

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**STRUPENOST IN ESTROGENOST BISFENOLA A PRED
IN PO MOKRI OKSIDACIJI**

DIPLOMSKO DELO

Jana KRAUTBERGER

**Mentorja: doc. dr. Tatjana Tišler
prof. dr. Albin Pintar**

Nova Gorica, 2011

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

ZAHVALA

Za pomoč tako pri praktičnem raziskovalnem delu kot pri pisanju diplome se najprej z vsem srcem zahvaljujem mentorjema Tatjani Tišler in Albinu Pintarju, za odgovore pri skoraj neštetih vprašanjih se zahvaljujem Mirjani Bistan, za zelo uporabne nasvete pri laboratorijskem delu pa hvala tudi Emilu Medenu.

POVZETEK

Bisfenol A (BPA) je okoljsko onesnaževalo, ki se v industriji plastike uporablja v zelo velikih količinah. Je strupen za vodne organizme, deluje pa tudi kot hormonski motilec z estrogenim delovanjem. Komunalne čistilne naprave pri odstranjevanju BPA iz vod niso najuspešnejše, zaradi česar je potrebno najti nove, učinkovitejše postopke čiščenja. Zelo obetavne nove tehnologije so napredni oksidacijski procesi, kamor spada tudi katalitska mokra oksidacija. V tem diplomskem delu smo poskušali ugotoviti, kako je ta postopek pod različnimi pogoji, pri različnih temperaturah (200 in 230° C) in tlakih ter različnih katalitskih pogojih (brez katalizatorja ter ob uporabi katalizatorja TiO₂ in Ru/TiO₂) uspešen pri odstranjevanju BPA iz vode. Razgradnjo BPA v vzorcih smo spremljali z uporabo HPLC analize, določali smo tudi strupenost in estrogenost napajalne raztopine BPA in vzorcev po mokri oksidaciji. Uporabili smo teste strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri*, algami *Desmodesmus subspicatus*, raki *Daphnia magna* in zarodki rib *Danio rerio*. Določali smo tudi estrogenost z uporabo YES testa. Testi strupenosti in estrogenosti so potrdili, da je BPA strupen za vodne organizme in estrogeno aktiven. HPLC analiza je pokazala, da je mokra oksidacija s heterogenim katalizatorjem popolnoma odstranila BPA iz vode, uspešnost pa smo potrdili tudi s testi strupenosti in estrogenosti. Vendar pa je potrebno vedno preveriti tudi možnost izluževanja strupenih snovi iz reaktorja kot posledico vpliva visokih temperatur in tlakov v postopku mokre oksidacije.

KLJUČNE BESEDE: bisfenol A, mokra oksidacija, heterogena kataliza, strupenost, estrogenost

SUMMARY

Bisphenol A (BPA) is an environmental pollutant, which is used in plastic industry in very high amounts. It is toxic to aquatic ecosystem and estrogen disruptor. Sewage treatment plants are not very successful in removing BPA from waste water streams, so it is necessary to find new and more efficient methods. One of the most promising new technologies are advanced oxidation processes, and among them catalytic wet oxidation. In this thesis, we tried to determine how successfully catalytic wet oxidation removes BPA from water under different operating conditions – different temperatures (200 and 230° C) and pressures, and different catalytic conditions (no catalyst, TiO₂ and Ru/TiO₂). BPA degradation was monitored by HPLC analysis. Toxicity and estrogenicity tests were also performed on feed BPA solution and on samples after wet oxidation. Toxicity tests used in this thesis were done with bacteria *Vibrio fischeri*, algae *Desmodesmus subspicatus*, crustacean *Daphnia magna* and fish embryos *Danio rerio*. Estrogenicity was determined by YES test. Toxicity and YES tests confirmed that BPA is toxic and estrogenically active. HPLC analysis showed that heterogeneously catalyzed wet oxidation successfully removed BPA. Toxicity and YES tests confirmed that conclusion. However, it is necessary to check the possibility of leaching of toxic substances from the reactor as a result of high temperatures and pressures in the wet oxidation process.

KEY WORDS: bisphenol A, wet oxidation, heterogeneous catalysis, toxicity, estrogen disrupters

RAZLAGA OSNOVNIH POJMOV IN KRATIC

Akutni strupenostni test – je test za ugotavljanje koncentracije strupene snovi, ki v določenem kratkem časovnem obdobju (minute do nekaj dni) povzroči določen merljiv letalni oz. smrtni ali subletalni (nesmrtni) učinek.

Definitivni test – test strupenosti, ki sledi preliminarnemu testu in je namenjen določanju natančne vrednosti $EC_{50}/IC_{50}/LC_{50}$.

EC_{50} – v angleščini "effective concentration", je koncentracija, ki v določenem času povzroči določene subletalne učinke (gibanje, obnašanje) pri 50 % organizmov v izpostavljeni populaciji.

Estrogenost – je lastnost snovi, ki motijo hormonski sistem organizmov na način, da delujejo podobno kot naravni hormon estrogen (npr. tako, da se vežejo na njegov receptor).

IC_{50} – v angleščini "inhibition concentration", je koncentracija, ki v določenem času povzroči določeno zaviranje (luminiscence, rasti, razmnoževanja) pri 50 % organizmov v izpostavljeni populaciji.

Kontrola – je način, z uporabo katerega preverjamo pravilnost izvedbe testa. Kontrola vsebuje povsem enake sestavine kot testne raztopine, toda brez preiskovane strupene snovi. Torej, če je bil test izveden pravilno, ne sme privedi do več odzivov kot je določeno po standardu. Obstaja pa tudi pozitivna kontrola, ki vsebuje po standardu določene strupene snovi in mora privedi do po standardu določenih učinkov.

LC_{50} – v angleščini "lethal concentration", je koncentracija, ki v določenem času povzroči smrt pri 50 % organizmov v izpostavljeni populaciji.

Preliminarni test – je strupenostni test, ki se najprej izvede in je namenjen določanju približne vrednosti $EC_{50}/IC_{50}/LC_{50}$ oz. območja koncentracij med 0 in 100 % učinkom. Znotraj tega območja se nato izvede definitivni test.

Razredčevalna voda – je vodna raztopina po standardu določene sestave in fizikalno-kemijskih lastnosti, ki se uporablja pri pripravi kontrole in testnih raztopin za strupenostne teste in omogoča preživetje organizmov v času testa.

Strupenost – je stopnja škodljivega delovanja neke snovi na izpostavljene organizme, povzročena škoda pa je odvisna predvsem od koncentracije te snovi ter časa in načina izpostavitve.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.3 HIPOTEZA	2
2 TEORETIČNE OSNOVE	3
2.1 BISFENOL A	3
2.1.1 Fizikalne in kemijske lastnosti	3
2.1.2 Proizvodnja in uporaba	4
2.1.3 Usoda v vodnem okolju	4
2.1.4 Strupenost	5
2.1.5 Estrogenost bisfenola A	5
2.1.6 Načini razgradnje in zmanjšanje strupenosti	6
2.2 STRUPENOSTNI TESTI	7
2.2.1 Ekotoksikologija in strupenostni testi	7
2.2.2 Strupenostni testi z luminiscenčnimi bakterijami <i>Vibrio fischeri</i>	7
2.2.3 Strupenostni testi z algami <i>Desmodesmus subspicatus</i>	8
2.2.4 Strupenostni testi z vodnimi bolhami <i>Daphnia magna</i>	9
2.2.5 Strupenostni testi z zarodki rib zebrič <i>Danio rerio</i>	10
2.3 ESTROGENOST	11
2.3.1 Možne metode za ugotavljanje hormonskih motilcev	11
2.3.2 YES test	12
2.4 RAZGRADNJA BPA	13
2.4.1 Katalitska mokra oksidacija	13
2.5 SPREMLJANJE RAZGRADNJE	14
2.5.1 HPLC	14
3 EKSPERIMENTALNI DEL	16
3.1 PRIPRAVA VODNE RAZTOPINE BISFENOLA A	16
3.2 IZVEDBA STRUPENOSTNIH TESTOV	16
3.2.1 Test strupenosti z bakterijami <i>Vibrio fischeri</i>	17
3.2.2 Test strupenosti z algami <i>Desmodesmus subspicatus</i>	19
3.2.3 Test strupenosti z vodnimi bolhami <i>Daphnia magna</i>	22
3.2.4 Test strupenosti z zarodki rib zebrič <i>Danio rerio</i>	23
3.3 DOLOČANJE ESTROGENOSTI	26
3.3.1 Izvedba SPE	26
3.3.2 Izvedba YES testa	27
3.4 RAZGRADNJA BISPHENOLA A	29
3.4.1 Izvedba mokre oksidacije	29
3.5 SPREMLJANJE RAZGRADNJE BISPHENOLA A	29
3.5.1 HPLC	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1 STRUPENOST IN ESTROGENOST BISFENOLA A PRED MOKRO OKSIDACIJO	31
4.1.1 Strupenost za bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	31
4.1.2 Strupenost za alge <i>Desmodesmus subspicatus</i>	32
4.1.3 Strupenost za vodne bolhe <i>Daphnia magna</i>	32
4.1.4 Strupenost na zarodke rib zebrič <i>Danio rerio</i>	33
4.1.5 Estrogenost BPA	34
4.2 RAZGRADNJA BISFENOLA A	35
4.2.1 Spremljanje razgradnje s HPLC	35

4.3 STRUPENOST IN ESTROGENOST VZORCEV PO MOKRI OKSIDACIJI.....	36
4.3.1 Strupenost vzorcev za bakterije <i>Vibrio fischeri</i> po mokri oksidaciji.....	36
4.3.2 Strupenost vzorcev za alge <i>Desmodesmus subspicatus</i> po mokri oksidaciji.....	36
4.3.3 Strupenost vzorcev za vodne bolhe <i>Daphnia magna</i> po mokri oksidaciji.....	37
4.3.4 Strupenost vzorcev na zarodke rib zebrič <i>Danio rerio</i> po mokri oksidaciji	37
4.3.5 Estrogenost vzorcev po mokri oksidaciji	38
4.3.6 Primerjava strupenosti in estrogenosti vzorcev po mokri oksidaciji	40
5 ZAKLJUČKI	42
6 VIRI	44

1 UVOD

1.1 Opredelitev problema

Brez številnih industrijsko proizvedenih kemikalij si življenja, vsaj v zahodnem svetu, skoraj ne moremo več predstavljati. Na mnogo različnih načinov nam lajšajo življenje, nekatere pa na žalost nimajo samo pozitivnih učinkov. Samo v ZDA je na leto registriranih okoli 2000 novih kemikalij, natančne številke o številu vseh kemikalij na svetu pa sploh ni. Za kemikalije v zdravilih, kozmetiki in v živilskih proizvodih obstaja nekaj podatkov o strupenosti, toda samo za peščico kemikalij obstajajo podatki o strupenosti na vodne organizme. Zaradi velikega pomena vodnih ekosistemov je nova zakonodaja, zlasti vodna direktiva (Direktiva Evropskega..., 2000) in Uredba o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij oz. REACH (Uredba..., 2006) vedno bolj usmerjena k preprečevanju in zmanjševanju onesnaževanja vodnih teles ter k izboljševanju zaščite zdravja ne samo ljudi, temveč tudi okolja pred tveganjem zaradi kemikalij. Izboljšuje se tudi ozaveščenost ljudi.

V javnosti zadnje čase narašča zanimanje o bisfenolu A (BPA), kemikaliji, ki je nujno potrebna v proizvodnji plastike in je sestavni del plastenkov za pijačo, stekleniček za dojenčke, plastične embalaže za hrano, nahaja pa se tudi v plastičnih avtomobilskih delih, gospodinjskih aparatih in še marsikje. Ker je dokazano, da je motilec hormonskega sistema, je v modi uporaba plastenkov za pitje brez dodanega BPA oz. z oznako "BPA free". Še bolj kot človeka pa lahko BPA ogroža organizme v okolju. Zaradi vsestranske uporabnosti proizvodnja BPA samo v zahodni Evropi znaša okoli 1150 tisoč ton letno, ena od ocen pa kaže, da naj bi bila svetovna proizvodnja BPA okoli 3,2 milijonov ton letno. Ne samo proizvodnja, tudi uporaba in končno odlaganje izdelkov, ki vsebujejo BPA, predstavlja nevarnost za okolje, še zlasti za vodno okolje.

Ekotoksikološke raziskave kažejo, da je BPA strupen za vodne organizme, škodil pa bi jim lahko tudi kot hormonski motilec. Čistilne naprave pri razgrajevanju BPA niso nujno najuspešnejše, zato je potrebno najti drugačen način razgradnje, ki bi lahko vodno okolje bolje ščitil pred škodljivimi vplivi BPA. Za zelo obetavne nove tehnologije razgrajevanja tudi težje razgradljivih organskih spojin se kažejo napredni oksidacijski procesi, kamor spadajo na primer Fenton ali foto-Fenton procesi, fotokataliza, ozonacija in tudi mokra oksidacija. V primerjavi z ostalimi naj bi bila mokra oksidacija z ekonomskega in tehnološkega stališča (Kim in Ihm, 2010) najbolj uporabna za čiščenje odpadnih vod. Ker pa kot oksidant ne uporablja vodikovega peroksida ali ozona, ampak čisti kisik ali samo zrak, je tudi ekološko prijaznejša od ostalih metod, še posebej pa je primerna za obdelavo odpadnih voda z visoko vsebnostjo organskih snovi in za strupena onesnaževala, ki so neprimerna za biološko čiščenje. Z uporabo mokre oksidacije se lahko kompleksne organske spojine razgradijo do biorazgradljivih produktov ali pa se celo mineralizirajo do vode, ogljikovega dioksida in drugih neškodljivih končnih produktov, npr. anorganskih soli. Pregled literature ni pokazal, kako bi lahko bila pri odstranjevanju BPA iz vod uspešna mokra oksidacija, zaradi česar smo se odločili to ugotoviti mi. Odločili smo se, da bomo poskušali tudi z uporabo katalizatorjev. Uspešnost razgradnje smo se namenili spremljati z uporabo HPLC analize tehnike. Ker pa to nič ne pove o vplivih na vodne organizme, smo izvedli še teste strupenosti in preizkus estrogenosti.

1.2 Cilji diplomske naloge

Cilj diplomske naloge je bil izvesti razgradnjo bisfenola A s procesom mokre oksidacije ter z nadaljnjimi testi ugotoviti, koliko se strupenost in estrogenost po razgradnji zmanjšata v primerjavi s strupenostjo in estrogenostjo BPA pred razgradnjo.

Mokro oksidacijo smo izvedli pri različnih temperaturnih (200 in 230° C) in katalitskih pogojih (brez katalizatorja, s TiO₂ ter s kombinacijo Ru in TiO₂) ter študirali posamezne stopnje razgradnje in učinkovitost razgradnje glede na strupenost in estrogenost vodnih vzorcev z BPA pred obdelavo. Na ta način je bil cilj ugotoviti, ali je proces mokre oksidacije primeren način za odstranjevanje BPA, torej za zaščito vodnega okolja, ter kateri pogoji so pri izvedbi mokre oksidacije najbolj optimalni v smislu največjega zmanjšanja strupenosti in estrogenosti.

1.3 Hipoteza

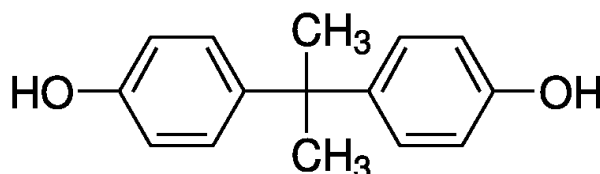
Pri izvedbi mokre oksidacije smo pričakovali, da se bo ta proces na osnovi pregleda literature izkazal za primeren način razgradnje BPA in da bomo iz vode uspeli v veliki meri ali celo popolnoma odstraniti BPA. Predvidevali smo tudi, da se bo pri višji temperaturi razgradilo nekoliko več BPA ter da bo razgradnja z uporabo heterogenih katalizatorjev uspešnejša kot brez uporabe katalizatorja. Pričakovali smo tudi, da se bosta strupenost in estrogenost zmanjševali vsaj približno sorazmerno s stopnjo razgradnje, torej da bodo obdelani vzorci manj strupeni in estrogeni pri višji temperaturi razgradnje in pri uporabi katalizatorjev.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Bisfenol A

2.1.1 Fizikalne in kemijske lastnosti

Bisfenol A (BPA) ali po IUPAC-u 4,4-hidroksi 2,2-difenilpropan je sestavljen iz dveh fenolnih obročev. Strukturna formula BPA je prikazana na sliki 2. Pri sobnih razmerah je v trdnem stanju v obliki kristalčkov, kosmičev ali tabletk bele ali svetlo rjave barve.



Slika 1: Strukturna formula BPA (vir: <http://www.viewzone.com/plasticpoison.html>, april 2011)

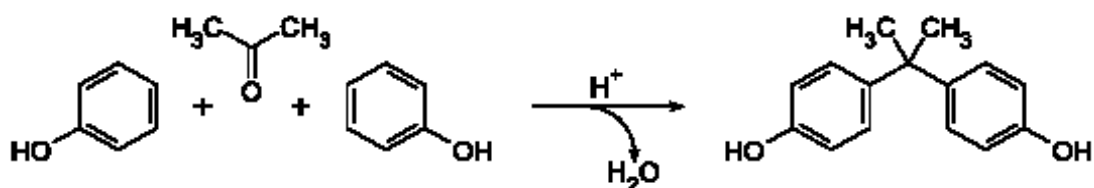
Topnost v čisti vodi in pri sobnih pogojih je 300 ± 5 mg/l in se pri pH 4–10 naj ne bi spreminjala, prav tako pa naj tudi ne bi bila odvisna od ionske jakosti do 0,1 mol/l KNO_3 (Shareef in sod., 2006). Za predvidevanje strupenosti kemikalije je pomembno tudi vedeti, ali se je ta kemikalija sposobna kopičiti v organizmu oz. biokoncentrirati. Biokoncentracijski faktor (BCF) je kvocient med koncentracijo onesnaževala v organizmu in okolju, določi pa se lahko eksperimentalno ali z uporabo različnih modelov. Bolj kot je snov lipofilna, prej se lahko do določene mere zadržuje v maščobnem tkivu ali jetrih, zaradi česar je dobro poznati tudi porazdelitveni koeficient oktanol-voda ($\log K_{ow}$), ki lahko sovпада z BCF (Walker in sod., 2006: 74–76). Porazdelitveni koeficient BPA se lahko izračuna na različne načine, a za uporabo v okoljskih modelih se najpogosteje uporablja vrednost $\log K_{ow}$ 3,40 (Staples in sod., 1998). Prav tako so zaradi različnih načinov izračuna različne tudi vrednosti BCF, ki se gibljejo od 5,1–196, BPA ima tako nizek potencial kopičenja v vodnih organizmih (Staples in sod., 1998). Ostale fizikalno-kemijske lastnosti so prikazane v preglednici 1.

Preglednica 1: Fizikalno kemijske-lastnosti bisfenola A

Parameter	Vrednost	Vir
Formula	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$	
Molekulska masa	228 g/mol	
Stanje pri sobnih pogojih	Trdno: kristalčki, kosmiči, tabletk	
Tališče	$\sim 150\text{--}157^\circ \text{C}$	Staples s sod., 1998
Vrelišče	$\sim 220\text{--}398^\circ \text{C}$	
Parni tlak	$5,3 \times 10^{-9}$ kPa pri 25°C (v okoljskih modelih)	Updated European ..., 2010
Plamenišče	$\sim 207^\circ \text{C}$	
Samovnetljivost	$\sim 523^\circ \text{C}$	
Oksidativne lastnosti	Ni oksidant	
Topnost	300 ± 5 mg/l pri 25°C (v okoljskih modelih)	Shareef s sod., 2006
K_{ow}	3,40 (v okoljskih modelih)	

2.1.2 Proizvodnja in uporaba

BPA (CAS številka 80-05-7) je v industriji zelo široko uporabna kemikalija. V EU se ga približno 71 % uporablja v proizvodnji polikarbonatnih plastičnih mas, 25 % pa v proizvodnji epoksi smol. Poleg tega se v manjših količinah uporablja tudi pri proizvodnji fenolnih smol, PVC, termoplastov, poliuretana, gum, zavornih tekočin, zaviralcev gorenja, termoreaktivnega papirja ter še marsičesa (Updated European ..., 2010). Zaradi tega je med drugim prisoten v plastičnih embalažah za hrano, v plastenkah za vodo, v pločevinkah in tetrapakih kot notranja zaščitna plast, v plastičnih avtomobilskih delih in gospodinjskih napravah in še marsikje (Kang in sod., 2006b).



Slika 2: Reakcija proizvodnje BPA

(vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Synthesis_Bisphenol_A.svg, april 2011)

Glavni način proizvodnje BPA je z uporabo reakcije 2 molov fenola in 1 mola acetona, prikazane na sliki 2, ki pa lahko poteka na dva različna načina. Prvi poteka z uporabo kondenzacije fenola z acetonom pri nizkem pH, visoki temperaturi in ob prisotnosti katalizatorja in promotorjev. BPA se nato prečisti z uporabo destilacije in kristalizacije. Drugi način je temu sicer podoben, vendar uporablja druge katalizatorje in drugačne postopke prečiščevanja, tako da nastane manj odpadka (Staples in sod., 1998). Letna proizvodnja BPA v zahodni Evropi je okrog 1 150 000 ton letno (Updated European..., 2010), na globalni ravni pa je na internetnem viru ocenjena na približno 3,2 milijonov ton (Applications of..., 2007).

