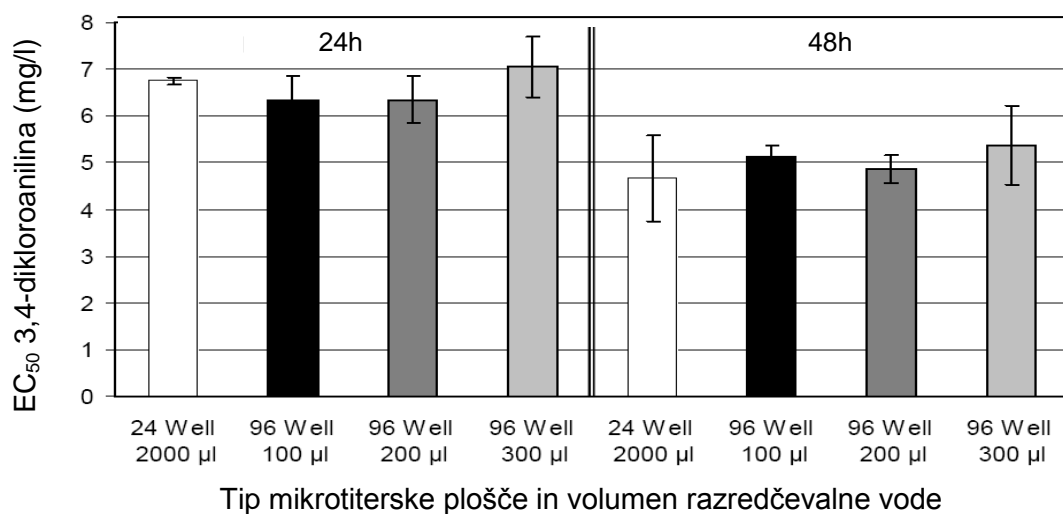
2.4.1.3 Svetloba

Svetloba je predpogoj za razvoj in rast zebrič, ki potrebujejo dnevni cikel 12h svetlobe in 12 h teme. Ob prižigu luči (svetloba) se prične valjenje jajčec in oplojevanje, ki traja približno pol ure. V primeru motenj svetlobnega cikla (npr.: 24 h svetloba) se njihov cikel valjenja poruši in posledično ni iker (jajčec).

2.4.1.4 Potreben volumen pripravljene razredčevalne vode za razvoj zarodka zebričice

Po standardu ni določen volumen testirane raztopine za individualni zarodek, predlagan pa je volumen 2 ml. Braunbeck in Lammer (2006) sta izvedla eksperiment z 3,4-dikloroanilinom, ki ni pokazal nobenih bistvenih sprememb glede na izpostavljenost različnim volumnom. Strupenost 3,4-dikloroanilina na zarodke zebrič pri različnih volumnih razredčevalne vode je prikazana na spodnji sliki (Slika 9).

Torej so lahko zarodki zebrič izpostavljeni ne samo v 24-mikrotiterskih ploščah z 2 ml pripravljene razredčevalne vode, temveč so lahko izpostavljeni tudi manjšim volumnom, celo 100 mikrolitrom v 96-mikrotiterskih ploščah. To omogoča, da je test na ribah, primeren za testiranje majhnih volumnov testnih substanc (npr.: metaboliti pesticidov), kar je ena izmed prednosti tega testa.



Slika 9: Strupenost 3,4-dikloroanilina na zarodke zebrec pri različnih volumnih razredčevalne vode (Braunbeck in Lammer, 2006)

2.4.1.5 Vpliv pH

Iz doktorske naloge Kristina Brust (2001) je razvidno, da testirano območje pH-ja od 8 do 11 nima vpliva na smrtnost zarodkov zebrec, pri višjih vrednostih pH-ja pa je opazen vpliv. V doktorski nalogi je bilo testirano območje pH-ja med 8 in 12.

2.4.1.6 Starost zarodkov ob izpostavitvi

Delitev iker na oplojene in neoplojene lahko opravimo, ko so ikre deljene vsaj na 4 celice, ker jih je prej težko ločevati. Za uporabo oplojenih iker (zarodkov) v testu pa naj bi po navedbah člankov (Brust, 2001; Nagel, 2002; Braunbeck in Lammer, 2006; OECD, 2006) bile jajčeca (ikre) v stadiju delitve od 4 do 32 celic. V standardu ISO 15088 (2007) je dovoljena uporaba iker v testu, ki so v stadiju delitve od 4 do 128 celic.

Starejše ikre so bolj nagnjene k večji stopnji spontanih poškodb (malformacij) in zaradi tega se jih ne uporablja za testiranje (Kammann, 2004).

2.5 Testirane kemikalije / onesnaževala

V svetu uporaba kemikalij narašča, informiranost o možnih škodljivih vplivih kemikalij na organizem je velikega pomena, predvsem iz stališča varstva okolja in zdravja. Za izbor testiranih kemikalij in onesnaževal smo se odločili na podlagi že pridobljenih rezultatov na odraslih zebrecih, kar nam je omogočilo tudi primerjanje občutljivosti testa na zarodkih zebrec s testom na odraslih zebrecih.

2.5.1 Insekticidi

Insekticidi so pesticidi, ki jih uporabljamo za zatiranje žuželk in s tem tudi za omejevanje širjenja bolezni, ki jih nekatere izmed njih prenašajo. Koncentracije, potrebne za učinkovitost anorganskih in organokovinskih pesticidov, so običajno precej strupene za človeka in druge sesalce. Obenem lahko v okolju ostanejo še dolgo časa po prenehanju uporabe. Organski pesticidi, ki so učinkoviti pri nižjih koncentracijah, v večini primerov niso biorazgradljivi (odstranjevanje organskih snovi iz okolja - sprememba v strukturi molekule) (Baird, 2003).

V diplomskem delu uporabljeni insekticidi niso namenjeni za uporabo v vodnih sistemih, temveč prehajajo v vodni sistem bodisi s pronicanjem, spiranjem s kmetijskih površin ob izdatnih padavinah ali med samim škropljenjem, ko veter odnaša del škropiva v bližnje vode. To je tudi razlog, da se izvajajo raziskave tudi v vodnih sistemih.

2.5.1.1 Neonikotinoidi

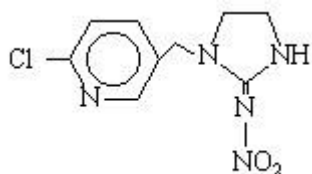
Novo generacijo pesticidov, ki izhaja iz naravnega insekticida nikotina, izoliranega iz rastlin, predstavljajo neonikotinoidni pesticidi. So sistemični insekticidi širokega spektra z močnim insekticidnim delovanjem ob stiku ali zaužitju (Cox, 2001).

Neonikotinoidni pesticidi skladno z evropsko direktivo o rastlinskih zaščitnih sredstvih (Council Directive 91/414/EEC:1991) delno nadomeščajo organofosfatne insekticide.

2.5.1.1.1 Imidakloprid

Imidakloprid je relativno nov, sistemični insekticid, prvič proizveden leta 1985 v podjetju Bayer, z namenom zatiranja škodljivcev, ki so bili odporni na insekticide. Leta 1994 je bil registriran v Združenih državah Amerike. Trenutno je to insekticid s hitro svetovno prodajno rastjo in je možen nadomestek široko uporabljenih organofosforinih pesticidov. Zaradi same mobilnosti imidakloprida v zemlji pa je tudi potencialni vodni onesnaževalec (Cox, 2001).

Imidakloprid (1-[(6-kloro-3-piridinil)metil]-2-imidazolidon)(Slika 10) je polaren, nehlapljiv, hidrolitsko stabilen insekticid, ki je visoko učinkovit za zatiranje škodljivcev (Gupta in sod., 2002), v zemlji pa razmeroma obstojen (Roberts in Hutson, 1999). Je kristalinično brezbarvna snov s šibkim karakterističnim vonjem (Fito-info, 12.5.2008).



Slika 10: Strukturna formula imidakloprida

Imidakloprid zaradi podobnosti naravnemu nikotinu uvrščamo v skupino nikotidnih kemikalij. Kot nikotin tudi imidakloprid vpliva na živčni sistem. Zaradi molekularne oblike, velikosti in naboja se tako nikotin kot nikotinoidi prilegajo na molekularni receptor živčnega sistema, ki je sicer namenjen vezavi molekule acetilholina, ki sproža prenos živčnega impulza iz ene živčne celice na drugo. Nikotinski acetilholinski

receptorji so prisotni tako pri žuželkah kot pri vretenčarjih, le da so pri prvih pogostejši na stiku med živčnimi celicami (v živčnem sistemu), pri vretenčarjih pa na stiku živčnih celic in mišic (Matsuda in sod., 2001).

Imidaklopid in drugi nikotinoidi torej ireverzibilno blokirajo acetilholinski receptor. To poteka tako, da se imidaklopid v sinapsah živčnih celic veže na postsinaptične nikotinske acetilholinske receptorje, kjer deluje kot agonist acetilholina. Afiniteta imidakloprida za vezavo na receptorje je pri insektih mnogo bolj izražena kot pri sesalcih. Zaradi selektivne strupenosti za žuželke in zato manjšega tveganja za človeka je zanimiv za komercialno uporabo (Matsuda in sod., 2001).

Imidaklopid obsega širok spekter uporabe:

- za zatiranje škodljivcev v kmetijskih dejavnostih,
- za zatiranje ščurkov in termitov v gospodinjstvih,
- za zdravljenje domačih živali,
- tretiranje trat in vrtno prsti, itd.

Sredstva za zatiranje vsebujejo različne koncentracije imidakloprida. V preglednici (Preglednica 2) je prikazan seznam registriranih sredstev v Sloveniji, ki vsebujejo imidaklopid (Informacijski sistem za varstvo rastlin... , 2008).

Preglednica 2: Seznam fitofarmaceutskih sredstev, registriranih v RS, ki vsebujejo imidaklopid

| Sredstvo, ki vsebuje imidaklopid | Tretirane rastline | Ciljni organi | Vsebnost imidakloprida |
|--|---|---|------------------------|
| CONFIDOR SL 200, KOHINOR SL 200 | breskev, češnja, hmelj, hruška, jablana, paprika, okrasne rastline, paradižnik, jajčevci, slive, paradižnik | bolšice, hmeljeve listne uši, listne uši, rastlinjakovi ščitkarji, resarji. Sadni listni duplinarji in zavrtači | 20 % |
| GAUCHO FS 350 | koruza | koruzni rilčkarji, listne uši, strune, svedske mušice | 35 % |
| GAUCHO WS 70 | sladkorna pesa | listne uši, mahovinarji, pesne muhe, pesni bolhači, strune | 70 % |

Imidaklopid ima tendenco, da ostaja v vodni raztopini zaradi njegove polarnosti, visoke topnosti v vodi, nizkega porazdelitvenega koeficienta K_{ow} in nizkega koeficienta sorpcije na delce zemlje. Mikroorganizmi prisotni v okolju (vodi in sedimentih) še dodatno pripomorejo k odstranjevanju imidakloprida iz naravnega vodnega okolja (Bayercropscience, 2002).

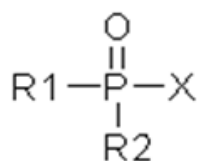
2.5.1.1.2 Confidor SL 200

Confidor SL 200 je pripravek, ki vsebuje imidaklopid (20 % imid.= 200g imid./l). Namenjen je za zatiranje škodljivcev, kot so listne uši, rastlinjakovi ščitkarji, koloradski

hrošč, škržati, resarji, itd. Delovanje imidakloprida se razlikuje od delovanja dosedanjih insekticidov, kar pomeni, da se v rastlini počasi razgradi in zato omogoča izredno učinkovito in dolgotrajno delovanje, brez možnosti navzkrižne rezistence. Ob pravilni uporabi v praksi je primeren za integrirano varstvo pred škodljivci. Rastline sredstvo zelo dobro prenašajo brez znakov fitotoksičnosti, kar dokazuje njegova registracija v več kot 90 državah sveta (Bayercropscience, 2008).

2.5.1.2 Organofosforni insekticidi

Organofosforni pesticidi (Slika 11) spadajo med neobstojepe pesticide, zato so iz tega vidika bolj sprejemljivi kot organoklorni pesticidi (Baird, 2001). Organofosfati so estri fosforne kisline in njenih derivatov.



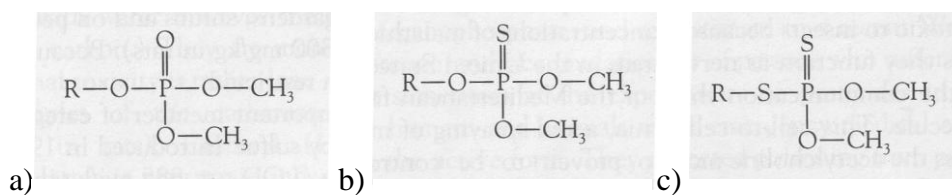
Slika 11 : Strukturna formula organofosfatov

Organofosfati se selektivno vežejo na acetilholinesterazo in s tem blokirajo njeno delovanje. Na ravni atomov bi lahko rekli, da se fosforjev atom iz organofosfata veže na encim in tvori vez med njima. Na sliki (Slika 11) je X izstopajoča skupina, ki v reakciji nukleofilne substitucije med organofosfatom in acetilholinesterazo zapusti kompleks kot anion. Prisotnost organofosfatne molekule onemogoča prenos impulza oziroma komunikacijo med dvema živčnima celicama. Daljše alkilne verige (R1, R2) zvečajo hidrofobnost, zaradi česar take molekule lažje prehajajo prek kože, celičnih membran, itd. (Baird, 2001).

Največjo skupino modernega kemijskega orožja predstavljajo organofosforne spojine, med katere spada tudi klormefos, ob akutni izpostavljenosti visokim dozam deluje na živčni sistem. Podobne snovi kot so organofosforni bojni strupi se uporabljajo tudi v kmetijstvu kot pesticidi (malation, paration, klormefos) (Kovačević in Majdič, 2007).

Organofosfati povzročajo ireverzibilno zaviranje acetilholinesteraze. Kot posledica zaviranja acetilholinesteraze se pri akutnih zastrupitvah z organofosfati čezmerno kopiči nepresnovljen acetilholin v centralnem in perifernem živčnem sistemu, krvi in drugih organih (Fito-info, 17.5.2008).

Organofosforne insekticide delimo na tri podskupine (Slika 12): fosfati, fosforotioati, fosforoditionati. Podskupine se pa med seboj ločijo po številu kisikovih oziroma žveplovih atomov, posledično se spreminjajo tudi njihove lastnosti (Baird, 2001).



Slika 12: Splošne formule organofosfornih podskupin: fosfat (a), fosforotioati (b), fosforoditionati (c) (Baird, 2001)

2.5.1.2.1 Klormefos

Klormefos je pesticid, ki ga uvrščamo med organofosforne insekticide. Njegovo kemijsko ime je S-klorometil O,O-dietil fosforotioat. Na sliki (Slika 13) je prikazana strukturna formula klormefosa. Je brezbarvna do rahlo obarvana tekočina, z močnim neprijetnim vonjem, topen pa je v organskih topilih (Fito-info , 15.5.2008).



Slika 13: Strukturna formula klormefosa

Dostopnih podatkov o strupenosti klormefosa na vodne organizme je zelo malo. Po študiji strupenosti (Tišler in sod., 2007) na vodne organizme, klormefos v vodi ni obstojen, saj so se koncentracije klormefosa občutno znižale glede na začetno vrednost. Ugotovili so tudi, da je nižanje koncentracije klormefosa posledica izhlapevanja, svetlobe ter povišane temperature. Vodne raztopine klormefosa se hrani v hladilniku, 2-8 °C, ker je izredno hlapen in pri tej temperaturi je padec koncentracije dosti manjši kot pri sobni temperaturi (Virant in sod., 2007).

2.5.2 Izcedne vode iz deponije na vtoku in iztoku čistilne naprave

Deponije odpadkov imajo škodljiv vpliv na bližnje in sosednje okolje, zlasti na vode, zrak, prst, rastlinstvo in živalstvo. Zato so opremljene in urejene deponije za odlaganje odpadnih snovi postale nujne za odlaganje odpadnih snovi in s tem varovanja okolja. Odpadki so snovi, ki nastajajo pri različnih procesih, povezanih s človekovim delovanjem in so njegovi stalni spremljevalci. Te snovi so v večji meri neuporabne in stremimo za tem, da jih ustrezno odložimo in v čimvečji meri predelamo in ponovno uporabimo. Čeprav so te snovi lahko sekundarni vir surovin ali energije, v njih večinoma vidimo le vir obremenjevanja okolja (Petrič, 2008).

Vodo, sestavljeno pretežno iz padavinske vode, ki je vdrla v deponijsko telo, iz onesnažene presežne vode iz odpadkov z visokim deležem vode in iz reakcijske vode, ki nastaja pri razgradnji odpadkov, imenujemo izcedna voda. Ta voda se izceja iz deponijskega telesa in je različno obremenjena z organskimi in anorganskimi snovmi. Sestava izcedne vode je odvisna predvsem od vrste in debeline sloja odloženih odpadkov, oblike in načina obratovanja deponije in fizikalno-kemijskih pogojev (temperatura, vlaga, itd.). Velika onesnaženost izcednih vod iz deponije z

najrazličnejšimi snovmi je pogosto vzrok za slabo ali neučinkovito čiščenje na najrazličnejših čistilnih napravah. Velik problem pri konstruiranju čistilnih naprav povzroča tudi stalno spreminjanje izcednih voda iz deponij in velika odvisnost njihove sestave od fizikalno-kemijskih dejavnikov in padavin. Problem izcednih vod je največkrat vsebnost različnih kovin (Cd, Co, Pb, Mn, Al, Cr, Cu, Zn), nitratov, itd.. Izcedne vode čistimo, da zmanjšujemo njihov vpliv na okolico, največkrat pa se poslužujemo bioloških (mikroorganizmi) in fizikalno-kemijskih (flokulacija, ionska izmenjava, termični postopki, itd.) postopkov. Izcedne vode iz komunalnih deponij so bolj strupene kot izcedne vode iz deponij posebnih in nevarnih odpadkov, razlog pa je v raznolikosti odloženih odpadkov (Petrič, 2008).

S kemijskimi analizami in biološkim testiranjem določamo kakovost odpadnih vod. S kemijskimi analizami lahko ugotovimo trenutno stanje, vrsto in količino strupene snovi, ne moremo pa ugotoviti, kakšen je vpliv strupenih snovi na organizme, to opravimo z biološkimi testi (strupenostnimi).

2.5.3 Topila

Topila so hlapne tekočine, ki imajo lastnost raztapljanja plinov, tekočin ali trdnih snovi pri čemer, kemična sestava topljenca in topila ostaneta nespremenjeni. Torej je snov, s pomočjo katere lahko neko substanco raztapljamo.

Pomembnejša topila:

- voda
- alifatski ogljikovodiki
- aromatski ogljikovodiki (ksilen in toluen)
- terpentin (topilo za smole in maščobe)
- alkoholi (metanol, etanol,...)
- estri (etil acetat in butil acetat)
- ketoni (aceton (propanon), butanon)

2.5.3.1 Aceton

Aceton, v organski kemiji znan kot propanon ali dimetil keton, je najpreprostejši predstavnik ketonov. Ta snov s formulo $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ raztaplja številne spojine, od anorganskih soli do ogljikovodikov. Zaradi tega je pomembno topilo za izvedbo številnih organskih reakcij (Atkins in sod., 1997).

