

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**STRUPENOST IN ESTROGENOST ORGANSKIH UV-  
FILTROV NA VODNE ORGANIZME**

DIPLOMSKO DELO

Mitja MARC

Mentor: doc. dr. Tatjana TIŠLER

Nova Gorica, 2012

## **ZAHVALA**

Mentorici doc. dr. Tatjani Tišler se zahvaljujem za ponujeno priložnost opravljanja diplomskega dela na Kemijskemu inštitutu v Ljubljani, za ves trud, nasvete in pomoč pri nastajanju diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem osebju Laboratorija za okoljske vede in inženirstvo za vso pomoč in koristne napotke pri izvedbi eksperimentalnega dela. Posebna zahvala gre Emilu Medenu za uvajanje v novo laboratorijsko okolje ter Mirjani Bistan za neizmerno potrpežljivost in ustrežljivost med eksperimentalnim procesom.

## POVZETEK

Široka poraba spojin za zaščito pred UV-sončnimi žarki vodi v njihovo vse večje pojavljanje v naravnih okoljih. To sproža številna ugibanja o njihovi usodi v naravi, saj je slednja za številne UV-filtre še nepoznana. UV-filtri iz skupine benzofenonov so pogoste sestavine sončnih krem in zato obstaja velika verjetnost, da zaidejo v vodno okolje. Poznavanje okolju nevarnih lastnosti benzofenonov je pomanjkljivo, zato smo v diplomski nalogi preučevali potencialno strupenost in estrogensko aktivnost organskih UV-filtrov, in sicer 2-hidroksi-4-metoksibenzofenona (BP3) ter 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonske kisline (BP4) na vodne organizme. Strupenost izbranih UV-filtrov smo določali na zelene alge (*Desmodesmus subspicatus*), morske bakterije (*Vibrio fischeri*), vodne bolhe (*Daphnia magna*) in ikre rib cebric (*Danio rerio*). Hkrati smo testirali še potencialno estrogensko aktivnost obeh benzofenonov s testom YES z gensko spremenjenimi glivami kvasovkami (*Saccharomyces cerevisiae*). Ugotavljali smo tudi strupenost in estrogensko aktivnost klorirane oblike BP3, imenovane (5-kloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)fenilmetanon, saj se ta pojavlja kot potencialni produkt BP3 v okoljih z dovolj prisotnega klora. Rezultati so pokazali, da je bil BP3 strupen za večino uporabljenih organizmov, BP4 pa bistveno manj. Klorirana oblika BP3 je bila zaradi hidrofobnosti težavna za testiranje strupenosti z bakterijami, vodnimi bolhami in ribami, v testih strupenosti z zelenimi algami pa smo ugotovili povečano strupeno delovanje. S testom YES smo dokazali, da nobena od testiranih spojin ni bila estrogensko aktivna.

**KLJUČNE BESEDE:** benzofenoni, estrogenska aktivnost, strupenost, UV-filtri, vodno okolje

## SUMMARY

Nowadays a variety of UV light absorbing products is widely used and consequently pollution of the aquatic environment with these products has increased. A fate of UV filters in the environment is mostly unknown. UV filters from the benzophenone family are frequently used in sunscreens and this is why there is a significant probability to find them in the aquatic environment. There is a lack of available toxicity data of benzophenones on aquatic organisms and therefore we decided to study toxicity and estrogenicity of some UV filters. We have performed toxicity tests and test for estrogenic activity with two organic UV filters 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (BP4). We studied toxic effects of UV filters on marine bacteria (*Vibrio fischeri*), green algae (*Desmodesmus subspicatus*), water flea (*Daphnia magna*) and zebrafish eggs (*Danio rerio*). We have also tested the possibility of estrogenic effect that these two benzophenones could have on the genetically-modified yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*) used in the YES assay. A chlorinated BP3 called (5-chloro-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) phenylmethanone, which could be present in waters with high amounts of chlorine, was also tested for toxicity and estrogenicity. The obtained results showed that BP3 was more toxic than BP4 to tested aquatic organisms. Due to hydrophobic nature of the chlorinated BP3 it was impossible to determine toxicity to bacteria, water flea and fish, but we detected the increased toxicity in a case of green algae. The YES assay demonstrated that all three tested compounds were not estrogenic.

**KEYWORDS:** aquatic environment, benzophenones, estrogenic activity, toxicity, UV filters

## KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 PROBLEM.....	1
1.2 NAMEN.....	1
2 TEORETIČNI DEL.....	2
2.1 UV-SVETLOBA.....	2
2.2 UV-FILTRI.....	2
2.3 BENZOFENONI V KOZMETIKI.....	3
2.3.1 BENZOFENON-4 (BP4).....	3
2.3.2 BENZOFENON-3 (BP3).....	4
2.4 KLORIRANJE IN/ALI RAZGRADNJA IZBRANIH BENZOFENONOV TER NASTANEK 5-KLOROBENZOFENONA.....	4
2.4.1 KLORIRANJE BP4.....	4
2.4.2 KLORIRANJE BP3.....	5
2.5 TESTI STRUPENOSTI.....	7
2.5.1 KRATKOTRAJNI TESTI STRUPENOSTI.....	8
2.5.2 DOLGOTRAJNI TESTI STRUPENOSTI.....	8
2.6 TESTNI ORGANIZMI.....	8
2.6.1 MORSKE BAKTERIJE ( <i>Vibrio fischeri</i> ).....	8
2.6.2 ENOCELIČNE ZELENE ALGE ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ).....	9
2.6.3 VELIKE VODNE BOLHE ( <i>Daphnia magna</i> ).....	10
2.6.4 RIBE CEBRICE ( <i>Danio rerio</i> ).....	11
2.6.5 KVASOVKE ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	12
2.7 OKOLJSKE KONCENTRACIJE UV-FILTROV.....	13
2.8 HORMONSKI MOTILCI.....	14
2.8.1 UČINKI BP3 IN BP4 NA HORMONSKI SISTEM.....	15
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	17
3.1. PRIPRAVA IZHODNIH RAZTOPIN UV-FILTROV.....	17
3.2 TESTI STRUPENOSTI Z LUMINISCENTNIMI BAKTERIJAMI ( <i>Vibrio fischeri</i> ).....	18
3.3 TESTI STRUPENOSTI Z ENOCELIČNIMI ZELENIH ALGAMI ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ).....	20
3.4 TESTI STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI ( <i>Daphnia magna</i> ).....	22
3.5 TESTI STRUPENOSTI S CEBRICAMI ( <i>Danio rerio</i> ).....	23
3.6 TESTI YES S KVASOVKAMI ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	24
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	26

4.1 STRUPENOST BP4 .....	26
4.2 STRUPENOST BP3 .....	28
4.3 STRUPENOST CI-BP3 .....	30
4.4 ESTROGENOST BP4, BP3 IN CI-BP3 .....	31
5 ZAKLJUČKI .....	34
6 VIRI.....	35

## KAZALO SLIK

SLIKA 1: Spojina benzofenon-4 (Dobravec, 2010) .....	3
SLIKA 2: Spojina benzofenon-3 (Dobravec, 2010) .....	4
SLIKA 3: Reakcija BP4 s TCCA v bazičnem mediju (Dobravec, 2010) .....	5
SLIKA 4: Reakcija BP4 s TCCA v vodi (Dobravec, 2010) .....	5
SLIKA 5: Oba predlagana poteka razgradnje BP3 (Negreira in sod., 2008) .....	5
SLIKA 6: Kloriranje BP3 in nastanek 5-klorobenzofenona (Dobravec, 2010) .....	6
SLIKA 7: 5-klorobenzofenon (Vir: <a href="http://www.lookchem.com/cas-328/3286-91-7.html">http://www.lookchem.com/cas-328/3286-91-7.html</a> , junij 2011) ...	7
SLIKA 8: Nacepljen <i>Vibrio fischeri</i> v petrijevki se sveti v popolni temi (Vir: <a href="http://umwelt-sc.com.br/site/areas_laboratorios.php">http://umwelt-sc.com.br/site/areas_laboratorios.php</a> , junij 2011) .....	9
SLIKA 9: <i>Desmodesmus subspicatus</i> pod mikroskopom (Vir: <a href="http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=31627">http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=31627</a> , junij 2011) .....	10
SLIKA 10: Vodne bolhe v akvariju (Vir: <a href="http://www.warrenphotographic.co.uk/05651-water-fleas">http://www.warrenphotographic.co.uk/05651-water-fleas</a> , junij 2011) .....	11
SLIKA 11: Odrasle cebrice (Vir: <a href="http://animalworldofwater.blogspot.com/2011/05/zebra-danio-danio-rerio.html">http://animalworldofwater.blogspot.com/2011/05/zebra-danio-danio-rerio.html</a> , junij 2011) .....	12
SLIKA 12: Celica kvasovke in njeni funkcionalni deli (Raspor, 1996) .....	13
SLIKA 13: Kvasovke pod mikroskopom pri 1000x povečavi (Vir: <a href="http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm">http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm</a> , junij 2011) .....	13
SLIKA 14: Testne spojine, in sicer BP3, Cl-BP3 in BP4 .....	17
SLIKA 15: Termoblok in luminometer proizvajalca Dr. Lange za izvedbo testa zaviranja luminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> (Vir: <a href="http://www.dekonta.cz/en/services-and-products/laboratory-sevices/laboratory-equipment.html">http://www.dekonta.cz/en/services-and-products/laboratory-sevices/laboratory-equipment.html</a> , junij 2011) .....	19
SLIKA 16: Princip štetja v Bürkerjevi kamrici; puščici prikazujeta potek štetja alg (Vir: <a href="http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online%20courses/faoman/mcd/micro/work22.htm">http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online%20courses/faoman/mcd/micro/work22.htm</a> , junij 2011) .....	21
SLIKA 17: Mladice vodnih bolh v steklenih petrijevkah (BP4 600 mg/l) .....	23
SLIKA 18: Ikre cebric v začetnem stadiju razvoja .....	24
SLIKA 19: Priprava mikrotitrne plošče za test YES (Vir: <a href="http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cblmethod_elisa.htm">http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cblmethod_elisa.htm</a> , junij 2011) .....	25
SLIKA 20: Zaviranje luminiscence bakterij v odvisnosti od koncentracije BP4 .....	26
SLIKA 21: Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije BP4 .....	27
SLIKA 22: Negibnost vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BP4 .....	27
SLIKA 23: Zaviranje luminiscence bakterij v odvisnosti od koncentracije BP3 .....	28

SLIKA 24: Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije BP3 .....	28
SLIKA 25: Negibnost vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BP3 .....	29
SLIKA 26: Smrtnost zarodkov v odvisnosti od koncentracije BP3 .....	29
SLIKA 27: Primerjava med zdravim zarodkom kontrole (levo) in poškodovanim zarodkom zaradi prisotnosti BP3 koncentracije 75 mg/l (desno) .....	30
SLIKA 28: Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije Cl-BP3 .....	30
SLIKA 29: Aktivnost $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije BP4.....	31
SLIKA 30: Aktivnost $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije BP3.....	32
SLIKA 31: Aktivnost $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije Cl-BP3 .....	32
SLIKA 32: Mikrotitrna plošča z BP4 .....	33
SLIKA 33: Mikrotitrna plošča z BP3 .....	33
SLIKA 34: Mikrotitrna plošča s Cl-BP3 .....	33

## KAZALO TABEL

PREGLEDNICA 1: Hitrost reakcije ( $t_{1/2}$ ) kloriranja BP3 pod različnimi eksperimentalnimi pogoji pri sobni temperaturi (Negreira in sod., 2008: 5).....	6
PREGLEDNICA 2: Akutna strupenost BP4 in BP3 za vodne bolhe ( <i>D. magna</i> ) ter primerjava obeh z bolj lipofilnim UV-filtrom (Fent in sod., 2009: 2).....	14



# 1 UVOD

S pojmom onesnaževala se naziva veliko število kemikalij: od preprostih anorganskih ionov do kompleksnih organskih molekul. Onesnaževanje se deli na antropogeno in naravno. Antropogena onesnaževala vstopajo v ekosistem po različnih poteh, kot je nenamerno slabo upravljanje s prostorom in stvarmi (onesnaževanje iz rudnikov, sežigi/požari, ladijske razbitine itd.). Onesnaževala se množično sproščajo tudi s slabim upravljanjem z odlagališči odpadkov, kjer lahko pride do hudih onesnaženj podtalnice zaradi strupenih izcednih vod. Poznamo še namerno antropogeno onesnaževanje, s katerim se človek ubrani pred neželenimi organizmi, kot so pleveli, mrčes, glodavci in podobno. Onesnaževanje je lahko tudi popolnoma naraven pojav. To se dogaja na območjih s povišano vulkansko aktivnostjo, kjer se sprošča veliko strupenih plinov, kot je  $\text{SO}_2$ . Tako sproščena onesnaževala imajo dobre možnosti za potovanje v prostoru in lahko onesnažijo velika območja sveta. To velja zlasti za onesnaževala, ki se premikajo v zračnih masah ter vodi (Walker in sod., 1997). Med vodna onesnaževala sodijo tudi UV-filtri antropogenega izvora.

Veliko število organskih spojin, sposobnih absorpcije sončne UV-svetlobe, se uporablja v kremah za sončenje, kot zaščita pred opeklinami in kožnim rakom. Delež teh snovi lahko dosega tudi 10 % teže določenega proizvoda. Te snovi se uporablja v kozmetiki, tako za zaščito las in kože pred UV-svetlobo kot tudi za podaljšanje roka trajanja izdelkov. Spojine, sposobne absorpcije, se dodaja tudi številnim drugim izdelkom, kot so tekstil in razne plastike. V zadnjih desetletjih se raba UV-zaščitnih sredstev vztrajno večja, kar je posledica večje osveščenosti ljudi o negativnih učinkih UV-sevanja na kožo (Díaz-Cruz in Barceló, 2009). Zaradi večje porabe UV-filtrov se večja tudi njihovo pojavljanje v naravnih okoljih. Da bi bolje razumeli škodljive vplive, ki jih imajo antropogene snovi na organizme v okolju, uporabljamo različne ekotoksikološke metode.

Ekotoksikologija je veda, ki preučuje posledice delovanja strupenih snovi na organizme, populacije in združbe ter obnašanje teh snovi v okolju. Eden izmed ciljev ekotoksikološkega testiranja je pridobitev ustreznih podatkov, ki se jih uporabi za določitev varne koncentracije za organizme iz različnih ekosistemov za določeno kemikalijo ter v nadaljevanju za oceno tveganja kemikalij za okolje (Jørgensen, 2010).

## 1.1 PROBLEM

S hitrim človeškim razvojem se večja tudi proizvodnja in poraba različnih UV-filtrov. Določene količine UV-filtrov končajo tudi v okolju, kjer je njihova nadaljnja usoda še slabo raziskana. Predpostavlja pa se njihova potencialna strupenost za organizme v okolju. Problem lahko nastane tudi pri stiku UV-filtrov s klorom v kloriranih kopalnih vodah. Obstaja verjetnost, da so tako nastali klorirani produkti primarnega UV-filtra še bolj strupeni za organizme.

## 1.2 NAMEN

Namen diplomskega dela je bil preučiti morebitno strupenost in estrogensko aktivnost izbranih UV-filtrov in kloriranega derivata na vodne organizme, saj so literaturni podatki zelo skopi. Testirana UV-filtra sta predstavnika družine benzofenonov, in sicer 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) in 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kislina (BP4). Poleg njiju smo določali tudi strupenost kloriranega UV-filtra BP3, 5-klorobenzofenona (Cl-BP3). Ob testih strupenosti na bakterije, alge, rake in ribe smo izvedli še test YES (Yeast Estrogen Screen), s katerim smo preverili potencialno estrogenost preučevanih UV-filtrov.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 UV-SVETLOBA

Elektromagnetno valovanje delimo na več delov, in sicer glede na dolžino elektromagnetnega vala. Najdaljše valovne dolžine dosegajo radijski valovi (od 100 m do 0,1 mm), nato sledi mikrovalovanje (od 15 mm do 1 mm), infrardeče valovanje (od 1 mm do 760 nm), vidna svetloba (od 760 nm do 380 nm), ultravijolično valovanje (od 400 nm do 100 nm), rentgenski žarki (od 10 nm do 1 pm) ter gama žarki (od 1 pm in manj) (ISO/DIS 21348, 2005).

Sončno ultravijolično radiacijo (UVR) delimo na več delov. Najmanjšo valovno dolžino ima UVC (od 100 nm do 280 nm), sledita UVB (od 280 nm do 315 nm) in UVA (od 315 nm do 400 nm) (ISO/DIS 21348, 2005).

Na transmisijo UV-svetlobe do človeške kože vplivajo številni dejavniki. Ti vključujejo naravno prisotne zaščitne snovi, kot so oblaki, megla in druge snovi v atmosferi, ki prestrežejo pot svetlobe do tal. Tak primer je sončna UVC-svetloba, ki se filtrira že v ozonski plasti in ne doseže Zemljine površine. V človeški koži so tudi epidermalne kromofore, ki ščitijo kožo pred UV-žarki. Človek svojo kožo zaščiti tudi s fizičnimi preprekami, kot so obleke, pokrivala in sončna očala, ter z uporabo kozmetičnih sredstev z dodatki UV-filtrov (Kullavanijaya in Lim, 2005).