2.1.3 Usoda v vodnem okolju

BPA lahko v vodno okolje pride na različne načine: pri proizvodnji BPA, pri uporabi BPA v proizvodnji, pri uporabi artiklov, ki vsebujejo BPA (npr. izgube iz PVC plastenk) in seveda pri izluževanju v podtalnico pri končnem odlaganju številnih tovrstnih izdelkov. Točkovni viri so predvsem industrijski iztoki ter tudi iztoki iz čistilnih naprav zaradi nepopolnega odstranjevanja BPA. Lee in Peart (2000) sta dokazala, da čistilne naprave iz odpadnih voda odstranijo od 37 do 94 % BPA. Z uporabo podatkov o produkciji in uporabi BPA ter z uporabo emisijskih faktorjev so bile emisije BPA ocenjene na regionalni ravni na okoli 41 129 ton letno v čistilne naprave in 5 371 ton letno na sprejemajoča vodna telesa, na kontinentalni ravni pa 369 464 ton letno na čistilne naprave oz. 44 250 ton letno v sprejemajoča vodna telesa (Updated European..., 2010).

V vodnem okolju je BPA podvržen številnim procesom: biorazgradnji, fotodegradaciji, adsorpciji na koloide in na sediment. Številni viri navajajo, da je BPA v aerobnih pogojih dobro biorazgradljiv, pod anaerobnimi pogoji pa ne (Kang in sod., 2006 a in b; Staples in sod., 1998; Updated European ..., 2010). V morski vodi je BPA razgradljiv težje kot v sladki. Razpolovni čas BPA v tekoči vodi je tako ocenjen na okoli 3–5 dni, vseeno pa je to dovolj za vpliv na vodne organizme (Kang in sod., 2006a). Zaradi teh procesov in zaradi že omenjenega nizkega potenciala za kopičenje v organizmih so izmerjene

vrednosti v različnih vodah in v organizmih običajno v rangu $\mu\text{g/l}$ ali celo v ng/l oziroma ng/kg . V monitoringu zaznane najvišje koncentracije so podane v preglednici 2.

Preglednica 2: Najvišje zaznane koncentracije BPA, dobljene iz monitoringa (Nakanishi et al., 2007)

Najvišja zaznana koncentracija BPA	
Površinske vode	22 $\mu\text{g/l}$
Podzemne vode	0,028 $\mu\text{g/l}$
Izpusti iz čistilnih naprav	0,42 $\mu\text{g/l}$
Voda iz pipe	0,007 $\mu\text{g/l}$
Deževnica	0,04 $\mu\text{g/l}$
Ribe in školjke	30 $\mu\text{g/kg}$

2.1.4 Strupenost

Omenjeno je že, da je BPA biorazgradljiv. Razgrajujejo ga številne bakterije, glive, nekateri planktonski organizmi pa tudi rastline in nekatere živali. Metabolizem lahko strupenost in estrogenost še poveča, večinoma pa vendarle vodi k razstrupljanju. Glavne metabolne poti vodijo do popolne razgradnje BPA, primarni metaboliti pri tem so 4-hidroksi acetofenon, 4-hidroksi benzaldehid in 4-hidroksi benzojska kislina. Čeprav številni organizmi biorazgradijo ali metabolizirajo BPA, to ne pomeni, da BPA nima nobenih estrogenih ali strupenih učinkov (Kang in sod., 2006a). Znano je namreč, da je BPA strupen za vodne organizme. Že dolgo je znana akutna strupenost na sladkovodne in morske alge, rake in ribe. EC50 in LC50 vrednosti so podane v preglednici 3 in se gibljejo med 1–10 mg/l , kar pomeni, da je BPA zmerno strupen za alge, vodne nevretenčarje in ribe (Alexander in sod., 1988).

Preglednica 3: Strupenost BPA za sladkovodne in morske alge, rake in ribe (Alexander et al., 1988)

Organizem		Parameter	Vrednost
Sladkovodni organizmi	Zelena alge - <i>Selenastrum capricornutum</i>	96 h EC 50	2,7 mg/l^{a}
			3,1 mg/l^{b}
	Vodne bolhe – <i>Daphnia magna</i>	48 h EC 50	10,0 mg/l
		24 h EC 50	7,75 mg/l^{c}
		24 h EC 50	8,57 mg/l^{c}
Morski organizmi	Ribe – <i>Pimephales promelas</i>	96 h LC 50	4,7 mg/l
	Kremenaste alge – <i>Skeletonema costatum</i>	96 h EC 50	1,0 mg/l^{a}
			1,8 mg/l^{b}
	Kozice – <i>Mysidopsis bahia</i>	96 h LC 50	1,1 mg/l
	Ribe – <i>Menidia menidia</i>	96 h LC 50	9,4 mg/l

a – rezultat, dobljen s štetjem števila celic

b – rezultat, dobljen z uporabo fluorescence klorofila A

c – za primerjavo rezultati nekoliko novejše študije (Brennan in sod., 2006)

2.1.5 Estrogenost bisfenola A

Dokazano je, da je BPA sposoben vezave na estrogeni receptor in tako lahko vpliva na hormonski sistem organizma. Na ta način bi lahko precej negativno vplival tudi na

zdravje ljudi, zaradi česar je preučevanje estrogenega delovanja BPA tema kar nekaj raziskav. Sam estrogeni potencial BPA so odkrili po nesreči (Krishnan in sod., 1993). Nadaljnje raziskave so to še potrdile: YES test je pokazal, da je aktivnost BPA manjša za tri (Routledge in Sumpter, 1996) oz. za pet (Ike in sod., 2002) velikostnih razredov v primerjavi z naravnim estrogenom 17 β -estradiolom in tako velja za šibko estrogeno spojino.

2.1.6 Načini razgradnje in zmanjšanje strupenosti

Kot že omenjeno, je učinkovitost čistilnih naprav za odstranitev BPA ocenjena od 37 do 94 %. Ker pa je dokazano, da je BPA strupen in še motilec hormonskega sistema, ki bi lahko povzročil veliko škodo tako v ekosistemih kot pri ljudeh, se iščejo alternativni, bolj učinkoviti načini razgradnje BPA, ki bi tudi učinkovito zmanjšali njegovo strupenost in estrogenost. Eden od teh načinov je fotokataliza. Chiang in sod. (2004) so fotokatalitsko razgrajevali BPA z uporabo TiO_2 pri pH 3 in 10 ter razgradnjo spremljali z uporabo HPLC in TOC analize. Ugotovili so, da se je BPA uspešno razgradil, vendar je bilo pri pH=10 mineraliziranega le 20-30 % ogljika iz BPA. Ko so na katalizator dodali še platino, se je hitrost razgradnje in mineralizacije BPA povečala še do okoli 3–6-krat. Z uporabo HPLC analize so tudi ugotovili, da prihaja do nastanka intermediatov, ki so pri pH=10 veliko bolj obstojni. Strupenostni testi z luminiscenčno bakterijo *Vibrio fischeri* so pokazali, da so intermediati, ki so nastali na začetku razgradnje BPA, pri pH=3 bolj strupeni od samega BPA, zato se strupenost na začetku nekoliko poveča, nato pa pada, medtem ko pri razgradnji pri pH=10 strupenost pada počasneje in brez začetnega povečanja strupenosti.

Torres in sod. (2008) so se razgradnje BPA lotili na malo drugačen način, in sicer z uporabo foto-Fentonove reakcije v kombinaciji z utrasifikacijo vode, ki proizvaja zadostne količine vodikovega peroksida. H_2O_2 nato oksidira Fe^{2+} , v tako imenovani Fentonovi reakciji pa nastajajo zelo reaktivni oksidanti (OH radikali), ki so sposobni razgradnje tudi biološko in kemijsko težje razgradljivih snovi iz vode. UV sevanje pomembno prispeva k hitrejši razgradnji. Na takšen način so s TOC analizo ugotovili, da se je po 4 urah odstranilo 70 % začetne množine ogljika, niso pa spremljali strupenosti.

Cui in sod. (2009) so poskušali odstraniti BPA iz vode z uporabo elektrokemijske razgradnje, in sicer z uporabo štirih različnih tipov anod: Ti/z borom dopiran diamant (BDD), Ti/Sb- SnO_2 , Ti/Ru O_2 in Pt. Tako kot pri Fentonovi reakciji se tudi pri elektrolizi vode tvorijo OH radikali, ki povzročijo razpad BPA v enoobročne aromatske spojine, ki nato razpadejo na alifatske kisline in se končno mineralizirajo v CO_2 . TOC analiza je pokazala, da se je največ ogljika, 90 %, odstranilo z uporabo Ti/Sb- SnO_2 anode. Nastajanje vmesnih produktov so spremljali s HPLC analizo, strupenosti pa niso določali.

Razgradnjo BPA z ostalimi naprednimi oksidacijskimi procesi so nadaljevali Rodríguez in sod. (2010). Preizkusili so Fe(III) fotolizo, ferikarboksilatno fotolizo, TiO_2 fotokatalizo, H_2O_2 fotolizo in kombinacije teh metod. Razgradnjo so prav tako spremljali s TOC in HPLC analizama, nastanek vmesnih produktov pa so spremljali še z GC-MS analizo. Nekateri od identificiranih stranskih produktov razgradnje BPA so benzaldehid, fenol, 4,4-dihidroksibenzofenon, 4-hidroksiacetofenon, 4-izopropenilfenol in 2-etilheksanol. Strupenostni testi z *Vibrio fischeri* in rezultati TOC analize so pokazali, da obstaja močna povezava med stopnjo mineralizacije in strupenostjo. Z 20 % mineralizacijo

BPA se je strupenost zmanjšala za 70–30 %, so pa tudi pri Fentonovem procesu ugotovili, da se je na začetku razgradnje, še preden se je začela strupenost zmanjševati, le-ta nekoliko povečala.

2.2 Strupenostni testi

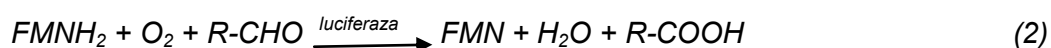
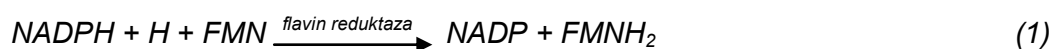
2.2.1 Ekotoksikologija in strupenostni testi

Toksikologija je veda, ki preučuje vpliv strupov na organizem, toda zaradi naraščajoče okoljske ozaveščenosti je Truhaut leta 1969 besedi toksikologija dodal predpono eko- in prvič uporabil ta izraz, ki opisuje vedo, ki se ukvarja s škodljivimi učinki onesnaževal na ravni celotnega ekosistema. Ukvarja se s tem, od kod in na katere možne načine pridejo onesnaževala v ekosistem ter kakšna je njihova usoda v okolju; meri in ocenjuje vplive posameznega onesnaževala v okolju, in sicer vse od vpliva na dedni material ali hormonski sistem posameznega osebk do posledic v celotni populaciji in na koncu v celotnem ekosistemu (Hoffman in sod., 1995:1-6). Medtem ko nam kemijske analize lahko podajo ogromno informacij o tem, koliko je posameznega onesnaževala v vodi ali kakšna je koncentracija nekega plina v zraku, nam ne pove nič o škodljivih vplivih na organizme. Da bi lahko preprečili številne nepričakovane vplive, še preden nas presenetijo, kot nas je v preteklosti večkrat presenetila strupenost nekaterih danes prepovedanih kemikalij, so nujno potrebne tovrstne raziskave (Tišler in sod., 2009). In eno od v ta namen zelo uporabnih ekotoksikoloških orodij so tudi strupenostni testi.

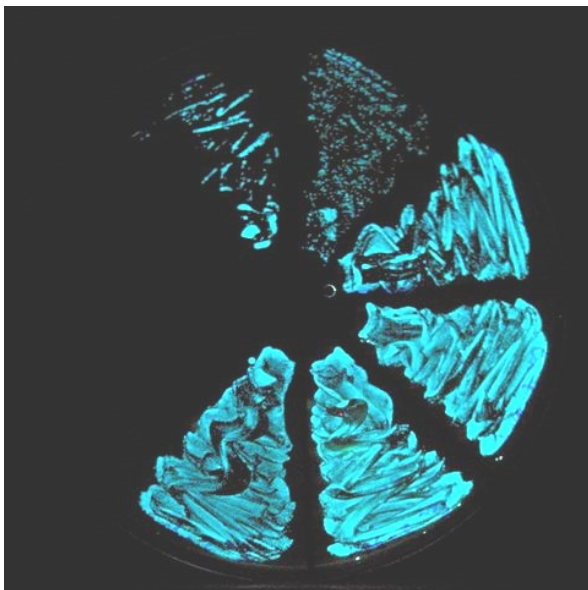
Tako kot v toksikologiji skuša tudi ekotoksikologija določiti povezavo med dozo in učinkom. To ugotovimo z uporabo strupenostnih testov, v katerih testni organizem izpostavimo določenim koncentracijam neke spojine ali zmesi in opazujemo koncentracije, pri katerih se pokažejo različni učinki – smrtnost ali drugi biokemijski, fiziološki, reproduktivni ali vedenjski učinki. Testni organizmi so po navadi izbrani tako, da lahko ugotovljene učinke prenesemo ne le na druge osebk iste vrste, ampak da lahko lažje predvidevamo posledice na celotni ekosistem. Različne vrste organizmov se lahko na neki toksin zelo različno odzovejo, razlike lahko obstajajo celo med posameznimi sevi, zato se običajno strupenostni testi izvedejo na več kot le eni vrsti testnih organizmov (Walker in sod., 2006: 87-90). Za določanje strupenosti v vodnem okolju se najpogosteje uporabljajo alge, vodne bolhe in ribe, zaradi enostavnosti testa pa so priljubljene tudi luminiscenčne bakterije.

2.2.2 Strupenostni testi z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je gram negativna morska bakterija, ki je sposobna bioluminiscence, kar prikazuje slika 3. Premika se z bički in pogosto živi v simbiozi z drugimi morskimi organizmi. Svetloba nastane z uporabo flavin mononukleotida (FMN), ki se reducira z nikotinamidadeninnukleotid fosfatom (NADPH_2) (enačba 1). V prisotnosti kisika, aldehida in luciferaze se reducirani FMNH_2 oksidira nazaj v FMN (enačba 2), pri tem pa se emitira svetloba valovne dolžine 490 nm.



Nastala svetloba je direktno sorazmerna z metabolno aktivnostjo bakterijske populacije in zaviranje delovanja encimov se kaže v sorazmernem zmanjšanju bioluminiscence. Zaradi občutljivosti in dobrega odziva bakterij na različne koncentracije kemikalij je vrsta *Vibrio fischeri* primeren testni organizem za ugotavljanje strupenosti. Meri se zmanjšanje svetlobe določene valovne dolžine, torej gre za subletalni učinek. Test je na voljo v obliki komercialno dostopnega in avtomatiziranega merilnega aparata s priloženimi potrebnimi spojinami in bakterijami. Gre za enega od najbolj priljubljenih in pogosto izvedenih testov strupenosti. Njegove prednosti so v tem, da je enostaven, hiter in ponovljiv (Parvez in sod., 2006).



Slika 3: Bioluminiscenca bakterije *Vibrio fischeri* (vir: http://bioluminescence-vibrio.blogspot.com/2010_04_01_archive.html, april 2011)

2.2.3 Strupenostni testi z algami *Desmodesmus subspicatus*



Slika 4: Alge *Desmodesmus subspicatus* (vir: http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/688.jpg, april 2011)

Alge so občutljivi, časovno in cenovno dokaj ugodni in zaradi velikega ekološkega pomena zelo primerni testni organizmi za ugotavljanje strupenosti, tako kemikalij kot tudi raznih iztokov in odpadnih voda (Arensberg, 1995). Merjeni strupeni učinek kemikalij na alge je najpogostejše zaviranje rasti populacije alg. V EU je test zaviranja rasti alg po REACH zakonodaji obvezen za vse kemikalije, katerih proizvodnja presega 1 tona na leto (Uredba Evropskega ..., 2006). Test zaviranja rasti alg je tudi standardiziran v ISO standardu ISO 8692 (2004). Običajno traja 72 ur, zaviranje rasti pa se lahko določi direktno s štetjem alg pod mikroskopom ali pa indirektno z uporabo drugih metod (spektrofotometrična metoda, določanje klorofila...) (Walker in sod., 2006: 102). V strupenostnem testu se uporablja kultura enoceličnih kroglastih zelenih alg vrste *Desmodesmus subspicatus* (staro poimenovanje *Scenedesmus subspicatus*) ali *Pseudokirchneriella subcapitata* (staro poimenovanje *Selenastrum capricornutum*). Celice alg *Desmodesmus subspicatus* pod mikroskopom so prikazane na sliki 4.

2.2.4 Strupenostni testi z vodnimi bolhami *Daphnia magna*



Slika 5: *Daphnia magna*

(vir: <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php>, april 2011)

Vodne bolhe ali *Cladocera* so red majhnih rakov, ki planktonsko živijo v celinskih vodah pa tudi v morju. Karapaks pokriva in ščiti skoraj celotno telo, razen glave, z enim sestavljenim očesom in dvema paroma tipalnic. Plavajo z uporabo drugega para velikih, razvejanih tipalk, prehranjujejo pa se z detritom, bakterijami in algami, in sicer na način, da vodo precejajo s filtrirnimi okončinami, ki se nahajajo na nogah. Zanje je še posebno značilno, da se v ugodnih pogojih razmnožujejo partenogenetsko, v neugodnih pogojih, zlasti jeseni, pa se pojavijo samci, ki oplodijo samice, nastanejo pa trpežna zimska jajca, ki preživijo neugodne razmere (Podobnik in Devetak, 2000: str. 194, 195).

Obstaja približno 400 vrst vodnih bolh. V strupenostnih testih se najpogostejše uporablja *Daphnia magna*, prikazana na sliki 5. To je sladkovodna vrsta, ki živi v majhnih evtrofnih ribnikih in skalnih bazenčkih. Odrasle samice so velike med 5 in 6 milimetrov. Za teste strupenosti so se začele uporabljati že od leta 1940 dalje. Zaradi svoje majhne velikosti in enostavnega rokovanja, velike plodnosti, kratke življenjske dobe, partenogenetskega načina razmnoževanja in vsesplošne razširjenosti je zelo primerna za laboratorijske teste, poleg tega pa je za teste strupenosti tudi dovolj občutljiva in

cenovno ugodna (Koivisto, 1995). V akutnem testu strupenosti se najpogosteje opazuje gibljivost (subletalni učinek) po 24 ali 48 urah, možno pa je izvajati tudi kronične teste strupenosti, npr. test reproduktivnosti. V akutnem testu strupenosti se uporabljajo en dan stare vodne bolhe, v akvariju pa ne sme biti prisotnih zimskih jajc, saj se lahko zmanjša njihova občutljivost in genetska enakost med posameznimi organizmi. Zaradi primerljivosti rezultatov med posameznimi laboratoriji je tudi tukaj prišlo do standardizacije, npr. za akutni strupenostni test zaviranja gibljivosti ISO 6341 (1996). Tako kot test zaviranja rasti alg je tudi ta test v EU obvezen za vse kemikalije s proizvodnjo večjo 1 t/leto.

2.2.5 Strupenostni testi z zarodki rib zebric *Danio rerio*



Slika 6: *Danio rerio* (vir: <http://www.melhorpeixe.com/paulistinha-danio-rerio.html>, november 2011)

Tako kot alge in vodne bolhe so tudi ribe zelo pogost testni organizem za ugotavljanje strupenosti. Zaradi etičnih dilem glede uporabe živali, sploh vretenčarjev, so se pri testih strupenosti začele razvijati alternativne, manj etično sporne metode, kot na primer uporaba biomarkerjev na nivoju celice in tkiv (Walker in sod., 2006: 106). Ena od alternativnih metod so tudi poskusi na zarodkih. Tudi v Sloveniji je potrebno za izvajanje strupenostnih testov na živalih – ribah, prositi za dovoljenje Veterinarske uprave (Zakon o zaščiti živali, 2007), medtem ko za delo z zarodki rib tega ni potrebno storiti. Strupenostni test za ugotavljanje strupenosti odpadnih voda na zarodke rib zebric je še ne tako dolgo nazaj bil tudi standardiziran – ISO 15088 (2007).