Aceton je kemikalija, ki se nahaja v naravi (kot proizvod pri metabolizmi), lahko pa je tudi sintetičen. Normalno hitro razpade na ogljikov dioksid in vodo, zelo nizke koncentracije acetona najdemo v vsakem organizmu, pri bolnikih s sladkorno boleznijo pa je ta reakcija upočasnjena in posledično imajo višjo koncentracijo acetona v urinu (Kornhauser, 1998). Nastaja namreč pri razgradnji maščob in je nujno potreben pri sintezi sladkorja in telesu lastnih maščob. Aceton je brezbarvna, zelo hlapljiva tekočina z izrazitim vonjem in okusom. Uporablja se kot topilo za lake, za izdelavo umetnih mas, itd. ali kot dodatek drugim kemikalijam (pri proizvodnji plastik in zdravil) (Atkins in sod., 1997).

2.5.3.2 Etanol

Etanol je alkohol, katerega formula je C_2H_5OH . Pri sobni temperaturi je brezbarvna kapljevina, pogosto imenovana kar alkohol, ker se z njim najpogosteje srečujemo. Vsebujejo ga alkoholne pijače. V večjih količinah in koncentracijah je strupen (Atkins in sod., 1997).

Etanol v naravi predelujejo glive kvasovke iz sladkorja z alkoholnim vrenjem, pridobivamo pa ga tudi v petrokemiji, iz naftnih derivatov, zlasti z oksidacijo etilena (Šinkovec, 1993). Kvasovke pri večji koncentraciji etanola odmrejo, zato je neposredno z vrenjem možno doseči do največ 25% delež etanola (prostorninski delež). Večjo koncentracijo dobimo z destilacijo, kjer pa ni možno doseči 100-odstotne čistosti etanola, ampak le do teoretično 95,7% (azeotropna zmes) (Atkins in sod., 1997).

Etanol je uporaben kot razkužilo, topilo in gorivo. Da se etanola namenjenega za tehnično uporabo ne bi načrtno uporabljalo za alkoholne pijače, ki so močno obdavčene, ga naredijo neužitnega. To naredijo tako, da etanolu dodajo strupene snovi (npr.: metanol) ter snovi neprijetnega vonja in okusa (Kornhauser, 1998).

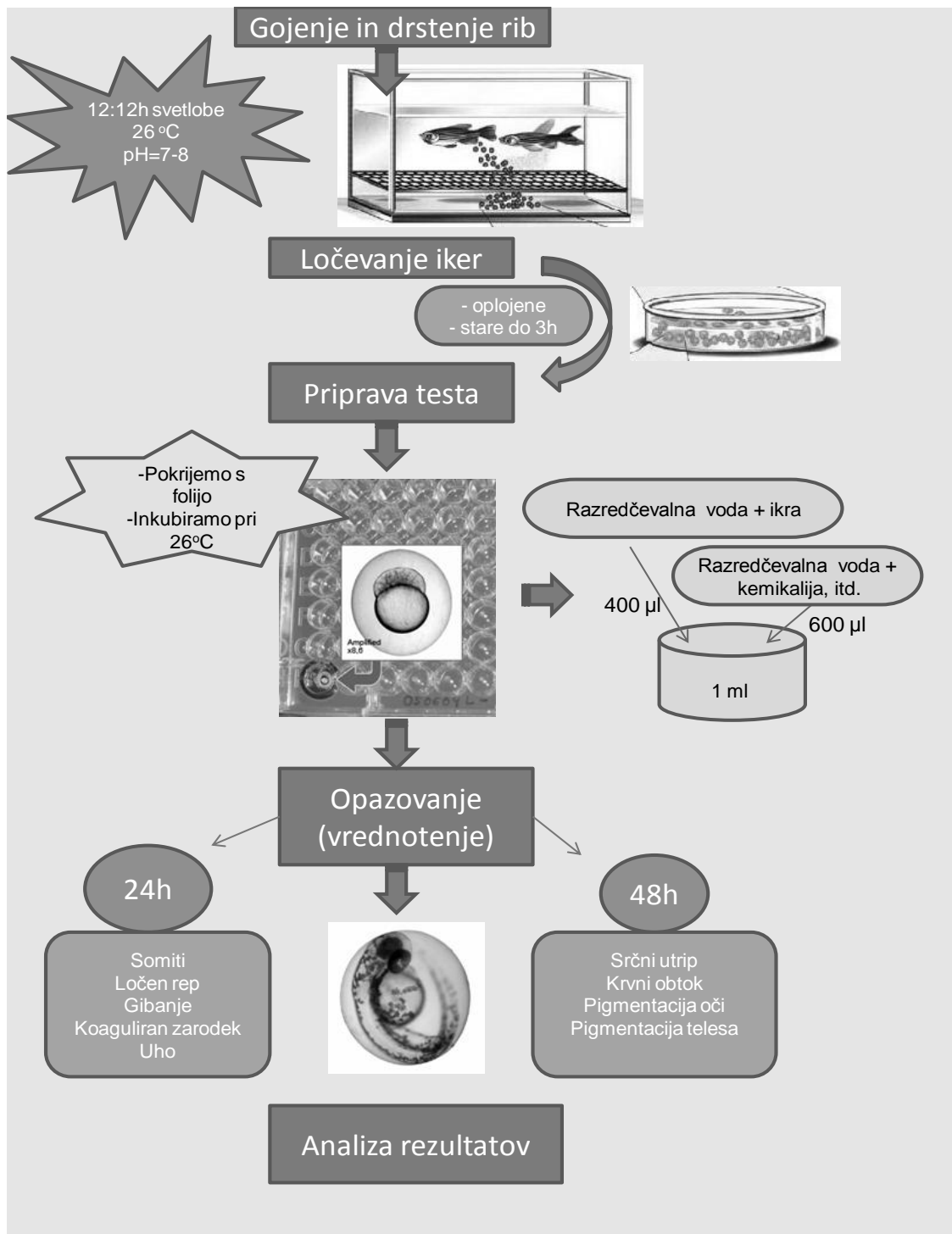
Etanol se uporablja kot gorivo že od nekdaj, vendar le kot pomožno ali zasilno gorivo. Gori mirno in popolno tudi brez posebno oblikovanega kurišča. V obdobju energetske krize 1973-1986 se je povečala uporaba etanola kot goriva, ki ga je možno pridobiti iz obnovljivih virov energije, predvsem iz biomase. Etanol naj bi delno zamenjal bencin v avtomobilizmu (Energenti, 2008).

2.5.3.3 Metanol

Metanol je enostaven alkohol, ki je strupen za ljudi in živali, ker se v telesu razgradi v mravljinčno kislino. Metanol, s formulo CH_3OH , spada med nasičene enovalentne alkohole. Je hlapljiva, brezbarvna tekočina, ki se z vodo meša v vsakem razmerju, raztaplja številne anorganske snovi slabše pa topi maščobe, olja in smolo. Gori z modrikastim plamenom v ogljikov dioksid (CO_2) in vodo (H_2O). Največ se uporablja za proizvodnjo umetnih mas, sredstev proti škodljivcem, uporablja pa se tudi kot topilo (Nafta-Petrochem, 2003). Metanol ni v prosti prodaji, kupijo ga lahko samo pooblaščen osebe. Prodaja se roza obarvan, z dodatkom neprijetnega vonja, kot svarilni znaki, da se prepreči uživanje.

3 MATERIAL IN METODE

Izvajanje strupenostnih preskusov je potekalo v več korakih, ki so predstavljeni na spodnji sliki (Slika 14).



Slika 14: Izvajanje strupenostnih testov z zarodki zebrič

3.1 Gojenje rib zebric

Ribe zebrice gojimo v termostatanem prostoru, ogrevanem na $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, brez dnevne svetlobe z režimom 12 h svetlobe (fluorescentna žarnica) in 12 h teme. Uporabljamo postano vodovodno vodo ali vodo iz neonesnaženega potoka. V 54 l akvariju imamo 45 rib zebric, dva samca na eno samico (Slika 15). Akvarij je opremljen z biološkim filtrom, ki skrbi za odstranjevanje amonijaka iz vode in pretočnim filtrom, ki skrbi za odstranjevanje iztrebkov in simulira gibanje vode v reki.



Slika 15: Akvarij z zebricami (*Danio rerio*) in valilnikom v levem in desnem kotu

Ribe zebrice hranimo trikrat dnevno s hrano, kupljeno v akvarističnih trgovinah. Priporočljiva je uporaba različne vrste hrane, tudi z vodnimi bolhami. Pozorni moramo biti, da rib ne hranimo preveč, ker se lahko pojavijo težave s pomanjkanjem kisika in amonijakom (previsok pH).

Enkrat tedensko čistimo akvarij in zamenjamo največ tretjino vode akvarija s postano vodo (vodo pustimo čez noč v termostatanem prostoru, da se primerno ogreje). Akvariju ne smemo čistiti ali menjavati vode en dan pred izvajanjem testov, ker moti drstenje. Čistoča akvarija je pomembna za uspešno pridobivanje iker.

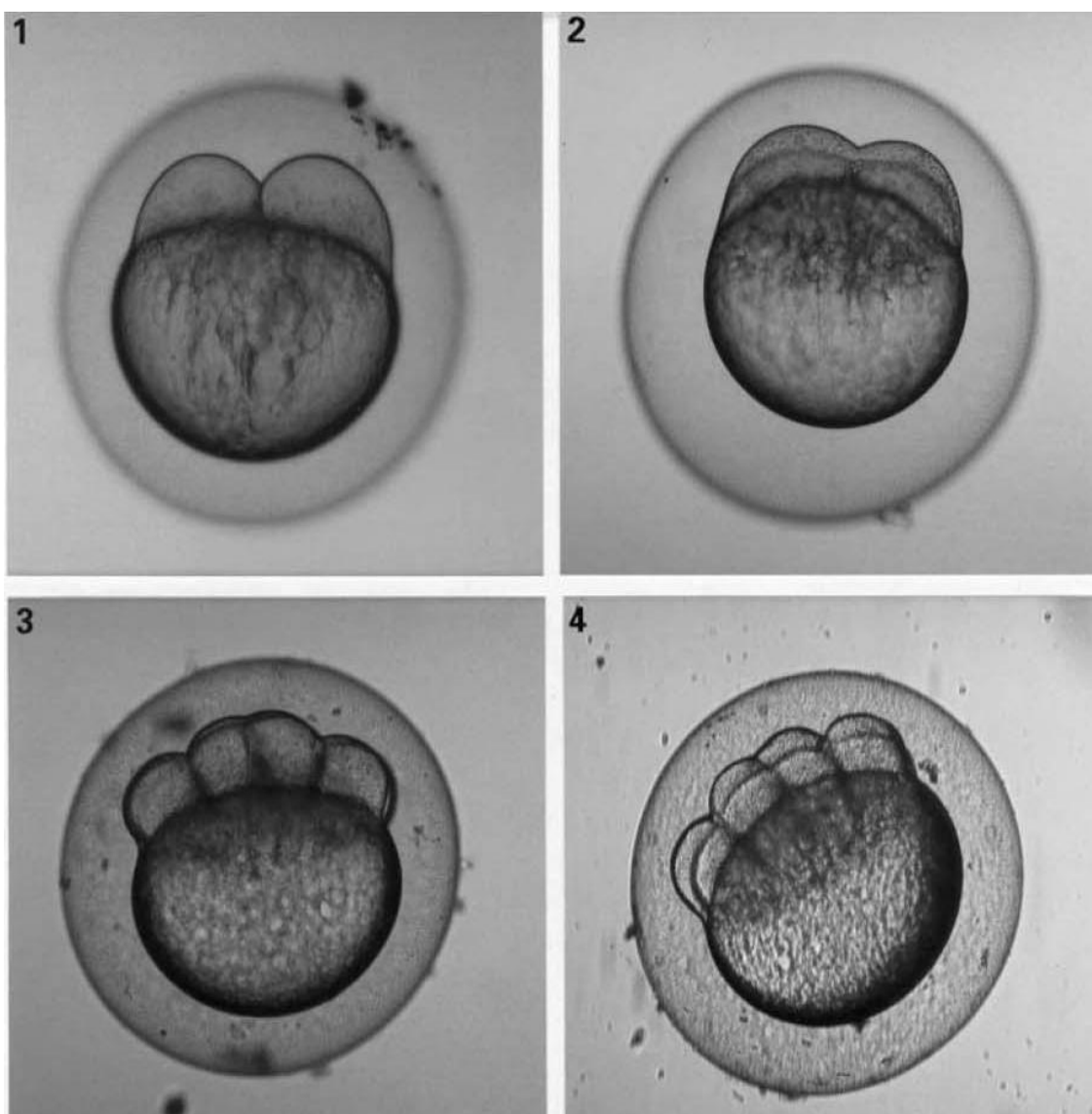
3.2 Drstenje in priprava iker za test

3.2.1 Zbiranje iker

Proti koncu delovnega dne v akvarij z zebricami postavimo valilnik za zbiranje iker. Valilnik je lahko narejen iz stekla ali plastike, v obliki globoke posode, preko katere je položena jeklena mrežica s kvadrati 5 mm. Nanjo so pritrjene plastične rastline in nekaj kroglic, da dajo skrivališče za drstenje. Izkušnje kažejo, da so najbolj primerne rastline zelene barve. Odložene ikre padejo skozi mrežo in so na ta način zaščitene pred odraslimi ribami, da jih ne pojedjo. Drstenje se prične takoj ko se prižgejo luči v akvariju in traja približno pol ure.

3.2.2 Priprava iker za test (ločevanje)

Iz valilnika vzamemo zbrane iker in jih precedimo preko plastičnega cedila (kovinski poškoduje iker). Na cedilu jih speremo s postano vodovodno vodo, da odstranimo praživali in prisotne drobne delce, nato speremo iker s pripravljeno razredčevalno vodo v petrijevko (z malo višjim robom). Za lažje ločevanje oplojenih in neoplojenih iker (Slika 16) postavimo petrijevko na temno podlago pod lupo (lupa - povečava cca. 30 x) in ob dodatni zunanji osvetlitvi pregledamo in ločimo iker. Neoplojene iker so tiste, ki imajo nad rumenjacom prazen prostor. Za izvedbo testa uporabimo iker, ki so bile oplojene približno isti čas (število celic nad rumenjacom) in morajo biti videti zdrave. Tako zbrane iker (oplojene) so pripravljene za izvedbo testa, potrebno pa jih je čimprej uporabiti (do 3 ure po prižigu luči (glej poglavje 4.1.3)), da se zarodek ne razvije prekomerno in da se na njih ne razmnožijo praživali, ki poškodujejo ikro.



Slika 16: Normalno oplojene iker zebrice (*Danio rerio*): (1) 0,75 h; (2) 1 h; (3) 1,2 h; (4) 1,5 h (Braunbeck & Lammer, 2006)

3.3 Izvedba testa

Test smo izvajali po standardu ISO 15088 (2007), ki je predlagan za določanje akutne strupenosti odpadnih vod na zarodkih zebrič. Predpisana razredčevalna voda vsebuje kalcijev klorid dihidrat, magnezijev sulfat heptahidrat, natrijev hidrogen karbonat in kalijev klorid (Preglednica 3). Za izvedbo testa se uporablja samo oplojene ikre s 4 do 128 celicami. Starost zarodkov ob izpostavitvi onesnaževalu je lahko do 3 h (glej poglavja 4.1.3). Test traja 48h pri temperaturi $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, do izvalitve pa običajno pride po 72h - 96h po oploditvi. Pri vsakem izvajanju testa moramo imeti poleg testnih koncentracij še kontrolo (pripravljena razredčevalna voda) in 3,4-dikloroanilin (referenčna kemikalija). V vsakem testu moramo imeti izpostavljenih najmanj 10 zarodkov za posamezno koncentracijo.

Parametrom, ki v standardu niso natančno predpisani, smo preverili njihov vpliv na rezultate (glej poglavje 3.3.3). Strupenostne teste smo izvedli v več ponovitvah. Najprej smo izvedli t.i. preliminarne teste, v katerih smo določili okvirno območje strupenosti. Nato smo z definitivnimi testi v ožjem koncentracijskem območju proučevali strupenost. Spodaj podajamo le pripravo raztopin za definitivne strupenostne teste, za katere v nadaljevanju podajamo tudi rezultate.

Test je veljaven če:

- smrtnost v kontroli ne presega 10%
- učinek na zarodke pri referenčni snovi (3,4-dikloroanilin) je od 10 - 90%

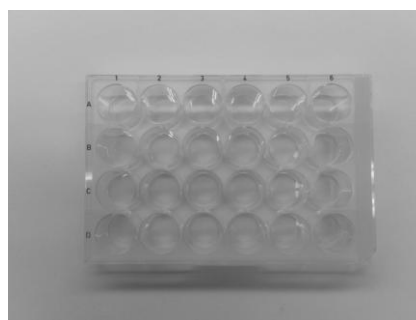
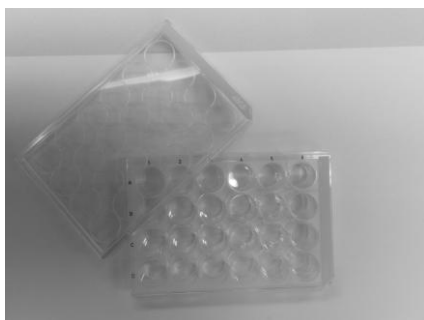
3.3.1 Priprava testnih plošč

Uporabljali smo testne plošče (Slika 17) narejene iz plastike, ki imajo 24 luknjic. Končni volumen testne raztopine v luknjici plošče je 1 ml. To izvedemo tako, da odpipetiramo:

- 600 μl kemikalije z pripravljeno razredčevalno vodo
- 400 μl razredčevalne vode z eno oplojeno ikro (zajamemo pod lupo).

Testno kontrolo smo pripravili z 600 μl pripravljene razredčevalne vode in 400 μl razredčevalne vode z eno oplojeno ikro.

Pri zajemanju oplojene ikre moramo biti pozorni, da jo ne poškodujemo. Kemikalijo smo dodajali poljubno glede na želeno koncentracijo, pomembno pa je, da se dogovorjeni skupni volumen (1ml) ohrani. Plošče smo inkubirali 48 h na $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ s svetlobnim režimom 12 h svetlobe in 12 h teme.



Slika 17: Testne plošče TPP 92421

3.3.2 Priprava razredčevalne vode

Razredčevalno vodo smo pripravili po standardu ISO 15088 (2007). Pripravili smo jo v 1L bučki tako, da smo dali nekaj destilirane vode v bučko, dodali potrebne soli (Preglednica 3) in dopolnili bučko z destilirano vodo do oznake. Bučko smo pretresli. Hranili smo jo v prostoru s stalno temperaturo $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Bučko smo pustili odprto in s tem omogočili dostop zraka, da se je razredčevalna voda obogatila s kisikom.

Preglednica 3: Vsebnost hranil v razredčevalni vodi (ISO 15088:2007)

| Kemikalija (sol) | Koncentracija snovi v razredčevalni vodi (mg/l) |
|---|---|
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 294,0 |
| $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ | 123,3 |
| NaHCO_3 | 63,0 |
| KCl | 5,5 |

3.3.3 Optimizacija izvedbe testa

Pred izvajanjem strupenostnega testa smo opravili optimizacijo testa. Najprej smo preverili vpliv različnih vrst razredčevalnih vod na razvoj zarodkov, vpliv pH-ja na razvoj zarodkov in vpliv različnih starosti zarodkov ob izpostavitvi onesnaževalu.