### 2.2 UV-FILTRI

Organski UV-filtri se uporabljajo v številnih izdelkih za osebno nego. Prisotni so v različnih kremah, sredstvih za sončenje, kremah za obraz in roke, losjonih za telo ter v ostali kozmetiki. UV-filtri se nanaša na kožo kot površinsko zaščito pred poškodbami, ki jih povzroča UV-svetloba. Energija UV-sevanja je večja od energije vidne svetlobe, zato lahko povzroči degradacijo organskih snovi. Poškodbe kože zaradi UV-sevanja nastanejo kot posledica povečanega delovanja prostih radikalov v njej. Večina UV-filtrov, vključno z benzofenoni, je fotoiniciatorjev. Fotoiniciator je vsaka snov, ki pod vplivom UV-svetlobe razpade na proste radikale (Jjemba, 2008). Radikali nastanejo kot posledica cepitve vezi znotraj molekule fotoiniciatorja ali pa pri postopku, ko vzbujena molekula fotoiniciatorja reagira z drugo molekulo (ko-iniciator), pri čemer nastanejo prosti radikali (BAILINGCN, 2012). Prosti radikali iz filtrov nadomestijo morebitne proste radikale, ki bi nastali v koži, zaradi UV-sevanja (Jjemba, 2008). Tako fotoiniciatorji preprečijo vzbujanje molekul substrata (kože) ter ga s tem zaščitijo (BAILINGCN, 2012).

Za razliko od anorganskih UV-filtrov, kot sta titanov oksid ( $\text{TiO}_2$ ) in cinkov oksid ( $\text{ZnO}$ ), ki svetlobo odbijata oziroma sipata, organski filtri največ svetlobe absorbirajo. Oba tipa anorganskih filtrov nudita učinkovito zaščito proti UVB-žarčenju (Jjemba, 2008).

Večino organskih UV-filtrov sestavljajo molekule aromatskih spojin, ki so vezane prek karbonilne skupine. Taka struktura omogoča molekulam, da absorbirajo UV-žarčenje ter ga emitirajo kot energijo nižje valovne dolžine (Jjemba, 2008).

Izdelki, ki vsebujejo UV-filtri, so kategorizirani tudi na podlagi zaščitnega faktorja pred opeklinami, ki jih povzroča UVB. Faktor zaščite je odvisen od koncentracije učinkovine v posameznemu izdelku. Večina krem za sončenje vsebuje mešanico različnih UV-filtrov. S tem dosežemo popolno pokritost spektra v UV-delu (Jjemba, 2008).

Večina organskih UV-filtrov je aromatskih spojin z nekaj nenasičenimi stranskimi verigami, lipofilnih in z velikim porazdelitvenim koeficientom  $\log K_{ow}$  (oktanol/voda) (Jjemba, 2008).

Vnos UV-filtrov v okolje se vrši direktno prek rekreacije, kot je plavanje, ali pa indirektno s tuširanjem, pranjem obleke in brisanjem kože. Majhne količine filtrov izločamo tudi z ekskrecijo zaradi vnosa filtra v telo prek kože (Jjemba, 2008).

## 2.3 BENZOFENONI V KOZMETIKI

Benzofenoni so organski UV-filtri, sestavljeni iz dveh aromatskih obročev, povezanih med seboj s karbonilno vezjo. Na obroče so vezane različne funkcionalne skupine. Zaradi specifičnih funkcionalnih skupin so benzofenoni dobili različna imena. Trenutno obstaja na trgu kar dvanajst vrst benzofenonov (Draelos, 2008).

Kozmetična industrija uporablja tri spojine iz družine benzofenonov, in sicer benzofenon-3 (oksibenzon), benzofenon-4 (sulisobenzon) in benzofenon-8 (dioksibenzon). Ti filtri nudijo zaščito kože v glavnem pred kratkovalovnimi UVA2-žarki valovne dolžine okoli 320 nm in manj (Draelos, 2008).

V Evropski uniji je BP3 in BP4 dovoljeno uporabljati v kozmetiki. Najvišja koncentracija BP3 v izdelku ne sme presegati 10 %. Uradni list predvideva še dodatno opozorilo na embalaži izdelka: vsebuje benzofenon-3, ki pa ni obvezno, če je koncentracija BP3 0,5 % ali nižja. Opozorilo se nanaša na morebiten fotoalergijski potencial snovi. Koncentracija BP4 v kozmetičnih izdelkih pa ne sme presegati 5 % (kot kislina) (Uradni list EU, 2009).

### 2.3.1 BENZOFENON-4 (BP4)

IUPAC ime: 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonska kislina

Druga imena: Sulisobenzon

CAS številka: 4065-45-6

Molekulska formula:  $C_{14}H_{12}O_6S$

Molska masa: 308,31 g/mol

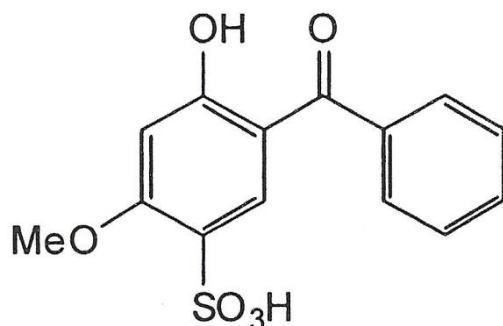
Tališče: 145 °C

Vrelišče: razpade\*

Raba: Za zaščito usnja in drugih tekstilnih vlaken pred ultravijolično svetlobo. Kot UV-filter v kozmetiki (The Merck index, 2001).

Akutni LD50 za oralni vnos: 3530 mg/kg (podgane)\*

\*(ScienceLab, 2011)



**Slika 1:** Spojina benzofenon-4 (Dobravc, 2010)

### 2.3.2 BENZOFENON-3 (BP3)

IUPAC ime: 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon

Druga imena: Oksibenzon

CAS številka: 131-57-7

Molekulska formula:  $C_{14}H_{12}O_3$

Molska masa: 228,24 g/mol

Tališče: 66 °C

Vrelišče: 160 °C\*

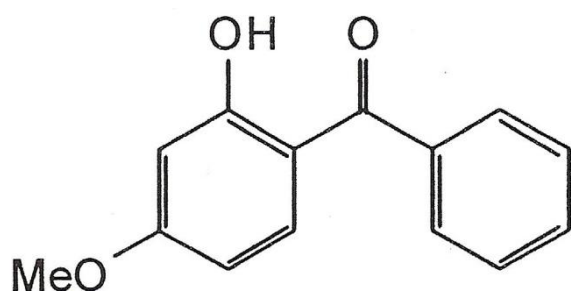
Topnost: netopen v vodi, topen v organskih topilih (alkoholi, toluen)\*

Raba: Za zaščito in stabilizacijo plastik ter barv pred ultravijolično svetlobo. Kot UV-filter v kozmetiki (The Merck index, 2001).

Akutni LD50 za oralni vnos: 7400 mg/kg (podgane)\*

Toksičnost za ljudi: lahko povzroči kontaktni fotoalergijski dermatitis\*

\*(ScienceLab, 2011)



*Slika 2: Spojina benzofenon-3 (Dobravec, 2010)*

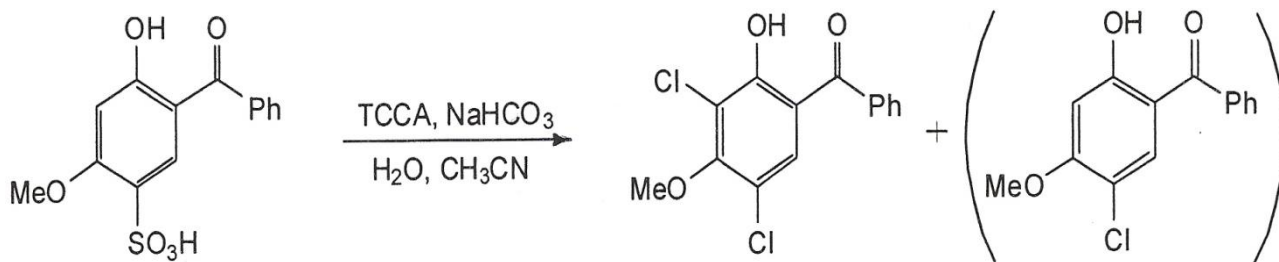
## 2.4 KLORIRANJE IN/ALI RAZGRADNJA IZBRANIH BENZOFENONOV TER NASTANEK 5-KLOROBENZOFENONA

S spiranjem UV-filtrov s kože se večja verjetnost njihovega stika s snovmi, raztopljenimi v vodi. Mogoče so različne reakcije in raznovrstni produkti. V kopalni in pitni vodi je zelo razširjen element klor. Ta se uporablja za dezinfekcijo vode. Zaradi oksidativnih lastnosti klora je verjetnost nastanka kloriranih produktov UV-filtrov zelo velika. Mogočih je več različnih kloriranih oblik istega tipa filtra. Razgradnja oziroma kloriranje UV-filtra lahko privede do še bolj strupenih produktov za vodne organizme (Dobravec, 2010).

### 2.4.1 KLORIRANJE BP4

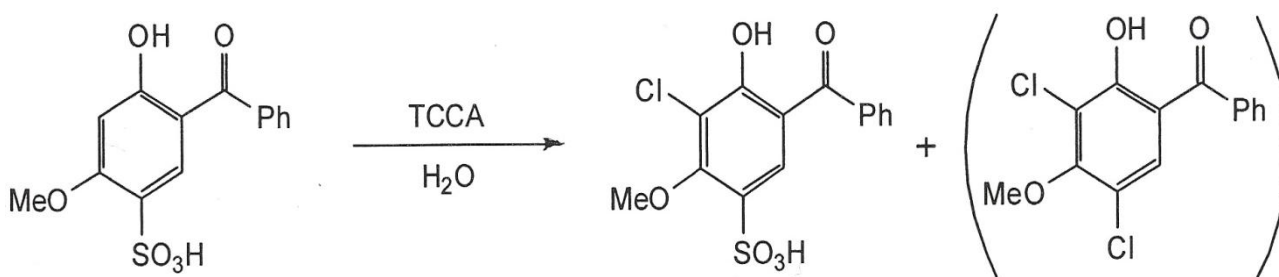
Najpogostejša sredstva za kloriranje pitne ali tehnološke vode so soli hipoklorove kisline (HClO) in trikloroizocianurna kislina (TCCA). Slednja je še posebej priljubljena za dezinfekcijo bazenskih voda. Velika poraba BP3 in BP4 v kozmetiki poveča možnost stika s TCCA, kar lahko privede do tvorbe kloriranih oblik UV-filtrov (Dobravec, 2010).

Kloriranje benzofenona-4 s TCCA lahko poteka v bazičnih pogojih, pri čemer pride do eliminacije sulfonske kisline, ki jo zamenja klorov atom. Tako dobimo iz BP4 dve spojini, pri čemer zadnja nastaja v sledovih (Dobravec, 2010).



**Slika 3:** Reakcija BP4 s TCCA v bazičnem mediju (Dobravec, 2010)

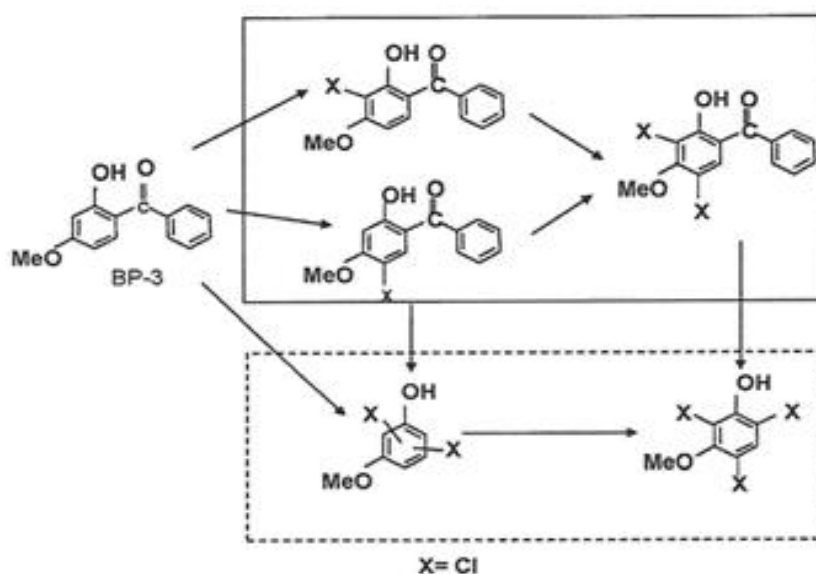
Vodna raztopina benzofenona-4 ima nizek pH. Pri teh pogojih poteče reakcija s TCCA, pri čemer nastane iz BP4 dve spojini. Druga spojina nastane v sledovih. Po dveh urah v reakcijski zmesi ni več izhodne spojine (Dobravec, 2010).



**Slika 4:** Reakcija BP4 s TCCA v vodi (Dobravec, 2010)

## 2.4.2 KLORIRANJE BP3

Halogeniranje in/ali razgradnja benzofenona-3 poteka po dveh poteh. Prvi način predpostavlja nastanek halogeniranega BP3 na *orto* in/ali *para* mestih fenola. *Mono-* in *di-*halogenirane strukture lahko tudi razpadejo, in sicer zaradi razgradnje karbonilne vezi, pri čemer dobimo trikloro-metoksifenol. Razpad BP3 se lahko zgodi že na samem začetku halogeniranja, kar predvideva drugi način na **Sliki 5**, v črtkanem okvirju (Negreira in sod., 2008).



**Slika 5:** Oba predlagana poteka razgradnje BP3 (Negreira in sod., 2008)

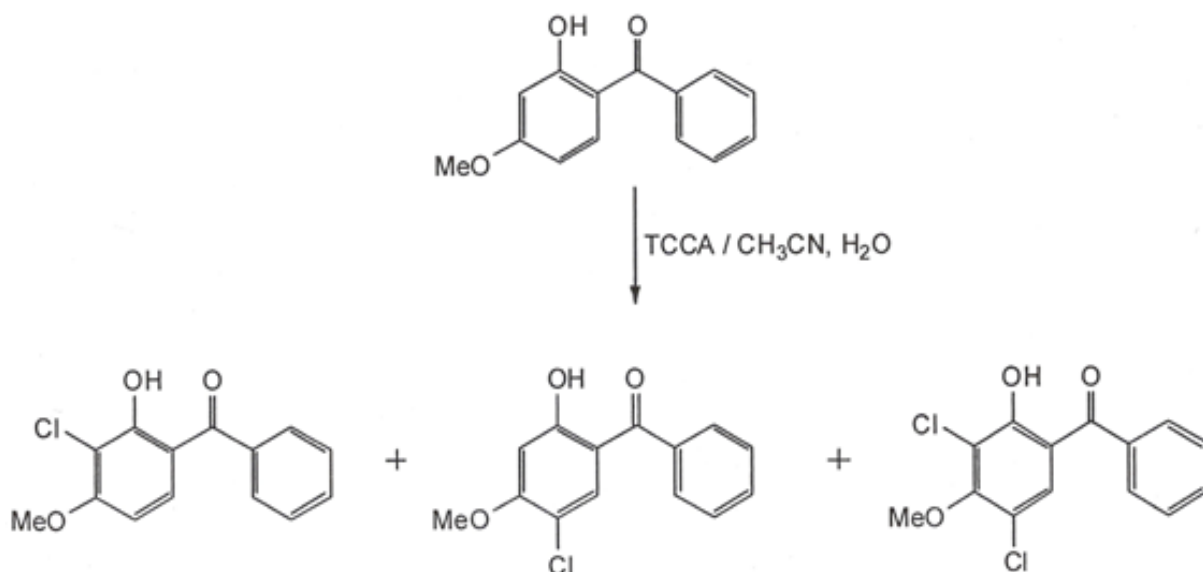
Stabilnost BP3 v klorirani vodi je odvisna od koncentracije klora, pH vode ter prisotnosti drugih raztopljenih snovi. BP3 je pri višjem pH manj stabilen, zato reakcija kloriranja poteka hitreje. Hitrost kloriranja benzofenona-3 pospešuje tudi prisotnost drugih oksidantov v vodi. Sledovi bromida, enakih koncentracij kot v naravnem vodnem okolju, vodijo v razpad BP3, pri čemer nastanejo bromirane spojine in mešanica kloro-bromovih spojin. Bromirane snovi uvrščamo med bolj problematične kot klorirane snovi. Vplivi različnih pH vrednosti, koncentracije klora in dodatki bromida na stabilnost BP3 v vodi so prikazani v **Preglednici 1** (Negreira in sod., 2008).

Na reaktivnost molekule benzofenona vpliva vrsta funkcionalne skupine, ki je vezana na osnovno ogrodje spojine. Benzofenon-1 (2,4-dihidroksibenzofenon) je najpomembnejši metabolit BP3. Od BP3 se razlikuje samo v zamenjavi metoksi skupine s hidroksi. Ta razlika omogoča BP1 hiter proces kloriranja. BP1 se popolnoma klorira v 40 sekundah pri koncentraciji klora 0,1 µg/ml (Negreira in sod., 2008).