Zebrice so tropske ribe, ki spadajo v družino pravih krapovcev. Odrasle ribe, prikazane na sliki 6, so precej trpežne, vzdrževanje pa je enostavno in poceni, zaradi česar so zelo pogoste tako v ljubiteljskih akvarijih kot znanstvenih laboratorijih. Akvarijska voda mora biti seveda topla, okoli 25° C, in ob primernem dnevno-nočnem ciklu svetlobe ter v odsotnosti motenj in stresnih situacij se razmnožujejo vsak dan. Da pa odrasle ribe ne pojedjo iker, je v akvarije potrebno vstaviti valilnike z zaščitno mrežico. Za teste se lahko uporabljajo le oplojena jajca v 4–128-celičnem stadiju, ki so simetrična in brez nepravilnosti. 24 ur po nastavitvi testa se opazuje subletalne znake: negibnost ter nerazvite oči, in smrtno učinke: ni razvitih somitov, rep ni ločen od rumenjaka ter zarodek je koaguliran. Smrtni učinek, ki ga je možno opaziti po 48 urah, je, da ni srčnega utripa, opazni subletalni učinki pa so lahko odsotnost pigmenta v telesu ali v očeh, ni otolitov v ušesih, ni krvnega obtoka. Možne so tudi deformacije. Zarodke je možno opazovati tudi dlje časa, in sicer, če se po 72 urah izvalijo ali ne.

2.3 Estrogenost

Zadnja leta se javnost in znanost vedno bolj zanimata za tako imenovane hormonske motilce, naravne ali umetne snovi, ki so sposobne vplivati na hormonski ter razmnoževalni sistem organizmov, posledično pa tudi na ekosisteme in ljudi. Učinki v okolju, povezani s hormonskimi motilci, so na primer krhkost jajčnih lupin pri pticah, želvah in ribah, feminizacija samcev, napake v reproduktivnem sistemu ter imunskem sistemu. Tudi pri ljudeh lahko povzročijo zmanjšanje količine in kvalitete sperme pri moških, zvišali pa naj bi lahko tudi pojavnost raka na prsih ali prostati. Najbolj znani in raziskani so učinki naravnih ali sintetičnih estrogenov oz. ksenoestrogenov. V naravi so ugotovili, da povzročajo izločanje vitelogenina, ki se sicer pojavlja le pri odraslih ribjih samicah, lahko tudi pri samcih, povzročajo pa tudi feminizacijo ribjih samcev in pojav hermafroditov, kar lahko vodi v sterilnost in upadanje populacije. Glede na to, kako delujejo, ločimo hormonske motilce v glavnem na estrogene, androgene, anti-androgene ter progestrogene. Hormonski sistem motijo tako, da se vežejo na iste hormonske receptorje in delujejo močnejše (agonisti) ali šibkeje (antagonisti) kot naravni hormon, lahko pa vplivajo tudi na sintezo in metabolizem hormonov. Učinki hormonskih motilcev se najbolj izražajo v vodnem okolju, saj so vodni organizmi lahko skozi vse življenje izpostavljeni nizkim, a že škodljivim koncentracijam teh snovi (Sumpter, 2005). Najmočnejša sta naravni hormon E2 (17β -estradiol) in temu podoben sintetični hormon EE2 (17α -etinilestradiol), ki lahko delujeta že v koncentracijah nekaj ng/l, obstajajo pa še mnogi ksenoestrogeni, ki so morda manj estrogeno aktivni, vendar pa so lahko tudi v naravi prisotni v večjih količinah. Med takšne ksenoestrogene spadajo nekateri organoklorni pesticidi, poliklorirani bifenili (PCB) in dibenzofurani, ftalati in seveda, kot že omenjeno, bisfenol A (Preziosi, 1998). Hormonski motilci pa so še veliko bolj razširjeni; najdemo jih ne samo v insekticidih in repelentih, ampak tudi med antibiotiki, analgetiki in nekaterimi drugimi zdravili, v sončnih kremah, v zaviralcih gorenja in celo v dišavah.

2.3.1 Možne metode za ugotavljanje hormonskih motilcev

Zaradi splošne razširjenosti in potencialnih zdravstvenih in ekoloških posledic so v svetu razvili številne metode za ugotavljanje prisotnosti hormonskih motilcev. Ena od možnih bioloških metod so testi na celotnem organizmu. Na raznih žuželkah, dvoživkah, ribah in pticah se opazujejo deformacije, motnje v reproduktivnem sistemu, razvoju zaroda ali jajc ter sproščanje proteinov, npr. vitelogenina. Prednost teh metod je, da pokažejo dejanske, kumulativne učinke, vendar se odzivi od vrste do vrste razlikujejo. Tu pa so seveda tudi etične dileme, zaradi česar se vedno bolj uporabljajo testi na nivoju celice in ekspresije genov (Chang in sod., 2009). Opazuje se vezava hormonskega motilca na ustrezní protein, ki je označen z luciferazo ali β -galaktozidazo (YES test), kar lahko merimo z luminometrom ali spektrofotometrom. Tovrstni testi dajo običajno hiter in enostaven odziv, vendar pa so manj primerni za bolj kompleksne vzorce oz. mešanice hormonskih motilcev. Zaradi selektivne propustnosti celične membrane, transporta in metabolizma strupov pa je težko predvideti, kako bi hormonski motilec lahko deloval na celotni organizem. Obstajajo imunološki, necelični testi, najbolj znani so RIA, RIANA in ELISA, ki obstaja tudi že v obliki komercialno dostopnega testnega kompleta. Tu se opazuje vezava hormonskega motilca na protitelo, ki je označeno z radioaktivnim izotopom, fluorescentno molekulo ali encimom,

ki razgrajuje ustrezeni substrat, tako da pride do barvne spremembe. V primerjavi z drugimi metodami je bistvena prednost imunoloških testov ta, da lahko z njimi zaznamo prisotnost hormonskih motilcev že v izjemno nizkih koncentracijah (Chang in sod., 2009).

2.3.2 YES test

YES test je eden od najpogostejše uporabljenih testov za določanje estrogenosti. Razvili so ga z namenom ugotavljanja, katere spojine so sposobne vezave na človeški estrogeni receptor in tako sposobne motiti hormonski sistem. Kratica YES se v angleščini uporablja za »yeast estrogen screen«. Kot že nakazuje samo ime, se v tem testu estrogeni določajo z uporabo kvasovk, in sicer gensko spremenjenega seva *Saccharomyces cerevisiae*. V kromosom kvasovke je bila vnesena DNA sekvenca človeškega estrogen receptorja (hER).



Slika 7: Mikrotiterska plošča za YES test

Uspešnost vezave estrogene spojine na estrogeni receptor se preverja z uporabo dodanega plazmida, ki vsebuje tako imenovani "reporter gen" *lac-Z*. Vezava estrogena na hER receptor pripelje do izražanja reporter gena in posledično sinteze encima β -galaktozidaza. Ta se sprosti iz celice v medij, ki vsebuje dodano barvilo CPRG (chlorophenol red- β -D-galactopyrnanoside). CPRG je običajno rumene barve, toda β -galaktozidaza ga pretvori v produkt rdeče vijolične barve, ki ga lahko zmerimo na spektrofotometru pri valovni dolžini 540 nm. Spremembo barve prikazuje slika 7. Rezultate nato preračunamo v aktivnost β -galaktozidaze, vendar ta sama po sebi ne pove še nič o estrogenosti določene spojine. Potrebna je primerjava z naravnim estrogenom E2, kjer je bil odziv izmerjen pri okoli 1,5 ng/ do 3000 ng/l. Če je na primer odziv neke snovi izmerjen pri višjih koncentracijah, ta velja za šibkejši hormonski motilec. YES test je tako pokazal, da je BPA šibko estrogena spojina, saj je bila aktivnost β -galaktozidaze merjena pri za tri velikostne razrede višjih koncentracijah kot pri E2 (Routledge in Sumpter, 1996).

2.4 Razgradnja BPA

2.4.1 Katalitska mokra oksidacija

Izraz "napredni oksidacijski procesi" je skupni imenovalec za vse načine razgradnje, ki imajo sposobnost izrabljati visoko reaktivno $\text{OH}^\cdot$ radikale, zaradi česar so sposobne oksidirati tudi težko razgradljive organske spojine. Med napredne oksidacijske procese spadajo že omenjeni Fenton ali foto-Fenton procesi, fotokataliza, ozonacija in tudi mokra oksidacija, ki jo je prvič vpeljal F.J. Zimmermann leta 1958. Mokra oksidacija je med vsemi naprednimi oksidacijskimi procesi z ekonomskega in tehnološkega stališča najbolj uporabna za čiščenje odpadnih voda, ker pa kot oksidant ne uporablja vodikovega peroksida ali ozona, ampak čisti kisik ali samo zrak, je tudi ekološko prijaznejša od ostalih metod. Še posebej velik potencial ima za obdelavo odpadnih voda z visoko vsebnostjo organskih snovi (s približno 10–100 g/l kemijske potrebe po kisiku) in za strupena onesnaževala, ki so neprimerna za biološko čiščenje. Z uporabo mokre oksidacije se kompleksne organske spojine lahko razgradijo do biorazgradljivih produktov ali pa se celo mineralizirajo do vode, ogljikovega dioksida in drugih neškodljivih končnih produktov, npr. anorganskih soli (Kim in Ihm, 2010).

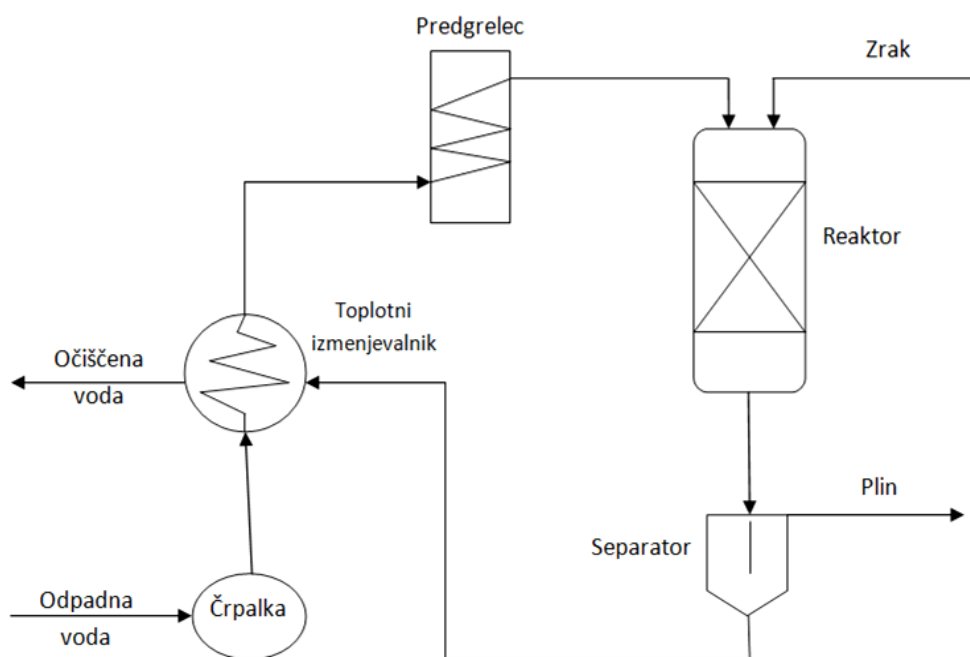
Mokra oksidacija poteka pod visokimi temperaturami (125–350° C) in pod visokim tlakom (5–200 bar), da voda z raztopljenimi organskimi onesnaževali ostane v tekočem stanju. V reaktor se kot plinski oksidant dodaja tudi zrak ali čisti kisik. Pri enostavni mokri oksidaciji gre torej za dvofazni sistem. Lahko pa v reaktor dodamo tudi katalizator v trdnem stanju in tako dobimo trofazni sistem. Ob uporabi katalizatorja lahko mokra oksidacija poteka pod milejšimi pogoji, kar seveda pelje k manjši porabi energije in manjšim obratovalnim stroškom, poleg tega pa lahko pravilni katalizator prispeva k boljši in hitrejši razgradnji. Še bolje pa se običajno obnese uporaba heterogenega katalizatorja. Ti vključujejo žlahtne kovine ter kovinske in druge okside. Žlahtne kovine, npr. rutenij, paladij, rodij in platina, so običajno nanešene na nosilec, ki je lahko npr. titanov, cerijev ali cirkonijev dioksid, in pa na karbonske materiale, npr. silicijev karbid (Levec in Pintar, 2007; Kim in Ihm, 2010).



Slika 8: Reaktor za katalitsko mokro oksidacijo

(vir: <http://www.micromeritics.com/Pressroom/Press-Release-List/Particulate-Systems-Granted-Exclusive-Distribution-of-the-PID-EngTech-Microactivity-Reference-Reactor-MAR-in-Select-Markets-Worldwide.aspx>, september 2011)

Slika 8 prikazuje reaktorski sistem, ki smo ga uporabili za izvedbo mokre oksidacije. Sestavljen je, kot prikazuje slika 9, iz črpalke, ki pod delovnim tlakom črpa odpadno vodo preko toplotnega izmenjevalnika in grelca v reaktor, kamor se vodi tudi zrak oz. v določenih sistemih tudi čisti kisik. Pretakanje plina in odpadne vode v reaktorju je lahko sotočno ali protitočno. Iz reaktorja steče zmes v visokotlačni separator, plin izide iz sistema, voda pa se pred iztokom še ohladi. V primeru reaktorja, ki sem ga uporabljala v tem diplomskem delu, sta kisik in vodna raztopina BPA v reaktorju tekla sotočno navzdol, predgreval pa se je tudi kisik. Pred iztokom iz reaktorja je še jekleni "filter" s porami premera 2 μm , ki zadržuje morebitne odluščene koščke katalizatorja, zato voda iz sistema izteka bistra in je ni potrebno filtrirati (Levec in Pintar, 2007).



Slika 9: Poenostavljeni reaktorski sistem za katalitsko mokro oksidacijo (po Levec in Pintar, 2007)

2.5 Spremljanje razgradnje

V pregledu literature smo ugotovili, da so ostali raziskovalci za spremljanje razgradnje BPA najpogosteje uporabljali HPLC sisteme, nekateri pa so izvedli še TOC analizo (Chen in sod., 2006; Chiang in sod., 2004; Rodrigues in sod., 2010; Rosenfeldt in Linden, 2004; Torres in sod., 2008). Tudi mi smo se odločili, da bomo razgradnjo BPA spremljali z uporabo HPLC analitske tehnike.

2.5.1 HPLC

HPLC je kratica za "high performance liquid chromatography" ali po slovensko za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Je kromatografska tehnika, ki je uporabna za analizo in ločevanje kompleksnih zmesi in temelji na različni porazdelitvi analita med

mobilno fazo (tekočina) in stacionarno fazo, kar je posledica različne polarnosti. Mobilni fazi podobno polarne komponente zapustijo kolono s stacionarno fazo hitreje kot tiste, ki so po polarnosti podobne stacionarni fazi. Komponente vzorca imajo tako različen retencijski čas, z uporabo katerega jih prepoznamo in ločimo med sabo. HPLC pa ne omogoča samo kvalitativne analize, temveč tudi kvantitativno glede na intenzivnost signala, dobljenega na detektorju.

HPLC sistemi so sestavljeni iz avtomatskega injektorja za vzorce, črpalke, ki pod visokim tlakom poganja vzorec z mobilno fazo čez sistem, rezervoarja za mobilno fazo, predkolone, ki še dodatno prečisti vzorec in ščiti kromatografsko kolono, kromatografske kolone in detektorja. Mobilna faza je lahko ultra čista voda, ustrezno organsko topilo ali pufer. Uporablja se lahko več mobilnih faz, sestava oz. razmerje je lahko med analizo konstantno (izokratska elucija) ali pa se s časom spreminja (gradientna elucija). Mobilna faza pa v nobenem primeru ne sme biti takšna, da bi v njej lahko bila topna stacionarna faza. Kromatografska kolona je lahko kovinska ali plastična, napolnjena pa je s stacionarno fazo v obliki prahu, gela ali tankega filma, ki je fizikalno ali kemijsko vezan na inertni trdni nosilec. Najpogostejša ali tako imenovana "normalna" stacionarna faza je silikagel – SiO_2 (ali tudi rahlo bolj alkalen Al_2O_3), ki je polaren in zahteva uporabo nepolarne mobilne faze. Če pa je analit nepolaren, se običajno uporabljata nepolarna mobilna faza ter silikagel, ki ima na površino vezane manj polarne substituentne (običajno hidrofozne alkilne verige različne dolžine), tako da je mobilna faza polarnejša od stacionarne in tako govorimo o "reverzno" fazni HPLC. Po ločbi na koloni analit pripotuje na detektor, ki je najpogostejše UV-VIS spektrofotometrični detektor ali detektor na diodno vrsto (DAD). Kadar pa želimo zaznati analite v zelo majhnih koncentracijah, pa se lahko uporablja tudi zelo občutljiv masni spektrometer (MS).

Dobljen rezultat je v obliki kromatogramov. Kromatografski vrhovi morajo biti med sabo lepo ločeni, krivulje simetrične ter ne preširoke in ne preozke. Sestavo mobilne faze in kromatografske kolone izberemo tako, da dobimo na koncu čim bolj idealen kromatogram. Koncentracija določenega analita se izračuna z uporabo integracije površine kromatografskega pika (Skoog in sod., 2007: 816 - 854).

3 EKSPERIMENTALNI DEL

V prvem delu praktičnega dela diplomske naloge smo pripravili testne raztopine iz bisfenola A v obliki praška tako, da smo v drugem koraku izvedli strupenostne teste z luminiscenčnimi bakterijami *Vibrio fischeri*, z algami *Desmodesmus subspicatus*, vodnimi bolhami *Daphnia magna*, z zarodki rib *Danio rerio* ter še preskus estrogenosti z YES testom. Po določitvi strupenosti in estrogenosti osnovne spojine BPA je sledila razgradnja z uporabo mokre oksidacije in s tremi različnimi kombinacijami katalizatorjev ter pri dveh različnih temperaturnih in tlačnih pogojih. Vzorce voda, ki so pritekli iz reaktorja, smo zbirali in z vsakim od šestih tako dobljenih vzorcev izvedli vse strupenostne teste ter test estrogenosti, razgradnjo pa smo po času spremljali z uporabo HPLC analize.

3.1 Priprava vodne raztopine bisfenola A

Kot je opisano že v poglavju 2.1, je BPA slabše topen v vodi. Topnost naj bi bila okoli 300 mg/l pri sobnih pogojih. Toda v praksi je bila topnost v ultra čisti vodi še manjša. Najenostavnejša možnost bi bila priprava zelo koncentrirane raztopine BPA v nepolarnem topilu, etanolu ali acetonu in potem redčenje v ultra čisti vodi. Toda pri mokri oksidaciji bi uporaba topila lahko povzročila nastanek dodatnih produktov razgradnje, topila pa so lahko tudi strupena za testne organizme. Standard ISO 14442 (2006) sicer dopušča uporabo topila na način, da končna koncentracija topila v testni raztopini ni večja od 0,01 vol. %, vendar se za njegovo uporabo vseeno nismo odločili. Namesto s topilom smo si tako pomagali z ultrazvočno kopeljo in magnetnim mešalom. Natehtali smo 10–40 mg BPA (odvisno od izhodne koncentracije) in ga topili v ultra čisti vodi v 250–500 ml bučki. Bučko smo za 1 uro dali v ultrazvočno kopel, nato pa vsaj 1 uro (včasih tudi čez noč) mešali na magnetnem mešalu pri nekoliko povišani temperaturi (do 60° C). Višja kot je bila koncentracija BPA, večkrat smo ta postopek ponovili, vendar posamezne raztopine nismo puščali v ultrazvočni kopeli več kot 3 ure. Koncentracija raztopine BPA, ki smo jo dali v reaktor za mokro oksidacijo, je bila 20 mg/l, za izvedbo strupenostnih testov pa smo uporabljali tudi raztopino BPA s koncentracijo 80 mg/l.

3.2 Izvedba strupenostnih testov

Vse štiri strupenostne teste smo izvajali po mednarodnih ISO standardih, in sicer:

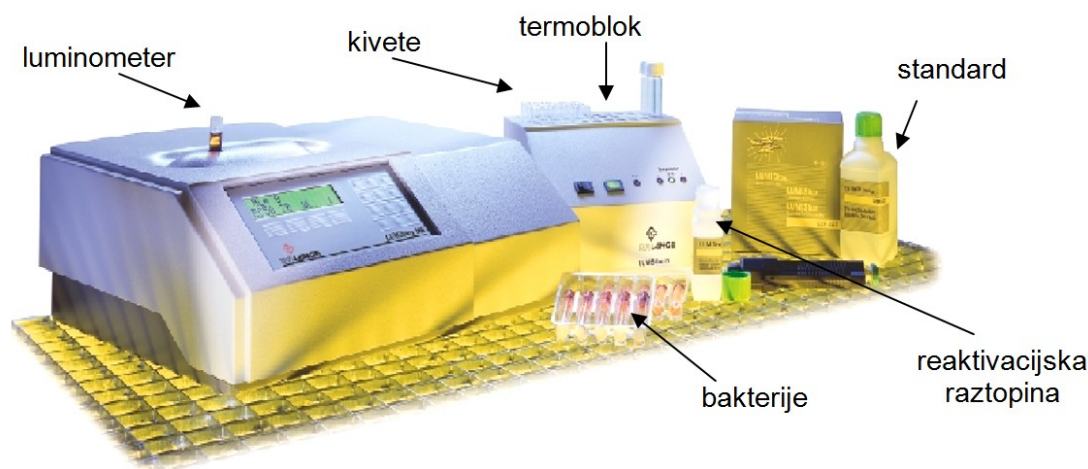
- ISO 11348-2 (2007): določanje zaviralnega učinka vzorcev vode na oddajanje svetlobnih emisij bakterije *Vibrio fischeri* (test z luminiscenčnimi bakterijami),
- ISO 8692 (2004): test zaviranja rasti sladkovodnih enoceličnih zelenih alg,
- ISO 6341 (1996): določanje zaviranja gibanja vodnih bolh *Daphnia magna* – akutni strupenostni test,
- ISO 15088 (2007): določanje akutne strupenosti odpadnih voda na zarodke rib zebric (*Danio rerio*).