Po standardu ISO 15088 (2007) je predpisana uporaba razredčevalne vode (Preglednica 3). Zanimalo nas je, kako se razlikujejo učinki na zarodke, če uporabimo vodovodno vodo, postano vodovodno vodo (izločen vodni kamen) in po standardu predpisano razredčevalno vodo.

Zanimalo nas je tudi, če je potrebno razredčevalno vodo ob vsaki pripravi umerjati na $\text{pH} = 7,0$ ali to nima bistvenega vpliva na sam razvoj zarodka zebrice. Primerjali smo $\text{pH} = 7,0$ (nevtralno) in $\text{pH} = 8,0$, ki ga ima razredčevalna voda po sami pripravi.

Prepričati smo se želeli, če starost zarodka ob izpostavitvi vpliva na sam rezultat strupenostnega testa. Izpostavili smo zarodke različnih starosti (1h, 2h, 3h, 4h in 5h) pripravljeni razredčevalni vodi.

3.3.4 Priprava kemikalij za strupenostni test

V diplomskem delu smo testirali strupenost referenčne kemikalije (3,4-dikloroanilin), treh topil (aceton, metanol, etanol), nekaj onesnaževal (imidaklopid, Confidor SL 200, klormefos) in izcedne vode iz deponije na vtoku in iztoku čistilne naprave. Za testiranje kemikalij je bilo potrebno pripraviti primerne raztopine kemikalij, ki smo jih lahko uporabili v testih strupenosti.

3.3.4.1 Priprava referenčne kemikalije (3,4-dikloroanilin)

Referenčna kemikalija vsebuje 0,05 g 3,4-dikloroanilina (Merck) v 500 ml pripravljene razredčevalne vode. Test smo opravili v 3 poskusih.

3.3.4.2 Priprava topil (aceton, etanol, metanol)

Željen volumen topila (aceton, etanol, metanol) smo odpipetirali v luknjice na plošči, kjer smo predhodno namestili ustrezen volumen razredčevalne vode in nato dodali še oplojene ikre. Testirane koncentracije posameznega topila so podane v spodnjih preglednicah (Preglednica 4, Preglednica 5, Preglednica 6).

V preliminarnem testu za aceton smo uporabili najvišjo koncentracijo 5 % (v/v) acetona in nižje koncentracije: 0, 1, 2, 3 in 4 % (v/v). V definitivnem testu smo zarodke zebrič izpostavili koncentracijam: 0, 1, 1.5, 2 in 2.5 % (v/v). Test smo opravili v 4 ponovitvah.

Preglednica 4: Priprava testnih koncentracij acetona

| Testirana koncentracija acetona (%(v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|---|---------------------|
| | Volumen acetona (µl) | Volumen razredčevalne vode (µl) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (µl) | Skupni volumen (µl) |
| kontrola | / | 600 | 400 | 1000 |
| 1 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 1.5 | 15 | 585 | 400 | 1000 |
| 2 | 20 | 580 | 400 | 1000 |
| 2.5 | 25 | 575 | 400 | 1000 |

V preliminarnem testu za etanol smo uporabili najvišjo koncentracijo 5 % (v/v) etanola in nižje koncentracije: 0, 1, 2, 3 in 4 % (v/v). V definitivnem testu smo zarodke zebrič izpostavili koncentracijam: 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 in 3.5 % (v/v). Test smo opravili v 4 ponovitvah.

Preglednica 5: Priprava testnih koncentracij etanola

| Testirana koncentracija etanola (%(v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------|---|---------------------|
| | Volumen etanola (µl) | Volumen razredčevalne vode (µl) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (µl) | Skupni volumen (µl) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 1 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 1.5 | 15 | 585 | 400 | 1000 |
| 2 | 20 | 580 | 400 | 1000 |
| 2.5 | 25 | 575 | 400 | 1000 |
| 3 | 30 | 570 | 400 | 1000 |
| 3.5 | 35 | 565 | 400 | 1000 |

V preliminarnem testu za metanol smo uporabili najvišjo koncentracijo 5 % (v/v) metanola in nižje koncentracije: 0, 1, 2, 3 in 4 % (v/v). V definitivnem testu smo zarodke zebrič izpostavili koncentracijam: 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5 in 4 % (v/v). Test smo opravili v 3 ponovitvah.

Preglednica 6: Priprava testnih koncentracij metanola

| Testirana koncentracija metanola (%(v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|
| | Volumen metanola (μ l) | Volumen razredčevalne vode (μ l) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μ l) | Skupni volumen (μ l) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 1 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 2 | 20 | 580 | 400 | 1000 |
| 2.5 | 25 | 575 | 400 | 1000 |
| 3 | 30 | 570 | 400 | 1000 |
| 3.5 | 35 | 565 | 400 | 1000 |
| 4 | 40 | 560 | 400 | 1000 |

3.3.4.3 Priprava izhodnih raztopin onesnaževal

3.3.4.3.1 Imidaklopid

Imidaklopid je bela snov v obliki praška. Ker je izredno drag, so ga na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v sodelovanju z Univerzo v Novi Gorici sami ekstrahirali iz pripravka. Za izvedbo testa smo imidaklopid raztopili v razredčevalni vodi do koncentracije 400 mg/l, kar je blizu njegove maksimalne topnosti v vodi (0,51 do 0,61 g/l pri 20° C) (Jemec in sod., 2007). S pred pripravljeno koncentracijo 400 mg/l smo v testu lahko dejansko pripravili končno koncentracijo 320 mg/l, saj je potreben tudi vnos razredčevalne vode z oplojenim jajčecem (>200 μ l). Za pripravo 20ml raztopine s koncentracijo 400 mg/l je potrebno zatehtati 10 mg. Kemikalijo (imid.) smo pripravili v razredčevalni vodi, ker bi z uporabo destilirane vode zmanjševali količino soli v testu.

Imidaklopid je slabše topen, zato smo pripravek mešali na magnetnem mešalu približno eno uro. V bučko smo dali mešalo in jo zavili v aluminijasto folijo. Zaradi statičnosti imidakloprida (sposobnost lepljenja na stene), smo imidaklopid zatehtali v epico, kjer je izpostavljen manjšim površinam. V epico smo dodali razredčevalno vodo in vse skupaj stresali (vortex). Šele nato smo s pipeto odvzeli raztopino in jo dali v bučko. Nekajkrat smo postopek ponovili. Z razredčevalno vodo smo bučko z zatehtanim imidaklopidom dopolnili do oznake. Po enournem mešanju na magnetnem mešalu je bila željena raztopina pripravljena.

V definitivnem testu smo testirali naslednje koncentracije: 0 mg/l, 10 mg/l, 40 mg/l, 60 mg/l, 80 mg/l, 160 mg/l in 320 mg/l. Priprava posameznih koncentracij je prikazana v preglednici (Preglednica 7). Test smo opravili v 3 ponovitvah.

Preglednica 7: Priprava testnih koncentracij imidakloprida

| Testirana koncentracija imidakloprida (mg/l) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|--|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|
| | Izhodna raztopina 400mg/L (μ l) | Volumen razredčevalne vode (μ l) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μ l) | Skupni volumen (μ l) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 10 | 25 | 575 | 400 | 1000 |
| 40 | 100 | 500 | 400 | 1000 |
| 60 | 150 | 450 | 400 | 1000 |
| 80 | 200 | 400 | 400 | 1000 |
| 160 | 400 | 200 | 400 | 1000 |
| 320 | 800 | / | 200 | 1000 |

3.3.4.3.2 Confidor SL 200

Željen volumen Confidor SL 200 (Pinus Rače) smo odpipetirali v luknjico plošče, kamor smo predhodno dali ustrezen volumen razredčevalne vode. Ko smo pripravek vnesli na ploščo, smo dodali še oplojene ikre. Testiranje višjih koncentracij Confidorja SL 200 onemogoča njegova emulzija in penjenje. Testirali smo naslednje koncentracije: 0.1 % (v/v), 0.2 % (v/v), 0.4 % (v/v), 0.6 % (v/v), 0.8 % (v/v), 1 % (v/v), 1.2 % (v/v), 1.4 % (v/v) (Preglednica 8). Test smo opravili v 3 poskusih.

Preglednica 8: Priprava testnih koncentracij Confidorja SL 200

| Testirana koncentracija Confidorja SL 200 (%(v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------|
| | Confidor SL 200 (μ l) | Volumen razredčevalne vode (μ l) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μ l) | Skupni volumen (μ l) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 0.1 | 1 | 599 | 400 | 1000 |
| 0.2 | 2 | 598 | 400 | 1000 |
| 0.4 | 4 | 596 | 400 | 1000 |
| 0.6 | 6 | 594 | 400 | 1000 |
| 0.8 | 8 | 592 | 400 | 1000 |
| 1 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 1.2 | 12 | 588 | 400 | 1000 |
| 1.4 | 14 | 586 | 400 | 1000 |

3.3.4.3.3 Klormefos

Klormefos (Riedel-de Haen) ima zahtevnejšo predpripravo od zgoraj navedenih kemikalij. Je hlapen in močnega vonja, zato smo pri sami pripravi kemikalije uporabljali digestorij. Ker je slabo topen v vodi, smo ga raztapljali v etanolu. Etanol je strupen za zarodke, zato smo dodali vedno enak volumen etanola, ki pa je vseboval različne koncentracije klormefosa, ki smo jih predhodno pripravili v etanolu. S tem dosežemo enake pogoje v vseh luknjicah.

Naša izhodna raztopina (raztopina A) je bila 2000 mg/l klormefosa v etanolu. Ker klormefos razpada na svetlobi, smo raztopino hranili v temi in v hladilniku. Z redčenjem izhodne raztopine smo dobili željene koncentracije za testiranje (raztopina B). Testirali smo naslednje koncentracije: 0.1 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l (Preglednica 9). Test smo opravili v 3 ponovitvah, opravili pa smo tudi preskus v semi-statični izvedbi, kar pomeni, da smo po 24h zarodke prestavili na nove pripravljene plošče.

Preglednica 9: Priprava testnih koncentracij klormefosa

| Testirana koncentracija klormefosa (mg/l) | Priprava testirane koncentracije | | | | |
|---|--|--|---------------------------------------|---|---------------------------|
| | Raztopina B: Redčitve Izhodne raztopine (mg/l) | Dodatek redčene izhodne raztopine (raztopine B) (μ l) | Volumen razredčevalne vode (μ l) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μ l) | Skupni volumen (μ l) |
| 0 | / | / | 600 | 400 | 1000 |
| 0.1 | 10 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 0.5 | 50 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 1 | 100 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 5 | 500 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 10 | 1000 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 15 | 1500 | 10 | 590 | 400 | 1000 |
| 20 | 2000 | 10 | 590 | 400 | 1000 |

Za dodatek 1 % (v/v) etanola (10 μ l) smo se odločili na podlagi rezultatov testa z etanolom (glej poglavje 4.2.2.2)

3.3.4.3.4 Izcedne vode iz deponije

Izcedna voda je bila odvzeta na regionalni komunalni napravi, tako na vtoku (izcedna voda iz deponije) in na iztoku čistilne naprave. Za izvajane strupenostnega testa na zarodkih zebrič smo odpipetirali željene volumne izcedne vode v luknjice plošč, kjer smo že predhodno nalili ustrezen volumen razredčevalne vode. Po vnosu izcedne vode na ploščo smo dodali še oplojene ikre.

Za izcedne vode iz deponije na vtoku čistilne naprave smo testirali naslednje koncentracije: 2 % (v/v), 2.5 % (v/v), 3 % (v/v), 3.5 % (v/v), 4 % (v/v), 5 % (v/v) (Preglednica 10). Za izcedne vode iz deponije na iztoku čistilne naprave smo testirali naslednje koncentracije: 10 % (v/v), 15 % (v/v), 20 % (v/v), 25 % (v/v), 30 % (v/v), 35 % (v/v) (Preglednica 11). Teste smo opravili v 4 ponovitvah.

Ugotovili smo, da že hlapi izcedne vode iz deponije vplivajo na kontrolo, če je le ta na isti plošči kot izcedna voda. Zato smo pripravljali kontrolo na ločeni testni plošči kot izcedno vodo. Ti problemi so se pojavili le v primeru izcedne vode iz deponije na vtoku čistilne naprave, razlog za to je v visoki stopnji hlapljivih snovi. Izcedno vodo iz deponije na vtoku čistilne naprave smo filtrirali čez filter papir (0.2 μ m), ker je vsebovala veliko suspendiranih delcev.

Preglednica 10: Priprava testnih koncentracij izcedne vode na vtoku čistilne naprave

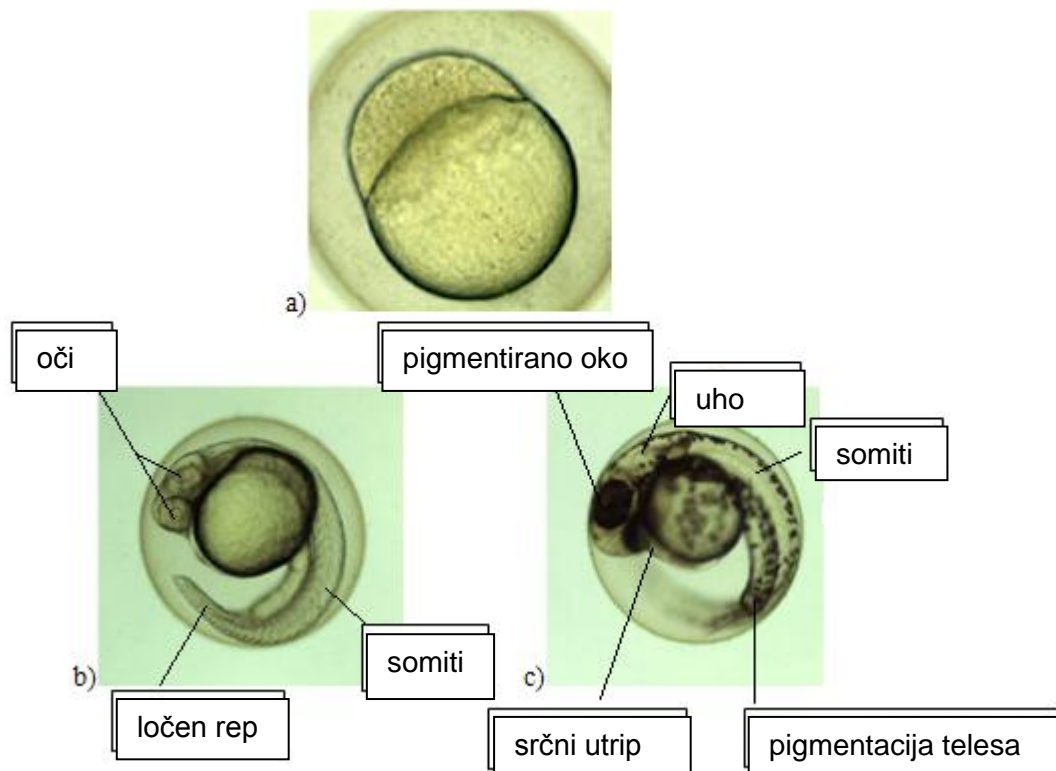
| Testirana koncentracija izcedna vode na vtoku (% (v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|---|---|--|--|----------------------------------|
| | Volumen izcedne vode na vtoku (μl) | Volumen razredčevalne vode (μl) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μl) | Skupni volumen (μl) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 2 | 20 | 580 | 400 | 1000 |
| 2.5 | 25 | 575 | 400 | 1000 |
| 3 | 30 | 570 | 400 | 1000 |
| 3.5 | 35 | 565 | 400 | 1000 |
| 4 | 40 | 560 | 400 | 1000 |
| 5 | 50 | 550 | 400 | 1000 |

Preglednica 11: Priprava testnih koncentracij izcedne vode na iztoku čistilne naprave

| Testirana koncentracija izcedna vode na iztoku (% (v/v)) | Priprava testirane koncentracije | | | |
|--|--|--|--|----------------------------------|
| | Volumen izcedne vode na iztoku (μl) | Volumen razredčevalne vode (μl) | Volumen razredčevalne vode z oplojeno ikro (μl) | Skupni volumen (μl) |
| 0 | / | 600 | 400 | 1000 |
| 10 | 100 | 500 | 400 | 1000 |
| 15 | 150 | 450 | 400 | 1000 |
| 20 | 200 | 400 | 400 | 1000 |
| 25 | 250 | 350 | 400 | 1000 |
| 30 | 300 | 300 | 400 | 1000 |
| 35 | 350 | 250 | 400 | 1000 |

3.4 Opazovanje biomarkerjev

Testne plošče z zarodki smo pregledovali po 24h in 48h. Za pregled po 24h smo se odločili predvsem zaradi možnosti, da lahko že po 24h sklepamo na stanje zarodka po 48h. V testih smo opazovali biomarkerje (spremembe), ki povzročijo smrt zarodka (letalne) in tiste, ki povzročijo učinek na razvoj zarodka, ki pa ni smrten (subletalne).



Slika 18: Različno stari zarodki zebrič: (a) 2.5 h, (b) 25h in (c) 40 h (Bachmann, 2002)

3.4.1 Letalni biomarkerji

- Odsotnost somitov

To so vretenca, ki so vidna že po 12h, pri njihovem opazovanju ni bilo težav.

- Ni ločen rep od rumenjaka

Opazujemo, če je rep ločen od rumenjaka ali ne. Problemi pa nastopijo pri zarodkih z deformacijo, ker je pri takih primerih nekoliko zahtevnejše opazovanje in je potrebna izurjenost opazovalca. Ločen rep od rumenjaka opazimo pri 24h opazovanju.

- Odsotnost srčnega utripa

Za spremljanje srčnega utripa je potrebno pazljivo spremljanje in praksa, ker utrip ni povsod lepo viden. Za lažje opazovanje smo uporabljali topo iglo, s katero smo si poskušali pripraviti najugodnejšo lego zarodka za opazovanje utripa. Srčni utrip se prične pojavljati od 24h starosti zarodka naprej. Opazen je pri 48h opazovanju.

- Mrtev zarodek - koaguliran

Pod lupo vidimo to kot črn krog. Je zelo enostaven za prepoznati. Koaguliran zarodek se prepozna pri 24h opazovanju. Drugače pa se koaguliran zarodek lahko prepozna že po nekaj urah izpostavljenosti zarodka onesnaževalu.

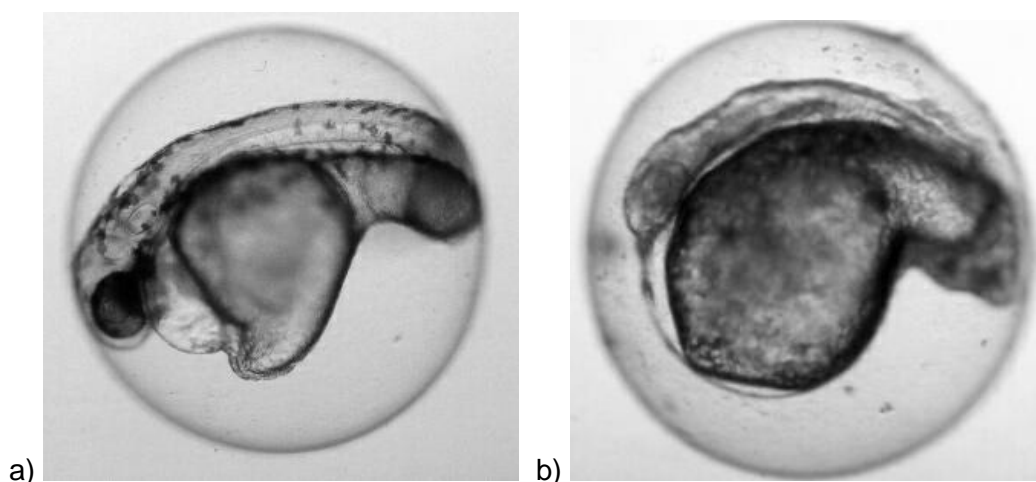
3.4.2 Subletalni biomarkerji

- Odsotnost pigmentacije

Že neintenzivno pigmentacijo smo obravnavali kot pigmentacijo telesa. Vidna je kot črne pike po celem telesu.