**Preglednica 1:** Hitrost reakcije ( $t_{1/2}$ ) kloriranja BP3 pod različnimi eksperimentalnimi pogoji pri sobni temperaturi (Negreira in sod., 2008: 5)

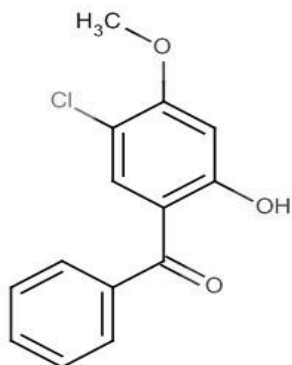
Analit	Matriks	pH	Dodan prosti klor (µg/ml)	Dodan bromid (ng/ml)	$t_{1/2}$ (min)
BP3	Ultračista voda	7.2	0.30	0	2.7
		7.2	0.60	0	1.2
		8.2	0.30	0	1.8
		8.2	0.60	0	0.8
		7.2	0.30	1	2.8
		7.2	0.30	10	0.8

Dobravec M. (2010) navaja možnost nastanka mešanice treh kloriranih oblik benzofenona-3 ob stiku s TCCA. BP3 je v vodi slabo topen, zato je reakcija potekala pri sobni temperaturi v zmesi topil CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 1 : 2. Reakcija je eksotermna. Po dobrih dveh urah ni več izhodne spojine. Produkti so rumene kristalinične spojine. Prvi dve nastali spojini sta blede rumene barve, medtem ko je tretja intenzivno rumena. Spojina na sredini **Slike 6** je 5-klorobenzofenon.



**Slika 6:** Kloriranje BP3 in nastanek 5-klorobenzofenona (Dobravec, 2010)

IUPAC ime: (5-kloro-2-hidroksi-4-metoksifenil)fenilmetanon  
CAS številka: 3286-91-7  
Molekulska formula: C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>Cl  
(Vir: <http://www.lookchem.com/cas-328/3286-91-7.html>, junij 2011)



**Slika 7:** 5-klorobenzofenon (Vir: <http://www.lookchem.com/cas-328/3286-91-7.html>, junij 2011)

## 2.5 TESTI STRUPENOSTI

Strupenost je stopnja škodljivega delovanja neke snovi na organizem. Za vse snovi, s katerimi se sreča organizem, velja pravilo, da je pravi odmerek tisti, ki loči zdravilno učinkovino od strupa. To pomeni, da je škoda na organizmih odvisna od koncentracije tuje snovi ter časa izpostavitve (Walker in sod., 1997). Koncentracije kemikalij v vodi merimo z inštrumenti, strupenost pa lahko ugotovimo samo s testi na živih organizmih, saj naprava, s katero bi merili strupenost, ne obstaja (Jørgensen, 2010).

Vsi posamezniki znotraj populacije organizmov se na prisotnost kemikalije v svojem okolju ne odzovejo enako. Odstopanja pri osebkih so opazna tako pri koncentraciji kot času izpostavitve. Nekateri posamezniki se odzovejo pri nižjih koncentracijah, drugi pri višjih, nekateri prej, drugi kasneje, nekateri pa sploh ne. Normalna porazdelitev odgovora na kemikalijo ima sigmoidno obliko. To pomeni, da majhen del populacije občuti strupenost že pri najnižjih koncentracijah, drugi del pa pri najvišjih. Med tema ekstremoma koncentracij pa se nahaja večina. Zaradi takega odziva organizmov so toksikološki testi izvedeni z določenim razponom koncentracij kemikalije (Jørgensen, 2010).

Teste strupenosti vedno izvajamo v zaprtih sistemih pod laboratorijskimi pogoji. Temperatura in svetloba sta definirani, prostor/medij, v katerem se nahaja testni organizem, prav tako (Jørgensen, 2010). Za potrebe diplomske naloge smo izvajali teste strupenosti na vodnih organizmih. Vodna toksikologija je kvalitativna in kvantitativna študija o toksičnih učinkih kemikalij in drugih antropogenih snovi na vodne organizme. Med toksične učinke se šteje tako letalne (smrtnost) kot subletalne (sprememba v rasti osebkov, razvoju, reprodukciji, obnašanju itd.). Učinke strupenosti se izrazi kvantitativno kot število umrlih osebkov, odstotek izvalitve jajc, spremembe v velikosti organizmov, odstotek inhibicije encimov, število telesnih anomalij in incidence tumorjev (Rand in Petrocelli, 1985).

Za točno opredelitev strupenosti potrebujemo tudi kontrolo. To je vzporedna testna skupina organizmov, katera ni izpostavljena testni snovi (onesnaževalu). Ostali pogoji izvedbe testa pa ostajajo enaki. Z njo se prepričamo, da osnovni pogoji v testih ne vplivajo na dobljene

rezultate (Rand in Petrocelli, 1985). Teste strupenosti delimo na akutne in kronične (Jørgensen, 2010).

### **2.5.1 KRATKOTRAJNI TESTI STRUPENOSTI**

Kratkotrajni oziroma akutni testi strupenosti omogočajo ocenjevanje posledic izpostavitve intenzivnemu, kratkotrajnemu delovanju strupenih snovi (onesnaževala) na testnem organizmu (Ibanez in sod., 2007).

Pri akutnih strupenostnih testih se opazuje naraščajočo smrtnost organizmov glede na koncentracijo testne snovi. LD50 (lethal dose / smrtni odmerek) ali LC50 (lethal concentration / smrtna koncentracija) se uporabljata za opredelitev smrtnosti prek zaužitja snovi oziroma izpostavitve v vodni raztopini. To je koncentracija, ki izzove 50 % smrtnost testiranih organizmov v 96 urah izpostavitve (Ibanez in sod., 2007).

Akutni testi, pri katerih zaznavamo subletalne učinke po izpostavitvi testnega organizma onesnaževalu, opredelimo z EC50 (effective concentration / učinkovita koncentracija). Upoštevanje EC50 je pomembno zlasti pri testih z organizmi, katerih smrtnost je težko dokazljiva, npr. z nevretenčarji. V takih primerih EC50 opredeljuje abnormalno obnašanje organizmov, kot sta imobilizacija in izguba orientacije (Ibanez in sod., 2007).

Strupenostne teste na kopenskih živalih se izvaja prek oralnega zaužitja snovi ali pa prek dermalnega nanosa oziroma direktnega vbizganja snovi v žival (Ibanez in sod., 2007).

### **2.5.2 DOLGOTRAJNI TESTI STRUPENOSTI**

Z dolgotrajnimi testi strupenosti oziroma kroničnimi testi strupenosti opazujemo dolgoročne posledice zastrupljanja na posameznem osebk, vrsti ali populaciji. Med drugim se pri organizmih opazuje njihovo obnašanje, rast in razmnoževanje. Tako se lahko določi LOEC (lowest observed effect concentration), to je najnižja testirana koncentracija, ki že povzroči spremembe v merjenih odzivih organizma. NOEC (no-observed effect concentration) pa je najvišja testirana koncentracija, ki še ne povzroča sprememb v merjenih odzivih pri testnem organizmu (Ibanez in sod., 2007).

## **2.6 TESTNI ORGANIZMI**

Teste strupenosti izvajamo na različnih testnih organizmih. Za potrebe diplomske naloge je bilo izbranih pet testnih organizmov. Strupenost snovi smo testirali na morskih bakterijah (*Vibrio fischeri*), enoceličnih zelenih algah (*Desmodesmus subspicatus*), velikih vodnih bolhah (*Daphnia magna*) in cebricah (*Danio rerio*). Estrogenost snovi smo testirali na gensko spremenjenih kvasovkah (*Saccharomyces cerevisiae*).

### **2.6.1 MORSKE BAKTERIJE (*Vibrio fischeri*)**

Rod *Vibrio* vsebuje gram-negativne, oksidaza-pozitivne, fakultativno aerobne paličaste bakterije, zmožne fermentativnega metabolizma. Večina vrst rodu *Vibrio* ima bičke na obeh polih. Večina bakterijskih vrst tega rodu je vodnih in naseljuje tako sladke kot slane vode. *Vibrio fischeri* spada med halofilne bakterije, saj potrebuje za svoj obstoj približno 3 % NaCl, raztopljenega v vodi. Približno tako sestavo ima morska voda, poleg manjšega števila drugih raztopljenih snovi. Nekaj predstavnikov *Vibrio* skupine je bioluminiscentnih. Mednje sodi tudi



*Vibrio fischeri* (**Slika 8**). V skupini *Vibrio* je prav tako zelo znan predstavnik, in sicer *Vibrio cholerae*, ki povzroča hudo človeško bolezen kolero (Madigan in Martinko, 2006).



**Slika 8:** Nacepljen *Vibrio fischeri* v petrijevki se sveti v popolni temi (Vir: [http://umwelt-sc.com.br/site/areas\\_laboratorios.php](http://umwelt-sc.com.br/site/areas_laboratorios.php), junij 2011)

### 2.6.2 ENOCELIČNE ZELENE ALGE (*Desmodesmus subspicatus*)

*Desmodesmus subspicatus* spada med večje, a še vedno mikroskopske, sladkovodne zelene alge. Alga je prosto plavajoča v vodnem stolpcu, brez sposobnosti lastnega gibanja. Zelene alge so fotosintetski organizmi, njihova zelena barva pa je posledica prisotnosti zelenega fotosintetskega pigmenta klorofila, ki se nahaja v kloroplastih znotraj celic. Alge rastejo v kolonijah po 2, 4 ali 8 skupaj. 16 ali 32 celic skupaj je silno redek pojav. Alge lahko rastejo tudi posamezno. Sprožilec take oblike rasti je povečana koncentracija dušika in fosforja v njihovem okolju. Celice imajo nekaj trnov, kar prikazuje **Slika 9**. Rod *Desmodesmus* je kozmopolitski. Predstavlja začetek prehranjevalne verige, saj služi kot glavna hrana zooplanktonu in nekaterim ribam. Razmnoževanje je aseksualno z autosporami. Do leta 1999 se je rod imenoval *Scenedesmus*, nato pa so rod, na podlagi molekularnih raziskav, razdelili na dva dela, in sicer v rod *Scenedesmus* in *Desmodesmus*. Rod *Desmodesmus* vsebuje trnate alge, *Scenedesmus* pa tiste brez trnov. V evtrofičnih razmerah se alga hitro razrašča in povzroča težave višjim organizmom v teh vodah. Zaradi hitrega odzivanja in lahkega gojenja je *Desmodesmus subspicatus* učinkovit bioindikator. Z njim se lahko preučuje stanje hranil v mirujoči vodi ter ga uporablja kot modelni organizem za preučevanje fizioloških, ekoloških in razvojnih tez (Natural history museum, 2011).



**Slika 9:** *Desmodesmus subspicatus* pod mikroskopom (Vir: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=31627>, junij 2011)

### 2.6.3 VELIKE VODNE BOLHE (*Daphnia magna*)

Velika vodna bolha (*Daphnia magna*) spada v rod vodnih bolh ali kladocerov, ki je vrstno zelo bogat. Prikazana je na **Sliki 10**. To so rakci milimetrskih velikosti. Medtem ko je glava prosta, obdaja trup prvotno velik, prosojnemu plaščku podoben dvoloputast koš. Zelo opazne so velike, razraščene tipalke, s katerimi vodne bolhe plavajo. Očesce v glavi je nastalo z združitvijo obeh sestavljenih oči. Nog je šest parov. Samica velike vodne bolhe lahko zraste do šest milimetrov, samec pa le dva. Vodne bolhe imajo dvojne biološke posebnosti, in sicer partenogenezo in ciklomorfozo. Generacije vodnih bolh, ki si sledijo čez leto v naravnem okolju, so različnega nastanka. Večina generacij je navadno deviškородnih (partenogenetskih). Mladice so ženskega spola, nastale iz neoplojenih, diploidnih jajčec. Prava, haploidna jajčeca nastanejo šele ob posebnih razmerah v okolju. Mladice so kloni mater. To je zelo pomembno za sam test, saj nam omogoča testirane vzorcev na genetsko enakih osebkih. Vodne bolhe hitro dosežejo spolno zrelost. Tretja generacija mladih vodnih bolh je že uporabna za teste. Mi smo uporabljali generacije vodnih bolh od četrte naprej.

V naravi se vodne bolhe razmnožujejo tudi spolno. To se dogaja s prehodom letnih časov. Takrat živali doživljajo nekakšen stres oziroma dražljaj, kar je posledica fizikalno kemijskih pogojev v naravi, ki jim narekuje izleganje jajčec. Pri veliki vodni bolhi so te spremembe posledica krajšega dne, pomanjkanja hrane in zgostitve populacije. Iz pravih haploidnih jajčec se izvalijo samčki, ki nato oplodijo preostala jajčeca in tako se mešanje genov nadaljuje. Deviškородna jajčeca se nahajajo v valilniku na hrbtni strani odrasle bolhe, med košem in trupom. Ta se takoj razvijejo v samičke vodnih bolh. Oplodjena jajčeca pa ob smrti samic padejo na dno. Obdana so s čvrsto lupino, ki jih varuje pred zmrzaljo ali sušo. Druga biološka posebnost vodnih bolh je spreminjanje telesne oblike v zaporednih generacijah, kar imenujemo ciklomorfoza. Ta se pojavlja le sredi večjih jezer, ob bregu in manjših vodah pa ne. Med ciklomorfozo se navadno daljšata in spet krajšata kapucasti izrastek na glavi in koševa končna ost. Rast bodic sproža prisotnost plenilskih žuželčjih ličink. Podaljšani izrastki so dobra obramba, saj plenilskim ličinkam močno otežujejo požiranje plena. Zaradi izredno učinkovitega razmnoževanja so ti rakci zelo pomembna hrana ribam v vseh vodah sveta (Sket in sod., 2003).



**Slika 10:** Vodne bolhe v akvariju (Vir: <http://www.warrenphotographic.co.uk/05651-water-fleas>, junij 2011)

#### 2.6.4 RIBE CEBRICE (*Danio rerio*)

Ribe igrajo pomembno vlogo v vodnih prehranjevalnih spletih. So porabniki na višjih trofičnih nivojih, pogostoma kot končni člen določene prehranjevalne verige. Pripadajo jim pomembne funkcije regulacije v vodnih ekosistemih (ISO 15088, 2007).

Ribe cebrice spadajo v družino *Cyprinidae* (pravi krapovci) znotraj razreda *Osteichthyes* (ribe kostnice). So vitke, do 6 centimetrov dolge ribe srebrno-rumene barve z značilnimi štirimi temnimi vzdolžnimi črtami, ki potekajo od glave do repne plavuti. Spolni dimorfizem ni zelo očiten. Samice so običajno malo večje od samcev. Navadna cebrica je jatna, tropska sladkovodna riba. Njena domovina je JV Azija, kjer naseljuje zmerno do močno porasle vodotoke s temperaturo vode med 22 °C in 27 °C. V divjini se prehranjuje z ličinkami žuželk in rakov. Kot akvarijska riba je odporna, živahna in neizbirčna pri hrani. Cebrico pogosto uporabljajo v genetskih raziskavah, akvaristi pa so vzgojili več različic te priljubljene akvarijske ribice (AquaNubis, 2011). Odrasle ribe cebrice so prikazane na **Sliki 11**.

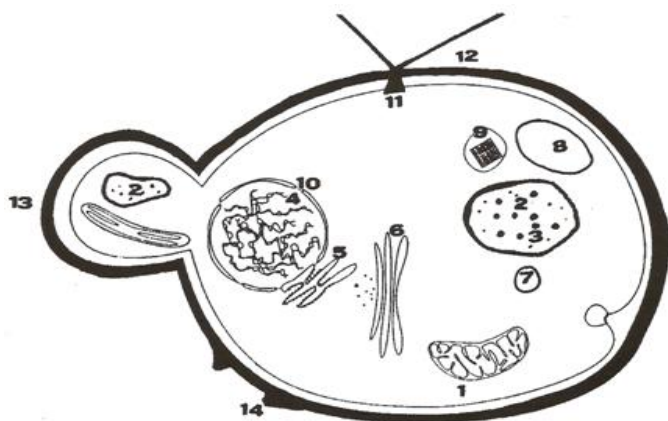


**Slika 11:** Odrasle cebrice (Vir: <http://animalworldofwater.blogspot.com/2011/05/zebra-danio-danio-rerio.html>, junij 2011)

Gojenje cebric (*Danio rerio*) je enostavno. Samice čez vse leto ležejo prozorna, nelepljiva jajčeca premera en milimeter. Jajčeca so raztrošena na dnu akvarija, kjer jih oplodi samec. Embrionalni razvoj cebric je dobro poznan in dokumentiran. Zaradi tega so cebrice ene najpomembnejših testnih rib pri raziskovanjih na področju razvojne biologije vretenčarjev. Potek razvoja zarodka je odvisen od same sestave vode oziroma od njene onesnaženosti. Smrt zarodka oziroma pojav določenih anomalij kaže na možne vplive zaradi onesnaženja vode z določeno snovjo oziroma mešanico snovi (ISO 15088, 2007).