Najprej smo izvedli preliminarne teste in tako ugotovili območje delovanja strupenosti BPA. Ko smo našli ustrezno območje strupenosti, smo to širše območje zožili in izvedli definitivni strupenostni test tako, da smo dobili odziv med 10 in 90 %. Na koncu smo rezultat ($IC_{50}/EC_{50}/LC_{50}$) izračunali na način, ki ga določa standard. Definitivni test smo zaradi gotovosti rezultata ponovili vsaj 2-krat.

3.2.1 Test strupenosti z bakterijami *Vibrio fischeri*

Test zaviranja luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* smo izvajali s komercialno dostopnim testnim kompletom proizvajalca Dr. Lange, ki upošteva ISO standard 11348-2 za delo z liofiliziranimi bakterijami. Komplet, prikazan na sliki 10, vključuje:

- luminometer LUMIStox 300 s pripadajočimi kivetami,
- termoblok LUMIStherm,
- programsko opremo LUMISoft 4,
- liofilizirane bakterije *Vibrio fischeri*,
- reaktivacijsko raztopino,
- 7,5 % raztopino NaCl (pozitivna kontrola),
- 2 % raztopino NaCl (kontrola).

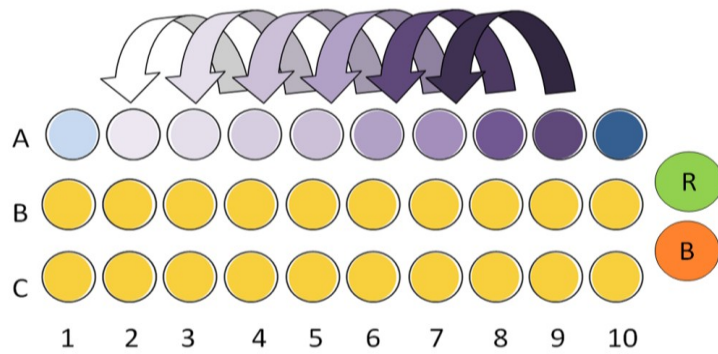


Slika 10: Testni komplet proizvajalca Dr. Lange za izvedbo testa zaviranja luminiscence bakterij *Vibrio fischeri* (vir: <http://www.toxicita.cz/lumistox/>, april 2011)

Priprava reaktivacijske raztopine in vzorcev: Vsaj 15 minut pred začetkom testa smo vklopili luminometer in termoblok, da sta se termostatirala na 15° C, kar je optimalna temperatura za te morske bakterije. Iz hladilnika smo vzeli reaktivacijsko raztopino, jo odpipetirali 12 ml v priloženo epruveto s pokrovčkom, privili pokrovček, močno pretresli ter dali v termoblok za 15 minut na 15° C. Nato smo pripravili vzorce na način, da so vsebovali 2 % NaCl, na primer tako, da smo natehtali 1 g čistega NaCl in ga z vzorcem raztopili v 50 ml bučki. Tako pripravljenim vzorcem smo izmerili pH in ga po potrebi z uporabo 0,1 M HCl in 0,1 M NaOH uravnali na $7,0 \pm 0,2$.

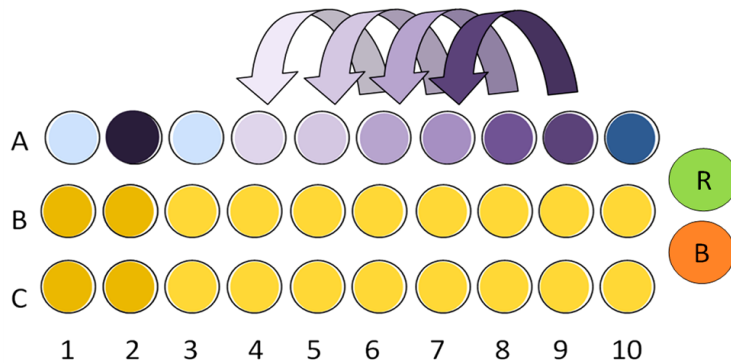
Priprava redčitvene vrste: Ko je bil vzorec pripravljen, smo naredili redčitveno vrsto. Termoblok ima 3 vrste, A, B in C, ter 10 stolpcev, skupno torej 30 lukenj za kivete. Redčitveno vrsto smo naredili v A vrsti. V A1 smo vedno dali 2 % raztopino NaCl kot kontrolo, v zadnjo, A10, pa 1,5 ml 7,5 % raztopino NaCl kot pozitivno kontrolo. Nato smo imeli na voljo 2 postopka:

1. postopek: Najvišja koncentracija merjenega vzorca je 50 % – v kivete A1-A7 smo odpipetirali po 1,5 ml raztopine z 2 % NaCl, v A8 pa 1 ml. V kiveto A9 smo odpipetirali 3 ml vzorca, v A8 2 ml vzorca, v A7 pa 1,5 ml. Nato smo s pipeto vsebino kivete premešali in odpipetirali 1,5 ml iz A8 v A6, iz A7 v A5 itd., kot prikazuje slika 11.



Slika 11: Priprava redčitev za strupenostni test z *Vibrio fischeri* po 1. postopku

2. postopek: Najvišja koncentracija vzorca je 80 vol. % (postopek, ki je prišel v poštev pri vzorcih iz reaktorja, da smo jih lahko čim manj razredčili) – v kiveto A1 smo odpipetirali 2 ml razredčevalne raztopine, v kiveto A2 pa 2 ml vzorca. Kivete A3 do A9 smo pripravili enako kot prej: v A3 je bilo ponovno 1,5 ml kontrole, v A4–A8 so bile redčitve, v A10 pa 1,5 ml pozitivne kontrole. Ta postopek prikazuje slika 12.



Slika 12: Priprava redčitev za strupenostni test z *Vibrio fischeri* po 2. postopku

Aktiviranje bakterij: Stekleničko z liofiliziranimi *Vibrio fischeri* smo vzeli iz zamrzovalnika ter iz škatle prepisali številko serije. Nežno smo jo mešali 2 minuti v vodni kopeli s sobno temperaturo in tako odtajali bakterije. Nato smo odprli pokrov stekleničke in vanjo odpipetirali 0,5 ml reaktivacijske raztopine in jo nato vrnili v termostatski posod. V sosednjo luknjo (B) smo dali še stekleničko z bakterijami in termostatisirali 15 minut. Po tem času smo resuspendirane bakterije previdno in nežno zmešali s preostalo reaktivacijsko raztopino ter prenesli po 0,5 ml zmesi v vse steklene kivete od B1 do C10. Po drugem postopku pa smo v stekleničko z resuspendiranimi bakterijami najprej dali 4,5 ml reaktivacijske raztopine, premešali in dali po 0,2 ml bolj koncentrirane suspenzije bakterij v kivete B1–C2, nato pa preostanek enako kot prej zmešali s preostalo reaktivacijsko raztopino ter odpipetirali po 0,5 ml v kivete B3–C10. Po prenosu reaktiviranih bakterij v kivete B1–C10 je sledila 15 minutna inkubacija.

Nastavitev programa in izvedba testa: Pred samim začetkom testa smo zagnali program LUMISoft 4 ter v 1. okence vpisali ime in izvajalca testa, številko serije bakterij ter datum. V drugo okence smo vpisali število vzorcev, časovni interval menjavanja kivet (običajno 30 s), število kontrol (1) ter čas testa (30 min). Na koncu je še tretje okence, kamor smo vpisali ime vzorca, število redčitev, način redčenja ter začetno koncentracijo vzorca, v drugi zavihek tretjega okenca pa še ime ter koncentracijo pozitivne kontrole. Ko so bili pravilno vpisani vsi podatki, smo kliknili START, na

lumnimetru pa označili program LSoft ter, kot v našem primeru, če vzorec ni bil obarvan, označili še NO COLOR CORR. Ko sta se lumnimeter in računalniški program povezala, je bilo vse pripravljeno za začetek testa. Program je čas začel odšteti takoj, ko smo v lumnimeter vstavili prvo kiveto, B1, in s pritiskom na MEASURE izmerili njeno začetno luminiscenco. Nato smo v 30 sekundah (ali več, če smo tako nastavili) v kiveto B1 odpipetirali 0,5 ml vzorca iz A1 (oziroma v 2. postopku 0,8 ml) in vsebino nežno premešali z uporabo pipete. Po preteku 30 sekund smo izmerili začetno luminiscenco druge paralelke, C1, ter zopet dodali 0,5 ml vzorca iz A1. Enak postopek smo ponovili od B2 do C10. Ko je minilo 30 minut od meritve začetne luminiscence kivete A1, smo izmerili končno luminiscenco. V intervalu 30 sekund smo izmerili končno luminiscenco vseh ostalih B in C kivet. Izmerjene vrednosti si je računalniški program sproti shranjeval, ob morebitni napaki pa smo do meritve luminiscence naslednje kivete imeli možnost popravka.

Izračun rezultatov: LSoft program je izračunal % zaviranja luminiscence tako, da je z uporabo začetne in končne luminiscence kontrole najprej izračunal korekcijski faktor, s katerim je nato popravil začetne intenzitete luminiscence vzorca, z uporabo tega podatka ter s končno intenziteto luminiscence pa izračunal % zaviranja luminiscence po času. Iz umeritvene krivulje grafa odvisnosti zaviranja luminiscence (y) od koncentracije vzorca (x) se je izračunala 30 min IC₅₀. Formule so naslednje:

$$\text{Izračun } fK: \quad fK = \frac{I_{tk}}{I_{t0}} \quad (3)$$

fK – korekcijski faktor

I_{tk} – končna luminiscenca kontrole

I_{t0} – začetna luminiscenca kontrole

$$\text{Izračun } I_c: \quad I_c = I_0 \times \overline{fK} \quad (4)$$

I_c – popravljena začetna intenziteta luminiscence vzorca

I_0 – začetna nepopravljena intenziteta luminiscence vzorca

$\overline{fK}$ – povprečje korekcijskega faktorja obeh kontrol

$$\text{Izračun \% inhib. :} \quad \% \text{ inhib.} = \frac{(I_c - I_t)}{I_c} \quad (5)$$

$\% \text{ inhib.}$ – zaviranje intenzitete luminiscence vzorca, izraženo v procentih

I_t – končna intenziteta luminiscence vzorca

Test je veljaven, če je zaviranje v vzorcu s pozitivno kontrolo med 40 in 60 % ter če je odstopanje paralelnih meritev od povprečja manjše od 3 %.

3.2.2 Test strupenosti z algami *Desmodesmus subspicatus*

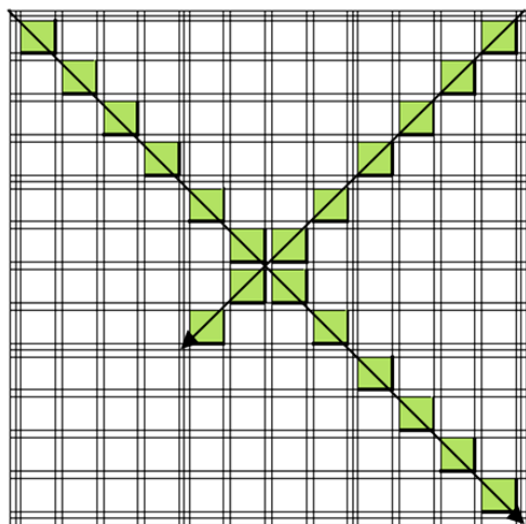
Strupenostni test z algami smo izvedli po standardu ISO 8692 (2004).

Priprava alg: Laboratorijsko kulturo alg *Desmodesmus subspicatus* smo ohranjali z uporabo vsakotedskega sterilnega cepljenja v Jaworski medij, test pa je potekal v rastnem mediju, ki je s hranili manj bogat. 3 dni pred začetkom testa strupenosti z algami smo alge sterilno precepili iz Jaworskega v rastni medij (ISO 8692, 2004). Tega smo pripravili tako, da smo v 200 ml bučko dali okoli 100 ml destilirane vode, sterilno odpipetirali 2 ml raztopine 1 in po 0,2 ml raztopin 2, 3 in 4 (sestava in koncentracija

hranil v raztopinah je opisana v preglednici 4). Izmerili smo pH rastnega medija in ga po potrebi uravnali na $8 \pm 0,2$ z uporabo 1 M HCl in 1 M NaOH. Dodali smo še ustrezen volumen alg (formula 8) iz Jaworskega medija in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Rastni medij z algami smo prelili v erlenmajerico, pokrili z vato in pod osvetljenostjo 4000 luksov stresali 3 dni na stresalniku pri 125 tresljajih na minuto (15 min stresanja/15 min mirovanja).

Preglednica 4: Sestava in koncentracija hranil za rastni medij/testno raztopino (ISO 8692, 2004)

Raztopina	Hranila	Koncentracija	Končna koncentracija v testni raztopini
1 – makro nutrienti	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
2 – Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l	64 µg/l
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	100 µg/l
3 – elementi v sledih	H ₃ BO ₃	185 mg/l	185 µg/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	415 µg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 µg/l
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 µg/l
4 – NaHCO₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l



Slika 13: Način štetja alg v Bürkerjevi kamrici

Štetje alg ter izračun njihove koncentracije: ISO standard 8962 (2004) dovoljuje več možnih načinov za štetje alg, priporoča pa uporabo kamric. V našem primeru smo uporabili Bürkerjevo stekelce, ki ima 2 kamrici za štetje, vsaka kamrica pa 12 krat 12 kvadratkov. V vsaki kamrici smo prešteli alge v 20 kvadratih tako, da smo šli po diagonali od zgornjega levega do spodnjega desnega roba (12 kvadratkov) ter do 2/3 diagonale, ki teče od zgornjega levega do spodnjega desnega roba, kot kaže slika 13. Prešteli smo vse alge na sredini kvadrata ter alge, ki ležijo na dveh robovih, npr. vedno na spodnjem in levem.

Koncentracijo alg smo izračunali po formuli:

$$\frac{No}{ml} = \frac{\text{Št.vseh alg v preštetih kamricah} \times 1000 \times \text{redčitveni faktor}}{\text{površina štetja (mm}^2\text{)} \times \text{globina celica (mm)} \times \text{število preštetih kvadratkov}} \quad (6)$$

$$\frac{No}{ml} = \frac{\text{število vseh preštetih alg} \times 1000}{0,16 \text{ ml}} \quad (7)$$

Volumen alg, ki ga odpipetiramo iz Jaworskega v rastni medij oz. v testno raztopino, se izračuna po naslednji formuli:

$$V_{alg} = \frac{1 \times 10^4 \text{ alg} \times \text{volumen bučke (ml)}}{\text{izračunana koncentracija alg v izhodnem mediju (št.alg/ml)}} \quad (8)$$

V_{alg} – volumen alg [ml]

Priprava testnih raztopin: Pred vsako cepitvijo oziroma pred vsakim testom smo pripravili svežo koncentrirano raztopino ravnega medija tako, da smo v 100 ml bučko v približno 50 ml destilirane vode sterilno odpipetirali 10 ml raztopine 1 ter po 1 ml raztopin 2, 3 in 4. Prezračevali smo 30 minut in prefiltrirali skozi membranski filter s porami 1,2 μm . Sledila je priprava testnih raztopin v 100 ml bučke; za vsako koncentracijo vzorca ter za kontrolo smo naredili dve paralelki. Vsako bučko smo najprej do polovice napolnili z destilirano vodo, dodali 10 ml koncentriranega ravnega medija ter ustrezen volumen raztopine s kemikalijo. V primeru vzorcev iz reaktorja smo dodajali direktno vzorec, da smo le-tega čim manj razredčili (okoli 3 %). Dodali smo še preračunan volumen alg iz testnega ravnega medija ter do značke dopolnili z destilirano vodo oz. z vzorcem. Tudi tukaj je bilo potrebno izmeriti pH in ga po potrebi uravnati na enak način kot pri pripravi alg. Paralelki smo naredili tako, da smo iz bučke prelili po 40 ml testne raztopine v 2 manjši erlenmajerici. Vse testne erlenmajerice smo pokrili z vato ter jih stresali 72 ± 2 uri na stresalniku pri 125 tresljajih na minuto in osvetljenosti 6000 – 10000 luksov.

Pregled in izračun rezultatov: Po 3 dneh smo vsako testno erlenmajerico pretresli, kanili kapljico na Bürkerjevo stekelce in prešteli število alg ter izračunali njihovo gostoto. Za vsako koncentracijo oz. vzorec smo nato izračunali povprečno specifično stopnjo rasti (formula 9) in odstotek zaviranja (formula 10). 72 h IC_{50} smo tudi v tem primeru izračunali z uporabo grafa odvisnosti odstotka zaviranja rasti alg od koncentracije BPA, pri vzorcih pa tega ni bilo potrebno računati.

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0} \quad (9)$$

μ - specifična stopnja rasti alg

t_0 – čas začetka testa

t_L – čas konca test

x_0 – začetna gostota alg

x_L – izmerjena gostota alg ob času

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100\% \quad (10)$$

$I_{\mu i}$ – odstotek zaviranja rasti alg

μ_i – povprečna stopnja rasti koncentracije oz. vzorca i

μ_c – povprečna stopnja rasti kontrole

Ob koncu testa je še bilo potrebno ponovno izmeriti pH kontrole, saj se pH med testom ne sme zvišati za več kot 1,5, saj bi to lahko precej vplivalo na rast alg. V tem primeru rezultati testa niso veljavni, prav tako pa niso veljavni, če povprečna specifična stopnja rasti alg v kontroli ni vsaj 1,4 ali pa njen variacijski koeficient presega 5 %.

3.2.3 Test strupenosti z vodnimi bolhami *Daphnia magna*

Strupenostni test določanja zaviranja gibanj vodnih bolh smo izvedli po standardu ISO 6341 (1996).

Priprava vodnih bolh: Vodne bolhe so se nahajale v 3-litrskih akvarijih v prostoru s stalno temperaturo $20 \pm 2^\circ \text{C}$, kjer je prepovedana uporaba organskih topil, saj so hlapi lahko za njih strupeni. Kulturo vodnih bolh smo stalno ohranjali s prenosom 25 mladih vodnih bolh v nov akvarij (za teste se lahko začne uporabljati vsaj tretja generacija). Tedensko smo čistili akvarije in menjavali laboratorijsko pripravljen rastni medij z vsemi potrebnimi vitamini in minerali, enkrat dnevno pa smo vodne bolhe hranili s predpisano količino posebej pripravljene suspenzije alg *Desmodesmus subspicatus*. En dan pred testom smo iz akvarija odstranili vse mlade vodne bolhe, tako da so ostale samo samice in da smo imeli naslednji dan na voljo do 24 ur stare mlade vodne bolhe. Če smo pri samicah opazili pojav zimskih jajc, vodnih bolh iz tega akvarija za teste nismo več uporabljali.

Priprava testnih raztopin: Test z vodnimi bolhami je potekal v razredčevalni vodi. Ker BPA nismo mogli raztapljati direktno v razredčevalni, ampak ultra čisti vodi, smo po standardu potrebne soli dodali na enak način kot pri vzorcih. Iz prej pripravljenih ločenih raztopin smo odpipetirali preračunane volumne tako, da je testna raztopina na koncu vsebovala 294 mg/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 123,25 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 64,75 mg/l NaHCO_3 in 5,75 mg/l KCl. Vzorce smo razredčili za manj kot 1 %. Zmeriti je bilo potrebno tudi pH in ga z uporabo raztopin NaOH in HCl uravnati na $7,8 \pm 0,2$. Vzorce in raztopine BPA smo pripravljali v 100 ml bučkah. Po 30 ml testne raztopine smo prelili v 2 stekleni petrijevki, preostalo pa smo zlili v tretjo, izhodno petrijevko.