- Deformacije

Ta biomarker je težko opredeliti, kam bi ga uvrstili (glej poglavje 5.1.11). Na spodnji sliki (Slika 19) sta prikazana dva primera deformacij.



Slika 19: Primera deformiranih zarodkov po 48h (a) in 24h (b) (Bachmann, 2002)

- Odsotnost oči (po 12h so prvi zametki)

Oči so lepo in hitro vidne pod lupo, tako, da samo določanje njihove prisotnosti / odsotnosti ni povzročalo problemov.

- Odsotnost pigmenta v očeh

Zarodke z intenzivno (črno) pigmentacijo smo obravnavali kot zarodke s pigmentom v očeh.

- Odsotnost krvnega obtoka

Krvni obtok najlažje zaznamo v repu, seveda s pomočjo pravilne izostritve lupe, vidimo ga kot tekoče prozorne črtice. Motnost zarodka otežuje zaznavo obtoka.

- Odsotnost ušesa (po 1h prvi zametki)

Uho je lepo vidno ob pravi izostritvi (ravnini) lupe oziroma z malo prakse.

- Odsotnost gibanja

Da bi nezanesljivost tega biomarkerja čimbolj zmanjšali, smo opazovali zarodek 10 sekund in s pomočjo tope igle poskusili vzpodbuditi zarodek k gibanju. Njegovo spremljanje je vprašljivo (glej poglavje 5.1.1).

3.5 Vrednotenje rezultatov

Rezultate smo vrednotili s pomočjo izračuna EC_{50} in LC_{50} za posamezno spremembo. Za prikaz ponovljivosti rezultatov med testi smo uporabili preglednice EC_{50}/LC_{50} , grafe EC_{50}/LC_{50} in izračunali koeficiente variacije. Prikazovanje rezultatov ločimo na 24h in 48h opazovanje, posamezni graf prikazuje vse opazovane spremembe na zarodkih.

3.5.1 EC_{50} / LC_{50}

Na podlagi pridobljenih rezultatov smo naredili raztreseni graf in sicer odvisnost učinka od koncentracije (% opazovane spremembe na zarodkih), pri tem uporabimo logaritemsko skalo za koncentracijo. Z enačbo premice lahko v primeru subletalnih biomarkerjev izračunamo EC_{50} vrednosti in v primeru letalnih biomarkerjev LC_{50} vrednosti.

3.5.2 Koeficient variacije

Za oceno ponovljivosti rezultatov med testi, smo uporabili izračun koeficienta variacije (KV), ki prikazuje razpršitev statističnih enot okoli aritmetične sredine (povprečja) njihove statistične populacije. Definiran je kot razmerje med standardnim odklonom (σ) in aritmetično sredino (\bar{x}). Od standardnega odklona, ki prav tako prikazuje razpršenost statističnih enot, pa se razlikuje po tem, da je merjen v odstotkih in ga je zato moč uporabiti za primerjavo razpršenosti enot različnih statističnih populacij. Koeficient variacije je izračunan po spodnji formuli (Slika 20) (Košmelj, 2001).

$$KV = \frac{100\sigma}{\bar{x}}$$

Slika 20: Formula koeficienta variacije

4 REZULTATI Z DISKUSIJO

Spremembe na zarodkih zebrič smo opazovali oziroma vrednotili po 24h in 48h. Najpogostejši telesni znaki razvoja zarodka po 24h so naslednji: somiti, ločen rep, gibanje, oči, uho in koaguliran zarodek. Po 48h pa je moč opaziti tudi srčni utrip, krvni obtok, pigmentacijo telesa in pigmentacijo oči.

4.1 Optimizacija strupenostnih testov

Pred izvajanjem testov strupenosti onesnaževal smo preverili, kako na razvoj zarodkov vplivajo različne fizikalno-kemijske razmere. Zanimalo nas je, ali je razvoj različen v različnih vrstah vod, v pogojih z različnim pH ter ali je odvisen od starosti zarodkov ob pričetku testa. V vseh teh preskusih smo opazovali razvoj zarodkov v kontrolnih raztopinah brez dodanih kemikalij.

4.1.1 Vpliv različnih vrst razredčevalnih vod na razvoj zarodka

Zanimalo nas je, kako vplivajo različne vrste razredčevalnih vod na razvoj zarodkov, kot so vodovodna voda, postana vodovodna voda (izločen vodni kamen) in po standardu predpisana razredčevalna voda. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da ni bistvenih razlik med uporabljenimi vodami.

Prednost pripravljene razredčevalne vode je v tem, da se s časom ne spreminja in da poznamo njeno sestavo, česar pri vodovodni in postani vodovodni vodi ne moremo zatrjevati. Glede na to, da so odzivi pri vseh uporabljenih vodah skoraj enaki, je bolj smiselno uporabiti razredčevalno vodo, ki nam zagotavlja stalno in znano količino soli.

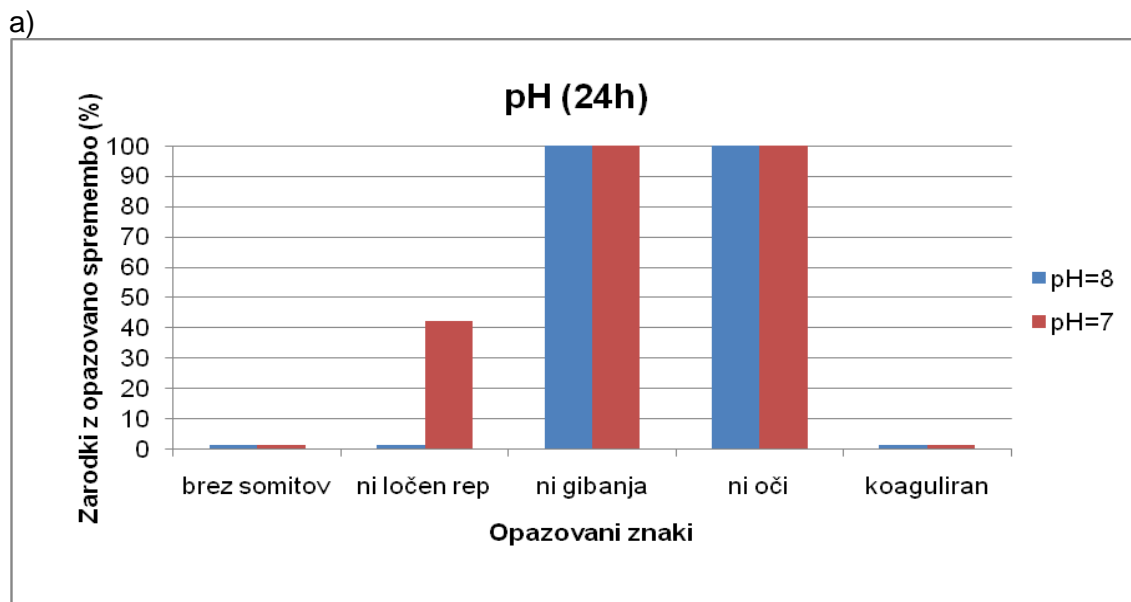




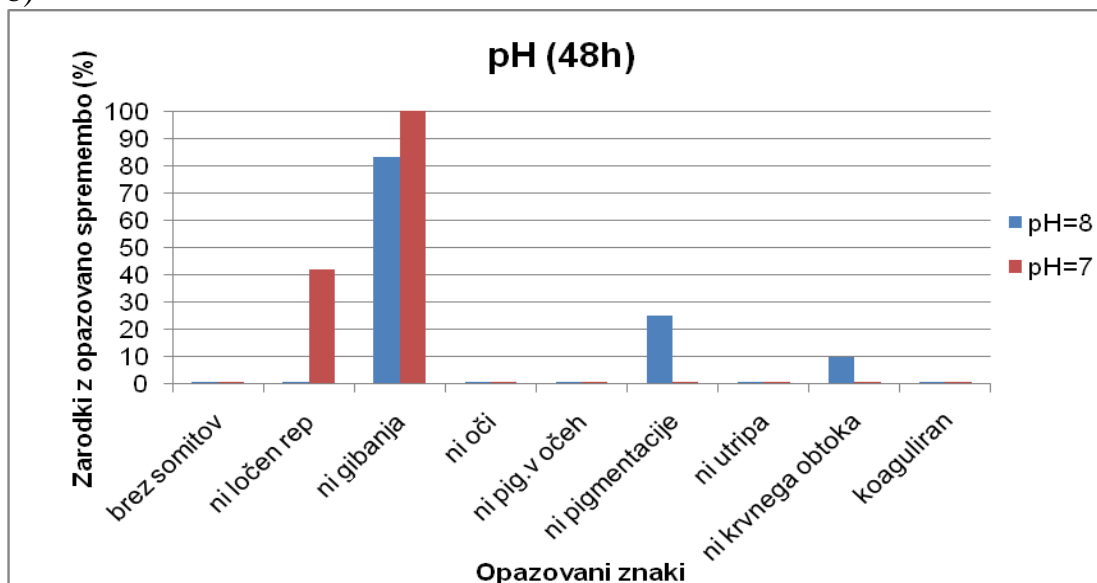
Slika 21: Vpliv različnih vrst vod na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.1.2 Vpliv pH na razvoj zarodka

Strupenostni test je bil opravljen za pripravljeno razredčevalno vodo z različno pH vrednostjo (7,0 in 8,0). Opravljen test potrjuje, da pripravljena razredčevalna voda s pH=8,0 in z pH=7,0 le malo vplivata na bi markerje razvoja zarodka. Zato se nismo odločili za umerjanje razredčevalne vode na pH=7,0, kot je priporočeno v standardu.



b)



Slika 22: Vpliv pH-ja na razvoj zarodka po 24h (a) in 48h (b)

V preskusih vpliva različnih vod in pH nismo spremljali razvoja ušesa, ker v času izvajanja teh preliminarnih preskusov še nismo bili pozorni na njegovo pojavljanje. Po 24h smo v nasprotju z nadaljnimi preskusi ugotovili, da večina zarodkov še nima razvitih oči. V tem primeru je do tega prišlo zato, ker je bila v danem primeru temperatura 23°C namesto 26°C kot v testih strupenostih.

4.1.3 Vpliv različnih starosti zarodkov ob izpostavitvi

S pomočjo testov, ki so bili opravljeni pri različnih starostih zarodkov (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h) ob izpostavitvi pripravljeni razredčevalni vodi brez kemikalij, smo prišli do zaključka, da je starost izpostavljenega zarodka pomembna. Pri zarodkih starih do 3h ob izpostavitvi nismo opazili bistvenega razlikovanja v razvoju zarodka. Pri zarodkih starih 4h in 5h pa smo opazili že večji vpliv na razvoj zarodka. Test smo naredili v dveh ponovitvah, rezultati so bili ponovljivi. Na sliki (Slika 23) je lepo viden trend, da z naraščajočo starostjo izpostavljenih zarodkov narašča vpliv na opazovane biomarkerje. Iz tega lahko zaključimo, da se s starostjo zarodkov povečuje njihova občutljivost.

Zato smo v strupenostnem testu na zarodkih zebri uporabljali zarodke stare do 3h, ker je procent zarodkov z opazovano spremembo pod 10% kot predpisuje standard (ISO 15088:2007). S tem se izognemo vplivu starosti zarodkov na rezultate. Starost zarodka se šteje od pričetka valjenja iker (ko se luč prižge v akvariju) pa do časa izpostavitve danemu onesnaževalu.

a)



b)



Slika 23: Vpliv različnih starosti zarodkov na razvoj zarodkov ob 24h (a) in 48h (b) izpostavitvi pripravljeni razredčevalni vodi

4.2 Strupenostni test

4.2.1 Testiranje strupenosti 3,4 – dikloroanilina (referenčna kemikalija)

Za referenčno kemikalijo testa strupenosti na zarodkih zebri nismo izvedli preliminarnih testov, ker je strupenost poznana. V definitivnem testu smo izpostavili

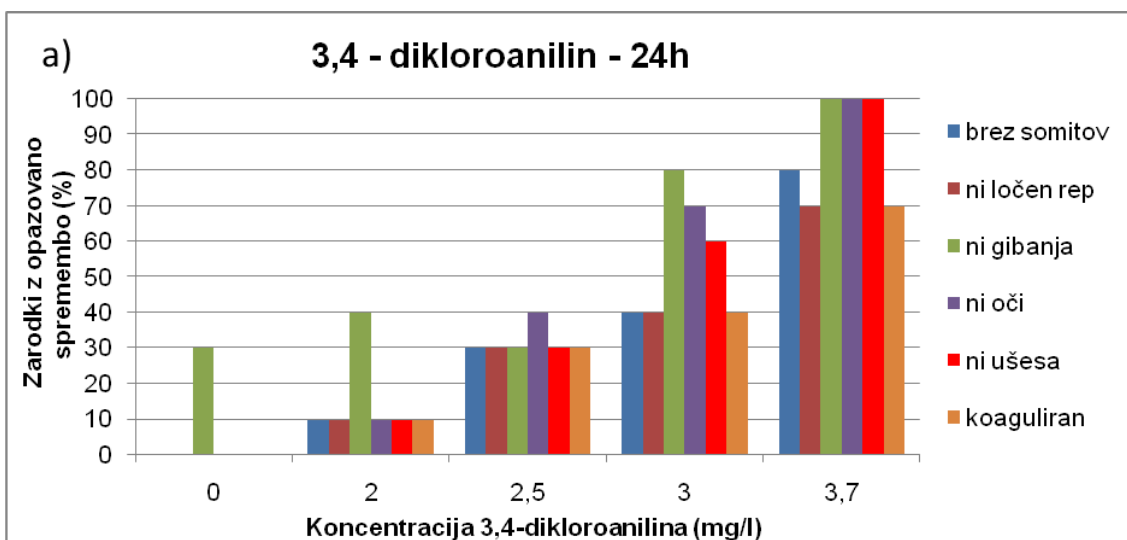
zarodke zebrič poleg predpisani koncentraciji (3,7 mg/l) še naslednjim koncentracijam: 0, 2, 2.5 in 3 mg/l, na podlagi katerih smo izračunali EC_{50} vrednosti po 24h in 48h izpostavljanja (glej poglavje 4.3.1).

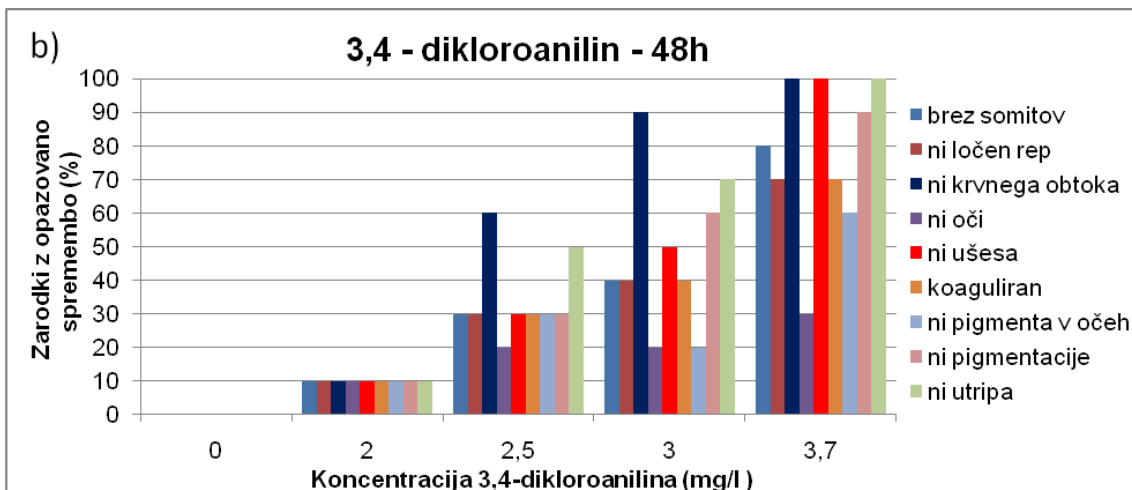
Za omenjeno referenčno kemikalijo ima predpisan standard (ISO 15088:2007) zelo široko območje delovanja, da je test veljaven. Po standardu predpisano mora biti učinek testirane substance pri koncentraciji 3,7 mg/l 3,4-dikloroanilina večji od 10 %. Po standardu ni natančno predpisano, kateri odziv se pri tem upošteva. Iz naših rezultatov (Slika 24) pa je razvidno, da je pri omenjeni koncentraciji po 24 h in 48 h učinek na večino biomarkerjev zelo visok (velikokrat kar 100 %). Opazili smo, da že koncentracija višja od 2 mg/l izpolnjuje predpisani pogoj za veljavnost testa po standardu. Pri koncentraciji 3,7 mg/l je namreč zelo pogosto učinek koaguliranega zarodka ali deformacij blizu 100 %. Veliko število deformacij in motnosti zarodkov, pa otežujejo samo spremljanje ostalih biomarkerjev.

Na podlagi teh testov smo se odločili, da uporabimo koncentracijo 2,5 mg/l kot našo pozitivno kontrolo (referenčno kemikalijo). Ugotovili smo, da ima ta koncentracija večjo informativno vrednost o tem, ali je test izveden korektno.

Iz danega testa (Slika 24) je razvidno, da odziv vseh opazovanih biomarkerjev po 24h izpostavljanja narašča s koncentracijo 3,4-dikloroanilina, kasneje po 48h pa se biomarker »ni pigmenta v očeh« ne povečuje z naraščajočo koncentracijo, vendar so odstopanja majhna. Tako lahko rečemo, da z naraščajočo koncentracijo 3,4-dikloroanilina narašča vpliv na opazovane biomarkerje.

Zaviranje razvoja zarodka z naraščajočo koncentracijo 3,4-dikloroanilina je lepo razvidno iz podanega testa (Slika 24). Test smo naredili v treh ponovitvah in rezultati so bili ponovljivi (gle poglavje 4.3.1).