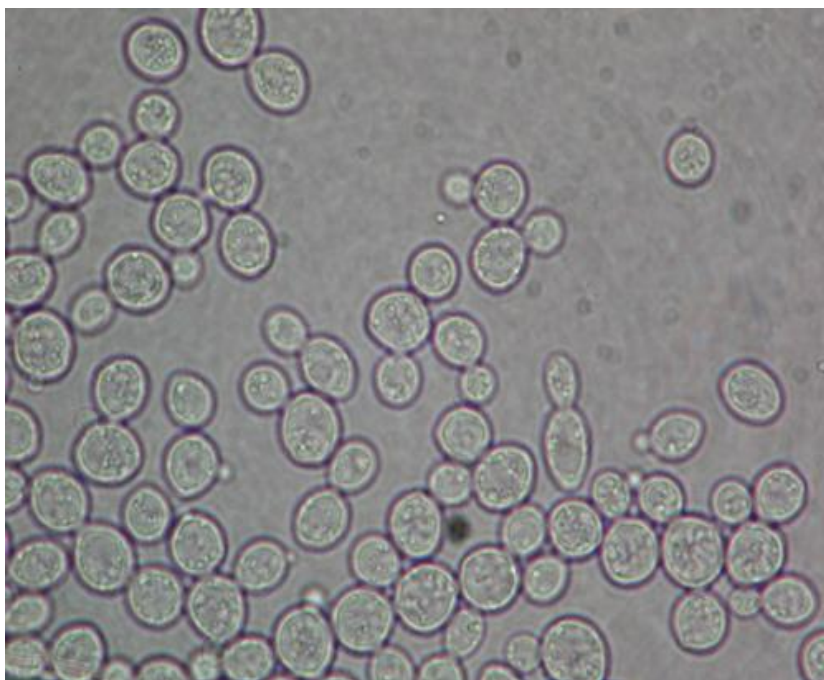
#### 2.6.5 KVASOVKE (*Saccharomyces cerevisiae*)

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko različna skupina organizmov, ki pripada dvema glavnima taksonoma, in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina*. Večina kvasovk se nahaja v zemlji ali na razpadajočih organskih odpadkih ter sodeluje v procesu kroženja organskih in anorganskih snovi. Glive kvasovke obdaja celična membrana, okrog katere je celična stena. Znotraj membrane je jedro ter organeli, kar prikazuje **Slika 12**. Spolno razmnoževanje je poznano pri številnih predstavnikih kvasovk, tako kot tudi njihov razmnoževalni cikel. Na podlagi tega so razvrščene v skupino askomicet ali bazidiomicet. V splošnem se s kopulacijo dveh kvasnih celic oziroma spor začne spolni krog, ki vodi v oblikovanje asko- oziroma bazidiospor. Nespolno razmnoževanje kvasovk pa poteka z brstenjem oziroma pri nekaterih s cepljenjem. Večina kvasovk izkazuje mnogostransko (multilateralno) brstenje, kjer se brsti lahko pojavijo praktično po celi površini odrasle celice. Tak primer je tudi *Saccharomyces cerevisiae* na **Sliki 13**. V aerobnih razmerah metabolizirajo številne sladkorje, medtem ko imajo v anaerobnih razmerah sposobnost fermentacije samo nekatere vrste. Njihovi metabolni proizvodi, kot je alkohol, pri *S. cerevisiae* omogočajo konverzijo živila v novo obliko ob sočasnem konzerviranju. Nekatere izjeme med kvasovkami pa so lahko tudi patogene. Mednje sodijo predstavniki iz rodu *Saccharomyces* in *Candida* (Raspor, 1996).



celica: 1 – mitohondrij, 2 – vakuola, 3 – granule v vakuolah, 4 – jedro, 5 – endoplazmatski retikulum, 6 – Golgijev aparat, 7 – lipidna granula, 8 – shranjevalna granula, 9 – peroksisom, 10 – pore v jedrni membrani, 11 – celična membrana, 12 – celična stena, 13 – brst, 14 – brazgotina brsta

**Slika 12:** Celica kvasovke in njeni funkcionalni deli (Raspor, 1996)



**Slika 13:** Kvasovke pod mikroskopom pri 1000x povečavi (Vir: [http://www.uwyo.edu/virtual\\_edge/lab13/fungi\\_results.htm](http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm), junij 2011)

## 2.7 OKOLJSKE KONCENTRACIJE UV-FILTROV

Študija o predvidenih in dejanskih koncentracijah UV-filtrov v vodah je bila izvedena na dveh švicarskih jezerih. Preučevani jezera sta bili jezero Zürich, tipično sredogorsko jezero, pomembno za rekreacijske namene in kot vir pitne vode ter Hüttnersee, jezero, ki je namenjeno izključno kopanju. Jezero Hüttnersee je bilo, zaradi svoje majhnosti, opredeljeno kot najhujši možen scenarij onesnaženja. Predvidene koncentracije UV-filtrov, med katerimi je bil tudi BP3, so bile pridobljene s pomočjo števila kopalcev in anketnega vprašalnika o porabi UV-zaščitnih sredstev, ki so ga raziskovalci delili mednje. Predvidena koncentracija UV-filtrov v jezeru Zürich je bila približno 300 ng/l, pri Hüttnersee pa 1100 ng/l. Dejanska

koncentracija UV-filtrov, merjena na terenu, je bila nižja od predvidene. Pri jezeru Zürich je bila koncentracija posameznih UV-filtrov med mejo detekcije, tj. med 2 ng/l in 29 ng/l. Jezero Hüttnersee je dosegalo nekoliko višje koncentracije UV-filtrov, in sicer med 2 ng/l in 125 ng/l. Najvišje koncentracije UV-filtrov so se pojavljale v topli polovici leta, kar se ujema s številom kopalcev med poletno sezono. Razlika med predvideno in dejansko koncentracijo je nastopila zaradi začetne predpostavke, da se 50 % UV-filtrov spere s kože kopalcev ter brez vključevanja procesov razgradnje UV-filtrov v okolju. Najvišjo koncentracijo izmed devetih preučevanih filtrov je dosegel BP3, in sicer 125 ng/l v jezeru Hüttnersee (Poiger in sod., 2004).

Benzofenon-3 lahko preide v telo skozi kožo. To je pokazala študija na enajstih prostovoljcih, povprečne starosti 26 let in obeh spolov. Prvi del študije je zaznal izločanje BP3 v urin že po prvem nanosu kreme (2 mg/cm<sup>2</sup> kože). Krema s 4 % BP3 je bila nanesena na celotno telo z izjemo glave in genitalij. Pri vseh prostovoljcih so zaznali prisotnost BP3 v urinu (0,4 % celotnega nanosa BP3) v roku 48 ur po mazanju. Drugi del študije, s prostovoljci povprečne starosti 27 let in obeh spolov, je tudi pokazal prisotnost BP3 v urinu po petdnevem mazanju. Krema je bila nanesena dvakrat dnevno v enakih količinah in enake koncentracije kot pri prvem delu poskusa. Da bi raziskali še vpliv UV-svetlobe na morebiten razpad BP3, so skupino 24 ljudi razdelili. Prve skupine niso izpostavljali UV-svetlobi, drugo pa so. Koncentracija BP3 v urinu je bila višja kot pri prvem delu študije (3,7 % celotnega nanosa BP3), a se pri obeh skupinah ni bistveno razlikovala. Razlog za to je lahko prekratek čas obsevanja z UV-svetlobo in dobra fotostabilnost benzofenona-3 (Gonzalez, 2006).

Akutni testi strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna* in petimi UV-filtri, med katerimi sta bila tudi BP3 in BP4, so pokazali, da strupenost narašča z log *Kow* (lipofilnostjo) testirane snovi (**Preglednica 2**). 48 h EC50 za BP3 je bil 1,9 mg/l, za BP4 pa 50 mg/l. Akutna strupenost je bila določena v skladu s smernicami OECD 202 za akutni imobilizacijski test (Fent in sod., 2009). Rezultati druge študije na ribah so prav tako pokazali, da se BP4 ne akumulira v ribjih lipidih, in sicer zaradi polarnosti molekule BP4. Ta se zato raje raztaplja v vodi kot v maščobi (Zenker in sod., 2008).

**Preglednica 2:** Akutna strupenost BP4 in BP3 za vodne bolhe (*D. magna*) ter primerjava obeh z bolj lipofilnim UV-filtrom (Fent in sod., 2009: 2)

UV-filter	Log <i>Kow</i> *	48 h EC50 (mg/l)
Benzofenon-4	0.89	50
Benzofenon-3	3.64	1.9
3-(4-metilbenziliden)-d-1 kafa	4.95	0.56

\*Log *Kow* po Zenkerju in sod. (2008).

## 2.8 HORMONSKI MOTILCI

Hormonski motilci so biologom in medicinski javnosti znani že od tridesetih let prejšnjega stoletja. Gre za eksogene učinkovine, ki spremenijo funkcije endokrinega sistema, kar vpliva na zdravje posameznika in/ali njegovo potomstvo. So agonisti ali pa antagonisti. Oponašajo endogene hormone v organizmu, se vežejo na specifične receptorje in preprečijo delovanje endogeno prisotnih hormonov. Negativne posledice izzovejo tudi s spremembo razkroja endogenih hormonov in pripadajočih receptorjev. Delujejo lahko na katerikoli stopnji sinteze hormonov, njihove sekrecije, metabolizma, točke delovanja in transporta (Jjemba, 2008).

Glavnina testov s hormonskimi motilci poteka na vodnih organizmih. Temu botrujeta dva med seboj povezana vzroka. Prvi je ta, da vodno okolje prejema vse izpuste odplak, ki jih namensko spuščamo iz čistilnih naprav in neurejene kanalizacije. Drugi vzrok je v tem, da je

bila večina najboljše dokumentiranih primerov endokrinega delovanja kemikalij izvedena na organizmih, ki so izključno vodni ali pa vsaj deloma vezani nanjo (Sumpter, 2005).

Vodni organizmi so konstantno izpostavljeni motilcem hormonskega sistema. Ti so lahko naravnega ali pa antropogenega izvora. Naravno so hormonski motilci prisotni v majhnih koncentracijah, ki ne vplivajo na hormonsko ravnovesje v vodi živečih organizmov (Sumpter, 2005).

Največ raziskav s področja hormonskih motilcev se posveča proučevanju estrogenih snovi, ki povzročajo feminizacijo moških. Obstajajo pa tudi drugi tipi hormonskih motilcev, z drugačnimi učinki na organizme, kot so androgene snovi, antiandrogene ter druge (Sumpter, 2005).

Večina testov z estrogenimi kemikalijami poteka na ribah. To so *in vivo* testi, ki potekajo na nivoju organizma, pri čemer se spremlja povišane koncentracije vitelogenina ter pojav interseksualnosti. Študije, ki bi zajemale celotno populacijo, so redke. Najbolj znana med njimi je raziskava o posledicah TBT (tributil kositra) na pojav interseksualnosti pri morskih polžih, kar lahko vodi v propad njihove populacije (Sumpter, 2005).

### 2.8.1 UČINKI BP3 IN BP4 NA HORMONSKI SISTEM

UV-filtri v vodnem okolju imajo zmožnost vplivanja na hormonski sistem na različne načine, kot agonisti ali antagonisti estrogenosti oziroma androgenosti. Številni med njimi imajo več kot en način delovanja. Čeprav večina UV-filtrov izzove hormonske učinke pri koncentracijah, ki so nekaj velikostnih razredov višje kot v okolju, je široka razširjenost UV-filtrov in izpostavljenost mešanicam z drugimi snovmi lahko vzrok za negativne posledice v okolju zaradi aditivnih učinkov (Kunz in Fent, 2006).

BP3 in BP4 sta se izkazala kot popolna antiandrogena in skoraj antiestrogena v testu YES s človeškima androgen (hAR-human androgen receptor) in estrogen (hER $\alpha$ -human estrogen receptor  $\alpha$ ) receptorjema. Najmočnejši antiestrogen izmed 19 testiranih snovi je bil BP3, a še vedno 45-krat manj učinkovit kot 4HT (4-hidroksitamoksifen), znan antiestrogen. BP3 in BP4 sta se pri istem preskusu hkrati pokazala tudi kot delno estrogena, vendar v manjši meri. V tej študiji sta bila uvrščena v drugo skupino, ki se je od prve in tretje razlikovala po tem, da ni bila popolnoma estrogena ali popolnoma antiestrogena glede na receptor hER $\alpha$ . Ta delni hER $\alpha$  agonizem je lahko posledica dodatnih skupin na osnovnem ogrodju benzofenona, kot sta hidroksi in metoksi skupina ter sulfonska kislina. To nakazuje na kompleksnost vpliva UV-filtrov na hormonski sistem (Kunz in Fent, 2006).

Študija z BP3 na dveh vrstah rib je pokazala, da oksibenzon vpliva na hormonsko ravnovesje osebkov oziroma na njihovo reprodukcijo, vendar pri znatno višjih koncentracijah, kot jih najdemo v naravi. 14-dnevni test na samcih šarenk (*Oncorhynchus mykiss*) in 21-dnevni test na samcih japonske medake (*Oryzias latipes*) je pokazal povišane koncentracije vitelogenina v osebkih pri koncentracijah BP3 okrog 700  $\mu\text{g/l}$ . Test se je izvajal tudi na samicah japonskih medak. Število odlaganih iker se ni bistveno razlikovalo od kontrole. Razlika je nastopila v odstotku uspešne oploditve in izvalitve. Ta je bil nižji pri ikrah, kjer je bila testirana koncentracija BP3 največja, to je 620  $\mu\text{g/l}$  (Coronado in sod., 2008).

Študija o vplivu BP3 in njegove mešanice z derivatom BP1 na hormonski sistem je pokazala na estrogenost spojin ter njihov aditivni učinek v mešanicah. Test je bil opravljen na estrogen-regulirani transkripciji gena pS2, nahajajočega se v celični liniji MCF-7 človeškega tumorja dojke. Intenzivnejša transkripcija gena pS2 je pomenila estrogeni učinek kemikalije. Estrogenost obeh spojin je bila približno pet stopenj nižja v primerjavi z estradiolom (E2), in

sicer E2 >> BP1 > BP3. Rezultati kažejo, da metabolizem BP3 lahko vodi do večje bioaktivacije na novo nastalih produktov, kot je BP1 (Heneweer in sod., 2005).



### 3 EKSPERIMENTALNI DEL

Cilj praktičnega dela diplomske naloge je bil testirati morebitno strupenost in estrogenost BP3, BP4 ter Cl-BP3 na petih vrstah organizmov. Strupenost smo določali na vodnih organizmih, in sicer bakterijah (*Vibrio fischeri* Beijernick, 1889), zelenih algah (*Desmodesmus subspicatus* (Chodat) Hegewald in Schmidt, 2000) in vodnih bolhah oziroma rakih (*Daphnia magna* Straus, 1820). Teste strupenosti smo opravljali tudi na ikrah rib cebric (*Danio rerio* Hamilton Buchanan, 1922). Estrogenost smo preverjali s testom YES, kjer je testni organizem kvasovka (*Saccharomyces cerevisiae*). Vsi testi strupenosti so bili opravljeni po postopkih standardov ISO. Izjema je bil test estrogenosti. Izvajali smo ga po postopku, ki sta ga opisala Routledge in Sumpter (1996).



**Slika 14:** Testne spojine, in sicer BP3, Cl-BP3 in BP4

#### 3.1. PRIPRAVA IZHODNIH RAZTOPIN UV-FILTROV

Testirane spojine se med seboj razlikujejo po topnosti v vodi. BP4 je hidrofilna spojina in se v vodi dobro raztaplja, BP3 in Cl-BP3 pa sta v vodi slabo topni, zato smo ju pripravili v organskih topilih. Po standardu ISO (ISO 14442, 2006) koncentracija topila v testih strupenosti ne sme presegati 0,1 ml/l (0,01 vol. %), zato smo poiskali najučinkovitejše topilo za obe spojini. Zaradi boljše primerjave strupenosti smo želeli uporabiti enako topilo za BP3 in Cl-BP3, ki hkrati ni strupeno za nobenega od petih organizmov. BP3 se je najbolje raztapljal v etanolu in acetonu. V literaturi zasledimo uporabo 70 % etanola za raztapljanje BP1 in BP3 (Heneweer in sod., 2008), Negreira in sod. (2008) pa so za raztapljanje BP3 v vodi uporabljali metanol.

Poleg etanola in acetona smo testirali še druga topila, in sicer acetonitril, etil acetat in DMSO (dimetil sulfoksid). V acetonu se je klorirana oblika BP3 slabše raztapljala kot BP3, topnost Cl-BP3 v acetonu pa je bila vseeno neprimerljivo boljša kot v etanolu in ostalih navedenih topilih. Zaradi slabe topnosti Cl-BP3 v etanolu in njegove strupenosti na alge (Tišler in Kožuh Eržen, 2006) smo izbrali 99,95 % aceton kot topilo za obe spojini. Zaradi omejenosti s priporočili standardov ISO (ISO 14442, 2006) smo pripravljali maksimalne topnosti obeh spojin v acetonu tik prek izoboritvijo.

Pred začetkom vseh testov je bilo treba preveriti strupenost topila. Šele ko smo se prepričali, da aceton v testiranih koncentracijah ni strupen na organizme, smo lahko začeli s testiranjem

BP3 in CI-BP3. Zaradi prisotnosti acetona smo pri vseh nadaljnjih poskusih potrebovali še negativno kontrolo, in sicer z najvišjo uporabljeno koncentracijo acetona v testu. Pri testih strupenosti z BP4 negativne kontrole ni bilo, saj je bila osnovna raztopina spojine pripravljena v deionizirani vodi (dH<sub>2</sub>O).

Vse tri testne spojine imajo po pripravi ustreznih koncentracij v vodi kisel pH in so prozorne. Po nevtralizaciji vzorcev (pH med 7 in 8) postanejo ti blede rumeni. Vzorce smo nevtralizirali z uporabo 0,1 M ali 1 M NaOH.

Pri testu YES nismo imeli negativne kontrole, ker je postopek izvedbe testa drugačen. Vse tri spojine smo pripravili v etanolu z začetno koncentracijo 1000 mg/l. Etanol je za kvasovke sicer strupen, vendar med postopkom priprave testa v celoti izhlapi in tako ne vpliva na poznejše rezultate. Negativna kontrola v testu YES je bil tako etanol in ne acetona kot pri ostalih testih.