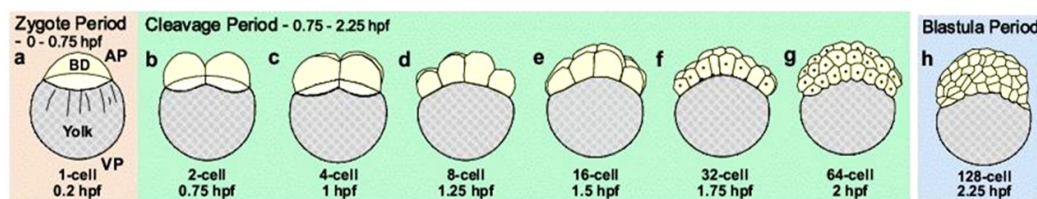
Nastavitev testa: Do 24 ur stare vodne bolhe smo previdno prenesli v stekleno čašo. Pri prenosu je bilo potrebno paziti, da vodne bolhe ne bi poškodovali in pa da smo jih prenesli s kapljico vode, da zračni mehurček ne bi slučajno prišel pod karapaks. V obeh primerih bi lahko že predhodno ovirano gibanje vplivalo na rezultate testa. Iz steklene čaše smo nato prenesli po 20 vodnih bolh v vsako izhodno petrijevko z namenom, da raztopino v testnih petrijevkah s prenašanjem vodnih bolh iz ene v drugo posodo čim manj razredčimo. Iz vsake izhodne petrijevke smo nato prenesli po 10 vodnih bolh v vsako testno petrijevko. Vse testne petrijevke smo nato postavili pod luč z intenziteto (1800 luks) in dnevno nočnim ciklom (16 ur svetlobe/8 ur teme) – pogoji so bili enaki kot v akvarijih, kjer smo gojili vodne bolhe.

Pregled in izračun rezultatov: Po 24 urah smo pregledali rezultate. V vsaki petrijevki smo prešteli negibne vodne bolhe – to so tiste živali, ki po rahlem stresu petrijevke po 15 sekundah ne splavajo, čeprav še lahko premikajo antene. V vzorcih smo po končanem testu ponovno izmerili pH in koncentracijo v vodi raztopljenega kisika. Rezultate (koncentracija + sešteto število negibnih vodnih bolh v obeh paralelkah) smo vnesli v računalniški program za probit analizo. Poleg rezultata se poda tudi zgornjo in spodnjo mejo pri 95 % intervalu zaupanja. Rezultati so veljavni, če je koncentracija

raztopljenega kisika ob koncu testa ≥ 2 mg/l, če je v kontroli ≤ 10 % negibnih vodnih bolh ter če je 24 h EC_{50} za $K_2Cr_2O_7$ med 0,6 mg/l in 2,1 mg/l. Kontrola občutljivosti vodnih bolh s $K_2Cr_2O_7$ se mora preveriti vsaj trikrat letno. Izvedli smo jo pred strupenostnim testom z BPA, 24 h EC_{50} vrednost je bila 1,1 mg/l $K_2Cr_2O_7$.

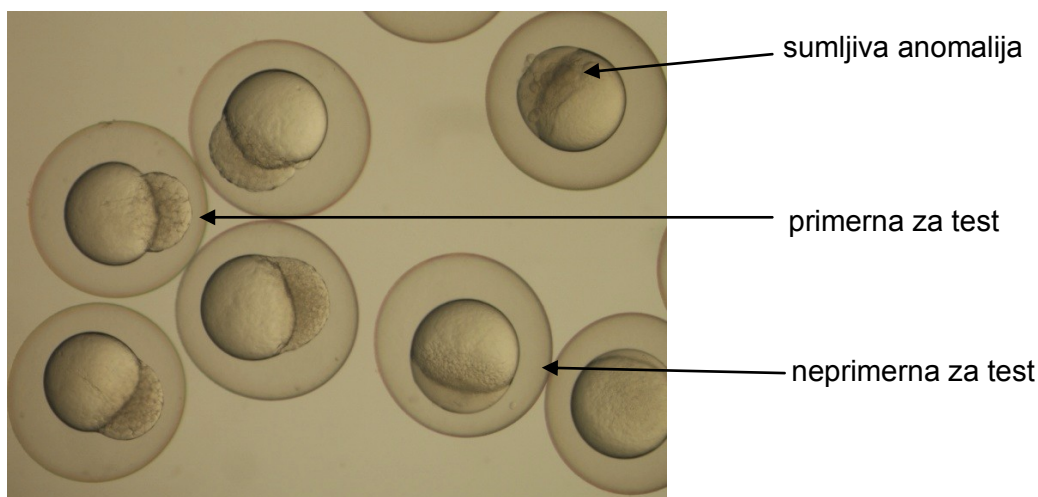
3.2.4 Test strupenosti z zarodki rib zebrič *Danio rerio*

Tudi ta test smo izvajali po ISO standardu (ISO 15088, 2007). Za razliko od prejšnjih testov organizmi niso bili pridobljeni iz drugih raziskovalnih laboratorijev, saj ISO standard dopušča dobavo rib iz trgovin za male živali, prav tako pa tudi uporabo komercialno dostopne hrane za ribe. Vendar pa morajo biti odrasle živali zdrave, brez kakršnih koli na zunaj vidnih bolezni, ter stare od 6 do 24 mesecev. Prav tako je prepovedana uporaba zdravil med šestimi meseci pred drstenjem. Akvariji se nahajajo v prostoru s $26 \pm 1^\circ C$, saj so zebričice tropske ribice. Dnevno-nočni cikel svetlobe je skozi celo leto enak in sicer 16 ur svetlobe in 8 ur teme.



Slika 14: Razvoj *Danio rerio* do 128-celičnega stadija
(vir: <http://aups.org.au/Proceedings/38/43-51/>, maj 2011)

Pridobivanje iker za test: Če želimo za teste imeti dovolj kvalitetnih iker, je pred izvedbo testa ribe priporočljivo hraniti še s svežo živalsko hrano, npr. z rakci *Artemia* ali z vodnimi bolhami, česar smo se posluževali tudi mi. En dan pred testom smo v akvarije nastavili valilnike, da ribe iker ne bi pojedle. Drstenje je potekalo približno 30 minut po prižigu luči. V tem času se ne sme hoditi v prostor z akvarijem, da rib ne zmotimo. Po vsaj 45 minutah smo valilnike vzeli iz akvarijev ter ikre s pomočjo cedilke z razredčevalno vodo (enaka kot za vodne bolhe) previdno sprali v petrijevke (za vsak akvarij v svojo petrijevko). Ikre smo pod lupo, kot kaže slika 15, čim prej pregledali in izločili neoplojene ikre in ikre s sumljivimi anomalijami pri delitvi celic (asimetrija, veziklji). Če ni oplojenih vsaj približno 50 % iker, potem ostalih sicer oplojenih iker za teste ne uporabljamo. Če je torej bilo več kot 50 % oplojenih iker, smo za test v drugo petrijevko prenesli samo oplojene ikre v 4- do 128-celičnem stadiju. Razvoj iker do 128-celičnega stadija prikazuje slika 14. Ikre smo prenašali z uporabo 1000-mililitrske pipete. Nastavke za pipetiranje smo odrezali, da so bili nekoliko širši, uporabljali pa smo le tiste s čim bolj topimi robovi, da iker pri prenašanju nismo poškodovali.

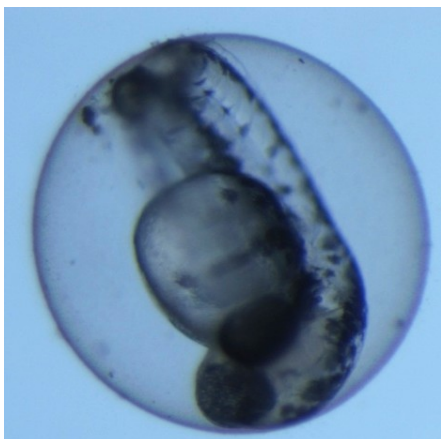


Slika 15: Razločevanje pod lupo med primernimi in neprimernimi ikrami za izvedbo testa strupenosti

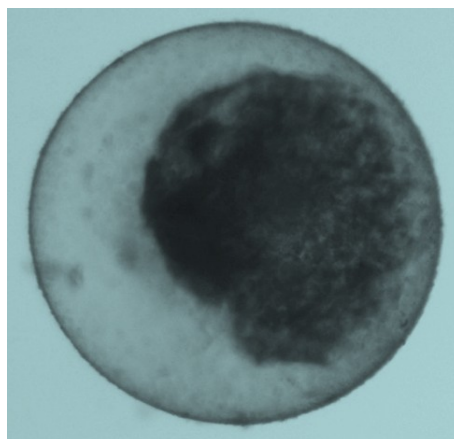
Priprava raztopin in nastavitev testa: Raztopine BPA in vzorcev smo pripravili na enak način kot za strupenostni test z vodnimi bolhami, le da je moral biti pH v tem primeru uravnan na $7,0 \pm 0,2$. Tudi koncentracija kisika mora biti večja – 4 mg/l O₂, saturacija mora biti okoli 50 %. Testne raztopine smo odpipetirali v TPP mikrotitrne plošče s 24 luknjicami premera 15,4 mm in prostornine 3,29 ml. Koliko ml testne raztopine prenesemo v eno luknjico, po standardu ni predpisano, mora pa biti volumen posoda enak. Po 0,8 ml vsakega vzorca oz. raztopine BPA določene koncentracije smo prenesli v 10 luknjic. Pri vsakem testu smo nastavili tudi 10 kontrol (samo razredčevalna voda) in 10 pozitivnih kontrol (3,7 mg/l 3,4-dikloroanilin). Pri vzorcih smo ike prenašali enako kot pri vodnih bolhah; 10 oplojenih iker smo najprej prenesli v petrijevko z vzorcem, nato pa po eno z 0,2 ml vzorca v luknjico mikroplošče. Končni volumen vzorca v vsaki luknjici je bil tako 1 ml. V primeru raztopin BPA in 3,4-dikloroanilina smo oplojene ike lahko prenašali direktno iz razredčevalne vode, če smo v luknjice v 0,8 ml odpipetirali preračunano 1,25-krat višje koncentracije BPA oz. 3,4-dikloroanilina od želenih končnih koncentracij. Mikroplošče z ikrami smo na koncu prenesli v termostatisiran prostor z akvariji.

Preglednica 5: Smrtni in subletalni učinki na zarodke po času opazovanja

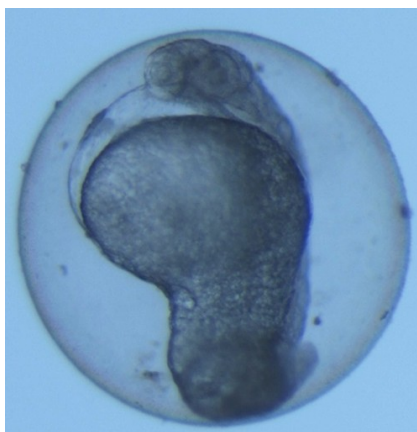
	Smrtni učinki	Subletalni učinki
Po 24 h	koaguliran zarodek rep ni ločen od rumenjaka ni razvitih somitov	ni gibanja ni razvitih oči
Po 48 h	ni srčnega utripa	ni pigmentacije telesa ni pigmenta v očeh
Ostalo	deformacije	



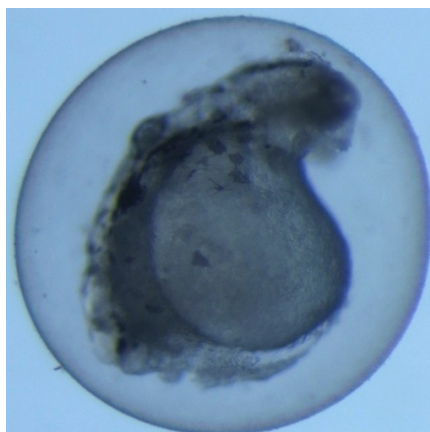
Slika 16: Normalno razvit zarodek, 48 h



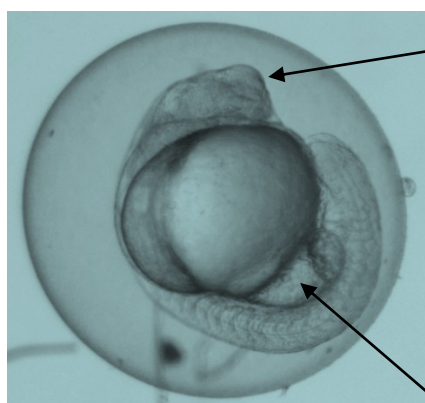
Slika 17: Koaguliran zarodek



Slika 18: Deformiran zarodek, 24 h



Slika 19: Deformiran zarodek, 48 h



Slika 20: Nenormalno razvit zarodek, 24 h

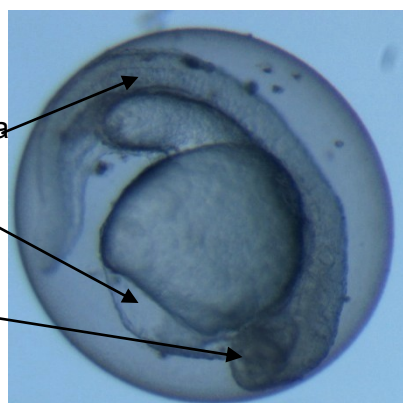
nerazvite oči

ni pigmentacije telesa

ni srčnega utripa

ni pigmentacije oči

rep ni ločen



Slika 21: Nenormalno razvit zarodek, 48 h

Pregled in analiza rezultatov: Zarodke smo pod lupo pregledovali po 24 in 48 urah. Učinki, ki smo jih opazovali, so podani v preglednici 5. Slika 16 prikazuje, kako po 48 h pod lupo zgleda normalno razvit zarodek, slika 17 prikazuje koaguliran zarodek, sliki 18 in 19 pa deformirane zarodke. Na slikah 20 in 21 so označeni nekateri smrtni in subletalni učinki. Po ISO standardu se opazujejo samo nekateri smrtni učinki – koaguliranost, neločen rep in odsotnost srčnega utripa. Z uporabo probit analize izračunamo 48h LC₅₀. Rezultati so veljavni, če v kontroli preživi vsaj 90 % zarodkov,

pozitivna kontrola pa mora dati vsaj 10 % smrtni odziv. Čeprav po standardu niso določeni, smo opazovali še nekatere možne subletalne učinke, ki lahko prav tako podajo pomembno informacijo o strupenosti.

3.3 Določanje estrogenosti

Estrogenost smo določali z uporabo YES testa, povzetega po Routledge in Sumpter (1996). Gensko spremenjene kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so razvili na Oddelku za genetiko, Glaxo (Velika Britanija). Kulturo smo v laboratoriju ohranjali z rednim sterilnim precepljanjem na ustrezno trdno rastno gojišče. 1–3 dni pred izvedbo testa smo jih precepili v tekoči rastni medij, predhodno pa je bilo potrebno pripraviti tudi testno mikrotitrsko ploščo. Pripravili smo tudi vzorce iz reaktorja, in sicer tako, da smo jih koncentrirali v metanolu z uporabo ekstrakcije na trdnem nosilcu (solid phase extraction oz. SPE). Zaradi primerljivosti smo na enak način pripravili tudi standarde in BPA. Ko so bili plošča in vzorci pripravljeni, smo na mikrotitrsko ploščo nanesti sveže precepljeni rastni medij s kvasovkami in CPRG-jem. Ko se je čez približno 3 dni razvila barva, smo rezultate izmerili na spektrofotometru in jih preračunali v aktivnost β -galaktozidaze.

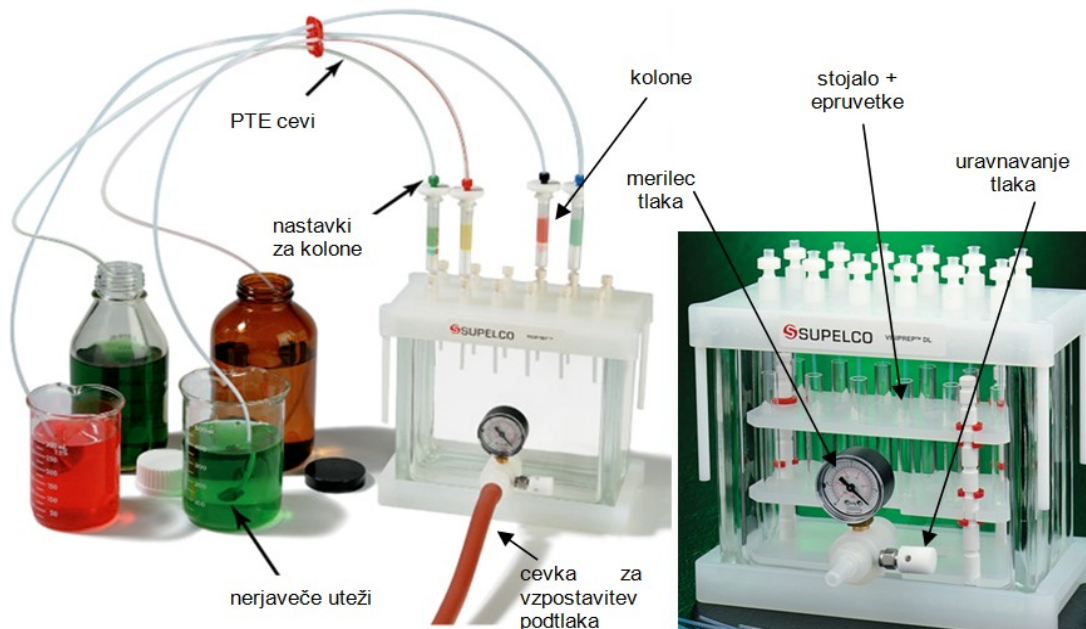
3.3.1 Izvedba SPE

Priprava standardov: Najprej smo pripravili standarde za SPE in BPA s koncentracijami 272 $\mu\text{g/l}$ 17 β -estradiola (E2), 296 $\mu\text{g/l}$ 17 α -etinilestradiola (EE2), 314 $\mu\text{g/l}$ progesterona (P) ter 0,2 mg/l BPA. Tako nizke koncentracije smo dosegli z zatehto 5 mg BPA in raztapljanjem v 1 ml etanola v epici. Z uporabo redčitvene vrste smo na koncu dobili ustrezne koncentracije. Primer za progesteron: 62,8 μl raztopine progesterona s koncentracijo 5 g/l smo prenesli v drugo epico in dopolnili z etanolom do 1 ml, tako da smo dobili koncentracijo 314 mg/l, ki smo jo 3-krat razredčili na 10 %, na koncu smo torej dobili koncentracijo 314 $\mu\text{g/l}$.

Priprava raztopin za SPE: Raztopine smo pripravljali z ultra čisto vodo v 100 oz. v 50 ml bučkah. Koncentracija v 1 ml metanola mora biti po SPE enaka kot v standardu, zato smo preračunali, kakšne volumne standardov se odpipetira v bučke in dopolni z ultra čisto vodo do značke. V primeru 100 ml bučke smo odpipetirali po 100 μl E2, EE2 in P ter 40 μl BPA. V primeru vzorcev smo v bučke prelili po 50 ml raztopine iz reaktorja, za primerjavo pa tudi 50 ml vhodne raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/l.

Izvedba ekstrakcije: Ekstrakcijo smo izvedli na ekstrakcijski napravi SUPELCO VisiprepTM, prikazani na sliki 22, za ekstrakcijo pa smo uporabljali kolone Oasis HLB (6 cc, 500 mg). Privili smo nastavke in označene kolone, ustvarili podtlak in kolone pripravili za ekstrakcijo oz. kondicionirali s 5 ml čistega metanola in 5 ml ultra čiste vode. Tekočini smo počasi po kapljicah spustili čez kolone, najprej metanol, ko je ta odtekel, pa še vodo. Nato smo sneli cevke, zaprli podtlak in mešanico vode in topila odlili v ustrezno posodo za odpad. Kolone smo nato povezali z bučkami in ponovno vzpostavili podtlak. Vzorec je nato počasi potoval do kolone in čez njo; potrebno je bilo poskrbeti, da je tekel počasi po kapljicah. Ko je preteklo vseh 50 ml tekočine, smo kolone zaradi morebitnih nečistoč sprali s 5 ml 5 % metanola. Zaprli smo podtlak in odlili preostalo odpadno tekočino. Sledilo je sušenje na način, da smo čez kolone dali pokrov z vodi za plin, odprli vse potrebne ventile ter tako z dušikom kolone dobro posušili. Nato smo v posodo pod nastavki postavili stojalo z epruvetkami, ustvarili

podtlak in na enak način kot prej skozi kolone spustili 4 ml čistega metanola. Ko je ta odtekel skozi kolone v epruvetke, smo podtlak zaprli, vzpostavili sušenje z dušikom in izparili metanol do oznake na epruveti, ki označuje 1 ml. Vsebinsko epruvetk smo prelili v ustrezno označene vial, ki smo jih do priprave mikrotitrskih plošč hranili v zamrzovalniku. Poleg standardov in vzorcev, vsakega v dveh paralelkah, je bilo zraven vedno potrebno narediti tudi 2 slepa vzorca (samo ultra čista voda).