Slika 24: Vpliv 3,4-dikloroanilina na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

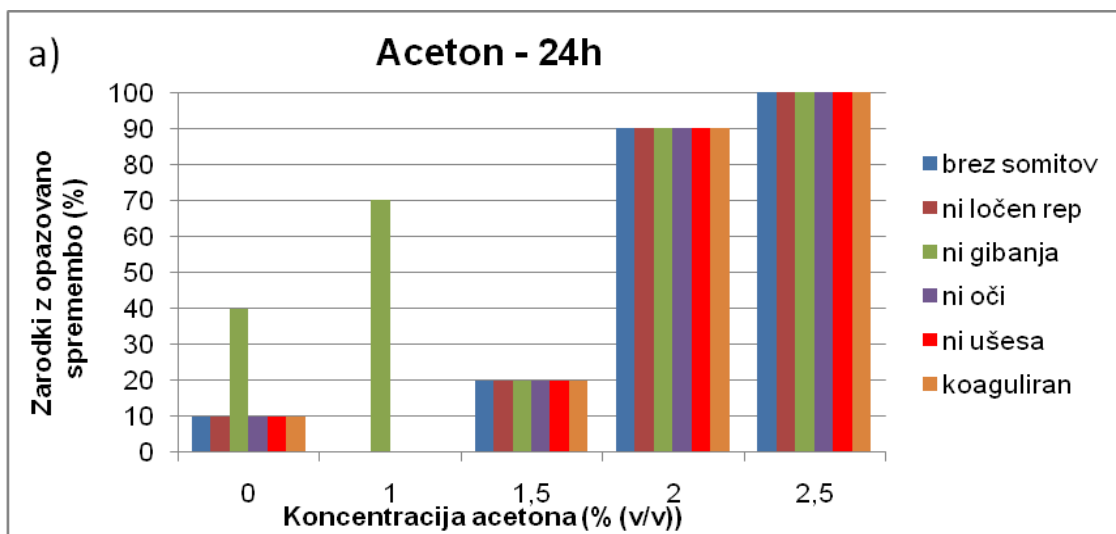
4.2.2 Testiranje strupenosti topil

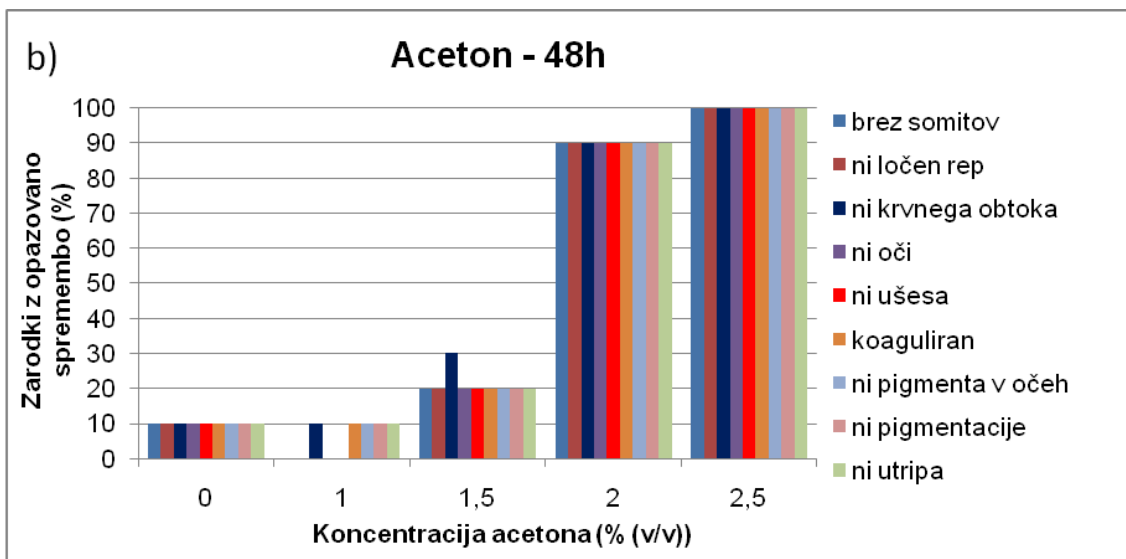
Iz dobljenih rezultatov za testirana topila lahko sklepamo, da so zarodki zebrič precej občutljivi na topila. Opazovani učinki na testirana topila: aceton, etanol in metanol, so v vseh primerih odvisni od koncentracije. To nakazuje, da imajo zarodki zebrič enak odziv na testirana topila.

4.2.2.1 Aceton

V definitivnem testu smo zarodke zebrič izpostavili koncentracijam: 0, 1, 1.5, 2 in 2.5 % (v/v) (Slika 25).

Rezultati po 24h so skoraj enaki kot po 48h, z naraščajočo koncentracijo acetona narašča vpliv na opazovane biomarkerje. Opazovani biomarkerji imajo enake odzive pri posameznih koncentracijah, izjema je le gibanje.



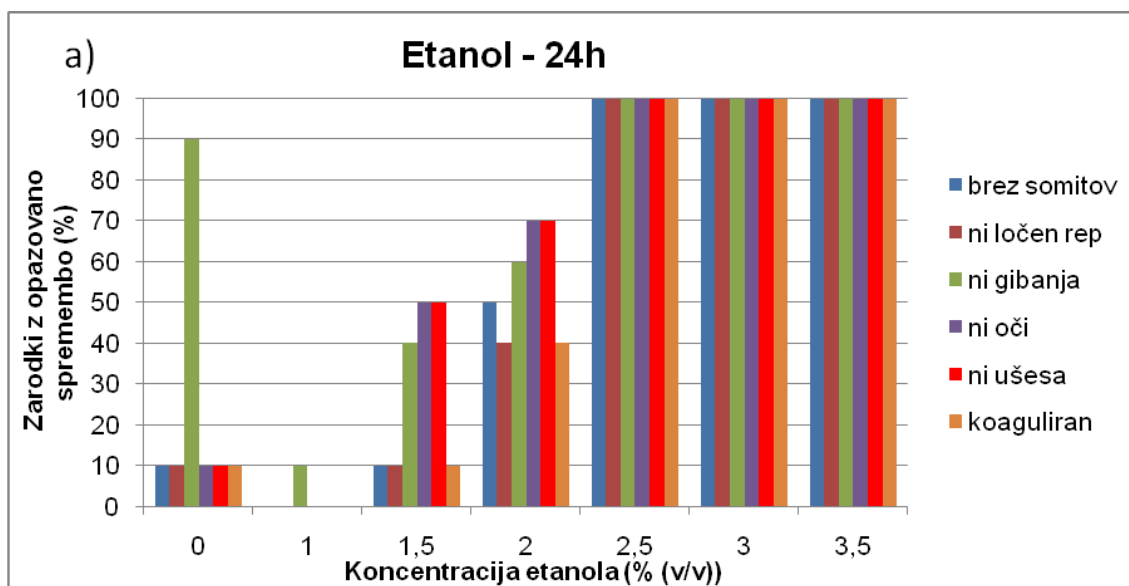


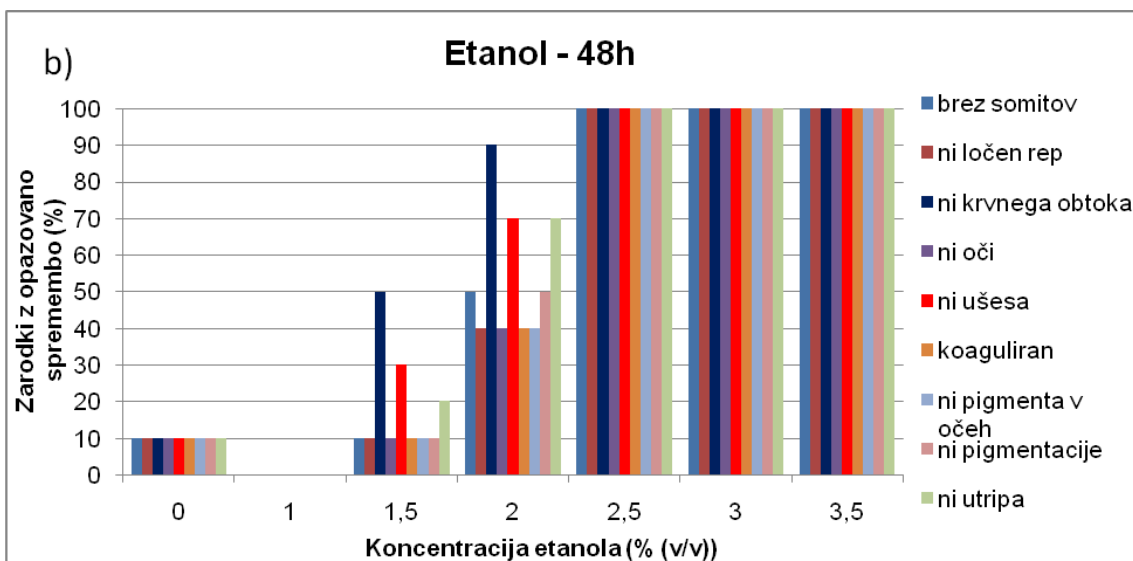
Slika 25: Vpliv acetona na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.2.2.2 Etanol

V definitivnem testu smo zarodke zebri izpostavili koncentracijam: 0, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 in 3,5 % (v/v) (Slika 26).

Rezultati po 24h so podobni kot po 48h, z naraščajočo koncentracijo etanola narašča vpliv na opazovane biomarkerje.



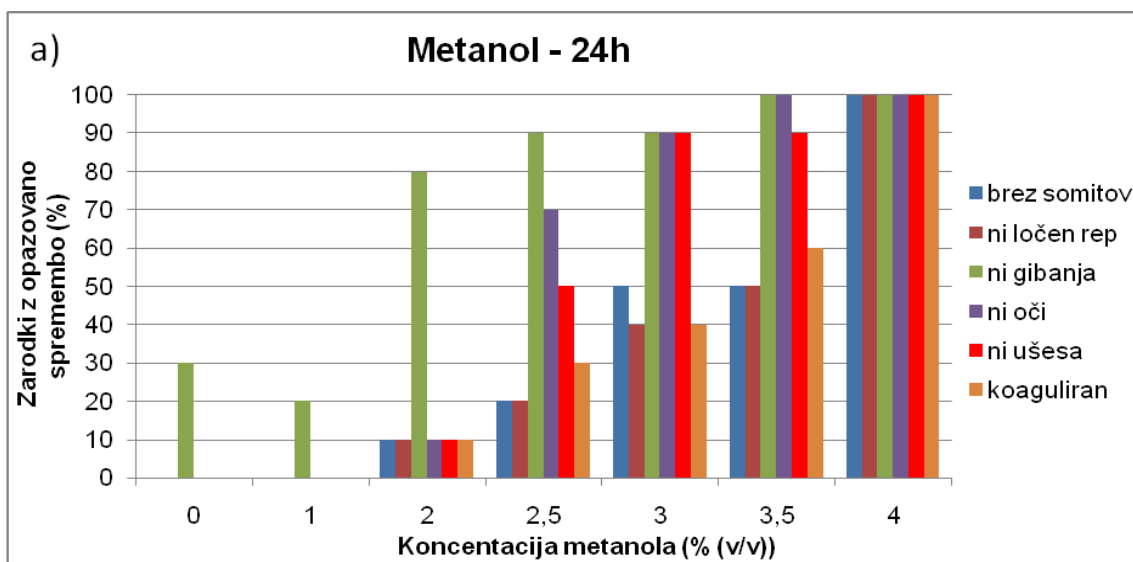


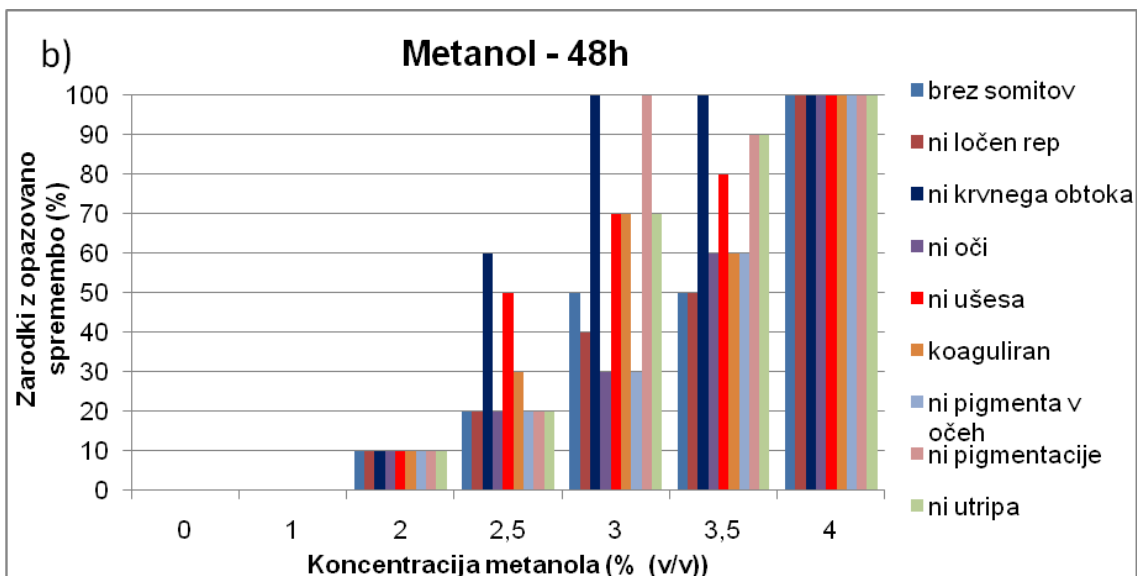
Slika 26: Vpliv etanola na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.2.2.3 Metanol

V definitivnem testu smo zarodke zebrec izpostavili koncentracijam: 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5 in 4 % (v/v) (Slika 27).

Rezultati po 24h so podobni kot po 48h, z naraščajočo koncentracijo metanola narašča vpliv na opazovane biomarkerje.





Slika 27: Vpliv metanola na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.2.3 Testiranje strupenosti onesnaževal

4.2.3.1 Imidaklopid

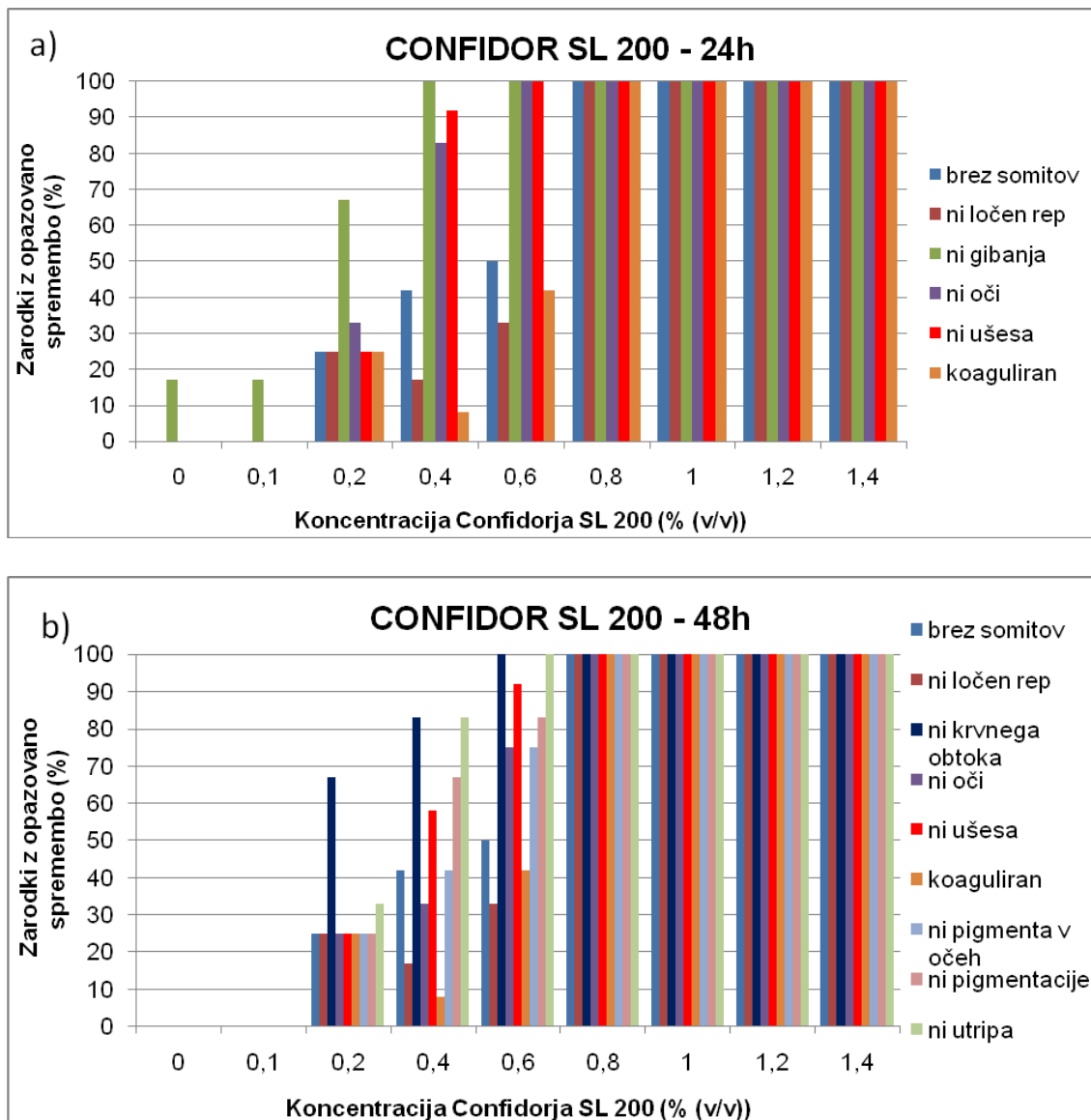
Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da imidaklopid vključno s koncentracijo 320 mg/l ne vpliva na sam razvoj zarodka. Test smo ponovili trikrat in rezultati so bili ponovljivi.

Na podlagi rezultatov strupenosti imidakloprida na odrasle zebriice (Kemijski inštitut, 2007) smo pričakovali, da bo test na zarodkih zebriic bolj občutljiv, vendar so rezultati pokazali drugače. Pri odraslih zebriicah je bil 48h LC_{50} 241 mg/l (Kemijski inštitut, 2007), na zarodkih zebriic pa ni bilo vpliva pri koncentraciji 320 mg/l. S podaljšanjem časa izpostavitve odraslih rib, njihova občutljivost počasi narašča, po 48h pa se ustali (24h LC_{50} = 244mg/l, 48-96h LC_{50} = 241mg/l) (Kemijski inštitut, 2007). Razlog za nižjo občutljivost zarodkov na imidaklopid je po našem mnenju v samem delovanju kemikalije, ker ta deluje na živčevje, zarodki pa nimajo še dobro razvitega živčnega sistema.

4.2.3.2 Confidor SL 200

Confidor SL 200 je pripravek, ki vsebuje 20% imidakloprida in različna topila. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko vidimo lep trend naraščanja strupenosti Confidorja SL 200 v odvisnosti od koncentracije. Koncentracija 0,8 % (v/v) Confidorja SL 200 po 48h predstavlja 100% odsotnost vseh opazovanih telesnih znakov na zarodkih oziroma 100 % smrtnost. Pri opazovanih biomarkerjih (brez somitov, ni oči, ni ušesa, ni pigmenta v očeh, ni pigmentacije, ni utripa, ni obtoka) razen koaguliranost zarodka in ni ločen rep, smo ugotovili, da z naraščajočo koncentracijo Confidorja SL 200 narašča vpliv na opazovane biomarkerje (Slika 28).

Imidakloprid ni deloval strupeno na zarodke pri koncentraciji 320 mg/l. Visoka občutljivost zarodkov na strupenost Confidorja SL 200 ne izvira samo iz kemikalije, imidakloprida, temveč tudi zaradi strupenosti topil in morebitnih medsebojnih vplivov med sestavinami Confidorja SL 200.



Slika 28: Vpliv Confidorja SL 200 na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

S časom izpostavitve odraslih rib, njihova občutljivost počasi narašča, po 72h pa se ustali (24h LC_{50} = 0,112 %(v/v), 48h LC_{50} = 0,108 %(v/v), 72-96h LC_{50} = 0,107 %(v/v)) (Kemijski inštitut, 2007), medtem ko se pri zarodkih rib njihova občutljivost hitreje povečuje (povprečja: 24h LC_{50} = 0,513 %(v/v), 48h LC_{50} = 0,237 %(v/v)) (Preglednica 17). Odrasle ribe so bolj občutljive kot zarodki.