Po končanem preskušanju strupenosti topila smo najprej izvedli preliminarne teste za vsako snov na vsakem organizmu v eni seriji. V preliminarnem testu smo uporabili širok razpon koncentracij vzorcev in tako dobili približno območje strupenosti vzorca. Preliminarnemu testu je sledil definitivni, s katerim smo določili točno območje strupenosti, kar nam je omogočilo določitev vrednosti EC<sub>50</sub> ali LC<sub>50</sub>.

### **3.2 TESTI STRUPENOSTI Z LUMINISCENTNIMI BAKTERIJAMI (*Vibrio fischeri*)**

Test je bil opravljen v skladu z ISO-standardom 11348-2, 2007.

S testom določamo akutno strupenost določene kemikalije na luminiscentne bakterije vrste *Vibrio fischeri*. Meri se naravno intenziteto luminiscence bakterij, ki se v prisotnosti strupenega vzorca zmanjša. Zaviranje intenzitete svetlobe primerjamo s kontrolo ter izrazimo v odstotku zaviranja luminiscence. Za pravilno odčitavanje rezultatov moramo uravnati pH v območju  $7 \pm 0,2$ . pH, nižji od 6 in višji od 8, lahko vpliva na luminiscenco bakterij. Prednost tega testa v primerjavi z drugimi biotesti je njegova hitrost in natančnost.

Za test smo uporabljali set LUMIStox LCK-482. *Vibrio fischeri* so morske bakterije, ki za svoj obstoj potrebujejo slano vodo (2 % natrijev klorid). So nepatogene. Bakterije so liofilizirane v steklenih epruvetah in shranjene pri temperaturi -18 °C. Življenjska doba bakterij pri tej temperaturi je od 9 do 12 mesecev. Pripravljene so za takojšnjo uporabo. Pred pričetkom testa smo bakterije odtalili ter zmešali z reaktivacijsko raztopino (glukoza/NaCl s pH 7,0). Test smo izvedli v termobloku pri temperaturi  $15 \pm 0,1$  °C (DR LANGE LUMIStherm Thermostat).



**Slika 15:** Termoblok in luminometer proizvajalca Dr. Lange za izvedbo testa zaviranja luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* (Vir: <http://www.dekonta.cz/en/services-and-products/laboratory-sevices/laboratory-equipment.html>, junij 2011)

V termobloku je bilo prostora za trideset kivet. Razvrščene so bile v treh vrstah po deset kivet (Slika 15). V vrsti A (zgornja vrsta) so bile samo testne snovi. Vrsti B (srednja vrsta) in C (spodnja vrsta) pa sta bili paralelki. Ker so bakterije morski organizmi, so bili vsi testirani vzorci pripravljene z 2 % NaCl. Kontrola je bila tako 2 % NaCl, pozitivna kontrola pa 7,5 % NaCl. Tako visoka slanost pozitivne kontrole je za *Vibrio fischeri* strupena. Po 30-minutni inkubaciji povzroči od 40 do 60 % zaviranje luminiscence. V primeru BP3 in CI-BP3 smo potrebovali še negativno kontrolo, in sicer koncentracijo acetona v najvišji testirani koncentraciji BP3 oziroma CI-BP3.

Poznamo dva postopka priprave testnih vzorcev: DIN in G1. Prvi predvideva polovično redčenje osnovnega vzorca, postopek G1 pa nam omogoča določanje najvišje možne testirane koncentracije, in sicer 80 vol. % vzorca.

Priprava testnih snovi za postopek DIN je bila sledeča: pozitivno kontrolo (7,5 % NaCl) smo dali v A10, in sicer 1,5 ml, kontrolo (2 % NaCl) pa v A1 (2 ml). Negativna kontrola (aceton) je bila v A2 (1,5 ml). V kiveto A9 smo dali 1,5 ml vzorca. V kivete od A7 do A3 smo dali po 1,5 ml 2 % NaCl, v A8 pa 1 ml 2 % NaCl in 2 ml vzorca. V A7 smo dali 1,5 ml vzorca, premešali ter prenesli 1,5 ml v A5. Iz A5 smo nato znova prenesli 1,5 ml v A3. Enak princip prenosa je veljal tudi za sode kivete, in sicer iz A8 v A6 po 1,5 ml ter nato iz A6 v A4 tudi po 1,5 ml. Pri BP4, kjer ni bilo negativne kontrole, smo redčitve izvajali do A2.

Postopek G1 je bil podoben postopku DIN, in sicer: pozitivna kontrola (7,5 % NaCl) je bila v kiveti A10 (1,5 ml), kontrola (2 % NaCl) pa v A1 in A3 po 2 ml. Negativno kontrolo (aceton) smo dali v A9 (1,5 ml). 2 ml vzorca smo dali v A2, v A8 pa 1,5 ml. V kivete od A7 do A4 smo dali po 1,5 ml 2 % NaCl. V A7 smo dali še 1,5 ml vzorca, premešali ter prenesli 1,5 ml v A6. Iz A6 smo nato prenesli 1,5 ml v A5 in po enakem postopku še v A4. Pri BP4, kjer ni bilo negativne kontrole, smo redčitve pripravljali od A8 navzdol.

Postopka DIN in G1 sta se razlikovala tudi pri pripravi bakterij v paralelkah B in C. Pri postopku DIN smo bakterije takoj zmešali z reaktivacijsko raztopino in jih nato dali v kivete od B1 do C10 po 500 µl. Postopek G1 pa je najprej predvideval dodatek 4,5 ml reaktivacijske raztopine ter vnos tako pripravljenih bakterij v kivete od B1 do C2 po 200 µl. Ostale bakterije smo zmešali z reaktivacijsko raztopino in jih dali v preostale kivete vrst B in C po 500 µl.

Luminiscenco bakterij smo merili v luminometru (dr. LANGE LUMISTox) (**Slika 15**). Najprej smo izmerili luminiscenco samih bakterij v kivetah od B1 do C10. Nato smo v kivete prenašali pripravljene vzorce iz vrstice A. Pri DIN postopku smo prenašali po 500 µl vzorca. Pri postopku G1 smo v kivete od B1 do C2 prenašali po 800 ml vzorca, v ostale kivete od B3 do C10 pa po 500 ml. Zaviranje luminiscence bakterij smo merili po pretečenih 30 minutah. Razliko med prvo in drugo meritvijo smo preračunali na kontrolo ter dobili odstotek zaviranja luminiscence bakterij. Celoten postopek je opisan v nadaljevanju. Za izračun odstotka inhibicije luminiscence smo uporabljali računalniško programsko opremo LUMISsoft4 (Lange, 2000).

### **Postopek izračuna odstotka zaviranja luminiscence pri bakterijah:**

Najprej smo izračunali korekcijski faktor fK, ki ga določajo meritve kontrole, in sicer  $fK = I_t/I_0$ , pri čemer je  $I_0$  začetna luminiscenca bakterij v kiveti ter  $I_t$  luminiscenca po dodatku določenega volumna 2 % NaCl. Ker so bili vsi vzorci pri testu z bakterijami v paralelkah, vključno s kontrolo, smo izračunali oba fK kontrole ter ju povprečili. Dobljeno povprečje smo nato pomnožili z začetno intenziteto svetlobe ( $I_0$ ) vseh vzorcev za vsako ponovitev posebej. Tako smo dobili vrednost  $I_{ct}$ , ki je dejansko vrednost  $I_0$ , popravljena s korekcijskim faktorjem. Iz dobljenih  $I_{ct}$  smo izračunali odstotek zaviranja luminiscence bakterij za vsak vzorec posebej. Vrednost intenzitete svetlobe po dodatku določenega volumna vzorca ( $I_t$ ) smo odšteli od  $I_{ct}$  in delili z  $I_{ct}$  ter pomnožili s 100, da smo dobili odstotke. Izračun smo ponovili za vsak vzorec posebej, in sicer  $(I_{ct}-I_t)/I_{ct} * 100 = \% \text{ zaviranja}$ . Dobljeno  $I_{ct}$  smo povprečili in dobili odstotek zaviranja luminiscence bakterij za vsak testiran vzorec.

### **3.3 TESTI STRUPENOSTI Z ENOCELIČNIMI ZELENIMI ALGAMI (*Desmodesmus subspicatus*)**

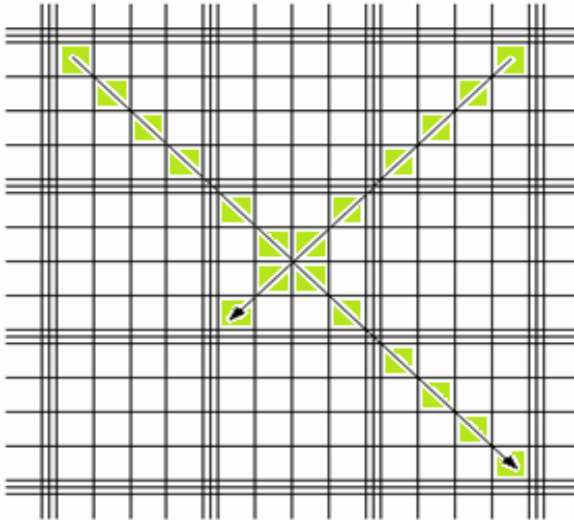
Test je bil opravljen v skladu z ISO-standardom 8692, 2004.

Ta mednarodni standard predstavlja metodo za določanje zaviranja rasti enoceličnih zelenih alg zaradi toksičnih učinkov onesnaževal ali njihovih mešanic. Metoda je primerna za snovi, ki so v vodi lahko topne. Modifikacija tega standarda ISO 14442, 2006 pa je namenjena testiranju snovi, ki so v vodi težje topne, hlapne ali pa spadajo pod težke kovine.

Standard daje na izbiro dvoje vrst testnih organizmov, in sicer *Desmodesmus subspicatus* in *Pseudokirchneriella subcapitata*. Obe vrsti zelenih alg sta planktonski, pripadajoči redu *Chlorococcales* (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*). Naši testi so bili opravljeni z algami vrste *Desmodesmus subspicatus*.

#### **Gojenje alg in priprava kulture za teste strupenosti:**

Alge smo gojili v Jaworskem mediju (ISO 8692, 2004). Tri dni pred začetkom testa smo jih precepili v s hranivi precej manj bogat rastni medij, sestavljen samo iz ključnih sestavin za njihov obstoj. Erlenmajerice z algami smo pustili na stresalniku (125 stresljajev/min., 15 min stresanja/15 min mirovanja) pod belo svetlobo (osvetljenost 4000 luksov). V tem času so se namnožile in rastni medij je postal živo zelene barve. Alge smo prešteli v Bürkerjevi kamrici. Prešteli smo obe kamrici po diagonali, in sicer tako kot prikazuje **Slika 16**. Z izračunoma smo določili koncentracijo alg v vodi ter ustrezen volumen alg za testiranje v različnih koncentracijah UV-filtrov.



**Slika 16:** Princip štetja v Bürkerjevi kamrici; puščici prikazujeta potek štetja alg (Vir: <http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online%20courses/faoman/mcd/micro/work22.htm>, junij 2011)

### Izračun koncentracije alg v ISO rastnem mediju:

$N_{alg}/ml = ((\text{število vseh alg v obeh kamricah} \times 1000 \times \text{redčitveni faktor}) / (\text{površina štetja} (mm^2) \times \text{globina celice} (mm) \times \text{število prešteti kvadratkov}))$  oziroma:

$$N_{alg}/ml = (\text{število vseh alg} \times 1000) / 0,16$$

Izračun potrebnega volumna alg za izvedbo testov strupenosti, ki ga dodamo v 100 ml bučke:

$$V_{alg} = (1 \times 10^4 \text{ alg}^* \times 100 \text{ ml}) / \text{koncentracija alg v ISO rastnem mediju}$$

\*v testu potrebujemo začetno koncentracijo alg  $1 \times 10^4$  alg/ml

### Izvedba testa:

Testne koncentracije UV-filtrov smo pripravili v 100 ml bučkah, pri čemer smo v vsako najprej nalili deionizirano vodo, dodali po 10 ml predhodno pripravljenega rastnega medija, ustrezen volumen izhodne raztopine UV-filtra in izračunan volumen alg. To smo dopolnili z deionizirano vodo. Vsebinsko bučke smo prelili v dve erlenmajerici, v vsako po 40 ml vzorca. Erlenmajerici smo zamašili z vato in postavili na stresalnik s 125 tresljaji na minuto in osvetljenostjo 6000-10.000 luks. Po treh dneh smo prešteli alge v vzorcih v Bürkerjevi kamrici po enakem postopku, kot je opisan zgoraj.

### Izračun rezultatov:

Iz dobljenih podatkov o številu alg v posameznih vzorcih smo izračunali odstotek zaviranja rasti alg glede na kontrolo.

Najprej smo izračunali povprečno specifično stopnjo rasti alg za vsak vzorec posebej po spodnji enačbi:

$$\mu = ((\ln_{x_t} - \ln_{x_0}) / (t_t - t_0))$$

$\mu$  = specifična hitrost rasti alg

$x_l$  = koncentracija alg na koncu poskusa  
 $x_0$  = začetna koncentracija alg  
 $t_i$  = čas konca testa  
 $t_0$  = čas začetka testa

Nato smo izračunali povprečje  $\mu$  za vsako paralelko, vključno s kontrolama. Ta povprečja  $\mu$  smo nato uporabili za izračun odstotka zaviranja rasti alg za vsako testirano koncentracijo po spodaj predpisani enačbi:

$$I_{\mu i} = ((\mu_c - \mu_i) / \mu_c \times 100)$$

$I_{\mu i}$  = odstotek zaviranja rasti alg za testno koncentracijo  $i$   
 $\mu_i$  = povprečna stopnja rasti za vsako koncentracijo  $i$   
 $\mu_c$  = povprečna stopnja rasti kontrole

### 3.4 TESTI STRUPENOSTI Z VODNIMI BOLHAMI (*Daphnia magna*)

Test je bil opravljen v skladu z ISO-standardom (ISO 6341, 1996).

Mednarodni standard opisuje metodo za določanje akutne strupenosti na vodni bolhi vrste *Daphnia magna* (*Cladocera*, *Crustacea*) zaradi kemikalij, ki so topne v vodi ali prisotne v obliki suspenzije. Strupenost se lahko določa tudi v prečiščenih ali neprečiščenih izpustih kanalizacije ter površinskih in podzemnih vodah.

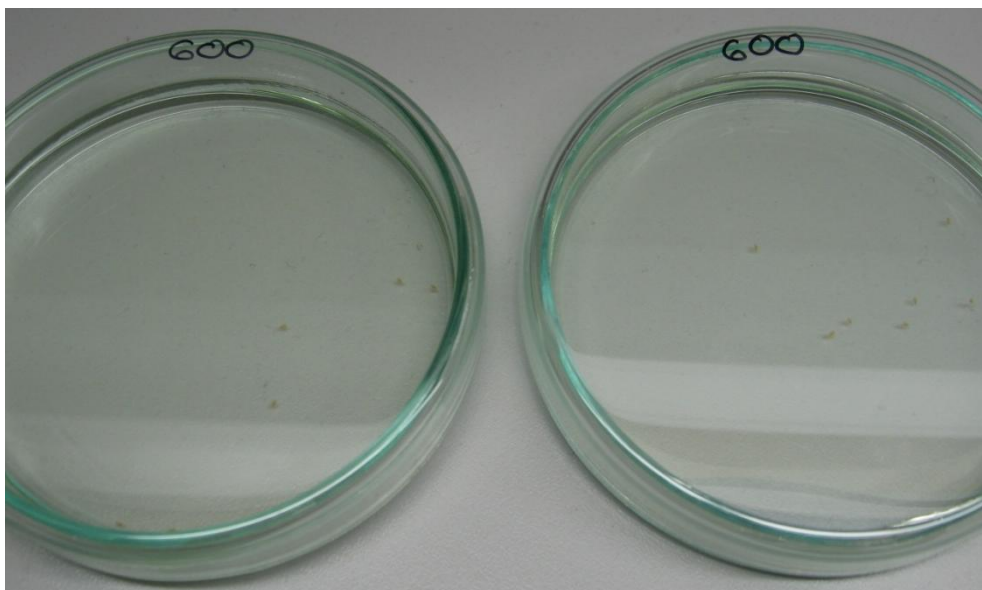
#### Gojenje vodnih bolh:

Testni organizmi so mlade vodne bolhe, stare največ 24 ur. Breje vodne bolhe se nahajajo v akvarijih pod posebnimi pogoji, kot jih zahteva standard. V vsakem 3-litrskem akvariju je 25 vodnih bolh, ki vsakodnevno rojevajo žive mladice. Te je treba vsakodnevno odstranjevati iz akvarijev s kapalko.

Testne vzorce smo pripravili v 100 ml bučkah. Vsak vzorec smo prelili v dve stekleni petrijevki, in sicer v vsako po 30 ml. Preostanek vsakega vzorca smo zlili v posebno petrijevko ali majhno čašo, v katero smo prenesli še 20 vodnih bolh. To smo imenovali »kopel«. Deset vodnih bolh smo nato prenesli v prvo petrijevko, preostalih deset pa v drugo (**Slika 17**). Tako smo dobili dve ponovitvi za vsak vzorec ter kontrole. Mladice smo prenašali v »kopel«, zato da smo se izognili redčenju, ki bi nastalo, če bi vodne bolhe neposredno prenašali iz akvarija v petrijevke z vzorcem. Vzorce smo pripravljali v razredčevalni vodi (ISO 6341, 1996). pH pripravljenih vzorcev je moral bil v območju  $7,8 \pm 0,2$ . Test je trajal 24 ur. Med tem časom mladice nismo hranili.