Slika 22: Naprava za izvedbo SPE (vir:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=57044|SUPELCO&N25=0&QS=ON&F=SPEC; maj 2011)

3.3.2 Izvedba YES testa

Priprava mikrotitrskih plošč: Uporabljali smo TPP plošče s 96 luknjicami premera 6,54 mm in prostornine 0,34 ml. Vsaka plošča ima luknjice v 8 vrsticah (A–H) in 12 stolpcih (1-12). Za standarde smo naredili 2 različni plošči, eno za standarde pred SPE, drugo za po SPE. V po 2 luknjici (A1-A2, A3-A4 ...) smo vnesli po 100 µl standardov E2, EE2, P in BPA pred oz. po SPE, A9 in A10 smo pustili prazne za slepi vzorec, v preostali luknjici A11 in A12 pa smo v primeru plošče s standardi po SPE za kontrolo odpipetirali še po 100 µl standardov E2 in P pred SPE. V preostale luknjice (B1 do H10 oz. H12) smo odpipetirali po 50 µl čistega etanola. Sledila je priprava redčitvene vrste na naslednji način: odpipetiramo 50 µl raztopine standardov iz luknjice A v luknjico B, zamenjamo nastavek, premešamo in odpipetiramo 50 µl razredčene raztopine standardov iz luknjice B v luknjico C. Enak postopek ponavljamo vse do vrstice H za vseh 12 stolpec. Delo si olajšamo z uporabo večkanalne pipete. Po narejenih redčitvenih vrstah smo ploščo pokrili ter jo pretresli na stresalniku. Sledilo je sterilno delo v laminariju, ki smo ga morali vklopiti vsaj 15 minut prej, da se je sterilno okolje lahko vzpostavilo. V laminariju smo odprli in označili novo mikrotitrsko ploščo ter z uporabo večkanalne pipete prenesli po 10 µl iz prejšnje mikrotitrskje plošče v točno enako luknjico (iz A1 v A1, A2 v A2, ...) nove mikrotitrskje plošče. Plošči smo v laminariju pustili odprti, da je etanol izhlapel. Staro mikrotitrsko ploščo smo zavrgli, novo pa prihranili in uporabili za test.

Mikrotitrsko ploščo z vzorci smo pripravili na podoben način, le da pri vzorcih ni bilo potrebno izvesti redčitvene vrste. Preračunan volumen osmih vzorcev iz reaktorja ter vhodne raztopine BPA po SPE smo odpipetirali direktno v luknjice testne mikrotitrsko plošče v vsaj 4 paralelkah. Vedno sledita še 2 stolpca s slepim vzorcem ter stolpca s pozitivno (redčitvena vrsta standarda E2 pred SPE) in negativno kontrolo (redčitvena vrsta standarda P pred SPE). Standarde smo pripravili na ločeni mikrotitrski plošči na enak način kot pri pripravi mikrotitrsko plošče s standardi.

Priprava minimalnega gojišča: V 1 l bučki smo raztopili 13,61 g KH_2PO_4 , 1,98 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,2 g KOH, 0,41g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, aminokisline: 375 mg serina, 150 mg valina, 100 mg glutamina, po 50 mg levcina, histidina in adenina, po 30 mg tirozina, izolevcina in lizina, 25 mg fenilalanina, po 20 mg metionina in arginina. V bučko smo še odpipetirali 1 ml $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ s koncentracijo 0,8 g/l ter dopolnili z ultra čisto vodo do oznake. Da so se aminokisline raztopile, je bilo potrebno vsaj dveurno mešanje na magnetnemu mešalu (600 rpm). Okoli 45 ml pripravljenega rastnega medija smo z merilnim valjem prelili v 200 ml erlenmajerice in avtoklavirali 20 min pri 121°C . Erlenmajerice smo nato hranili v temi pri sobni temperaturi (Routledge in Sumpter, 1996).

Priprava rastnega medija: V minimalni medij smo sterilno ob plamenu odpipetirali 5 ml glukoze raztopine (20 g raztopimo v 100 ml vode), 1,25 ml aspartatne kisline (200 mg raztopimo v 50 ml vode), 0,5 ml vitaminske raztopine (40 mg inositola in po 8 mg tiamina, piridoksina in pantotenske kisline raztopimo v 180 ml vode ter dodamo 20 ml biotinske raztopine – 2 mg raztopimo v 100 ml vode), 0,4 ml treoninske raztopine (1200 mg raztopimo v 50 ml vode) ter 125 μl CuSO_4 (249,7 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 50 ml). Vse raztopine smo pripravljali v ultra čisti vodi. Glukozno, aspartatno, treoninsko in biotinsko raztopino smo avtoklavirali in hranili pri sobni temperaturi, vitaminsko raztopino in raztopino CuSO_4 pa smo zaradi temperaturne nestabilnosti prefiltrirali skozi 0,2 μm filter in hranili v hladilniku. Pred vsako cepitvijo smo iz hranjenih raztopin pripravili svež rastni medij (Routledge in Sumpter, 1996).

Nastavitev testa: Eno veliko kolonijo zraslih kvasovk smo iz trdnega gojišča precepili v rastni medij in gojili na stresalniku ($\sim 140 \text{ rpm}$, 28°C) do optične gostote 1,000 (zmerimo na spektrofotometru pri 620 nm), kar lahko traja 1-3 dni. Za test smo pripravili nov rastni medij, vanj sterilno ob plamenu odpipetirali 2 ml kvasovk iz rastnega medija ustrezne optične gostote ter 200 μl CPRG-ja s koncentracijo 10 mg/ml. Po 200 μl tako pripravljenih kvasovk smo nato v laminariju odpipetirali v vsako luknjico suhe testne mikrotitrsko plošče. Ploščo smo na stresalniku rahlo pretresli in postavili v inkubator (34°C) za 2-3 dni, da se je razvila barva. Nato smo plošče odčitali na mikročitalcu pri valovnih dolžinah 575 nm (sprememba barve CPRG-ja) in 620 nm (rast kvasovk).

Izračun rezultatov: Mikročitalec nam je v računalniški program izpisal podatke v tabeli, ki smo jo lahko skopirali v Excel. Po formuli 11 smo nato izračunali aktivnost β -galaktozidaze. Ker smo pri vsakem standardu in vzorcu imeli 2 ali več paralelk, smo izračunali povprečje ter koncentracijo standardov in BPA v vsaki vrstici. Za primerjavo smo nato na enem grafu z absciso v logaritemski skali narisali odvisnost aktivnosti encima od koncentracije za vsak standard in BPA. Če progesteron reagira bolj kot ozadje, rezultati niso veljavni.

$$\text{Aktivnost } \beta\text{-galaktozidaze} = A(575 \text{ nm})_{\text{vzorca}} - [A(620 \text{ nm})_{\text{vzorca}} - A(620 \text{ nm})_{\text{slepega vzorca}}] \quad (11)$$

$A(575\text{ nm})_{\text{vzorca}}$ – izmerjena absorbanca vzorca pri $\lambda = 575\text{ nm}$
 $A(620\text{ nm})_{\text{vzorca}}$ – izmerjena absorbanca vzorca pri $\lambda = 620\text{ nm}$
 $A(620\text{ nm})_{\text{ozadja}}$ – izmerjena absorbanca slepega vzorca pri $\lambda = 620\text{ nm}$

3.4 Razgradnja bisphenola A

Kot že omenjeno, smo razgradnjo BPA izvedli pod šestimi različnimi pogoji, in sicer pri dveh različnih temperaturah – 200 in 230°C ter pri treh različnih kombinacijah katalizatorjev: brez katalizatorja (samo silicijev karbid SiC kot inertni nosilec), titanov dioksid TiO₂ in pa še rutenij (3,0 ut. %), nanešen na titanov dioksid (Ru/TiO₂). Katalitsko mokro oksidacijo smo izvedli v avtomatiziranem in računalniško vodenem laboratorijskem reaktorju Microactivity-Reference (PID Eng&Tech).

3.4.1 Izvedba mokre oksidacije

V litrskih bučkah smo vsakodnevno pripravljali kumulativno po 2 l sveže raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/l. Pred izvedbo ali ob menjavi katalizatorja smo reaktor očistili tako, da smo čezenj spustili samo ultra čisto vodo. Bučko z ultra čisto vodo (za vzorec ozadja) ali bučko z 20 mg/l BPA smo povezali s črpalko, v računalniškem programu nastavili pogoje, ki jih prikazuje preglednica 6, ter zagnali reaktor. Pretakanje kapljevinske faze skozi sloj katalizatorja je bilo v našem primeru sotočno s plinom od vrha navzdol, katalizator pa je bil statičen (strnjen sloj). Vzorec smo zbirali v čašo, ki smo jo nastavili pod izhodno cev, ter ga prelili v 500 ml steklenico in hranili v hladilniku.

Preglednica 6: Pogoji pri izvedbi mokre oksidacije

Pogoji		
$T_{\text{reakcije}} = T_{\text{peči}}:$	200° C	230° C
$T_{\text{zračne komore}}:$	150° C	150° C
$T_{\text{pregrelnika raztopine}}:$	180° C	200° C
Celotni tlak:	25,5 bar	38,0 bar
Parcialni tlak O ₂ :	10,0 bar	10,0 bar
Pretok O ₂ :	60 ml/min	60 ml/min
Pretok raztopine:	0,5 ml/min	0,5 ml/min
Masa katalizatorja	3,0 g	3,0 g

3.5 Spremljanje razgradnje bisphenola A

3.5.1 HPLC

Na iztoku iz reaktorja smo vsake 1,5 ure prelili nekaj zbranega vzorčka v vialo. Razgradnja je potekala tudi čez noč, vendar v tem času vzorčkov nismo jemali. Ustrezno označene vialo smo dali na ustrezno mesto na avtomatskem vzorčevalniku v HPLC aparaturi, v programu nastavili pogoje analize oz. metodo ter sekvenco analize – vrstni red ter mesto posameznega vzorčka na avtomatskem vzorčevalniku. Pogoji analize so podani v preglednici 7. Po nastavitvi pogojev smo zagnali črpalko in počakali na rezultate, ki se po analizi vsakega vzorčka izpišejo v poročilu, kjer je tudi že podana

površina kromatografskega pika. Površine kromatografskih pikov vzorčkov smo primerjali s površino kromatografskega pika vzorca vhodne raztopine BPA s koncentracijo 20 mg/l in za vseh 6 različnih eksperimentov izrisali graf odstotka razgradnje BPA v odvisnosti od časa trajanja poskusa.

Preglednica 7: Pogoji HPLC analize za spremljanje razgradnje BPA

Pogoji	
Volumen injiciranja:	20 µl
Mobilna faza:	A: metanol (75 %) B: ultra čista voda (25 %)
Elucija:	izokratična
Kolona:	Phenomenex Luna 5u C18 (2) (100 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm)
Temperatura analize:	30° C
Pretok:	1 ml/min
Detektor:	UV-VIS, 210 nm
Čas analize:	12 min

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultate in razpravo bomo podali po enakem vrstnem redu, kot je potekal eksperimentalni del diplome – najprej strupenosti in estrogenosti BPA, nato učinkovitost razgradnje ob uporabi različnih katalizatorjev, strupenost in estrogenost vzorcev z razgrajenim BPA, na koncu pa še primerjavo učinkovitosti katalitske mokre oksidacije pri različnih eksperimentalnih pogojih glede na zmanjšanje strupenosti in estrogenosti.

4.1 Strupenost in estrogenost bisfenola A pred mokro oksidacijo

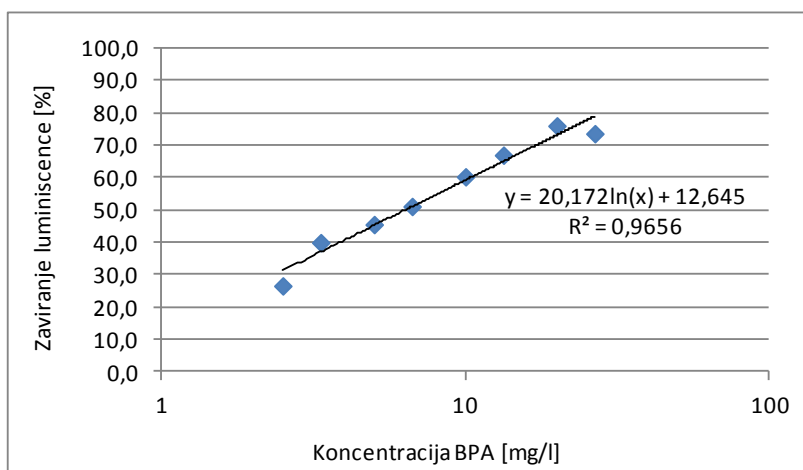
Rezultati strupenosti BPA so podani v preglednici 8. Za BPA najbolj občutljive organizme so se izkazale bakterije (30 min IC_{50} = 6,4 mg/l), sledijo vodne bolhe (24 h EC_{50} = 13,8 mg/l) in zarodki zebrič (48 h LC_{50} = 14,5 mg/l), najmanj strupen pa je BPA za alge (72 h IC_{50} = 19,2 mg/l). Vrednosti za strupenost so morda malo višje v primerjavi z literaturnimi podatki, vendar so bili uporabljeni ali različni organizmi ali različni parametri strupenosti, tako da podatkov ne moremo direktno primerjati.

Preglednica 8: Rezultati strupenosti BPA

Test strupenosti s/z	Strupenost [mg/l BPA]		
<i>Vibrio fischeri</i>	30 min IC_{20} = 1,4	30 min IC_{50} = 6,4	30 min IC_{80} = 28,2
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	72 h IC_{10} = 9,7	72 h IC_{50} = 19,2	72 h IC_{90} = 38,1
<i>Daphnia magna</i>	24 h EC_{10} = 8,7	24 h EC_{50} = 13,8	24 h EC_{90} = 22,2
<i>Dario rerio</i> (zarodki)	48 h LC_{10} = 10,3	48 h LC_{50} = 14,5	48 h LC_{90} = 20,4

BPA deluje estrogeno, vendar je v primerjavi z E2 in EE2 šibkejši hormonski motilec za približno 3 velikostne razrede, kar se lepo ujema s podatki v literaturi.

4.1.1 Strupenost za bakterije *Vibrio fischeri*

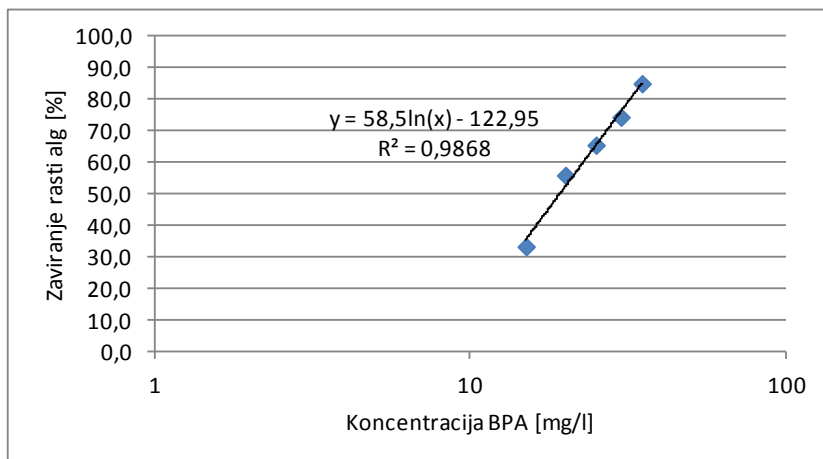


Slika 23: Zaviranje luminiscence v odvisnosti od koncentracije BPA

30 min IC_{50} vrednost za BPA je 6,4 mg/l (slika 23). Zaviranje se je začelo že pri najnižji testni koncentraciji (1,9 mg/l BPA), pri najvišji testni koncentraciji BPA (26,7 mg/l BPA)

pa je bilo zaviranje 73,6 %. Rezultati so veljavni, saj je bilo zaviranje v pozitivni kontroli 52 %, razlika med paralelkami pa ni bila nikoli višja od 3 %.

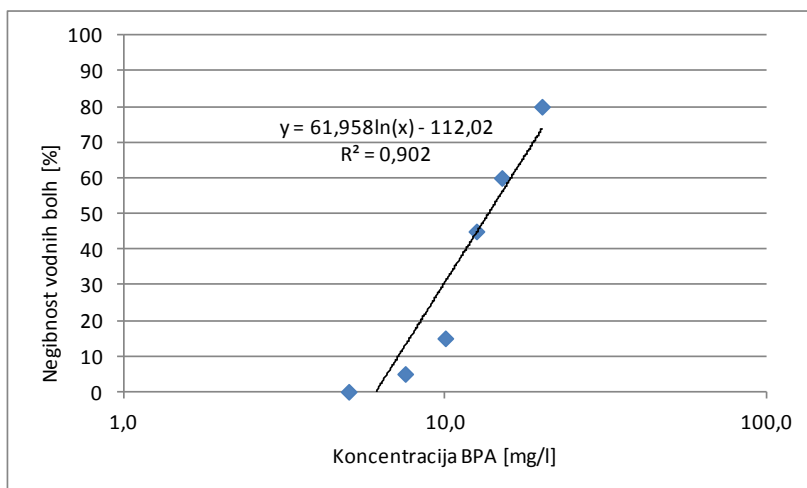
4.1.2 Strupenost za alge *Desmodesmus subspicatus*



Slika 24: Zaviranje rasti alg v odvisnosti od koncentracije BPA

72 h IC_{50} vrednost za BPA je 19,2 mg/l (slika 24). Zaviranje rasti alg se je začelo pri koncentraciji BPA 10 mg/l, najvišjo stopnjo zaviranja (87,7 %) pa smo opazili pri koncentraciji BPA 35 mg/l. pH ni bil problematičen, rezultati pa so veljavni tudi, ker je bila stopnja hitrosti rasti v kontroli večja od 1,4, varianca med paralelkami pa tudi ni presegala 5 %.

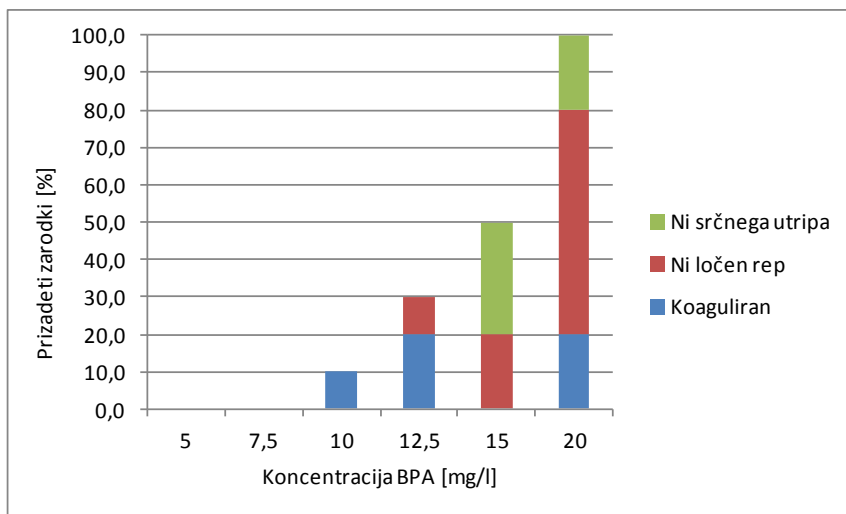
4.1.3 Strupenost za vodne bolhe *Daphnia magna*



Slika 25: Negibnost vodnih bolh v odvisnosti od koncentracije BPA

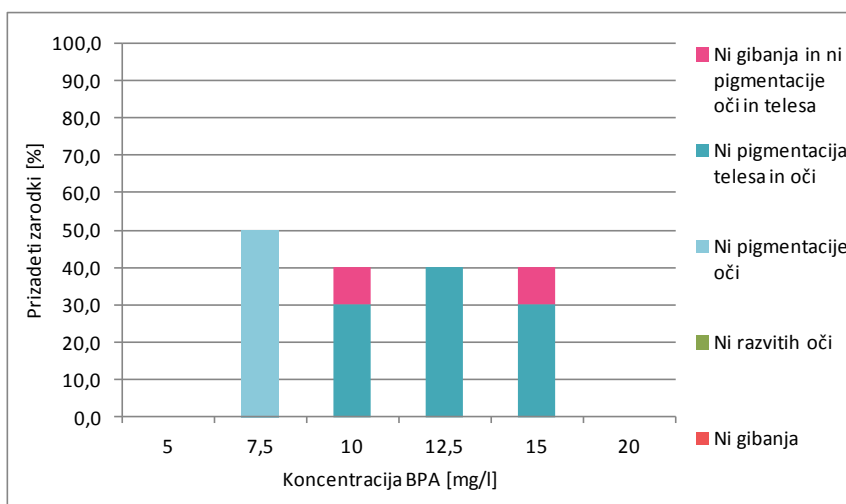
Z uporabo probit analize izračunana 24 h EC_{50} je 13,8 mg/l, spodnja in zgornja meja pri 95 % intervalu zaupanja pa sta 12,5 in 15,7 mg/l. Strupenost se je začela pri koncentraciji BPA 7,5 mg/l, pri koncentraciji 25,0 mg/l pa so bile negibne vse vodne bolhe (slika 25). Rezultati so veljavni, saj v kontroli ni bilo negibnih vodnih bolh, pH in vsebnost kisika pa v primeru raztopine BPA v ultra čisti vodi nista problematična.