4.2.3.3 Klormefos

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da klormefos do koncentracije 20 mg/l ne vpliva na razvoj zarodkov. Vsi opazovani telesni znaki so normalni. Test smo ponovili štirikrat, naredili smo tudi semi-statičen preskus (obnavljajoč). Skupno je bilo opravljenih pet testov strupenosti klormefosa.

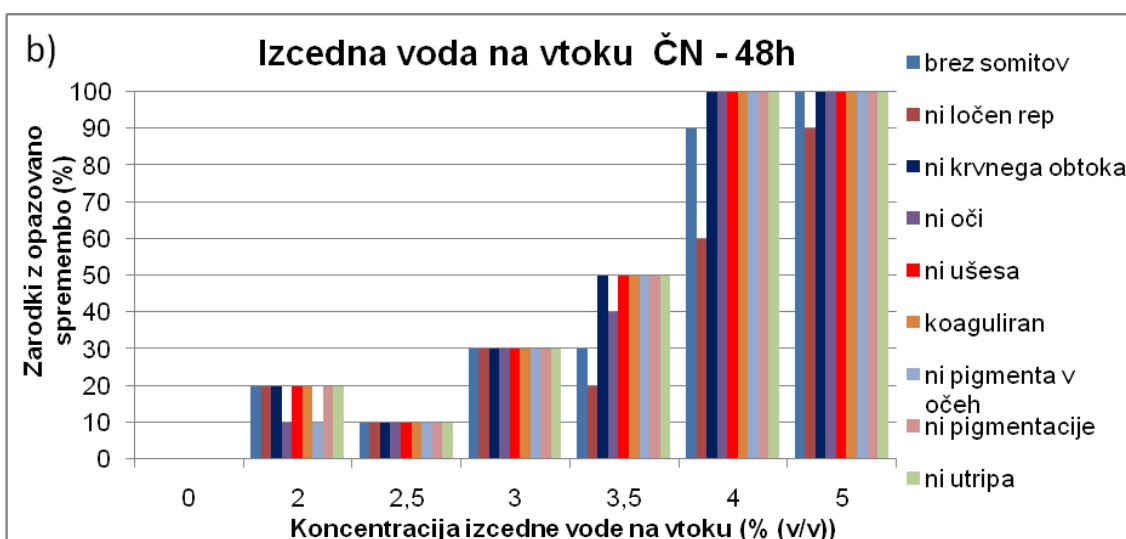
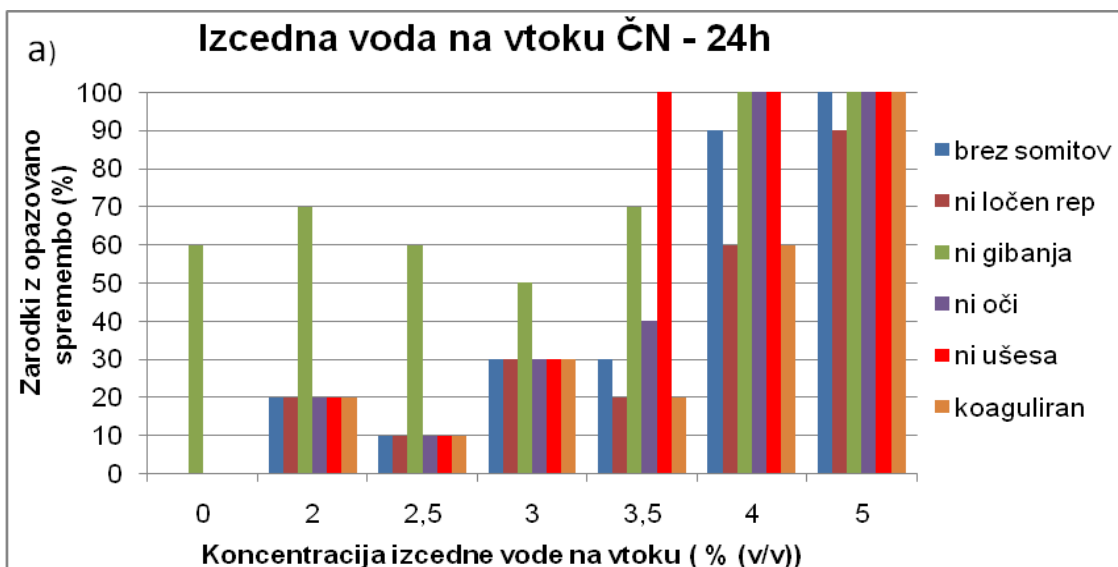
Na podlagi rezultatov strupenosti klormefosa na odraslih zebricah (Kemijski inštitut, 2007) smo pričakovali, da bo test na zarodkih zebric bolj občutljiv, vendar so rezultati testa pokazali drugače. Razlog za nižjo občutljivost samih zarodkov na klormefos je verjetno v samem delovanju kemikalije, ker ta deluje na živčevje, zarodki pa nimajo še dobro razvitega živčnega sistema. 96h LC₅₀ za odrasle zebrice je 8,0 mg/l (Kemijski inštitut, 2007). Občutljivost odraslih rib se do 72h izpostavitve pospešeno veča, po 72h pa počasneje (24h LC₅₀ = 11,2 mg/l, 48h LC₅₀ = 9,6 mg/l, 72h LC₅₀ = 7,3 mg/l, 96h LC₅₀ = 7,1 mg/l) (Kemijski inštitut, 2007).

Problem pa predstavljajo fizikalno-kemijske lastnosti kemikalije. Ta je hlapna in se razgrajuje na svetlobi, zato smo naredili še semi-statični (obnavljajoči) test, kar pomeni, da smo po 24h izpostavljene zarodke prestavili na nove plošče, vendar ni bilo velikih sprememb rezultatov med 24h in 48h opazovanjem biomarkerjev. To pomeni, da kljub obnavljanju raztopine ni bilo kakšnega večjega vpliva na odsotnost telesnih znakov. Opazili smo nekoliko večjo strupenost pri višjih koncentracijah. Tudi v primeru semi-statičnega, z naraščajočo koncentracijo klormefosa narašča vpliv na opazovane biomarkerje.

4.2.3.4 Izcedna voda iz deponije na vtoku čistilne naprave

S preliminarnim testom smo iskali območje strupenosti izcedne vode iz deponije na vtoku v čistilno napravo. Pri 5 % (v/v) izcedne vode smo opazili 100 % odziv na opazovane telesne znake, zato smo testirali še nižje koncentracije (%(v/v)) izcedne vode, ker je bil naš namen ugotoviti EC₅₀ in LC₅₀.

Iz prikazanega primera (Slika 29) je razvidno, da z naraščajočo koncentracijo izcedne vode narašča vpliv na opazovane biomarkerje (povečuje se odsotnost telesnih znakov) kljub rahlemu nihanju. Največje odstopanje od ostalih parametrov kaže gibanje, zato smo ga ovrednotili kot nezanesljiv pokazatelj, ker ga je zelo težko spremljati (opazovati) (glej poglavje 5.1.1).

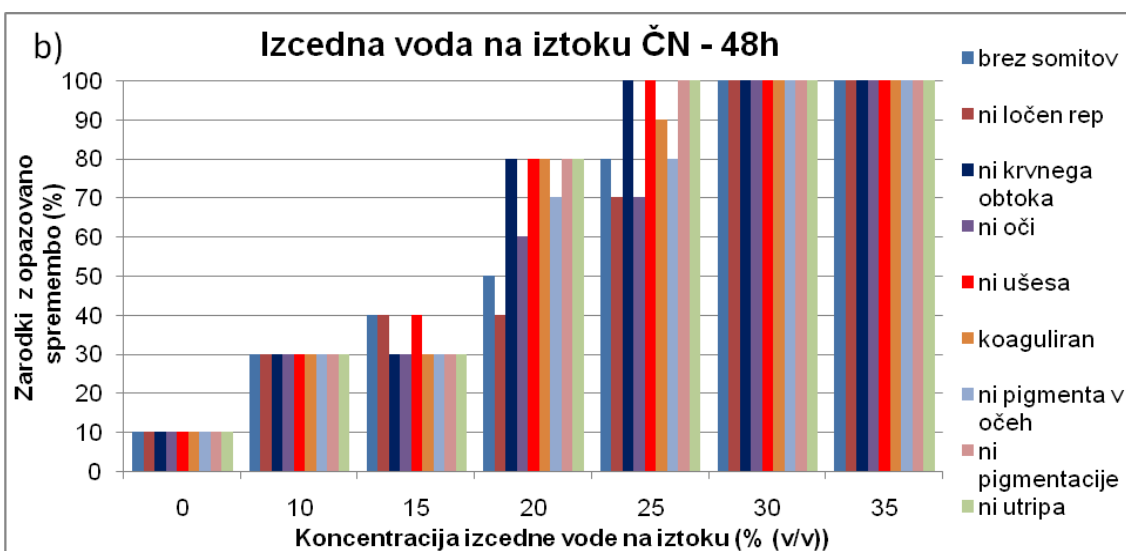
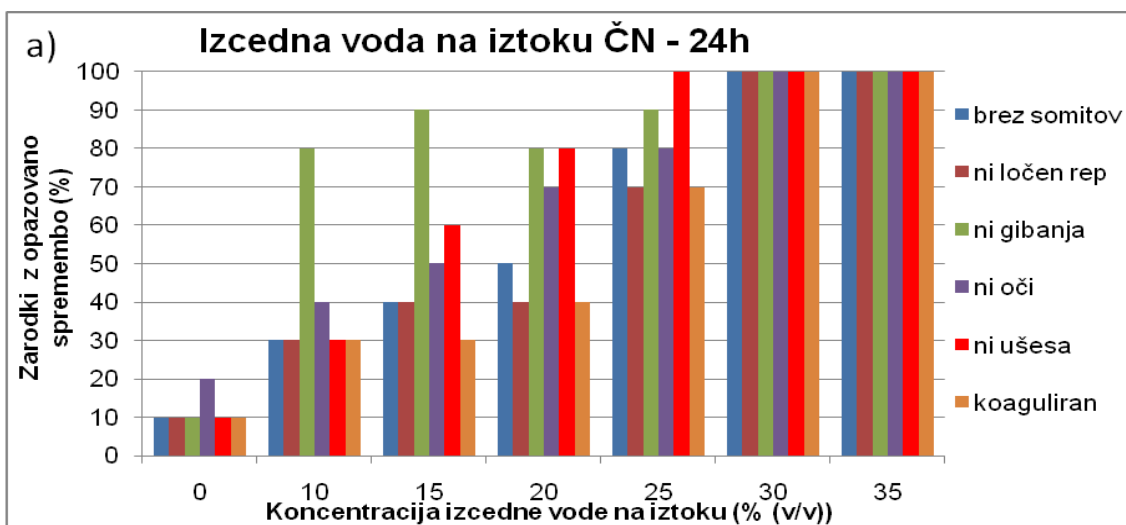


Slika 29: Vpliv izcedne vode iz deponije na vtoku čistilne naprave na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.2.3.5 Izcedna voda iz deponije na iztoku čistilne naprave

S preliminarnim testom smo iskali območje strupenosti izcedne vode iz deponije na iztoku čistilne naprave. Med 25 in 35 % (v/v) izcedne vode so vsi opazovani telesni znaki 100 % prisotni, kar pomeni, da je bilo potrebno testirati še nižje koncentracije izcedne vode, ker je bil naš namen ugotoviti EC_{50} in LC_{50} .

Iz slike (Slika 30) je razvidno, da se po 24h povečuje vpliv izcedne vode na opazovane biomarkerje (telesne znake) z višanjem koncentracije, kar pomeni, da pri večjem odstotku živali opazimo: odsotnost somitov, odsotnost ločenega repa, odsotnost srčnega utripa, koaguliran zarodek, itd. Ponovno smo opazili, da gibanje odstopa od drugih učinkov. Po 48h, lahko iz slike (Slika 30) razberemo, da z naraščajočo koncentracijo izcedne vode narašča vpliv na opazovane biomarkerje.



Slika 30: Vpliv izcedne vode iz deponije na iztoku čistilne naprave na razvoj zarodkov po 24h (a) in 48h (b)

4.3 Ponovljivost testov in izračunane EC_{50} in LC_{50} za onesnaževala

Ugotavljali smo tudi ponovljivost rezultatov (glej poglavje Kratice in izrazi). Enkratno opravljanje testa nam ne da pravega pogleda na rezultate, ker ne vemo, če so ti rezultati verodostojni. Zato smo vse teste večkrat ponovili in pri tem uporabljali najmanj dve paralelki. Ponovljivost posameznih testov za testirane kemikalije smo prikazali v preglednicah, ki prikazujejo 24h EC_{50}/LC_{50} oziroma 48h EC_{50}/LC_{50} vrednost za posamezne biomarkerje.

4.3.1 3,4-dikloroanilin (referenčna kemikalija)

Iz naših podatkov (Preglednica 12) je lepo razvidno, zakaj je ravno ta kemikalija izbrana za referenčno kemikalijo. Opazovani biomarkerji so zelo ponovljivi. Pri vseh treh testih je bil najbolj občutljivejši biomarker za 24h LC₅₀ odsotnost somitov, za 48h LC₅₀ pa odsotnost srčnega utripa. Pri primerjanju letalnih biomarkerjev med seboj opazimo primerljivost LC₅₀ vrednosti za različne biomarkerje med testi (1, 2 in 3). Tudi pri primerjanju subletalnih biomarkerjev lahko rečemo, da so EC₅₀ vrednosti zelo primerljive med testi. Pri vseh treh testih je bil najbolj občutljivejši biomarker za 24h EC₅₀ odsotnost gibanja, za 48h EC₅₀ pa odsotnost krvnega obtoka, vendar drugi subletalni biomarkerji ne odstopajo veliko od vrednosti EC₅₀ odsotnosti krvnega obtoka. Torej lahko rečemo, da ima 3,4-dikloroanilin zelo ponovljive učinke na opazovane telesne znake, kar je tudi lepo razvidno iz spodnje preglednice (Preglednica 12).

Na podlagi analize EC₅₀ za posamezne biomarkerje je razvidno, da so subletalni biomarkerji občutljivejši od letalnih.

Preglednica 12: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za 3,4-dikloroanilin

| KEMIKALIJA | 3,4-DIKLOROANILIN | | | | | | | |
|---|-------------------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg/l) | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | |
| Brez somitov | 2,98 | 2,98 | 3,00 | 3,00 | 2,82 | 2,82 | 2,93 | 2,93 |
| Ni ločen rep | | | 3,58 | 3,58 | 3,30 | 3,30 | 3,44 | 3,44 |
| Koaguliran | 2,98 | 2,85 | 3,12 | 3,12 | 3,23 | 2,62 | 3,11 | 2,86 |
| Ni utripa | | 2,43 | | 2,59 | | 2,37 | | 2,46 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 2,02 | | 2,44 | | 2,08 | | 2,18 | |
| Ni oči | 2,82 | 3,00 | 2,27 | | 2,51 | 2,80 | 2,53 | 2,90 |
| Ni ušes | 2,82 | 2,82 | 2,73 | 2,78 | 2,34 | 2,45 | 2,63 | 2,68 |
| Ni obtoka | | 2,16 | | 2,47 | | 2,24 | | 2,29 |
| Ni pigmenta v očeh | | 3,00 | | 3,63 | | 2,79 | | 3,14 |
| Ni pigmentacije | | 2,54 | | 2,78 | | 2,63 | | 2,65 |

LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

4.3.2 Topila

Ponovljivost v testih s topili (aceton, etanol in metanol) je bila zelo visoka. Vsi opazovani znaki imajo približno enake EC₅₀ in LC₅₀ vrednosti znotraj posameznega testa.

4.3.2.1 Aceton

Po 24h je ponovljivost nekoliko slabša, vendar se po 48h izboljša. Sklepamo lahko, da je zato po standardu predpisano opazovanje po 48h. Iz preglednice (Preglednica 13) je razvidno, da so vrednosti EC₅₀ oziroma LC₅₀ med opazovanimi spremembami zelo primerljive. Iz teh podatkov lahko zaključimo, da so opazovane spremembe (letalne in subletalne) enako občutljive na aceton.

Preglednica 13: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za aceton

| KEMIKALIJA | ACETON | | | | | | | | | |
|---|--------|------|------|------|------|------|-----|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (%(v/v)) | | | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Brez somitov | 1,45 | 1,45 | 2,00 | 2,00 | 1,62 | 1,62 | | | 1,69 | 1,69 |
| Ni ločen rep | 1,45 | 1,45 | 2,00 | 2,00 | 1,62 | 1,62 | | | 1,69 | 1,69 |
| Koaguliran | 1,45 | 1,45 | 2,00 | 1,79 | 1,62 | 1,58 | | | 1,69 | 1,61 |
| Ni utripa | | 1,45 | | 2,00 | | 1,58 | | | | 1,68 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 1,45 | | 0,98 | | 1,06 | | | | 1,17 | |
| Ni oči | | 1,45 | 1,84 | 1,84 | 1,62 | 1,58 | | | 1,73 | 1,63 |
| Ni ušes | 1,45 | 1,45 | 1,91 | 1,84 | 1,62 | 1,58 | | | 1,66 | 1,63 |
| Ni obtoka | | 1,45 | | 1,79 | | 1,54 | | 2,00 | | 1,60 |
| Ni pigmenta v očeh | | 1,45 | | 2,00 | | 1,58 | | | | 1,68 |
| Ni pigmentacije | | 1,45 | | 1,79 | | 1,58 | | | | 1,61 |

LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

4.3.2.2 Etanol

Po 24h je ponovljivost nekoliko slabša, vendar se po 48h izboljša. Iz preglednice (Preglednica 14) je razvidno, da so vrednosti EC₅₀ oziroma LC₅₀ med opazovanimi spremembami zelo primerljive. Iz teh podatkov lahko zaključimo, da so opazovane letalne in subletalne spremembe enako občutljive na etanol.

Preglednica 14: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za etanol

| KEMIKALIJA | ETANOL | | | | | | | | | |
|---|--------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (%(v/v)) | | | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Brez somitov | 1,52 | 1,52 | | | 1,82 | 1,82 | 1,83 | 1,83 | 1,72 | 1,72 |
| Ni ločen rep | 1,67 | 1,67 | | | 1,87 | 1,87 | 1,83 | 1,83 | 1,80 | 1,80 |
| Koaguliran | 1,67 | 1,36 | | | 1,87 | 1,87 | 1,83 | 1,73 | 1,80 | 1,65 |
| Ni utripa | | 1,36 | | | | 1,69 | 0,20 | 1,73 | | 1,60 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 1,22 | | | | 1,61 | | 1,30 | | 1,38 | |
| Ni oči | 1,30 | 1,36 | 1,64 | | 1,58 | 1,87 | 1,51 | 1,73 | 1,51 | 1,65 |
| Ni ušes | 1,30 | 1,36 | | | 1,58 | 1,65 | 1,55 | 1,73 | 1,48 | 1,58 |
| Ni obtoka | | 1,30 | | 1,52 | | 1,52 | | 1,25 | | 1,40 |
| Ni pigmenta v očeh | | 1,36 | | | | 1,87 | | 1,73 | | 1,65 |
| Ni pigmentacije | | 1,36 | | 1,95 | | 1,82 | | 1,73 | | 1,72 |

LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

4.3.2.3 Metanol

Po 24h je ponovljivost nekoliko slabša, vendar se po 48h izboljša. Iz preglednice (Preglednica 15) je razvidno, da so vrednosti EC_{50} oziroma LC_{50} med opazovanimi spremembami zelo primerljive. Večkrat pa prihaja do odstopanja rezultatov pri spremljanju odsotnosti gibanja in krvnega obtoka. Iz teh podatkov lahko zaključimo, da je občutljivost opazovanih sprememb na metanol podobna.