Pri testiranju BP3 in CI-BP3 smo pripravili tudi negativno kontrolo z acetonom. Negibnost mladice v kontroli in negativni kontroli ni smela preseči 10 %.

Po končanem testnem obdobju smo prešteli gibljive vodne bolhe. Gibljivost je bila definirana kot sposobnost plavanja živali v roku 15 sekund po rahlem tresenju petrijevke. Vodne bolhe, ki se v tem času niso odzivale, so bile opredeljene kot negibne. Negibnost je bila mišljena, tudi če so živali premikale samo antene.



**Slika 17:** Mladice vodnih bolh v steklenih petrijevkah (BP4 600 mg/l)

#### **Izračun rezultatov:**

Iz dobljenih rezultatov smo izdelali graf, v katerem so odstotki negibnih vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije. Tako smo lahko izračunali 24 h EC50 za vsak UV-filter.

### **3.5 TESTI STRUPENOSTI S CEBRICAMI (*Danio rerio*)**

Test strupenosti smo izvedli v skladu z ISO-standardom (ISO 15088, 2007).

S tem poskusom se spremlja akutno strupenost na iker cebric (*Danio rerio*), ki jo povzročajo različna onesnaževala, prisotna v vodi v roku 48 ur. Ta mednarodni standard se lahko uporabi tudi za določanje strupenosti komunalne odpadne vode ter industrijskih odplak.

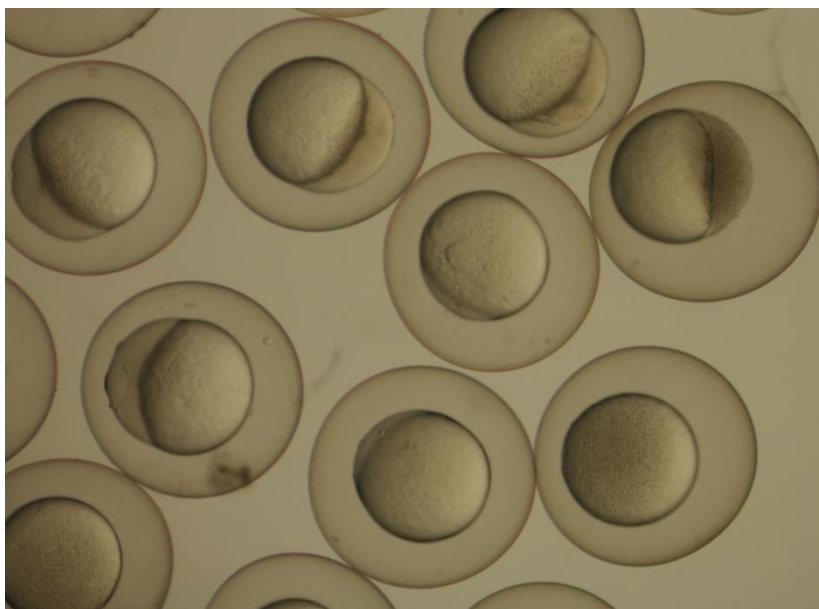
#### **Pridobivanje iker za teste:**

Akvariji z ribami se nahajajo v termostatanem prostoru s temperaturo  $26 \pm 1$  °C in z dnevno-nočnim ciklom 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Vsako jutro se ribe drstijo v posebnih kletkah znotraj akvarija. S tem se prepreči kanibalizem. Drstenje nastopi 30 minut po vklopu svetlobe. Po drstenju smo zarodke pobrali in pod lupo ločili oplojena jajčeca od neoplojenih ali poškodovanih. Za test smo uporabljali samo zdrava oplojena jajčeca, brez anomalij. Uporabljali smo jajčeca, ki so bila v stadiju diferenciacije 4 do 128 celic, kar prikazuje **Slika 18**. Hitro prebiranje ustreznih zarodkov za test je bilo ključnega pomena za uspeh samega testa, saj so se zarodki hitro diferencirali.

#### **Izvedba testa:**

Zarodke smo prenesli v polistirenske mikrotitrne plošče, in sicer vsako v svoj prostorček. V vsaki izmed 24 luknjic se je ikr nahajala v končnem volumnu raztopine 1 mililiter. Testne koncentracije in kontrolo smo pripravljali z razredčevalno vodo (ISO 15088, 2007). Pripravili smo tudi pozitivno kontrolo, in sicer 3,4-dikloroanilin s koncentracijo 3,7 mg/l. Pozitivna kontrola je morala povzročiti minimalno 10 % koagulacijo iker oziroma deformacijo zarodkov. V primerih BP3 in CI-BP3 smo pripravili tudi negativno kontrolo. Tako pripravljene mikrotitrne plošče smo inkubirali v istem prostoru, kjer se nahajajo akvariji z ribami. Za vsako koncentracijo ter kontrole smo testirali po deset iker na plošči.

Po 48 urah smo pregledali testne plošče in ugotavljali letalne in subletalne učinke UV-filtrov na zarodke cebric. Letalne posledice toksičnosti so bile videne kot koagulacija zarodka, odsotnost srčnega utripa in ne-ločenost repa od rumenjake vrečke. Predhodne študije so pokazale in potrdile nezmožnost takih zarodkov za izvalitev. Ugotavljali smo tudi subletalne znake zastrupitve, in sicer odsotnost oziroma slabo pigmentacijo telesa in oči. Če je bila smrtnost iker kontrole več kot 10 %, se je test izkazal kot neveljaven.



**Slika 18:** Ikre cebric v začetnem stadiju razvoja

48 h LC50 za ikre smo izračunali tako kot pri vseh ostalih testih, tj. z izdelavo grafa ter nato odčitavanja podatkov in končnega izračuna.

### 3.6 TESTI YES S KVASOVKAMI (*Saccharomyces cerevisiae*)

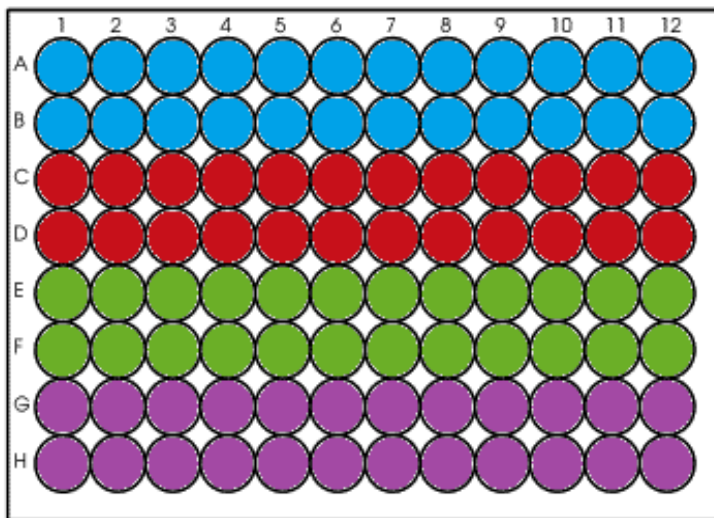
Test YES (Yeast Estrogen Screen) se uporablja za ugotavljanje prisotnosti estrogenov in estrogeno aktivnih snovi v vzorcu s pomočjo gensko spremenjenih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* imajo v svojem genomu gen za človeški receptor za estrogen (hER) ter plazmid, na katerem je zaporedje ERE. Če je v vodi prisoten estrogen ali estrogeno aktivna spojina, se veže na receptor in sproži kaskado reakcij, ki privede do prepisa gena *lac Z*. Prepis gena *lac Z* omogoča sintezo encima  $\beta$ -galaktozidaza, ki razgrajuje substrat, imenovan CPRG (klorofenol rdeče galaktopiranozid). CPRG je rumena snov, ki se razgradi v dva produkta (glukoza in klorofenol rdeče). Razgradnjo zaznamo kot spremembo barve iz rumene na rdeče. Absorbance merimo na spektrofotometru ter jih nato preračunamo v aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze.

Za test YES smo uporabljali polistirenske mikrotitrne plošče s 96 prostorčki. V te smo nanašali vzorce in kontrole (**Slika 19**). Prvi dve vrstici je zasedala testirana snov, v našem primeru BP3, CI-BP3 in BP4 (modra barva). Naslednji dve vrstici je zasedal E2 ( $17\beta$ -estradiol), ki je naravni estrogen (rdeča barva). Pod njim je bil progesteron (zelena barva) in zadnja je bila kontrola (vijolična barva). Vsi vzorci so bili pripravljene v etanolu z začetno koncentracijo 1000 mg/l. Vzorce smo redčili z etanolom, 11-krat od leve proti desni. Tako pripravljeno ploščo smo prenesli v laminarij, kjer smo sterilno prenašali po 10  $\mu$ l vsake redčitve na drugo ploščo v enaki razporeditvi. Po končanem postopku smo prvo ploščo



zavrgli, drugo pa pustili, da izhlapi ves etanol. Etanol je moral izhlapati, da ni motil nadaljevanja testa. Ko je etanol izhlapel, smo v vsak prostorček mikrotitrne plošče nanesti po 200  $\mu$ l raztopine rastnega medija z dodanimi kvasovkami in CPRG. Rastni medij smo pripravili po navodilih avtorjev Routledge in Sumpter (1996). Kolonije kvasovk so bile nacepljene v plastični petrijevki in shranjene v hladilniku na 4 °C. Tri dni pred začetkom testa smo največjo kolonijo kvasovk naceplili v rastno gojišče in pustili, da se kvasovke namnožijo do optične gostote 1 (izmerimo na sprektrofotometru pri 620 nm).

Plošče smo inkubirali 48 do 72 ur v inkubatorju na 32 °C. Razgradnja substrata je potekla pri naravnem estrogenu (pozitivna kontrola), pri progesteronu (negativna kontrola) pa ne. Če se je na plošči pojavila rdeča barva pri progesteronu ali slepi kontroli (samo kvasovke v rastnem gojišču s CPRG), se je test izkazal kot neveljaven. Absorbance smo merili na mikročitalcu (Biotek PowerWave XS) pri dveh valovnih dolžinah, in sicer pri 575 nm (razgradnja substrata CPRG) in 620 nm (rast kvasovk). Odčitavanje meritev nam je omogočal računalniški program KCjunior. Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze, ki je znak prisotnosti estrogenih snovi, tako kot je predvidevala metoda po Routledge in Sumpter (1996).



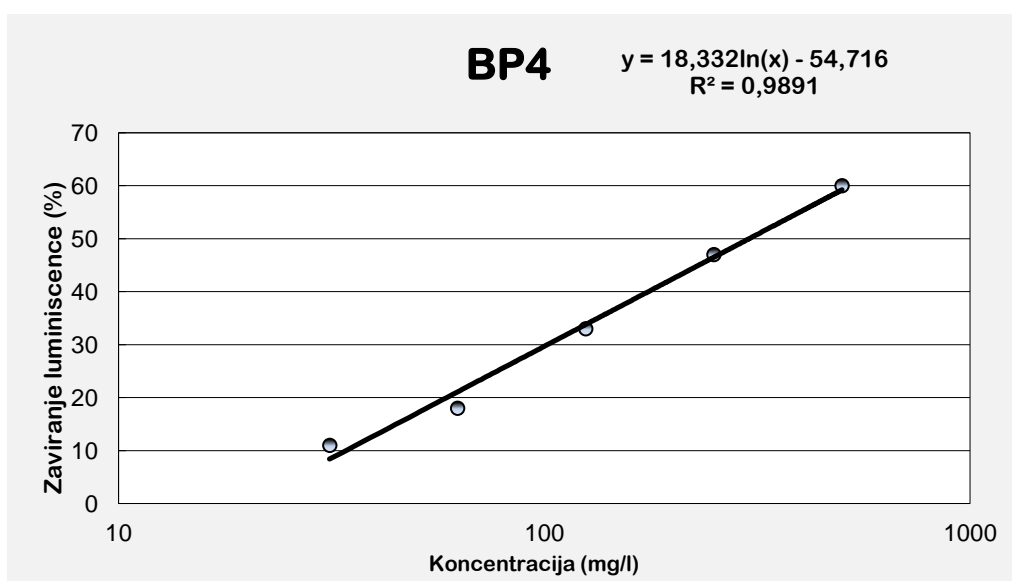
**Slika 19:** Priprava mikrotitrne plošče za test YES (Vir: [http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cblmethod\\_elisa.htm](http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/lab/cblmethod_elisa.htm), junij 2011)

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

BP3 in Cl-BP3 sta hidrofojni molekuli. Njuno raztapljanje v vodi je bilo mogoče samo ob prisotnosti organskega topila (aceton). Topnost BP3 v acetonu je bila boljša od Cl-BP3. Boljše je bilo tudi nadaljnje raztapljanje BP3 v vodi oziroma priprava različnih koncentracij vzorcev. Pri testiranju Cl-BP3 smo bili omejeni tudi z uporabo najvišje koncentracije topila v vzorcih (0,1 ml/l).

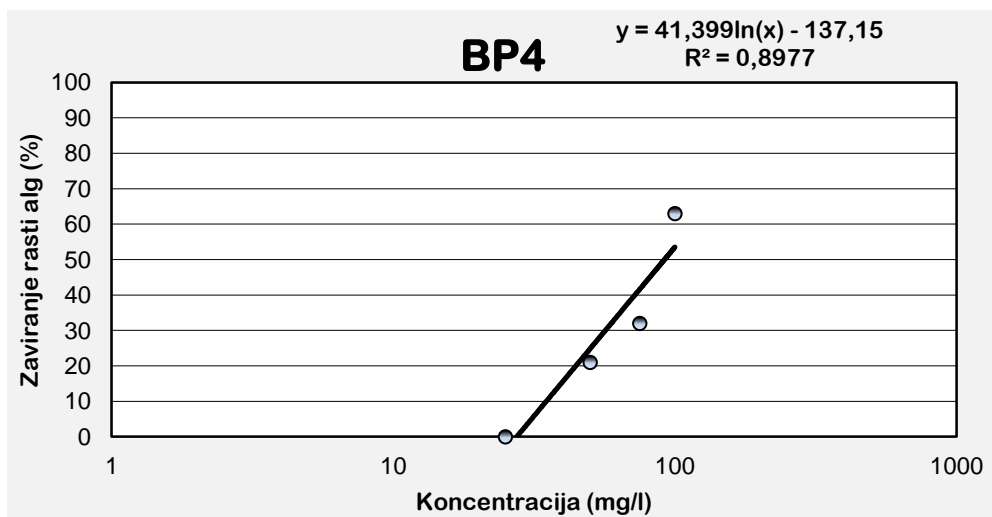
### 4.1 STRUPENOST BP4

Zaviranje luminiscence bakterij, rasti alg in normalnega gibanja vodnih bolh v odvisnosti od koncentracij BP4 je prikazano na **slikah 20-22**.



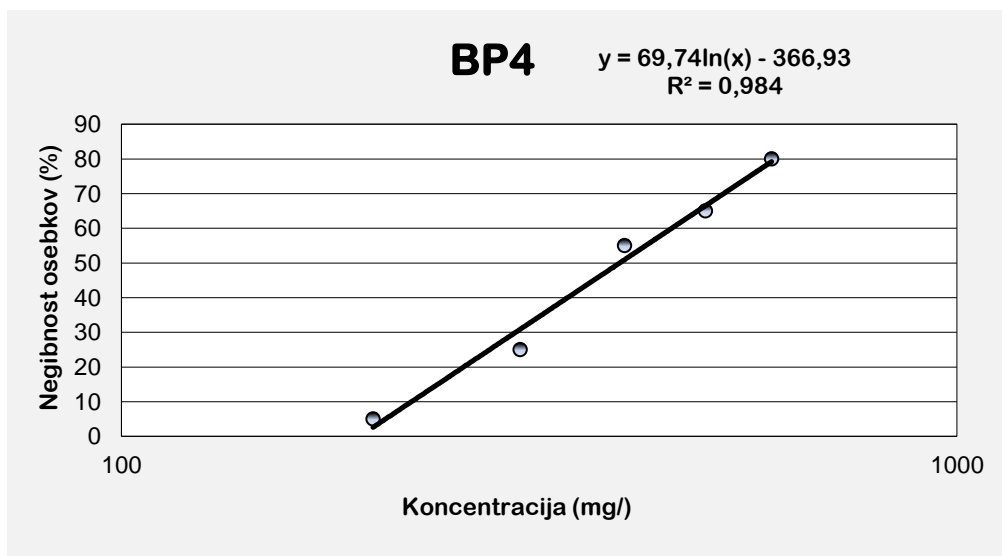
**Slika 20:** Zaviranje luminiscence bakterij v odvisnosti od koncentracije BP4

Test z bakterijami smo izvajali do koncentracije 680 mg/l BP4, ki je povzročila 60 % zaviranje luminiscence bakterij. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali 30 min IC50, ki je 303 mg/l. Tako visoka koncentracija ne velja več za strupeno. Koncentracija BP4, ki je povzročila 20 % zaviranje luminiscence bakterij, je 58,9 mg/l.



**Slika 21:** Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije BP4

Alge so se najhitreje odzvale na povečano koncentracijo BP4 v vodi. Začetek zaviranja rasti alg smo zaznali pri koncentraciji 50 mg/l, 72 h IC50 smo določili pri koncentraciji 91,9 mg/l. Pri najvišji testirani koncentraciji 100 mg/l je bilo zaviranje alg 63 %.