4.1.4 Strupenost na zarodke rib zebrič *Danio rerio*



Slika 26: Smrtni učinki v odvisnosti od koncentracije BPA

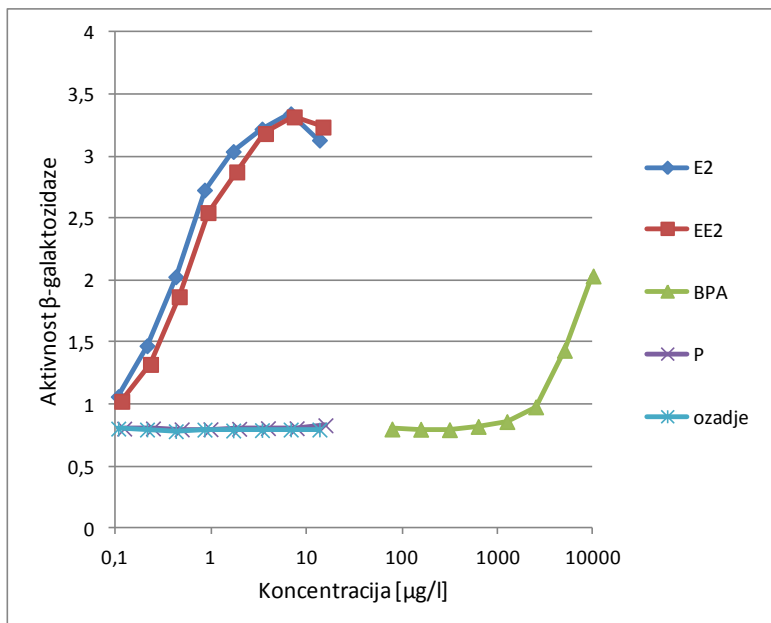
Z uporabo probit analize smo izračunali 48 h LC_{50} , ki je 14,9 mg/l, spodnja in zgornja meja pri 95 % intervalu zaupanja pa sta 13,0 in 16,8 mg/l. Smrtni vplivi na zarodke so se začeli kazati pri koncentraciji BPA 10 mg/l, smrt vseh zarodkov pa je povzročila koncentracija BPA 20 mg/l (slika 26). Rezultati so veljavni, saj pri kontroli ni bilo koaguliranih zarodkov, pri pozitivni kontroli pa je bilo mrtvih 60 % zarodkov, pH in vsebnost kisika pa tako kot pri vodnih bolhah nista bila problematična. Trend, ki ga je mogoče opaziti, je, da s koncentracijo BPA narašča število zarodkov, ki nimajo repa ločenega od rumenjaka. Subletalni učinki so se pojavili pri koncentraciji BPA 7,5 mg/l, opaženi subletalni učinki pri koncentracijah BPA 7,5 do 15 mg/l pa so bili odsotnost gibanja ter odsotnost pigmentacije oči in telesa (slika 27). Nerazvitih oči nismo opazili.



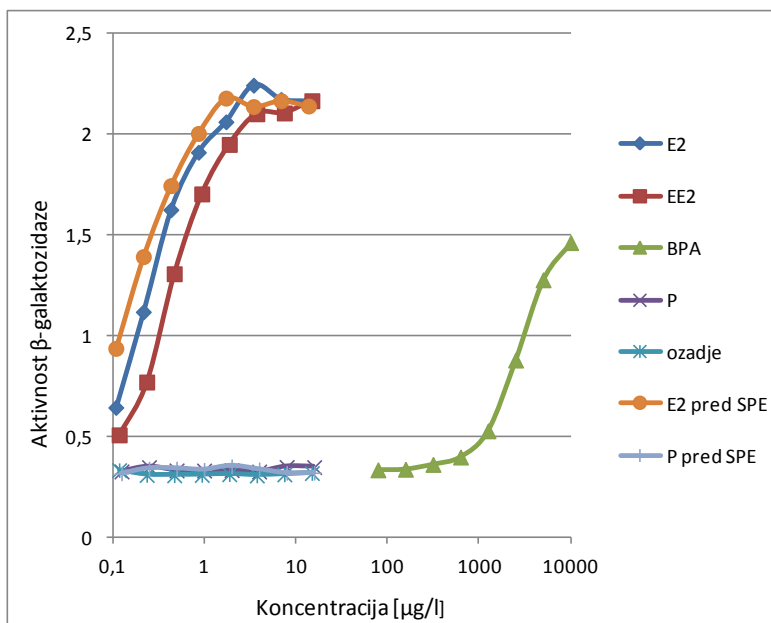
Slika 27: Subletalni učinki v odvisnosti od koncentracije BPA

4.1.5 Estrogenost BPA

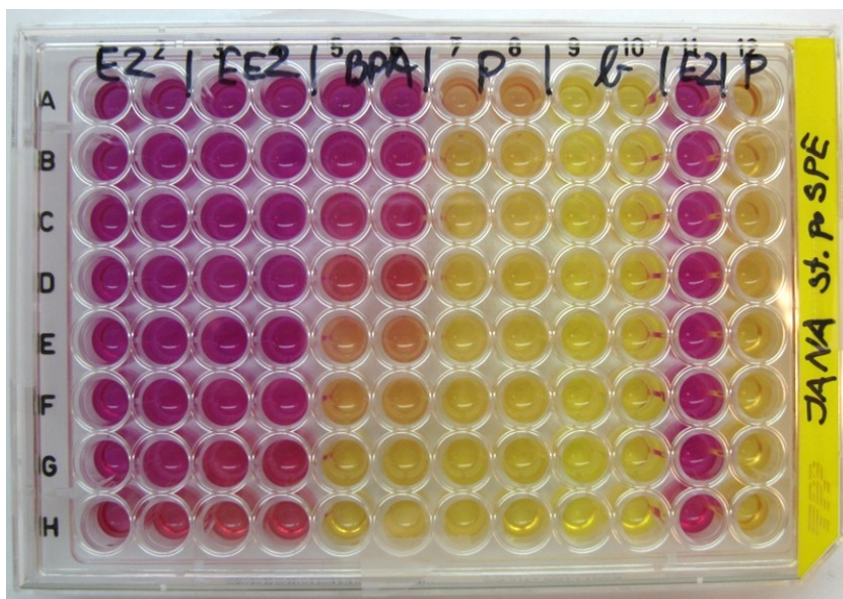
BPA postane estrogeno aktiven pri koncentracijah, ki so približno za 3 velikostne razrede višje od koncentracij za E2 in EE2, kar pomeni, da je šibkejši hormonski motilec. Estrogenost BPA pred in po SPE je zelo podobna, na nekoliko manjšo aktivnost β -galaktozidaze po SPE je vplivala nižja rast kvasovk. Kot kažeta sliki 28 in 29, progesteron ni reagiral podobno kot estrogen, ne prej ne po SPE, tako da so rezultati testa veljavni. Mikrotitrsko ploščo z rezultati pred SPE prikazuje slika 7, po SPE pa slika 30.



Slika 28: Estrogenost BPA v primerjavi s standardi (pred SPE)



Slika 29: Estrogenost BPA v primerjavi s standardi (po SPE)



Slika 30: Plošča z rezultati YES testa po SPE

4.2 Razgradnja bisfenola A

4.2.1 Spremljanje razgradnje s HPLC

Kot že omenjeno, smo mokro oksidacijo izvedli brez katalizatorja (reaktor je bil napolnjen s SiC), s katalizatorjem TiO_2 ter s kombinacijo katalizatorjev Ru/TiO_2 , vedno pri dveh različnih temperaturah – 200 in 230° C. Rezultati spremljanja stopnje razgradnje po času, dobljeni z uporabo HPLC analize, so podani v sledeči preglednici:

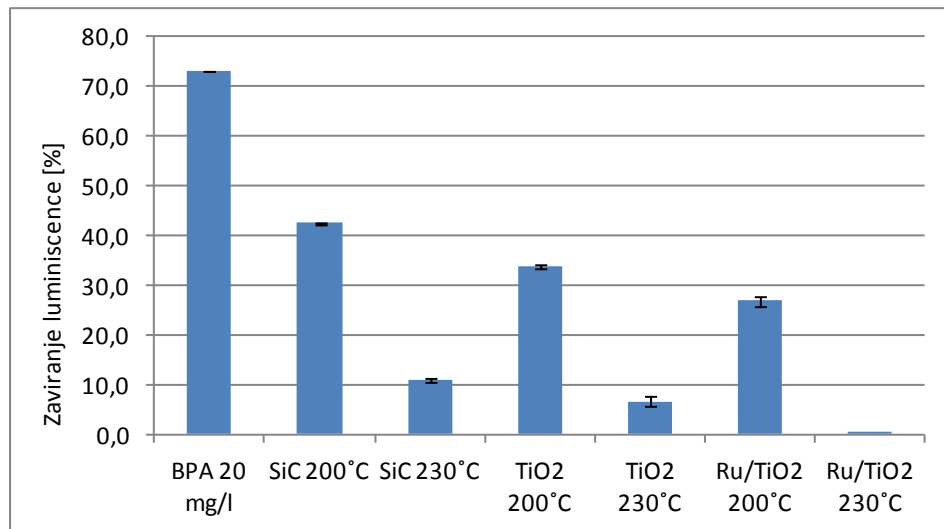
Preglednica 9: Stopnja razgradnje pri različnih pogojih mokre oksidacije

Katalizator	200° C	230° C
brez katalizatorja	39,7 % $\pm$ 0,5 %	58,7 % $\pm$ 0,2 %
TiO_2	87,6 % $\pm$ 0,1 %	96,2 % $\pm$ 0,1 %
$\text{Ru}(3,0 \text{ ut. \%})/\text{TiO}_2$	100,0 % $\pm$ 0,0 %	100,0 % $\pm$ 0,0 %

Brez katalizatorja se je razgradilo povprečno okoli 40 % BPA pri 200° C, pri višji temperaturi (230° C) pa se je razgradilo za 19 % več BPA. Z uporabo katalizatorja TiO_2 se je stopnja razgradnje bistveno izboljšala, vendar se še vedno ni razgradil ves prisoten BPA. Tudi tukaj je bila pri višji temperaturi višja stopnja razgradnje, vendar z nekoliko manjšo razliko – 8,6 %. Z uporabo kombinacije Ru/TiO_2 se je pri obeh temperaturah razgradil ves BPA, torej je od vseh pogojev razgradnje v našem primeru najbolj optimalna uporaba katalizatorjev Ru/TiO_2 pri 200° C (preglednica 9). Morda bi lahko bila temperatura razgradnje še nekoliko nižja, torej še bolj okolju prijazni pogoji mokre oksidacije, saj bi se za proces razgradnje tako porabilo manj energije. Mokra oksidacija je z uporabo pravilne kombinacije katalizatorjev zelo učinkovit način razgradnje BPA, toda le rezultati strupenostnih testov lahko pokažejo, kako je takšen način razgradnje v luči stranskih produktov učinkovit pri zmanjšanju strupenosti.

4.3 Strupenost in estrogenost vzorcev po mokri oksidaciji

4.3.1 Strupenost vzorcev za bakterije *Vibrio fischeri* po mokri oksidaciji



Slika 31: Zaviranje luminiscence pri vzorcih po razgradnji BPA v primerjavi s strupenostjo BPA pred razgradnjo

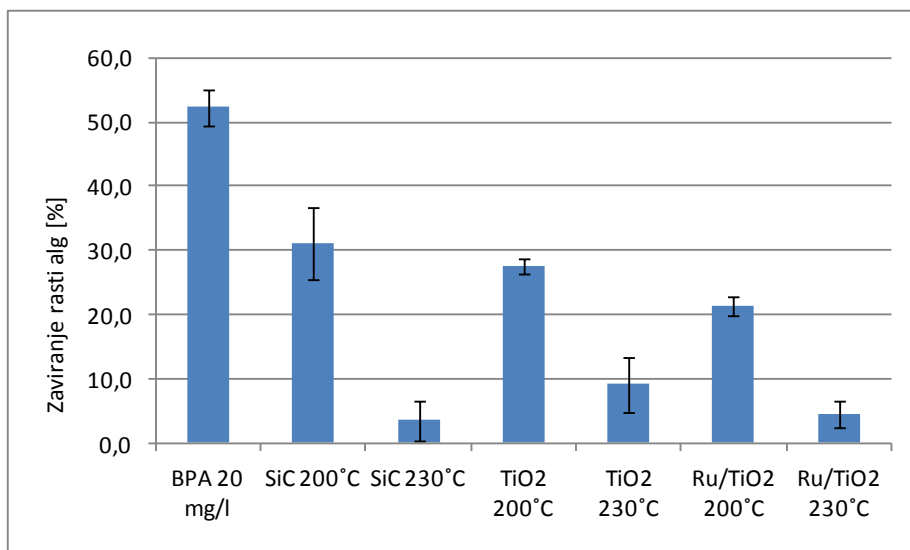
Test strupenosti z bakterijami je pokazal, da je z uporabo termične oksidacije mogoče uspešno odstraniti BPA iz vode, in sicer pri višji temperaturi razgradnje veliko uspešnejše kot pri nižji. Z uporabo katalizatorjev se je strupenost bolj zmanjšala kot brez uporabe katalizatorja (samo nosilec SiC). Z uporabo kombinacije katalizatorjev strupenosti nismo več zaznali (slika 31).

Preverili smo tudi, ali se morda iz reaktorja zaradi visokih temperatur in tlakov v eksperimentih sproščajo snovi, ki so strupene za vodne organizme. Pri obeh eksperimentalnih temperaturah smo spustili čez reaktor samo ultra čisto vodo in tako dobili dva slepa vzorca. Slep vzorec pri 200° C je povzročil 55,9 % zaviranje luminiscence, pri 230° C pa 88,1 % zaviranje. Iz reaktorja so se torej izluževale tudi za bakterije strupene organske snovi. Predpostavili smo, da gre za aditivno strupenost ter strupenost slepih vzorcev odšteli od strupenosti vzorcev.

Nekoliko nizek pH vzorcev smo pred testom uravnali. Rezultati so veljavni, saj je bila inhibicija kontrole med 40 – 60 %, razlike med paralelkama pa tudi niso presegale 3 %.

4.3.2 Strupenost vzorcev za alge *Desmodesmus subspicatus* po mokri oksidaciji

Tudi strupenostni test z algami je pokazal, da je mogoče pri višji temperaturi termične oksidacije uspešnejše odstraniti BPA in učinkovito zmanjšati strupenost za alge. Ugotovili smo, da se je strupenost vzorcev, kjer smo uporabili katalizator, zmanjšala v primerjavi z izhodno raztopino BPA, z izjemo vzorca brez uporabe katalizatorja pri 230° C (slika 32). Slep vzorec, ki smo ga tudi tukaj odšteli od vzorcev, je pri 200° C povzročilo zaviranje rasti alg za 35,7 %, pri 230° C pa skoraj za polovico več, 61,3 %.



Slika 32: Zaviranje rasti alg pri vzorcih po razgradnji v primerjavi s strupenostjo BPA pred razgradnjo

Tudi pri tem testu smo pH predhodno uravnali. Po testu smo ga ponovno izmerili ter ugotovili, da se ni relevantno spremenil. Stopnja rasti v kontroli je bila pri vseh testih večja od 1,4, variance med paralelkami niso presegale 5 %, tako da so rezultati veljavni.

4.3.3 Strupenost vzorcev za vodne bolhe *Daphnia magna* po mokri oksidaciji

Rezultati strupenostnih testov z vodnimi bolhami so pokazali, da je bila po 24 urah pri vseh vzorcih, odvzetih na izpustu iz reaktorja, smrtnost 100 %. Preverili smo tudi strupenost slepih vzorcev in ugotovili, da sta bila oba vzorca zelo strupena za vodne bolhe. Slepri vzorec je pri 200° C povzročil 60 % smrtnost, pri 230° C pa 100 %. V laboratoriju je bila na slepih vzorcih narejena še TOC analiza, ki je pokazala na prisotnost organskih snovi, ki so se najbrž izluževale iz reaktorja, kljub temu, da smo pred testom čez reaktor prečrpali obilo ultra čiste vode in ga tako očistili. Verjeten vzrok strupenosti slepih vzorcev na testirane organizme so bile organske snovi.

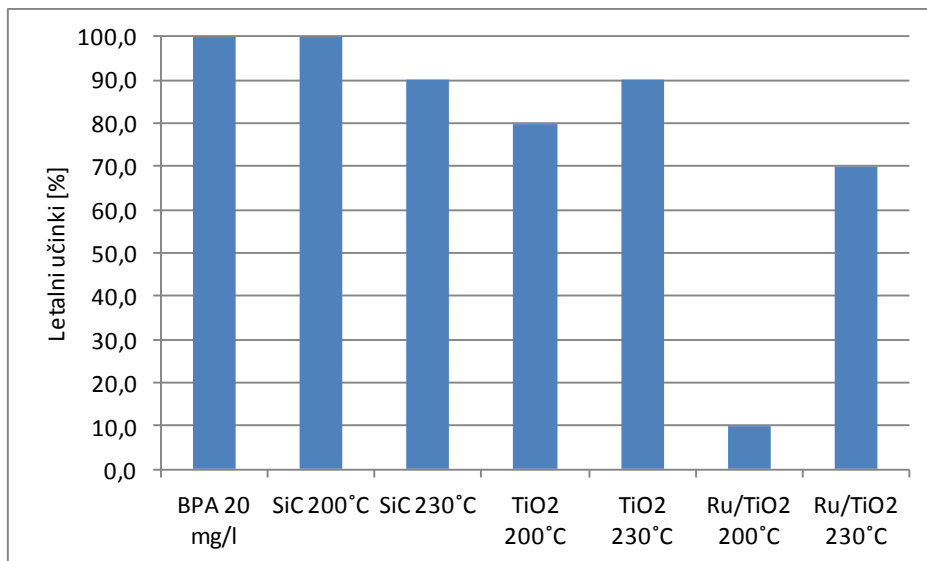
Ker je bila pri vseh vzorcih 100 % smrtnost vodnih bolh in ravno tako visoka strupenost slepih vzorcev, nismo mogli ovrednotiti učinkovitosti mokre oksidacije pri različnih eksperimentalnih pogojih v smislu zmanjšanja strupenosti na vodne bolhe pri odstranjevanju BPA iz vode.

Poudariti je potrebno, da pH in vsebnost kisika pred in po testih nista bila problematična, v kontroli pa ni bilo negibnih vodnih bolh, tako da so rezultati testa veljavni.

4.3.4 Strupenost vzorcev na zarodke rib zebrič *Danio rerio* po mokri oksidaciji

Rezultati strupenostnih testov na zarodke rib zebrič kažejo precej drugačno sliko kot pri bakterijah in algah. Brez uporabe katalizatorja (v sistemu se je nahajal le inertni sloj SiC) ter z uporabo TiO₂ ni občutnega zmanjšanja strupenosti v primerjavi z izhodno raztopino BPA, je pa učinkovitejša uporaba kombinacije katalizatorjev Ru/TiO₂. Za

razliko od rezultatov, dobljenih s pomočjo bakterij in alg, je pri uporabi katalizatorjev zmanjšanje strupenosti BPA uspešnejše pri nižji temperaturi mokre oksidacije; pri uporabi Ru/TiO₂ in 200° C strupenosti v primerjavi z izhodno raztopino BPA skoraj ni več (slika 33). Možna razlaga je, da so pri nižji temperaturi nastali stranski produkti, ki so bili za zarodke zebric bolj strupeni kot za alge in bakterije. Zarodki so obdani z ovojnico, ki je lahko učinkovita blokada za nekatere strupe, medtem ko druge prepušča skozi, tako da je iz tega vidika razlika med rezultati povsem mogoča. Tudi strupenost slepih vzorcev je bila najbrž iz tega razloga precej nižja kot pri ostalih testih: slepi vzorec, dobljen pri 200° C, ni bil strupen, slepi vzorec pri 230° C pa je povzročil le 10 % smrtnih učinkov.



Slika 33: Strupenost za zarodke rib zebric pri vzorcih po razgradnji v primerjavi s strupenostjo BPA pred razgradnjo

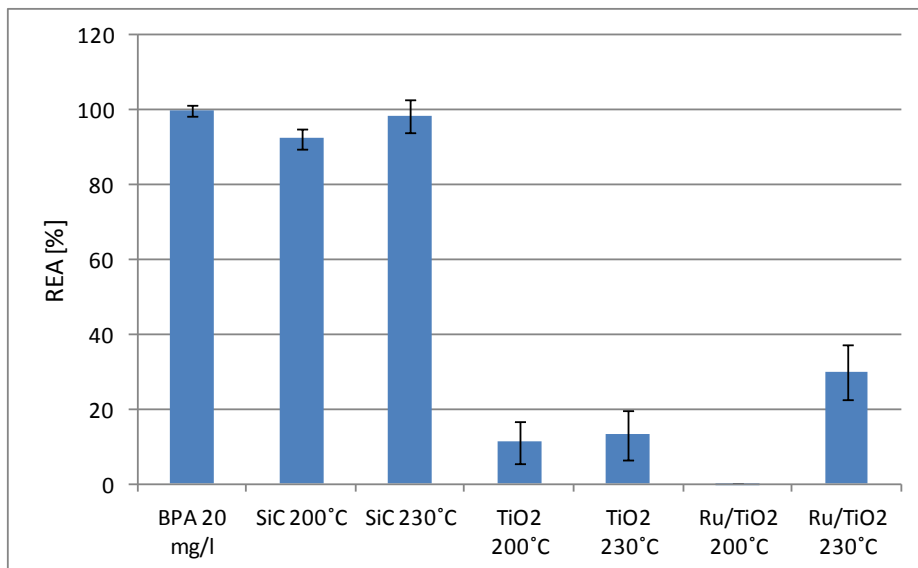
Od smrtnih učinkov prevladuje koagulacija, le pri pogojih TiO₂ in 200° C je bil v 10 % prisoten tudi neločen rep, 20 % zarodkov pa po 48 urah ni imelo srčnega utripa. Zarodki so bili ali koagulirani ali nespremenjeni, subletalne učinke pa smo opazili samo pri katalizatorju TiO₂ in temperaturi 200° C. Pri teh pogojih pri 20 % zarodkih ni bilo opaženega gibanja, pri 10 % ni bilo opaženih razvitih oči, pri 10 % pa ne pigmentacije telesa in oči. Subletalni učinki se pri ugotavljanju učinkovitosti mokre oksidacije niso izkazali kot uporabni biomarkerji.