Preglednica 15: Vrednosti 24h EC_{50}/LC_{50} in 48h EC_{50}/LC_{50} za metanol

| KEMIKALIJA | METANOL | | | | | | | |
|-----------------------------|---------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC_{50}/EC_{50} (% (v/v)) | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LETALNI (LC_{50}): | | | | | | | | |
| Brez somitov | 2,95 | 2,95 | 3,48 | 3,48 | 3,17 | 3,17 | 3,20 | 3,20 |
| Ni ločen rep | 3,05 | 3,05 | 3,55 | 3,55 | 3,17 | 3,17 | 3,26 | 3,26 |
| Koaguliran | 2,86 | 2,63 | 3,48 | 3,33 | 3,17 | 2,65 | 3,17 | 2,87 |
| Ni utripa | | 2,49 | | 3,20 | 1,27 | 2,30 | | 2,66 |
| SUBLETALNI (EC_{50}): | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 1,47 | | 2,56 | | 0,98 | | 1,67 | |
| Ni oči | 2,11 | 3,04 | 3,17 | 3,48 | 1,93 | 2,94 | 2,40 | 3,15 |
| Ni ušes | 2,24 | 2,34 | 3,09 | 3,20 | 2,34 | 2,49 | 2,56 | 2,69 |
| Ni obtoka | | 2,16 | | 2,03 | | 2,15 | | 2,11 |
| Ni pigmenta v očeh | | 3,04 | | 3,36 | | 2,94 | | 3,11 |
| Ni pigmentacije | | 2,34 | | 2,95 | | 2,32 | | 2,54 |

LEGENDA: siva = najnižji LC_{50} oziroma EC_{50}

4.3.3 Onesnaževala

4.3.3.1 Imidaklopid in klormefos

Zaradi majhne občutljivosti zarodkov zebrič na imidaklopid in klormefos, ni bilo mogoče izračunati EC_{50} za opazovane biomarkerje in posledično risanje grafa primerjave EC_{50} za posamezne biomarkerje med testi. Le pri enem poskusu klormefosa od petih, je bilo možno določiti nekatere EC_{50} in LC_{50} za posamezne biomarkerje (Preglednica 16).

Preglednica 16: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za klormefos

| KEMIKALIJA | KLORMEFOS | | | | | | | |
|---|-----------|-----|------|------|------|-----|------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg/l) | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | |
| Brez somitov | | | | | | | 16,5 | 16,5 |
| Ni ločen rep | | | | | | | 4,12 | 4,12 |
| Koaguliran | | | | | | | | |
| Ni utripa | | | | 0,41 | | | | 12,7 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | |
| Ni gibanja | | | 0,22 | | 12,8 | | 15,5 | |
| Ni oči | 0,49 | | | | | | 1,71 | 15,9 |
| Ni ušes | | | | | | | 8,05 | 16,9 |
| Ni obtoka | | | | | | | | 7,91 |
| Ni pigmenta v očeh | | | | | | | | 16,9 |
| Ni pigmentacije | | | | | | | | 9,82 |

4.3.3.2 Confidor SL 200

Preglednica 17: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za Confidor SL 200

| KEMIKALIJA | CONFIDOR SL 200 | | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (%(v/v)) | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | |
| Brez somitov | 0,63 | 0,63 | 0,39 | 0,39 | 0,53 | 0,53 | 0,51 | 0,51 |
| Ni ločen rep | 0,64 | 0,64 | 0,50 | 0,50 | 0,59 | 0,59 | 0,58 | 0,58 |
| Koaguliran | 0,84 | 0,65 | 0,50 | 0,50 | | 0,53 | 0,64 | 0,56 |
| Ni utripa | 0,30 | 0,34 | | 0,25 | 0,60 | 0,13 | | 0,24 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 0,19 | 0,19 | 0,17 | | | | 0,18 | |
| Ni oči | 0,40 | 0,55 | 0,25 | 0,35 | | 0,55 | 0,32 | 0,49 |
| Ni ušes | 0,41 | 0,49 | 0,25 | 0,30 | | 0,46 | 0,33 | 0,42 |
| Ni obtoka | 0,20 | 0,25 | | 0,21 | | | | 0,23 |
| Ni pigmenta v očeh | | 0,47 | | 0,34 | | 0,52 | | 0,44 |
| Ni pigmentacije | | 0,40 | | 0,30 | | 0,43 | | 0,38 |

LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

Na podlagi rezultatov testa (Preglednica 17) je najnižji izračunani 24h EC₅₀ za odsotnost gibanja, 24h LC₅₀ pa za odsotnost somitov. Po 48h pa je najnižji EC₅₀ za odsotnost krvnega obtoka, LC₅₀ pa za odsotnost srčnega utripa. Na podlagi analize EC₅₀ za posamezne biomarkerje je razvidno, da so subletalni biomarkerji občutljivejši od letalnih.

Pri vseh treh ponovitvah testa je bil po 48h najobčutljivejši letalni biomarker odsotnost srčnega utripa, subletalni najobčutljivejši biomarker pa se je izmenjeval – prvič odsotnost gibanja, drugič odsotnost krvnega obtoka in tretjič odsotnost pigmentacije (Preglednica 17).

Po naši interpretaciji rezultatov za tako različne biomarkerje, ki predstavljajo najobčutljivejši subletalni biomarker, je razlog v tem, da gibanja v večini primerov po 48h ni več opaziti, tu pa je bila izjema in to se tudi odraža na rezultatu (v prvem testu je odsotnost gibanja najobčutljivejši subletalni biomarker, zelo blizu pa mu je odsotnost krvnega obtoka). Zaradi 100% odsotnosti krvnega obtoka v tretji ponovitvi testa je najobčutljivejši subletalni biomarker odsotnost pigmentacije telesa. V primerjavi 48h EC₅₀ odsotnosti pigmentacije telesa (3. test) z 48h EC₅₀ odsotnosti krvnega obtoka (1. in 2. test), je le ta dvakrat večja. Zato sklepamo, da je na splošno odsotnost krvnega obtoka tisti najobčutljivejši subletalni biomarker Confidorja SL 200 (Preglednica 17).

Rezultati testov so primerljivi. Vendar so ponekod tudi večja odstopanja. Drugi test je bil najbolj občutljiv, prvi in tretji pa nekoliko manj.

4.3.3.3 Izcedna voda iz deponije na vtoku čistilne naprave

Preglednica 18: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za izcedno vodo iz deponije na vtoku čistilne naprave

| KEMIKALIJA | IZCEDNA VODA IZ DEPONIJE NA VTOKU ČISTILNE NAPRAVE (U1) | | | | | | | | | |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | povprečje | |
| Št. testov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (%(v/v)) | | | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Brez somitov | 4,17 | 4,17 | 2,88 | 2,88 | | | 3,30 | 3,30 | 3,45 | 3,45 |
| Ni ločen rep | | | 3,01 | 3,01 | | | 3,70 | 3,70 | 3,36 | 3,36 |
| Koaguliran | | 2,22 | 3,01 | 2,53 | | 3,93 | 3,58 | 3,14 | 3,30 | 2,96 |
| Ni utripa | | 1,78 | | 2,53 | | 3,19 | | 3,14 | | 2,66 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 1,58 | | | | 1,87 | | | | 1,73 | |
| Ni oči | 1,45 | 1,78 | 2,53 | 2,53 | 4,25 | 3,19 | 3,21 | 3,23 | 2,86 | 2,74 |
| Ni ušes | 1,45 | 1,78 | 2,47 | 2,47 | 3,65 | 3,53 | 2,90 | 3,14 | 2,62 | 2,73 |
| Ni obtoka | | 1,78 | | 2,47 | | 3,08 | | 3,14 | | 2,62 |
| Ni pigmenta v očeh | | 1,78 | | 2,75 | | 3,75 | | 3,17 | | 2,86 |
| Ni pigmentacije | | 1,78 | | 2,53 | | 3,50 | | 3,14 | | 2,74 |

LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

Na podlagi 4. testa (Preglednica 18) je najnižji izračunani 24h EC₅₀ za odsotnost ušesa, LC₅₀ pa za odsotnost somitov. Po 48h pa je najnižji EC₅₀ pri treh biomarkerjih enak (odsotnost ušesa, odsotnost krvnega obtoka, odsotnost pigmentacije), LC₅₀ pa je enak pri odsotnosti srčnega utripa in koaguliranem zarodku. Na podlagi rezultatov 24h EC₅₀ in 48h LC₅₀ je razvidno, da so subletalni biomarkerji občutljivejši od letalnih.

Pri vseh štirih testih je po 48h najbolj občutljivejši letalni biomarker odsotnost srčnega utripa (dvakrat je izenačen z koaguliranim zarodkom), občutljivost subletalnih biomarkerjev je podobna (večje število biomarkerjev z istimi EC₅₀).

4.3.3.4 Izcedna voda iz deponije na iztoku čistilne naprave

Na podlagi rezultatov 2. testa (Preglednica 19) je najnižji izračunani 24h EC₅₀ za odsotnost ušesa, LC₅₀ pa za odsotnost somitov. Po 48h pa je najnižji EC₅₀ enak (odsotnost krvnega obtoka, brez pigmentacije), LC₅₀ pa predstavlja odsotnost srčnega utripa.

Na podlagi analize EC₅₀ za posamezne biomarkerje po 24h je razvidno, da so subletalni biomarkerji nekoliko občutljivejši od letalnih (Preglednica 19).

Preglednica 19: Vrednosti 24h EC₅₀/LC₅₀ in 48h EC₅₀/LC₅₀ za izcedno vodo iz deponije na iztoku čistilne naprave

| KEMIKA LIJA | IZCEDNA VODA IZ DEPON IJE NA IZTOKU ČISTILNE NAPRAVE (U2) | | | | | | | | | |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | povprečje | |
| Št. poskusov | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h | 24h | 48h |
| LC ₅₀ /EC ₅₀ (%(v/v)) | | | | | | | | | | |
| LETALNI (LC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Brez somitov | 15,0 | 15,0 | 15,9 | 15,9 | 20,9 | 20,9 | 24,9 | 24,9 | 19,2 | 19,2 |
| Ni ločen rep | 16,9 | 16,5 | 16,8 | 16,8 | 27,7 | 27,7 | 24,9 | 24,9 | 21,5 | 21,5 |
| Koaguliran | 17,5 | 15,4 | 17,4 | 14,9 | 27,7 | 21,4 | 24,9 | 22,4 | 21,9 | 18,5 |
| Ni utripa | | 15,4 | | 14,6 | | 21,4 | 9,3 | 22,4 | | 18,5 |
| SUBLETALNI (EC ₅₀): | | | | | | | | | | |
| Ni gibanja | 14,4 | | | | | | 6,6 | | 10,5 | |
| Ni oči | 14,6 | 16,5 | 13,3 | 16,4 | 24,5 | 25,0 | 20,3 | 25,5 | 18,2 | 20,9 |
| Ni ušes | 14,9 | 16,5 | 13,1 | 16,3 | 20,9 | 20,9 | 18,1 | 21,4 | 16,7 | 18,8 |
| Ni obtoka | | 15,0 | | 14,6 | | 20,3 | | 22,4 | | 18,1 |
| Ni pigmenta v očeh | | 16,1 | | 15,6 | | 21,4 | | 22,4 | | 18,9 |
| Ni pigmentacije | | 14,6 | | 14,6 | | 21,4 | | 22,4 | | 18,3 |

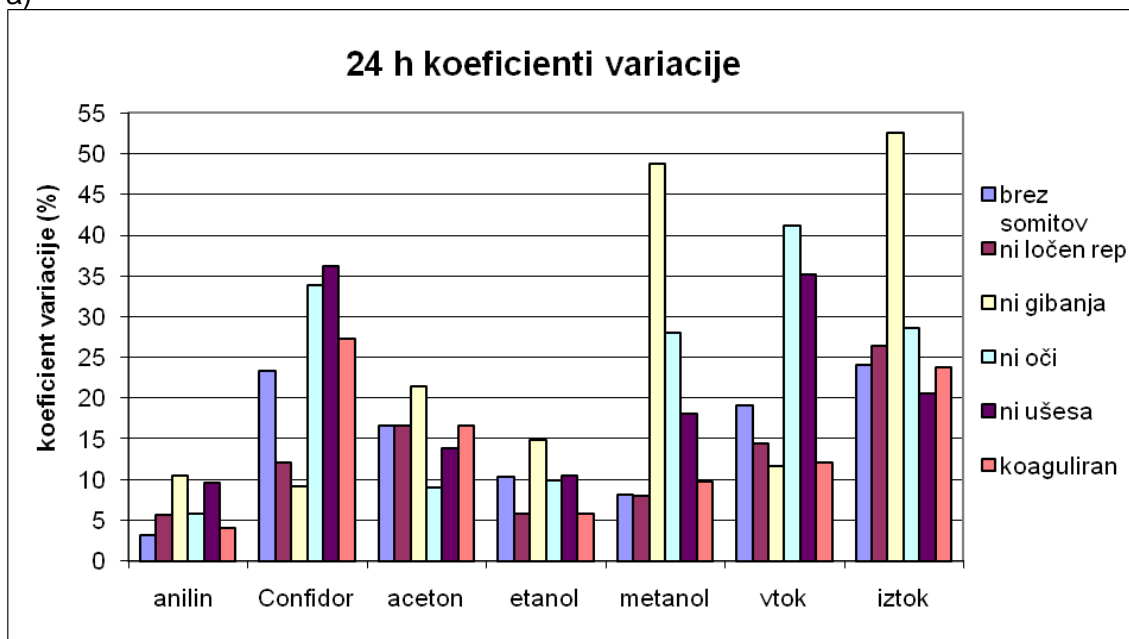
LEGENDA: siva = najnižji LC₅₀ oziroma EC₅₀

Če povzamemo, kateri letalni biomarker je v splošnem najbolj občutljiv, je za onesnaževala in referenčno kemikalijo odsotnost somitov po 24h, odsotnost srčnega utripa pa po 48h. Kateri je najmanj občutljiv letalni biomarker pri testiranih onesnaževalih pa je težko reči, ker se več biomarkerjev izmenjuje, največkrat koaguliran zarodek in odsotnost ločenega repa. Pri topilih je težko ločiti najbolj občutljivejši letalni/subletalni biomarker, ker so njihove vrednosti zelo primerljive. Po analizi rezultatov testov strupenosti topil smo opazili, da se pri subletalnih biomarkerjih, po 48h v vseh testih izkaže odsotnost krvnega obtoka za najbolj občutljivejši biomarker.

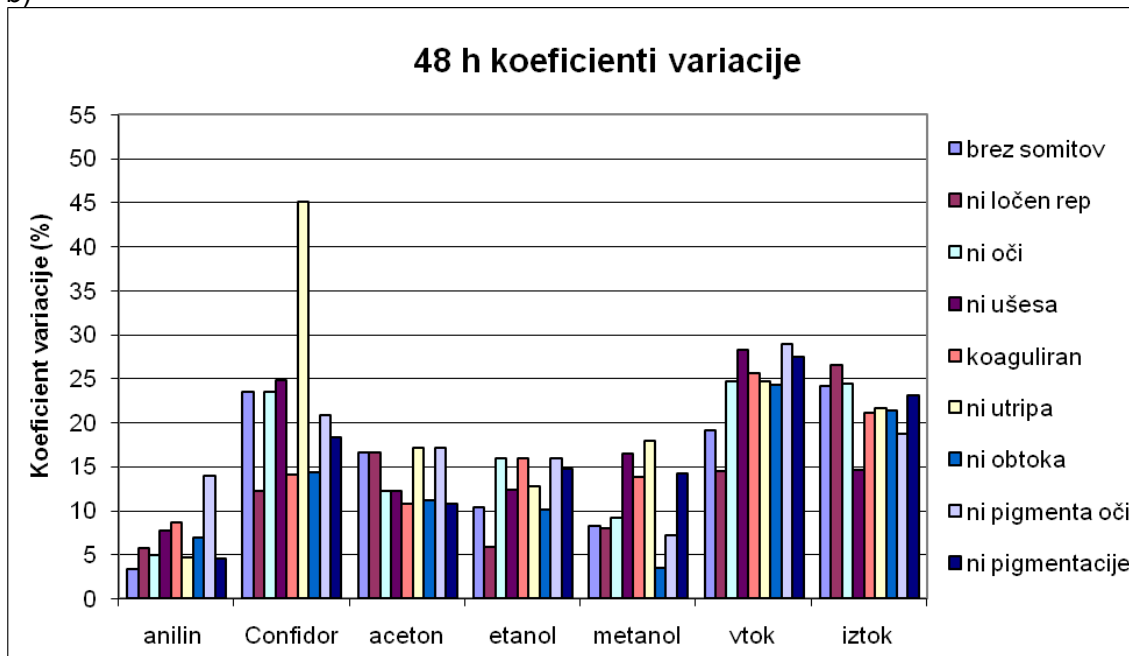
4.4 Koeficienti variacije za opazovane biomarkerje

S koeficientom variacije ocenimo odklon rezultatov od samega povprečja EC_{50} oziroma LC_{50} vrednosti opravljenih testov za posamezno onesnaževalo. Koeficient variacije izračunamo na podlagi predhodno izračunanih vrednosti povprečja in standardnega odklona (glej poglavje 3.5.2).

a)



b)



LEGENDA: anilin = 3,4-dikloroanilin, Confidor = Confidor SL 200, vtok = izcedna voda na vtoku v ČN, iztok = izcedna voda na iztoku ČN.

Slika 31: Koeficienti variacije za posamezno onesnaževalo/kemikalijo po 24h (a) in 48h (b)

Opazimo (Slika 31), da se pojavljajo najnižji koeficienti pri 3,4-dikloroanilinu in to je tudi eden od razlogov, da je bil ravno 3,4-dikloroanilin izbran za referenčno kemikalijo. Pri topilih so si koeficienti variacije podobni, majhna odstopanja so le pri metanolu. Najvišji koeficienti variacije pa pripadajo izcednim vodam in Confidorju SL 200, ker so to realni, kompleksni vzorci. Razvidno je tudi, da se ponovljivost parametrov po 48h izboljša.

5 SKUPNA RAZPRAVA

5.1 Zanesljivost spremljanih odzivov in morebitne nevšečnosti

Da bi ugotovili, katere biomarkerje je smiselno spremljati je zelo pomembna ponovljivost rezultatov. Že pri samem opazovanju odzivov izbranih biomarkerjev smo opazili, kateri biomarkerji so bolj zanesljivi in kateri manj, pri tem pa moramo poudariti, da je velikega pomena tudi uporabljena oprema za opazovanje (lupa). Pri spremljanju biomarkerjev je zelo pomembna natančnost in preciznost.

5.1.1 Gibanje

Najtežavnejše je bilo spremljanje gibanja, ker se v trenutku opazovanja, mogoče zarodek ne giblje, ampak prej in potem pa se morda je. Po 24h je bilo pogosteje prisotno gibanje, ker majhnost zarodka omogoča lažje gibanje v membrani (vitelinska). Po 48h pa gibanja običajno ni več opaziti, predvsem zaradi razvitosti zarodka, ki mu otežuje gibanje v membrani.

Mnenja smo, da je ta biomarker nezanesljiv.

5.1.2 Somiti

Odsotnost somitov, spada med letalne biomarkerje, pomeni, da se zarodek ne bo razvil, ker pojav somitov predstavlja prvo stopnjo razvoja. V veliki večini so rezultati 24h EC₅₀ v naših testih pokazali, da je najboljčutljivejši letalni biomarker, ki ima visoko zanesljivost spremljanja.