**Slika 22:** Negibnost vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BP4

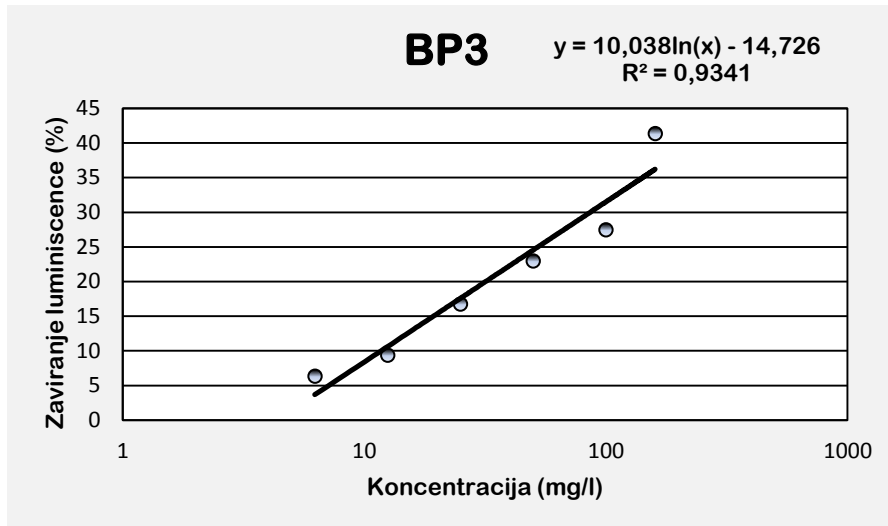
Strupenost na vodne bolhe je bila zelo visoko nad opredeljeno mejo strupenosti snovi. Negibne vodne bolhe smo opazili pri koncentraciji 200 mg/l, 24 h EC50 je bila 395 mg/l, pri najvišji testirani koncentraciji 600 mg/l smo določili 80 % negibnih vodnih bolh.

Pri ribah smo testirali najvišjo koncentracijo BP4 600 mg/l. Letalnih ali subletalnih posledic strupenosti ni bilo zaznati niti pri najvišji testirani koncentraciji, zato 48 h vrednosti EC50 nismo določili.

Rezultati testov strupenosti so nakazovali na majhno strupenost testiranega BP4 filtra na testirane organizme. Strupenost se je razlikovala glede na vrsto testnega organizma.

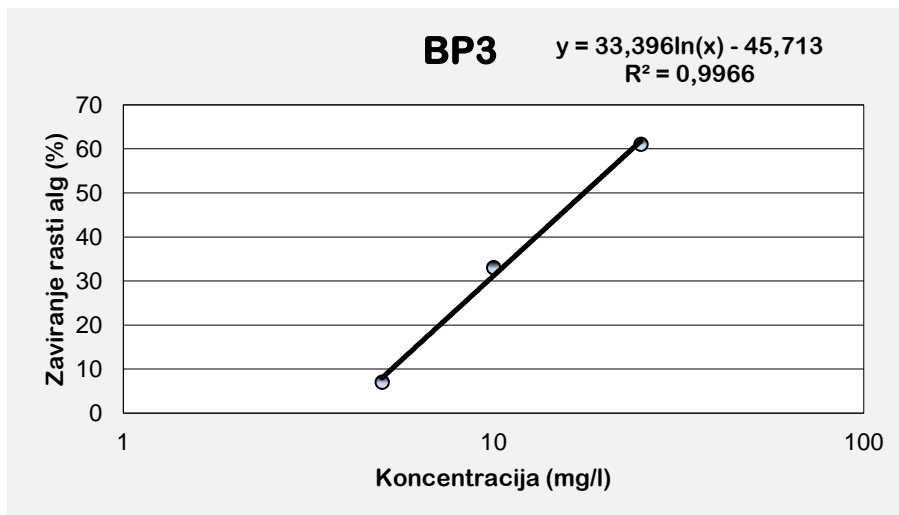
## 4.2 STRUPENOST BP3

Zaviranje luminiscence bakterij, rasti alg, normalnega gibanja vodnih bolh ter letalnih učinkov na zarodke cebric v odvisnosti od koncentracij BP3 je prikazano na **slikah 23-26**.



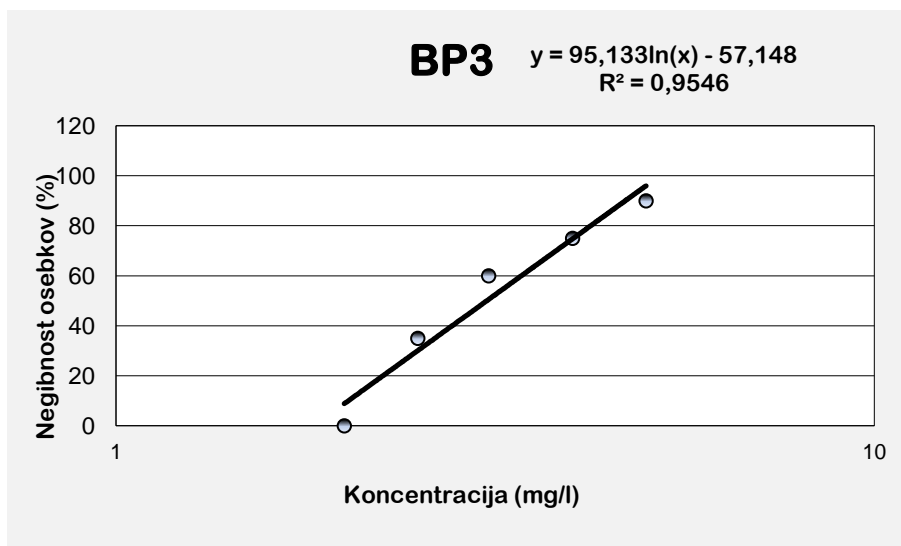
**Slika 23:** Zaviranje luminiscence bakterij v odvisnosti od koncentracije BP3

Bakterije so zahtevale pripravo najvišjih koncentracij BP3. Ker smo dobili manjše zaviranje luminiscence bakterij kot 50 % tudi pri najvišji testirani koncentraciji, nismo izračunali 30 min IC50. Pri pripravi testnih raztopin se je pojavilo izločanje BP3 v obliki usedline, zato bi bilo določanje strupenosti pri višjih koncentracijah nesmiselno. Bakterije niso bile izpostavljene pripravljenim koncentracijam, ampak nižjim. Dejanskih vrednosti nismo poznali.



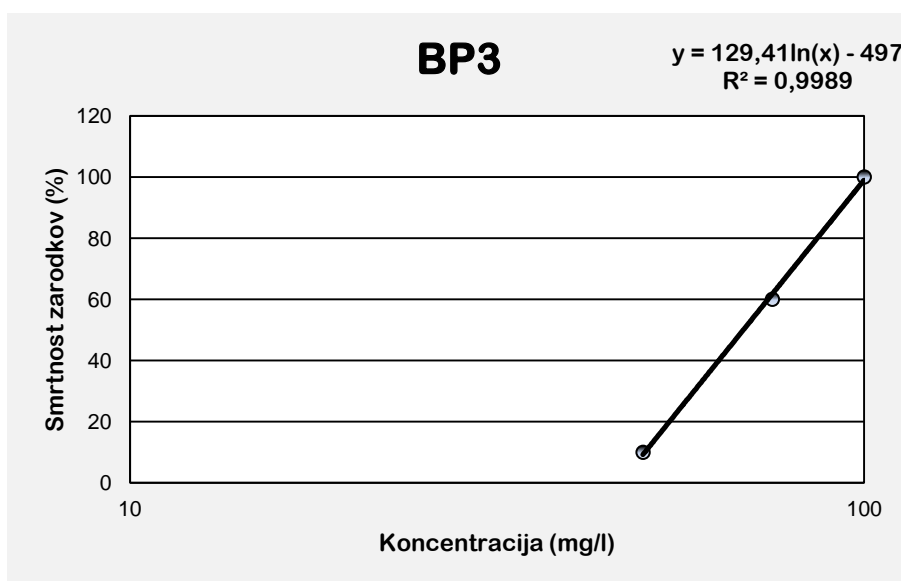
**Slika 24:** Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije BP3

BP3 je bil strupen za alge, saj se je strupenost začela pri koncentracijah pod 10 mg/l, 72 h IC50 smo določili pri 17,6 mg/l.



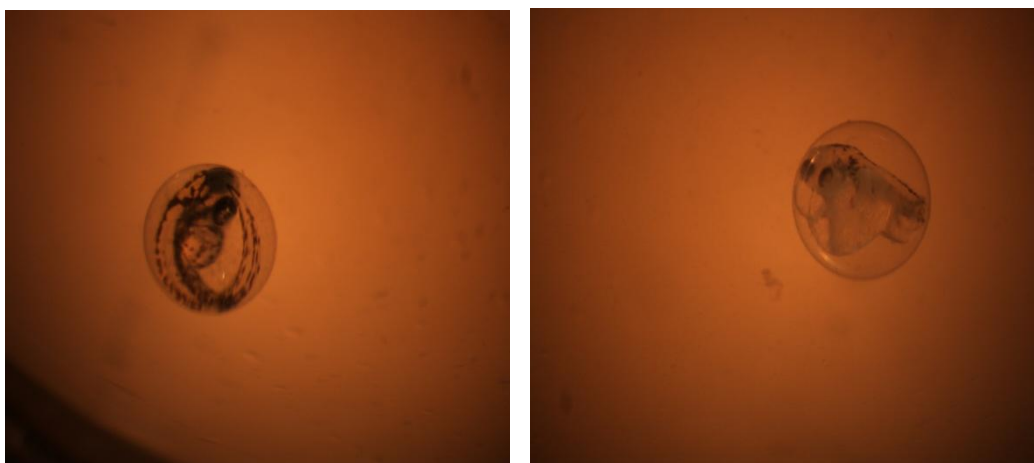
**Slika 25:** Negibnost vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BP3

Še večjo strupenost BP3 smo ugotovili pri testih z vodnimi bolhami, saj smo negibnost vodnih bolh zaznali že pri koncentraciji 2,5 mg/l. 90 % negibnost vodnih bolh smo opazili pri koncentraciji 5 mg/l. 24 h EC50 smo določili pri koncentraciji 3,1 mg/l.



**Slika 26:** Smrtnost zarodkov v odvisnosti od koncentracije BP3

Višji 48 h LC50 smo zabeležili pri ribjih ikrah, in sicer 68,5 mg/l. BP3 je povzročal nenormalen razvoj zarodkov oziroma njihovo deformacijo, pri najvišjih testiranih koncentracijah pa takojšnjo smrt iker zaradi koagulacije zarodkov. Pri koncentracijah do 50 mg/l BP3 še ni bil strupen. Strupenost v 48 urah je nastopila v območju med 50 mg/l in 100 mg/l. Višja koncentracija (nad 100 mg/l) je povzročila koagulacijo vseh zarodkov že po prvem dnevu izpostavitve, hkrati pa se je pojavilo tudi izobarjanje BP3. Primer zdravega, 48 ur starega zarodka in zaradi BP3 poškodovanega zarodka je na **Sliki 27**.

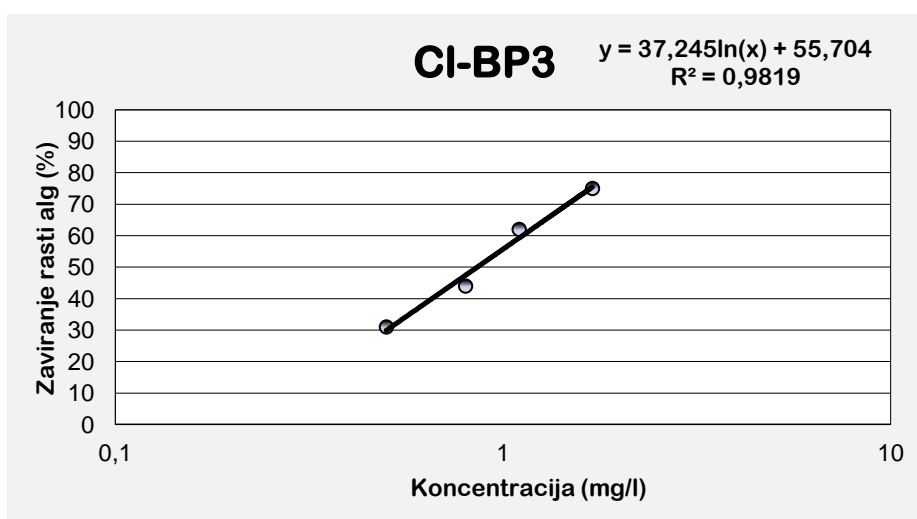


**Slika 27:** Primerjava med zdravim zarodkom kontrole (levo) in poškodovanim zarodkom zaradi prisotnosti BP3 koncentracije 75 mg/l (desno)

### 4.3 STRUPENOST CI-BP3

Določitev EC/IC50 za kloriran BP3 je bila zahtevna zaradi slabe topnosti molekule v vodi. CI-BP3 je bil pripravljen v acetonu. Priprava vzorcev z različnimi koncentracijami, višjimi od 1 mg/l, je pomenila gotovo izoboritev CI-BP3. Kloriran produkt se je, za razliko od svoje izhodne molekule BP3, izoboril takoj, ko je prišel v stik z vodo. Nastali so beli kosmi na dnu posode. Zaradi izobarjanja CI-BP3 so bile koncentracije v vzorcih nižje, kot je bilo mišljeno. Težave je lahko organizmom povzročala tudi fizična prisotnost kosmov v vodi.

Že preliminarni testi so pokazali, da bo CI-BP3 najbolj strupen za alge, saj se je strupeno delovanje BP3 začelo pri koncentracijah pod 1 mg/l. 72 h IC50 smo določili pri koncentraciji 0,86 mg/l (**Slika 28**).



**Slika 28:** Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije CI-BP3

Ostalim trem vrstam organizmov ni bilo mogoče opredeliti EC50 zaradi izločanja CI-BP3 v vodi. Testirane koncentracije so bile namreč previsoke. Pri vseh treh organizmih smo teste na določeni stopnji prekinili in predpostavili nestrupenost snovi pri najvišji testirani koncentraciji. Testirane koncentracije niso bile enake za vse tri skupine. Prilagojene so bile

glede na rezultate predhodnih testov z BP3. Zaradi podobnosti obeh molekul smo sklepali na podobne odzive pri organizmih.

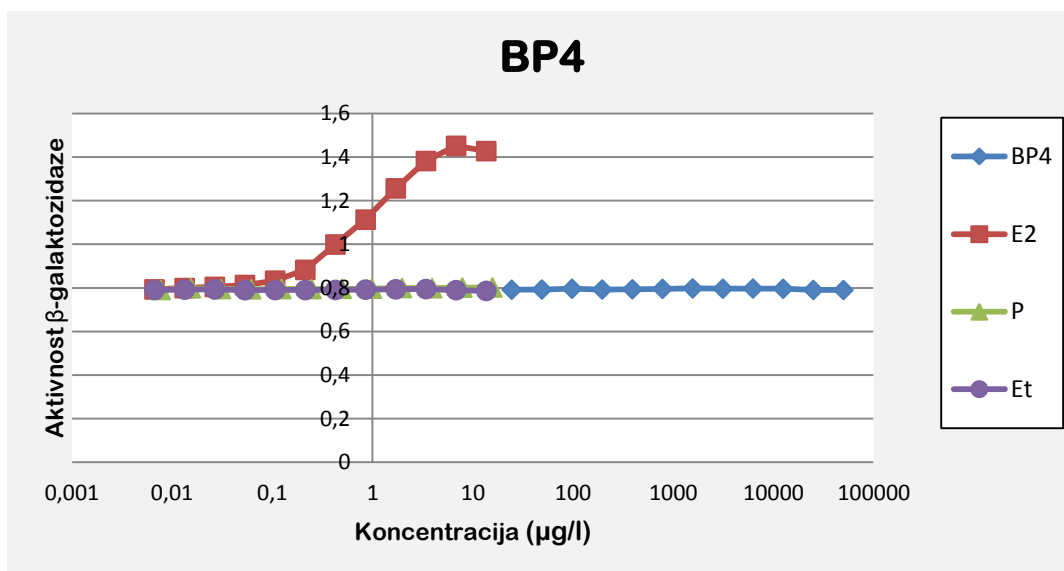
Bakterije smo testirali po DIN postopku (poglavje 3.2) z začetno koncentracijo 50 mg/l. CI-BP3 se je izobarjal, oborina se je hitro usedala na dno posode. Bakterije pri najvišji koncentraciji niso kazale znakov strupenosti, zato smo test na tej točki prekinili.

Vodne bolhe smo testirali do koncentracije 35 mg/l. CI-BP3 pri tej koncentraciji ni bil strupen. Pojavila se je oborina na dnu petrijevok.