Tako kot pri vodnih bolhah tudi pri testu z zarodki pH in vsebnost kisika nista bila problematična niti po 3 dneh. V kontroli ni bilo opaženih smrtnih učinkov, pri pozitivni kontroli pa je bilo opaženih več kot 10 % smrtnih učinkov. Rezultati testov z zarodki so torej veljavni.

4.3.5 Estrogenost vzorcev po mokri oksidaciji

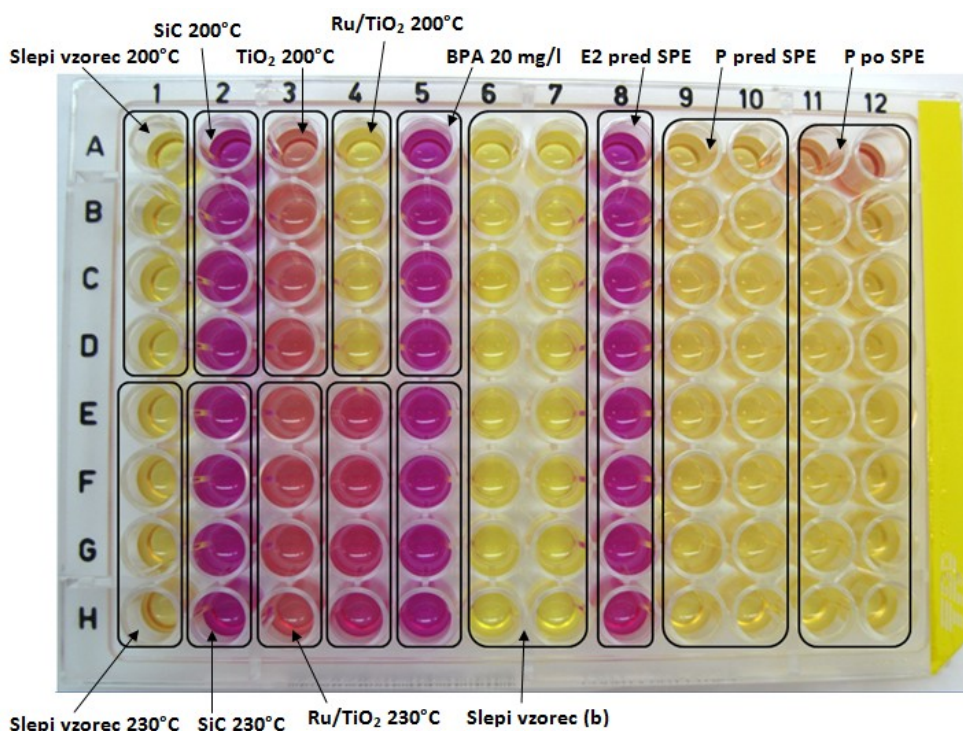
Rezultati YES testa so prikazani kot relativna estrogenost (REA), saj smo estrogenost vzorcev primerjali z estrogenostjo izhodne raztopine (20 mg/l BPA). Rezultati kažejo, da mokra oksidacija brez katalizatorja ni bila najuspešnejša pri odstranjevanju BPA iz vode, saj estrogenost vzorcev ni bila bistveno manjša od estrogenosti BPA pred razgradnjo. Precej uspešna pa je bila uporaba katalizatorjev TiO₂ in Ru/TiO₂. Bistvene razlike v estrogenosti pri temperaturah 200 in 230° C nismo ugotovili v eksperimentih

brez katalizatorja in z uporabo TiO_2 . Največja razlika pa je bila pri uporabi Ru/TiO_2 , kjer estrogenosti pri nižji temperaturi nismo več zaznali, pri višji pa je še ostala (slika 34).

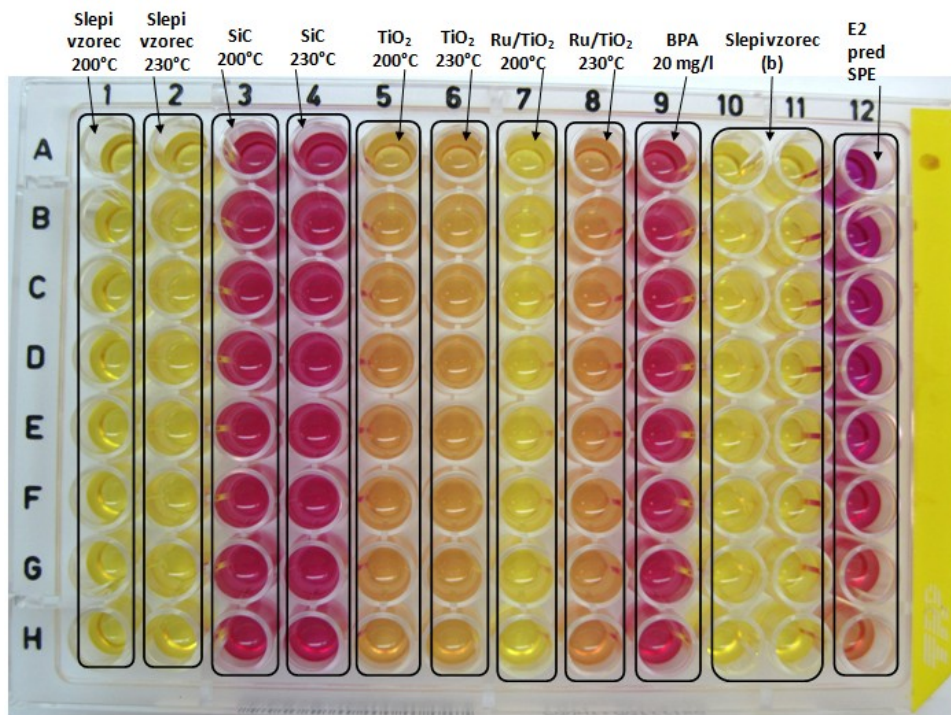


Slika 34: Estrogenost vzorcev v primerjavi z estrogenostjo BPA pred razgradnjo

Rezultati testa so veljavni, saj je E2 reagiral pravilno, progesteron pa ni reagiral podobno kot E2. Rezultati so prikazani na slikah 35 in 36.



Slika 35: 1. plošča za YES test z vzorci po razgradnji BPA



Slika 36: 2. plošča za YES test z vzorci po razgradnji BPA

4.3.6 Primerjava strupenosti in estrogenosti vzorcev po mokri oksidaciji

Preglednica 10: Primerjava stopnje razgradnje ter zmanjšanja strupenosti in estrogenosti glede na izhodno raztopino BPA pri posameznih testih strupenosti

Eksperimentalni pogoji	Stopnja razgradnje (%)	Bakterije: upad strupenosti (%)	Alge: upad strupenosti (%)	Zarodki rib zebrič: upad strupenosti (%)	YES test: upad estrogenosti (%)
SiC 200° C	39,7	41,9	40,4	0,0	0,0
SiC 230° C	58,7	85,2	93,3	10,0	0,0
TiO ₂ 200° C	87,6	53,7	47,2	20,0	87,3
TiO ₂ 230° C	96,2	90,8	82,4	10,0	89,2
Ru/TiO ₂ 200° C	100,0	63,2	58,9	90,0	100,0
Ru/TiO ₂ 230° C	100,0	99,9	91,3	30,0	85,0

Kot kaže preglednica 10, se rezultati med posameznimi testnimi organizmi precej razlikujejo, kar pa ni presenetljivo. Organizmi so na različne strupene snovi različno občutljivi, razliko smo lahko opazili že pri sami strupenosti BPA: razlika med najmanjšo (bakterije) in najvišjo (alge) dobljeno strupenostjo BPA je približno 3-kratna. Ker pa so pri mokri oksidaciji lahko nastali tudi različni stranski produkti, so lahko razlike še večje.

Če primerjamo stopnje razgradnje in zmanjšanje strupenosti, lahko opazimo, da ponekod bolj ali manj sovpadajo, drugod pa ne, sploh pri testu z zarodki rib zebrič in YES testu. Ker gre za zelo različne parametre, ta primerjava ni najbolj relevantna.

Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da je bila mokra oksidacija brez uporabe katalizatorja pri odstranjevanju BPA iz vode manj uspešna od katalitske mokre oksidacije. Uspešnejša je bila tudi uporaba katalizatorja Ru/TiO₂ od uporabe katalizatorja TiO₂. HPLC analiza ter testa strupenosti z algami in bakterijami so pokazali, da je bila odstranitev BPA in strupenosti najboljša pri Ru/TiO₂ in temperaturi 230° C, medtem ko sta test z zarodki rib zebric in YES test pokazala najboljšo odstranitev BPA in zmanjšanje strupenosti ter estrogenosti pri enakih katalitskih, a nižjih temperaturnih pogojih. Kljub temu, da je HPLC analiza pokazala najboljšo razgradnjo BPA pri 230° C in da pri tej temperaturi z uporabo katalizatorjev BPA ni bilo več mogoče zaznati, je lahko v vzorcu vendarle ostalo nekaj delno oksidiranih intermediatov, ki so še vedno povzročali strupenost na zarodke rib zebric in estrogenost.

5 ZAKLJUČKI

V prvem delu diplomske naloge smo določili strupenost BPA na bakterije, alge, rake in ribe ter estrogenost z YES testom, in sicer z namenom primerjave teh podatkov s strupenostjo in estrogenostjo vzorcev po mokri oksidaciji in tako ugotoviti učinkovitost odstranjevanja BPA iz vode. BPA se je izkazal najbolj strupen za bakterije *Vibrio fischeri* (30 min IC_{50} = 6,4 mg/l), malo manj za vodne bolhe *Daphnia magna* (24 h EC_{50} = 13,8 mg/l) in zarodke rib zebrič *Danio rerio* (48 h LC_{50} = 14,5 mg/l), najmanj strupen pa je BPA za alge *Desmodesmus subspicatus* (72 h IC_{50} = 19,2 mg/l). YES test je pokazal estrogeno delovanje BPA, vendar za približno tri velikostne razrede višjih koncentracij v primerjavi z naravnim (E2) in sintetičnim estrogenom (EE2). Rezultati testov strupenosti so pokazali, da je BPA strupen za vodne organizme in deluje kot hormonski motilec z estrogenim delovanjem.

Po izvedenih osnovnih testih strupenosti in estrogenosti je sledila razgradnja BPA s postopkom mokre oksidacije ter njeno spremljanje z uporabo HPLC analize. Najprej je ta potekala brez katalizatorja, pri čemer se je pri 200° C razgradilo 39,7 % BPA, pri 230° C pa 58,7 % BPA. Sledila je mokra oksidacija z uporabo katalizatorja TiO_2 , pri čemer se je pri 200° C razgradilo 87,6 % BPA, pri 230° C pa 96,2 % BPA. Na koncu je bila izvedena še mokra oksidacija s heterogenim katalizatorjem (Ru/TiO_2), pri čemer pa se je pri obeh reakcijskih temperaturah BPA popolnoma razgradil. Zaključek je, da je s stališča stopnje razgradnje mokra oksidacija z uporabo katalizatorjev, bodisi TiO_2 bodisi Ru/TiO_2 , zelo uspešna pri odstranjevanju BPA iz vode, brez katalizatorja pa le deloma. Odstranjevanje BPA je bilo pri višjih temperaturnih in tlačnih pogojih bolj učinkovito kot pri nižjih.

V zadnjem delu diplomskega dela smo izvedli še strupenostne teste z vzorci, obdelanimi v trifaznem reaktorju s procesom katalitske mokre oksidacije. Test strupenosti z bakterijami je pokazal, da je bila mokra oksidacija v primerjavi s strupenostjo BPA v izhodni raztopini zelo uspešna z uporabo katalizatorjev, zlasti pri heterogeni katalizi pri 230° C, razgradnja pri višji temperaturi pa precej uspešnejša od razgradnje pri nižji temperaturi. Podobne rezultate smo dobili v testih strupenosti z algami. Strupenostni test z zarodki je pokazal manjše zmanjšanje strupenosti vzorcev, vendar se je tudi tukaj uporaba katalizatorja Ru/TiO_2 , a pri nižji temperaturi, izkazala za zelo uspešno. Testi strupenosti so torej pokazali, da je mokra oksidacija v prisotnosti heterogenega katalizatorja uspešna pri odstranjevanju BPA iz vode tudi s stališča strupenosti.

Test strupenosti z vodnimi bolhami se je izkazal kot neuporaben pri določanju uspešnosti mokre oksidacije za odstranjevanje BPA iz vode. Izvedli smo strupenostne teste s slepima vzorcema, ki smo jih pripravili tako, da smo skozi reaktor črpali samo ultra čisto vodo pri obeh eksperimentalnih temperaturah. Na ta način smo preverili, ali se morda iz reaktorja zaradi visokih temperatur in tlakov ter hidrotermalnih obratovalnih pogojev v eksperimentih sproščajo snovi, ki so strupene za vodne organizme. Oba slepa vzorca sta bila zelo strupena za vodne bolhe, strupena sta bila tudi za druge testne organizme, še najmanj za zarodke rib zebrič. Rezultati TOC analize, izvedene v laboratoriju, so pokazali na prisotnost organskih snovi, ki so se izluževale iz reaktorja. Zaključimo lahko, da je pri tovrstnih eksperimentih v reaktorju vedno potrebno preveriti tudi morebitno strupenost slepih vzorcev, kadar se preučuje učinkovitost mokre oksidacije z uporabo organizmov.

YES test je pokazal, da je uporaba katalitske mokre oksidacije uspešno odstranila BPA iz vode tudi z vidika estrogenosti, kar pa ne velja za vzorce, kjer katalizatorjev nismo uporabili. Tako kot pri testu z zarodki se je tudi tukaj za najuspešnejši pogoj izkazala uporaba heterogenega katalizatorja pri nižji temperaturi. Opazili smo trend, da je bila mokra oksidacija glede zmanjšanja estrogenosti uspešnejša pri reakcijski temperaturi 200° C.

Hipotezo lahko skoraj povsem potrdimo: mokra oksidacija se je izkazala za primeren postopek za odstranjevanje BPA, saj smo ga iz vode z uporabo heterogenega katalizatorja uspeli popolnoma odstraniti. Pri višji temperaturi se je večinoma razgradilo več BPA kot pri nižji, toda ne povsod, razgradnja z uporabo heterogenega katalitskega postopka pa se je res izkazala za uspešnejšo kot brez uporabe katalizatorja. Povečanja strupenosti na račun bolj strupenih stranskih produktov nismo ugotovili, določili pa smo strupenost in rahlo estrogenost v slepih vzorcih.

Končni zaključek diplomskega dela je, da uporaba heterogene katalitske mokre oksidacije predstavlja zelo uspešno tehnologijo za odstranitev ksenoestrogena BPA iz vode z vidika določitev BPA s HPLC analizo. Tudi strupenostni testi z uporabljenimi organizmi so potrdili uspešnost uporabe mokre katalitske oksidacije, saj se je strupenost vzorcev v večini primerov znižala. Višja reakcijska temperatura je bila večinoma učinkovitejša od nižje, ne pa vedno. Za realno določitev strupenosti in estrogenosti obdelanih vzorcev s katalitsko mokro oksidacijo pa je vedno potrebno preveriti tudi strupenost slepih vzorcev, kajti visoke temperature in tlaki v postopku mokre oksidacije lahko povzročijo izluževanje strupenih snovi iz reaktorja.

6 VIRI

Alexander H.C., Dill D.C., Smith L.W., Guiney P.D., Dorn P. 1988. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 19 – 26

Applications of bisphenol A. 2007. Plastics Europe. <http://www.bisphenol-a-europe.org/uploads/BPA%20applications.pdf>. (26. 4. 2011)

Arensberg P., Hemmingsen V.H., Nyholm N. 1995. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere* 30, 11: 2103 – 2115

Brennan S.J., Brougham C.A., Roche J.J., Fogarty A.M. 2006. Multi – generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 64: 49 – 55

Chang H.S., Choo K.H., Lee B., Choi S.J. 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials*, 172: 1 – 12

Chen P.J., Linden K.G., Hinton D.E., Kashiwada S., Rosenfeldt E.J., Kullman S.W. 2006. Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere*, 65: 1094 – 1102

Chiang K., Lim T.M., Tsen L., Lee C.C., 2004. Photocatalytic degradation and mineralization of bisphenol A by TiO₂ and platinized TiO₂. *Applied Catalysis A: General*, 261: 225 – 237

Cui Y.H., Li X.Y., Chen G. 2009. Electrochemical degradation of bisphenol A on different anodes. *Water Research*, 43: 1968 – 1976

Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta 2000/60/ES z dne 23. oktobra 2000 o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike. UL L 327, 22.12.2000, poglavje 15 zvezek 05 str. 275 - 346

Hoffman L.L., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. 1995. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton, Lewis Publishers: 755 str.

Ike M., Chen M.J., Jin C.S., Fujita M. 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol-A. *Environmental Toxicology* 17, 5: 457 – 461

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. 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

Kang J.H., Kondo F., Katayama Y. 2006a. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology*, 217: 81 – 90

Kang J.H., Kondo F., Katayama Y. 2006b. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226: 79 – 89

Kim K.H., Ihm S.K. 2010. Heterogeneous catalytic wet air oxidation of refractory organic pollutants in industrial wastewater: A review. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1: 16 – 34

Koivisto S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution* 90, 2: 263 - 267

Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L., Feldman D., 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132: 2279–2286

Lee, H.B., Peart, T.E., 2000. Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 83: 290 – 297

Levec J., Pintar A. 2007. Catalytic wet air oxidation: A review. *Catalysis Today*, 124: 172 – 184

Nakanishi J., Miyamoto K., Kawasaki H. 2007. Bisphenol A Risk Assessment Document (AIST Risk Assessment Document Series No. 4) Summary. New Energy and Industrial Technology Development Organization, Research Center for Chemical Risk Management, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 32: 265 - 268

Podobnik A., Devetak D. 2000. 2. izdaja, *Biologija* 4 in 5, Raznolikost živih bitij. Ljubljana, DZS: 273 str.

Rodríguez E.M., Fernández G., Klammerth N., Maldonado M.I. 2010. Efficiency of different solar advanced oxidation processes on the oxidation of bisphenol A in water. *Applied Catalysis B: Environmental*, 95: 228 – 237

Rosenfeldt E.J., Linden K.G. 2004. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes. *Environmental Science & Technology*, 38: 5476 – 5483

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, 3: 241 – 248

Preziosi P. 1998. Endocrine disrupters as environmental signalers: an introduction. *Pure and Applied Chemistry* 70, 9: 1617 – 1631

Shareef A., Angove M.J., Wells J.D., Johnson B.B. 2006. Aqueous solubilities of estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol, and bisphenol-a. *Journal of Chemical & Engeneering data* 51, 3: 879 – 881

Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition. Pacific Grove, Thomson Brooks/Cole: 1039 str.

Staples C.A., Dorn F.B., Klecks G.M., O'Block S.T., Harris L.R. 1998. Review of the environmental fate, effects and exposure of BPA. *Chemosphere* 36, 10: 2149 – 2173

Sumpter J.P. 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33, 1: 9 – 16

Tišler T., Jemec A., Mozetič B., Trebše P. 2009. Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76: 907 – 914

Torres R.A., Sarantakos G., Combet E., Pétrier C., Pulgarin C. 2008. Sequential helio-photo-Fenton and sonification processes for the treatment of bisphenol A. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199: 197 – 203

Updated European Risk Assessment Report. 4'-isopropylidenediphenol (bisphenol a). European Communities, 2010

Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij (REACH), o ustanovitvi Evropske agencije za kemikalije ter spremembi Direktive 1999/45/ES ter razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 793/93 in Uredbe Komisije (ES) št. 1488/94 ter Direktive Sveta 76/769/EGS in direktiv Komisije 91/155/EGS, 93/67/EGS, 93/105/ES in 2000/21/ES. UL L 396, 30. 12. 2006., str. 1 – 849

Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. 2006. *Principles of Ecotoxicology*. 3rd edition. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 315 str.

Zakon o zaščiti živali. Ur.l. RS št. 43-2354/2007