5.1.3 Ločen rep

Opazovali smo odsotnost ločenega repa od rumenjaka oziroma odsotnost ločenega repa. Problemi nastopijo pri zarodkih z deformacijo. Njihov rep je ločen, a je zelo kratek in štrleč (Slika 17). Take primerki smo obravnavali kot ni ločen rep. Ta biomarker je dokaj zanesljiv, problem so le močno deformirani zarodki, čeprav je ločen rep do te mere, da se njegov razvoj ustavi. V literaturi (Brust (2001), Braunback & Lammer (2006), itd.) je označen kot letalni učinek in mi smo ga tudi tako označili. Pri višjih koncentracijah izpostavljenosti prihaja do primerov, kjer ima zarodek navidezno »ločen rep« (mali, štrleč) in motno »glavo«, vendar je zarodek zaostal oziroma je njegova stopnja deformacije tako velika, da je že v zgodnji fazi zaustavila njegov razvoj.

5.1.4 Koaguliran zarodek

To je zarodek, ki se ni razvil niti do prve stopnje razvoja. Pod lupo vidimo to kot črno piko, včasih ga prepoznamo že s prostim očesom kot belo piko. Ima visoko zanesljivost spremljanja.

5.1.5 Srčni utrip

To je letalni biomarker, ki ga opazujemo po 48h, izjemoma tudi že po 24h. Spremljali smo prisotnost oziroma odsotnost srčnega utripa. Možno je tudi spremljanje frekvence srčnega utripa. Za opazovanje srčnega utripa predstavlja problem motnost zarodkov, ti se pojavljajo predvsem pri višjih koncentracijah onesnaževal, ker se ne da lepo izostriti slike in posledično ni možna zaznava utripa.

5.1.6 Oči

To je subletalni biomarker, pri normalno razvitih zarodkih opažen že po 24h. Največji problem predstavlja ločevanje med tem ali je oko prisotno ali je v začetku nastajanja (zametki očesa). Za obvladovanje problema potrebujemo prakso. Naše vrednotenje rezultatov je temeljilo na tem, da zametke oči obravnavamo kot prisotnost oči. Za tako vrednotenje smo se odločili, ker na podlagi prisotnosti zametkov oči lahko predvidevamo, da se bodo oči razvile.

5.1.7 Uho

To je subletalni biomarker, pri normalno razvitih zarodkih opažen že pri opazovanju po 24h. Motnost zarodka otežuje njegovo opazovanje pri višjih stopnjah deformacije (višje koncentracije).

5.1.8. Krvni obtok

To je subletalni biomarker, pri normalno razvitih zarodkih opažen po 48h. V primeru, ko zarodka ne moremo izostriti, prihaja do problemov pri opazovanju. V takih primerih, ko so zarodki motni, kar se pojavlja predvsem pri višjih koncentracijah, ni mogoče ugotoviti ali je krvni obtok res prisoten ali ne, glede na dejstvo, da ga ne moremo nemoteno opazovati.

5.1.9 Pigmentacija v očeh

To je subletalni biomarker, pri normalno razvitih zarodkih opažen po 48h. Pri določanju pigmentacije v očeh je potrebno definirati, kaj za nas pomeni pigmentacija oči, ker je pigmentacija lahko intenzivna in neintenzivna. Zarodke z intenzivno (črno) pigmentacijo smo obravnavali kot zarodke s pigmentom v očeh.

5.1.10 Pigmentacija telesa

To je subletalni biomarker, pri normalno razvitih zarodkih opažen po 48h. Pri določanju pigmentacije telesa je ravno tako potrebno definirati, kaj za nas pomeni pigmentacija telesa, ker je pigmentacija lahko intenzivna in neintenzivna. Že neintenzivno

pigmentacijo smo obravnavali kot pigmentacijo telesa. Vidna je kot črne pike po celem telesu.

5.1.11 Deformacija

Velikokrat smo se srečali s problemom, ko nismo vedeli, kako bi ovrednotili opazovani zarodek. Ko smo ga pogledali pod lupo, ni imel normalne oblike in je bilo razvidno, da ta zarodek ne bo preživel. Kljub temu pa je imel lahko prisotno pigmentirano oko. Te deformacije so se v večini primerov pokazale že pri opazovanju po 24h, po 48h se je dana predpostavka potrdila. Kljub možnemu preživetju zarodka, ker mu je zaznati šibak srčni utrip, zarodek nima nikakršnih možnosti za preživetje.

Pri našem delu smo vrednotili take osebkke kar kot koaguliran zarodek, z razlogom, da je take vrste deformacije letalna in da je primerljiva z zarodkom, ki se ni razvil. Razlika je le v tem, da se je deformiran zarodek razvil do določene stopnje razvoja, potem pa je zaostal in odmrl. Medtem ko v primeru koaguliranega zarodka govorimo o tem, da se oplojena ikra ni razvila.

Nekatere opazovane spremembe se izoblikujejo v času do 24h starosti zarodka, te spremembe pa nam podajo mnenje o testu, ali bo veljaven, a je prišlo do fizikalnih sprememb, ipd. Zato je po našem mnenju smiselno opazovati spremembe po 24h in 48h, ker so že 24h rezultati koristni v smislu nadaljevanja testa. Ena od željenih lastnosti testov je hiter odgovor, katerega pa strupenostni test na zarodkih zebričah nudi že po 24h in to je tudi prednost testa predn testom na odraslih zebričah (4 dni).

6 ZAKLJUČKI

V prvem delu diplomskega dela smo uvedli in optimizirali metodo strupenostnih testov na zarodkih rib zebric. Iz opravljenih testov smo ugotovili, da morajo biti zarodki ob izpostavitvi mlajši od 3h, ker se drugače poveča možnost deformacij. Iz testov vpliva pH na zarodke smo prišli do zaključka, da razredčevalne vode ni potrebno nevtralizirati (pH = 7,0). Različne vrste razredčevalnih vod (pripravljena razredčevalna voda, vodovodna voda in postana vodovodna voda) nimajo vpliva na razvoj zebric, vendar zaključujemo, da je bolje uporabljati pripravljeno razredčevalno vodo kot vodovodno ali postano vodovodno vodo, predvsem zaradi znane sestave raztopine in posledično boljše ponovljivosti poskusov. Potrebno pa je tudi poudariti, da fizikalne spremembe zelo vplivajo na kvaliteto iker, zato je potrebno akvarij z zebricami čim manj izpostavljati fizikalnim spremembam. Opazili smo, da v primeru manjših fizikalnih spremembe v akvariju običajno naslednji dan ni iker. Zavedati se moramo, da so drugi dan po izpostavitvi fizikalni spremembi (stresu) ikre slabše kakovosti in zato je občutljivost povečana.

3,4-dikloroanilin je referenčna kemikalija in iz naših podatkov je lepo razvidno, da je razlog za tak izbor v zelo ponovljivih rezultatih, skoraj identičnih. Pri vseh treh poskusih je bil najboljčlovejši biomarker za 24h LC₅₀ odsotnost somitov, za 48h LC₅₀ pa odsotnost srčnega utripa. Po primerjanju samih letalnih oziroma subletalnih učinkov med seboj, smo opazili da so njihove LC₅₀ oziroma EC₅₀ vrednosti zelo primerljive med preskusi. Ob primerjanju naših rezultatov (48h LC₅₀) z drugimi že opravljenimi testi (Schulte, 1997) so ti primerljivi.

Po standardu za akutni strupenostni test na zarodkih zebric mora biti učinek 3,4-dikloroanilina (3,7 mg/l) na razvoj zarodkov večji od 10%, da je test veljaven. Na podlagi ohlapnih pogojev za veljavnost testa, smo se odločili testirati tudi nižje koncentracije 3,4-dikloroanilina. Po naših rezultatih lahko sklepamo, da bi že koncentracija višja od 2 mg/l izpopolnjevala predpisani pogoj za veljavnost testa. Priporočamo uporabo 2 - 2,5 mg/l 3,4-dikloroanilina za pozitivno kontrolo, ker pri tej koncentraciji še ni velikega števila deformacij, motnosti in koaguliranih zarodkov. Pri obeh koncentracijah je bila ponovljivost preskusa zelo dobra. To omogoča lažji pregled rezultatov, kot pri koncentraciji 3,7 mg/l, kjer je že prisotna motnost zarodkov, deformacije, koagulirani zarodki. Pri opazovanju testov je lepo vidna zaostalost zarodkov z naraščajočo koncentracijo. S tem, ko se odločimo za nižjo koncentracijo, je opazovanje izbranih biomarkerjev bolj natančno in precizno, ker motnost ne ovira opazovanja biomarkerjev in deformacije niso množične.

Po standardu je predvideno opazovanje testa samo po 48h, vendar smo se odločili opazovati učinke tudi po 24h, ker smo iskali biomarkerje, ki bi učinkovito pokazali strupenost že po 24h. Na podlagi LC₅₀ vrednosti, lahko rečemo, da sta odsotnosti somitov in ločenega repa tista dva biomarkerja, katerih občutljivost je po 24h enaka kot po 48h. Glede na to, da sta oba letalna biomarkerja, lahko sklepamo kakšen bo odziv kemikalije na zarodke zebric.

Zanesljivost biomarkerjev je zelo pomembna za samo vrednotenje rezultatov. Že pri samem opazovanju testa, opazovalec dobi hitro prvi občutek, kateri biomarkerji so bolj zanesljivi in kateri ne. Eden od hitro opaznih nezanesljivih biomarkerjev je gibanje, ki se ga težko opazuje, zaradi nestalne gibljivosti.

V drugem delu diplomskega dela smo določili strupenost različnih onesnaževal in okoljskih vzorcev. Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da za testirana onesnaževala velja, da je najbolj občutljivejši biomarker za 24h LC₅₀ odsotnost somitov in to se pokaže v vseh primerih, za 48h LC₅₀ pa v večini primerov odsotnost srčnega utripa. Tu je treba poudariti, da imidaklopid in klormefos, nista imela večjega učinka na razvoj zarodkov zebrič, kar tudi nakazuje na to, da zarodki zebrič niso enako občutljivi na vse vrste kemikalij.

Ob primerjanju najnižje vrednosti LC₅₀ na zarodkih zebrič z vrednostjo LC₅₀ na odrasle zebričice, za imidaklopid in klormefos smo ugotovili večjo občutljivost testa odraslih zebrič kot zarodkov. S primerjavo po 48h, pri odraslih ribah in zarodkih, lahko primerjamo občutljivost organizmov in lahko zaključimo, da je občutljivost odrasle ribe večja (48h LC₅₀ = 241 mg/l) (Kemijski inštitut, 2007). Verjeten razlog za manjšo občutljivost zarodkov je v nerazvitem živčnem sistemu, ker ta onesnaževala delujejo na živčni sistem. Klormefos pa je tudi zelo hlapen in razpada na svetlobi. Na topila pa so bili bolj občutljivi zarodki zebrič kot odrasle, kar smo potrdili s testiranjem Confidorja SL 200, ki je pripravek imidakloprida in topil. Izcedne vode pa ni bilo mogoče primerjati s testom na odraslih zebričah, ker ta ni bil opravljen zaradi premajhne količine vzorca.

Če povzamemo, sta najbolj občutljiva letalna biomarkerja za onesnaževala in referenčno kemikalijo odsotnost somitov po 24h, odsotnost srčnega utripa po 48h. Manj občutljivih letalnih biomarkerjev pri testiranih onesnaževalih je kar nekaj, težko reči, ker se več biomarkerjev izmenjuje, največkrat koaguliran zarodek in ni ločen rep. Pri topilih je težko določiti najbolj občutljivejši letalni/subletalni biomarker, ker so njihove vrednosti zelo primerljive. Po analizi rezultatov topil smo opazili, da se pri subletalnih biomarkerjih po 48h v vseh testih izkaže odsotnost krvnega obtoka za najbolj občutljivejši biomarker.

Testiranje z zarodki rib je potrebno še nadaljevati, da bi ugotovili, za katere kemikalije je ta test primeren in za katere ne. Verjetno je določen tip deformacije značilen za določeno kemikalijo. Pogoj za visoko zanesljivost podatkov pa je čim bolj izpopolnjena oprema za opazovanje in izurjenost samega opazovalca.

7 VIRI

- Atkins P.W., Clugston M.J., Frazer M. J., Jones R. A. Y. 1997. Kemija: zakonitosti in uporaba. Drugi natis. Tehnična založba Slovenija. Ljubljana: 106, 329, 432-433, 437.
- Bachmann J. 2002. Entwicklung eines Te r a t o g e n i t ä t s - S c r e e n i n g - Tests mit Embryonen des Zebrabärblings *Danio rerio*. Doctoral thesis. Technische Universität Dresden. Germany; <http://hsss.slub-dresden.de/documents/1034346530531-9011/1034346530531-9011.pdf> (15.5.2008).
- Baird C. 2001. Environmental chemistry. Second edition. University of western Ontario. New York: 320 - 322.
- Baird C. 2003. Environmental Chemistry. New York. W. H. Freeman nad Company: 557.
- Bayercropscience - Esters M. 2002. Environmental fate of imidacloprid. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. Vol. 55. No. 73. Special edition.
- Bayercropscience. 2008; http://www.bayercropscience.com.hr/docs/Insekticidi/confidor_prospekt_1.pdf (20.7.2008).
- Braunbeck T., Lammer E. 2006. Fish embryo toxicity assays. German federal environment agency. UBA contract number 203 85 422; <http://www.oecd.org/dataoecd/39/62/36817242.pdf> (16.6.2008).
- Bopp K. S., Minuzzo M., Lettieri T. 2006. The Zebrafish (*Danio rerio*): an emerging model organism in the environmental field. Institute for Environment and sustainability; http://ies.jrc.ec.europa.eu/uploads/fileadmin/Documentation/Reports/RWER/EUR_2006-2007/EUR_22598_EN.pdf (25.7.2008).
- Brust K. 2001. Toxicity of aliphatic amines on the embryos of zebrafish *Danio rerio* – experimental studies and QSAR. Dissertation. Technische Universität Dresden. Germany: 6, 36-37.
- Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. OJ L 230, 19.8.1991, p. 1.
- Cox C. 2001. Insecticide factsheet: Imidacloprid, Northwest Coalition for alternatives to pesticides/NCAP. Journal of pesticide reform. Vol. 21. No. 1.
- Craig P. M., Gilday S. D., Hove J. R. 2006. Dose-dependent effects of chemical immobilization on the heart rate of embryonic zebrafish. Lab Animal. Vol. 35. No. 9; <http://www.labanimal.com/labanimal/journal/v35/n9/full/labanimal1006-41.html> (20.7.2008).
- Energenti. 2008; <http://www.surovine.si/etanol.php> (13.10.2008).
- Fito-info. 2008; <http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/SI/Prirocnik/akt/106.htm> (12.5.2008).
- Fito-info. 2008; <http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/SI/Prirocnik/akt/125.htm> (15.5.2008).
- Fito- info. 2008; <http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/SI/Prirocnik/3vsebina.htm> (17.5.2008).
- Gupta S., Gaybhiye, Kalpana V.T., Agnihotri N.P. 2002. Leaching behaviour of imidacloprid formulation in soil. Bulletin of Environmental contamination and Toxicology. Vol. 68: 502-508.
- Informacijski sistem za varstvo rastlin - Registrirana sredstva FFS. 2008; <http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/index.htm> (9.6.2008).

- International Organization for Standardization. 1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions. ISO 5725-1. Geneva. Switzerland.
- International Organization for Standardization. 1996. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton Buchanan, Teleostei, Cyprinidae), Part 1: Static method. ISO 7346-1. Geneva. Switzerland.
- International Organization for Standardization. 2007. Water quality - Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088. Geneva. Switzerland.
- Jemec A. 2003. Ocena občutljivosti in specifičnosti biokemijskih biomarkerjev pri rakih. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. Oddelek za biologijo: xiii, xiv.
- Jemec A., Tišler T., Drobne D., Sepčič K., Fournier D., Trebše P. 2007. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustcean *Daphnia magna*. Chemosphere. Vol. 68: 1408-1418.
- Kammann U., Biselli S., Hühnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environmental pollution. Vol. 123: 279-287.
- Kammann U., Vobach M., Wosniok W. 2005. Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 51: 97-102.
- Kemijski inštitut Ljubljana. Laboratorij za kemijo, biologijo in tehnologijo vod – L05. 2007. neobjavljeno.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics. Vol. 203: 253-310.
- Kornhauser A. 1998. Organska kemija II. DZS. Ljubljana: 44, 48.
- Kos M., Bulog B. 1997. Embriologija vretenčarjev. Navodila za vaje. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. Založba Študentska organizacija Univerze v Ljubljani: 43.
- Košmelj K. 2001. Uporabna Statistika. Biotehniška fakulteta: 68.
- Kovačević K., Majdič G. 2007. Ali organofosforne snovi delujejo kot hormonski motilci? V: Proučevanje škodljivih učinkov in mehanizmov dolgotrajnega delovanja organofosfornih snovi na ljudi, živali in okolje in načrtovanje ustreznih protiukrepov. Zbornik prispevkov. Ljubljana: 14.
- Laale H. W. 1977. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research: A literature review. J. Fish. Biol.. Vol. 10: 121-173.
- Matsuda K., Buckingham S. D., Kleier D., Rauh J. J., Grauso M., Sattelle D. B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends in Pharmacological Sciences. Vol. 22. No. 11: 573-580.
- Nafta-Petrochem. 2003. Varnostni list v skladu z zakonom o kemikalijah - Metanol: http://www.arso.gov.si/novice/datoteke/023265-DVP_vl-001-metanol.pdf (9.10.2008).
- Nagel R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. 2006. Draft guideline. OECD Guideline for the testing of chemicals. Fish embryo toxicity test; <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf> (12.1.2008).

- Petrič R. 2008. Problematika kovin v izcedni vodi regionalne komunalne deponije. Diplomsko delo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana.
- Predavanje ekologija - r-strategisti. Akademsko leto 2007/2008; <http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/narbt/ekologija1.htm> (12.5.2008).
- Rand Gary M. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology. Second edition. Taylor and Francis. Boca Raton. Florida: 5-8, 39, 42, 77-78.
- Roberts T.R., Hutson D.H. 1999. Neonicotinoids overview, metabolic pathways of agrochemicals, Part 2: insecticides and fungicides. Cambridge. The royal society of chemistry: 105-106, 111-120.
- Schirone R.C., Gross L. 1968. Effect of temperature on early embryological development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. J. exp. Zool.. Vol. 169: 43-52.
- Schulte C., Nagel R. 1994. Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: Preliminary results. ATLA 22: 18.
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. ČZP Kmečki glas. Ljubljana: 191.
- Tišler T., Virant Celestina T., Meden E., Jemec A., Kožuh Eržen N. 2007. Ugotavljanje kroničnih učinkov klormefosa na vodne organizme. V: Proučevanje škodljivih učinkov in mehanizmov dolgotrajnega delovanja organofosfornih snovi na ljudi, živali in okolje in načrtovanje ustreznih protiukrepov. Zbornik prispevkov. Veterinarska fakulteta. Ljubljana: 9-13.
- Virant Celestina T., Zidar E., Kožuh Eržen N. 2007. Analitika klormefosa v vzorcih iz okolja in bioloških vzorcih. V: Proučevanje škodljivih učinkov in mehanizmov dolgotrajnega delovanja organofosfornih snovi na ljudi, živali in okolje in načrtovanje ustreznih protiukrepov. Zbornik prispevkov. Veterinarska fakulteta. Ljubljana.