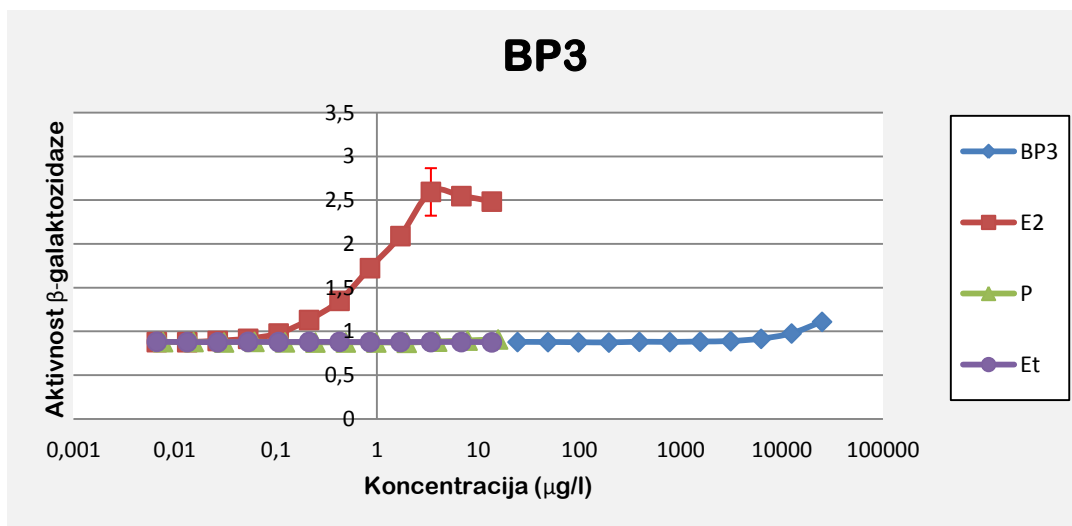
Najvišja testirana koncentracija BP3 pri ribah je bila 100 mg/l. Po 48 urah izpostavitve ni bilo zaznati ne letalnih niti subletalnih znakov zastrupitve. Ikre v mikrotitrskih ploščah je na dnu obdajala oborina CI-BP3.

#### 4.4 ESTROGENOST BP4, BP3 IN CI-BP3

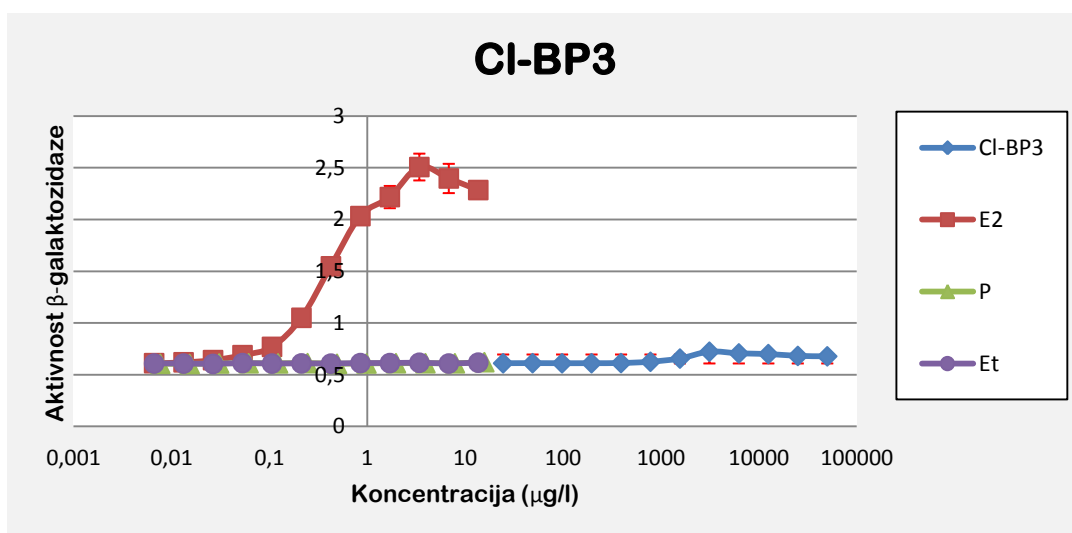
Rezultati testa YES s testiranimi UV-filtri so podani na **slikah 29-31**.



**Slika 29:** Aktivnost  $\beta$ -galaktosidaze v odvisnosti od koncentracije BP4



**Slika 30:** Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije BP3



**Slika 31:** Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije CI-BP3

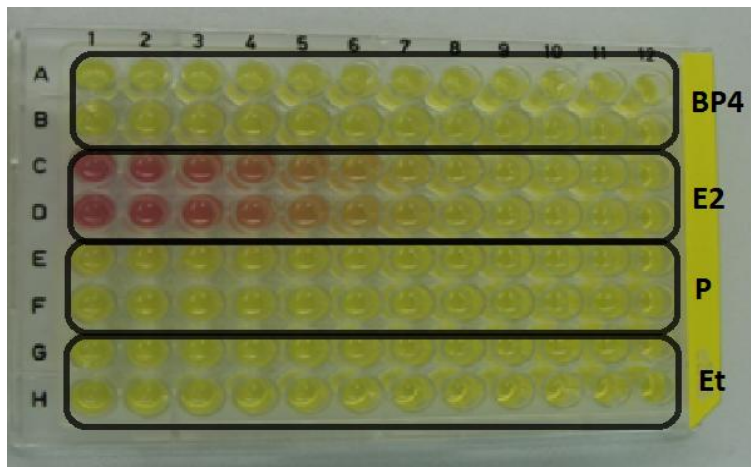
Rezultati testa YES so pokazali, da nobena izmed spojin BP4, BP3 in CI-BP3 ni estrogensko aktivna v smislu sposobnosti vezave na estrogenski receptor, tudi pri zelo visokih koncentracijah.

Na dan meritev absorbanc testnih plošč je bila rast kvasovk ugodna. Paralelke so bile tudi skladne in niso kazale večjih odstopanj, kar je razvidno že po razviti barvi plošč na **slikah 32, 33** in **34**. Kljub vizualni skladnosti so na grafih označeni tudi standardni odkloni za vsako redčitev posebej, kar prikazujejo **slike 29, 30** in **31**. Grafi prikazujejo aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze v odvisnosti od koncentracije vzorca. Etanol (Et oziroma K) in progesteron (P) nista kazala nobene estrogenosti in sta nastopala v obliki linearne črte, kar je popolnoma pravilno in skladno s pričakovanji. Nasprotno pa je moral človeški estrogen (E2) povzročiti estrogenost pri višjih testiranih koncentracijah, kar se je v našem primeru tudi zgodilo. Testne spojine (BP4, BP3 in CI-BP3) niso kazale tendence po estrogenosti in so nastopale v obliki skoraj linearnih črt.

Na **Sliki 33** je bil v vrstici G namesto serije etanola aceton (A). Aceton je bil testiran iz radovednosti. Redčili smo ga z etanolom po enakem postopku kot ostale spojine. Kot je razvidno s slike, je aceton v predelu G1 popolnoma izhlapel oziroma ni bil estrogensko



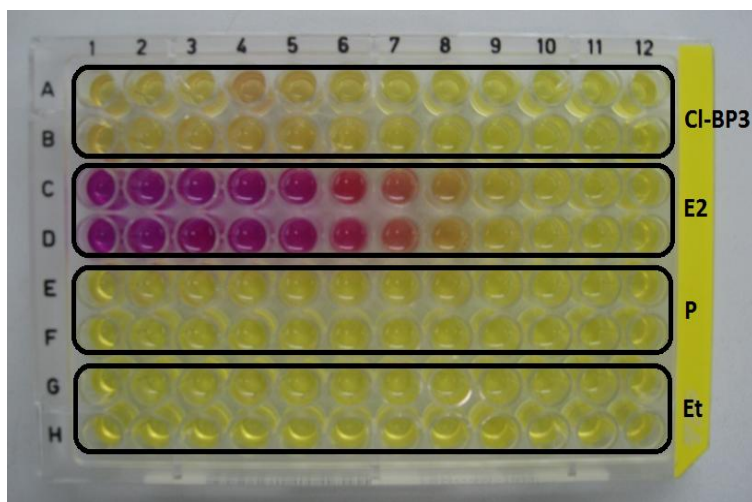
aktiven. V prostorčku G2 in redčitvah naprej pa se kaže določena stopnja estrogenosti. Obstaja možnost, da sta aceton in etanol reagirala med sabo. Tako naj bi nastala nova spojina, ki naj bi imela estrogene učinke na kvasovke. Reakcije med ketonom (aceton) in alkoholom (etanol) običajno vodijo do adicije alkohola na karbonilno skupino, kar vodi v nastanek hemiketala (Iupac goldbook, 2011).



**Slika 32:** Mikrotitrna plošča z BP4



**Slika 33:** Mikrotitrna plošča z BP3



**Slika 34:** Mikrotitrna plošča s CI-BP3

## 5 ZAKLJUČKI

Benzofenon-3 in benzofenon-4 sta organska UV-filtra iz skupine benzofenonov, sposobna absorbcije kratkovalovnega sončnega sevanja vključno z UVA2 območjem (Draelos, 2008). Sta sestavini kozmetičnih izdelkov in drugih materialov, ki so izpostavljeni UV-svetlobi, kot so razne plastike in usnje (The Merck index, 2001). Zaradi masovne rabe teh spojin postaja njihova prisotnost v okolju vedno večja.

UV-filtri se v okolje vnašajo neposredno s kopanjem v morjih, jezerih in rekah ali posredno z iztoki iz bazenov ali komunalnimi odpadnimi vodami (tuširanje, brisanje kože in pranje perila) (Jjemba, 2008). Usoda UV-filtrov v naravi je v glavnem nepoznana. Predpostavlja pa se možnost nastanka kloriranih produktov zaradi kloriranja bazenskih voda. Halogenirane spojine naj bi bile okolju še nevarnejše. To predpostavko smo preverili s testiranjem možnega produkta kloriranja BP3, in sicer 5-klorobenzofenona. Poleg strupenosti se v zadnjem času veliko poudarja tudi estrogenost snovi. Ta povzroča feminizacijo moških predstavnikov in s tem propad celotne populacije.

V okviru diplomske naloge smo testirali dva organska UV-filtra, in sicer 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon (BP3) in 2-hidroksi-4-metoksibenzofenon-5-sulfonsko kislino (BP4) ter kloriran produkt BP3, imenovan Cl-BP3. Teste strupenosti smo izvajali na štirih vrstah vodnih organizmov, test YES za določanje estrogenosti snovi pa na gensko spremenjenih kvasovkah. Zaradi hidrofobnosti BP3 in Cl-BP3 smo morali oba pripravljati v organskem topilu acetonu.

V večini primerov testi strupenosti niso pokazali večje strupenosti na izbrane organizme. Strupenost je bila definirana v primerih, ko so bile vrednosti EC50 nižje od 100 mg/l. Edina vrsta organizmov, ki je v tem območju izkazala veliko občutljivost na vse tri testirane spojine, so bile zelene alge vrste *Desmodesmus subspicatus*. Za alge je bil najmanj strupen BP4, saj smo 72 h IC50 določili pri 91,9 mg/l, večjo strupenost smo ugotovili pri BP3 (72 h IC50 = 17,6 mg/l) in kloriranem produktu BP3 (72 h IC50 = 0,86 mg/l). V testih strupenosti z algami se je jasno pokazala povečana strupenost kloriranega produkta v primerjavi z nekloriranim, izhodnim BP3-jem. V testih strupenosti z vodnimi bolhami je BP3 povzročil akutno strupenost pri nekaj miligramih na liter, 24 h EC50 je bil 3,1 mg/l. BP3 je bil strupen tudi za ikre cebric *Danio rerio*, vendar šele pri koncentracijah nekaj deset miligramov na liter. Bakterije *Vibrio fischeri* so bile edini testni organizem, s katerimi strupenosti nismo določili.

Test YES s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ni pokazal estrogenih učinkov za nobeno od treh testiranih snovi, niti pri najvišji testirani koncentraciji 1000 mg/l. Naši rezultati se ujemajo z rezultati, dobljenimi iz literature, saj Kunz in Fent (2006) navajata pojav antiestrogenosti za BP3 in BP4. Heneweer in sod. (2005) so opazili estrogenost BP3, vendar je bila v primerjavi s človeškim estrogenom (E2) zanemarljiva. Test je pokazal tudi večjo estrogenost nekaterih produktov BP3 od same matične molekule. V tem primeru nismo ugotovili povečane estrogenosti kloriranega produkta. Edina večja razlika je v topnosti v vodi in organskih topilih.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je bil BP3 bolj strupen za vodne organizme kot BP4. Dejanske strupenosti Cl-BP3 na bakterije, vodne bolhe in cebrice nismo določili zaradi težav z njegovo topnostjo v vodi. Rezultati testov strupenosti z algami pa so pokazali na povečano strupenost kloriranega produkta BP3 v primerjavi z izhodnim BP3-jem. Za celovitejšje poznavanje škodljivih učinkov ter bolj poglobljeno vedenje o strupenosti testiranih UV-filtrov, posebno kloriranega produkta, bi bilo treba izvesti tudi kronične teste strupenosti z različnimi vrstami organizmov. Rezultatov diplomske naloge tudi ne moremo posploševati na celoten spekter vodnih organizmov, saj so si med seboj zelo različni in pripadajo različnim vejam filogenetskega drevesa.

## 6 VIRI

AquaNubis: Akvaristični portal. 2011. <http://www.aquanubis.com/baza-organizmov/ribe/krapovci/danio-erio>

BAILINGCN: Benzophenone. 2012. [http://www.bailingcn.com/en\\_products\\_show.asp?id=510&sortname=Fine%20Chemicals&sort=MEDICINE%20%20INTERMEDIATES](http://www.bailingcn.com/en_products_show.asp?id=510&sortname=Fine%20Chemicals&sort=MEDICINE%20%20INTERMEDIATES)

Coronado M., De Haro H., Deng X., Rempel M. A., Lavado R., Schlenk D. 2008. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquatic Toxicology* 90: 182–187.

Díaz-Cruz M. S., Barceló D. 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, Št. 6.

Dobravc M. 2010. Reakcije UV filtrov z oksidanti prisotnimi v naravnih vodah. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, str. 23, 25.

Draelos Z. D. 2008. The cosmeceutical realm. *Clinics in Dermatology* 26: 627–632.

Fent K., Kunz P. Y., Zenker A., Rapp M. 2009. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine Environmental Research* 69: S4–S6.

Gonzalez H. 2006. Studies of Sunscreens: Percutaneous Absorption of Benzophenone-3 and Photostability. Department of Dermatology and Venereology. Institute of Clinical Sciences. The Sahlgrenska Academy at Göteborg University. Göteborg, Sweden.

Heneweer M., Muusse M., van den Berg M. Sanderson J. T. 2005. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV-filters on pS2- gene transcription in MCF-7 cells 2. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Utrecht University, Vol. 208: 170–177.

Ibanez J. G., Hernandez-Esparza M., Doria-Serrano C., Fregoso-Infrante A., Mohan Singh M. 2007. *Environmental Chemistry: Fundamentals*. Springer, New York: str. 112, 231.

ISO 6341. 1996. Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – acute toxicity test. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 8692. 2004. Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 11348-2. 2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 2: Method using liquid-dried bacteria. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 14442. 2006. Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water. International Organization for Standardization, Geneva.

ISO 15088. 2007. Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). International Organization for Standardization, Geneva.

ISO/DIS 21348. 2005. The draft ISO standard on determining solar irradiances. International Organization for Standardization, Geneva.

Iupac goldbook: hemiketals. 2011.  
<http://goldbook.iupac.org/H02776.html>

Jjemba P. K. 2008. Pharma-ecology: The occurrence and fate of pharmaceuticals and personal care products in the environment. John Wiley & Sons, Hoboken: str. 1, 3, 8, 11, 12, 185.

Jørgensen S. E. 2010. Ecotoxicology: A derivative of encyclopedia of ecology. Academic press, Amsterdam: str. 59, 61, 62.

Kullavanijaya P., W. Lim H. 2005. Photoprotection. J Am Acad Dermatol. 52: 937–58.

Kunz P. Y., Fent K. 2006. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of *in vivo* and *in vitro* estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. Aquatic Toxicology 79: 305–324.

Lange B. 2000. Dr. Lange LUMISsoft 4 Software, Version 1.001, Düsseldorf, Nemčija.

Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms: eleventh edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River: str. 159, 221–222, 355–356.

Negreira N., Canosa P., Rodríguez I., Ramil M., Rubí E., Cela R. 2008. Study of some UV filters stability in chlorinated water and identification of halogenated by-products by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1178: 206–214.

Natural history museum: *Desmodesmus subspicatus*. 2011.  
<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/index.html>

Poiger T., Buser H-R., Balmer M. E., Bergqvist P-A., Müller M. D. 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. Chemosphere 55: 951–963.

Rand G. M., Petrocelli S. R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Taylor&Francis, Bristol: str. 1, 3, 652.

Raspor P. 1996. Biotehnologija: osnovna znanja. BIA d.o.o. Ljubljana, str: 69–89.

Routledge E. J., Sumpter J. P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environmental Toxicology and Chemistry 15: 241–248.

ScienceLab: Chemicals & Laboratory Equipment. 2011  
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926361>  
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923058>

Sket B., Gogala M., Kuštor V. 2003. Živalstvo Slovenije. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana: str 193, 194.

Sumpter J. P. 2005. Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. *Acta hydrochim hydrobiol.* 33: 9–16.

The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 2001. Whitehouse Station. Merck & co., Inc: str. 1245, 1602.

Tišler T., Kožuh Eržen N. 2006. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology* 15, 495–502.

Uradni list Evropske unije, ISSN 1725-5155. 2009. Priloga VI: Seznam dovoljenih UV filtrov v kozmetičnih izdelkih. Slovenska izdaja. Zvezek 52. L 342/201-202.

Walker C. H., Hopkin S. P., Sibly R. M., Peakall D. B. 1997. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis, New York: str. 27, 107.

Zenker A., Schmutz H., Fent K. 2008. Simultaneous trace determination of nine organic UV absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1202: 64–74.