



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Efektuei Bideratutako Analisisa  
ospitaleko efluenteetan disruptore  
endokrino potentzialen  
detekziorako legamia bidezko  
*in-vitro* biosaioaz baliatuz,**

*Naroa Lopez Herguedas,  
Alicia Cano, Belén González Gaya,  
Iker Alvarez Mora, Leire Mijangos,  
Maitane Olibares, Ailette Prieto,  
Nestor Etxebarria eta Olatz Zuloaga*

169-174 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.22>



## Efektuei Bideratutako Analisia ospitaleko efluenteetan disruptore endokrino potentzialen detekziorako legamia bidezko *in-vitro* bioasioaz baliatuz

Lopez-Herguedas, N.<sup>1</sup>, Cano, A., González-Gaya, B.<sup>1,2</sup>, Álvarez-Mora, I.<sup>1,2</sup>, Mijangos, L.<sup>1,2</sup>, Olivares, M.<sup>1,2</sup>, Prieto, A.<sup>1,2</sup>, Etxebarria, N.<sup>1,2</sup> eta Zuloaga, O.<sup>1,2</sup>

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria), 2. Plentziako Itsas Estazioa (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria)  
naroa.lopez@ehu.eus

### Laburpena

Ospitale efluenteak urgaineratutako kutsatzaileen ingurumeneko agerpenaren erantzule nagusietako bat kontsideratzen dira izaten dituzten farmako eta disruptore endokrino kontzentrazio altuak kontuan izanda. Lan honetan, efektuei bideratutako analisi (EDA) estrategia erabiltzen da bizkaiko ospitale bateko efluenteko aktibitate estrogenikoaren erantzuleak izan daitezkeen konposatuak identifikatzeko asmoz, zatikatze teknikak, legamia bidezko *in-vitro* bioasio bat eta susmagarrien analisia konbinatuz. Aktibitatea erakutsi duten frakzioetan detektatu diren estrogenizitatearen hautagaien artean bibliografian disruptore endokrino bezala nabarmendutako zenbait konposatu detektatu dira, hala nola, A bisfenola (1452 ng/L), butilparabenoa (37 ng/L), diurona (3.2 ng/L) eta progesterona (52 ng/L).

Hitz gakoak: disruptore endokrinoak, efektuei bideratutako analisia, ospitale efluentea, kutsatzaile emergenteak

### Abstract

*Hospital effluents contribute to the occurrence of emerging contaminants in the environment due mainly to their high load of pharmaceutical active compounds and some endocrine disrupting compounds (EDCs). In this study, an effect-directed analysis (EDA) approach has been performed in order to identify the compounds potentially responsible of the endocrine disruption activity in a hospital effluent from Biscay combining fractionation techniques, a recombinant yeast (A-YES) *in-vitro* bioassay and suspect screening approach. Among the potential candidates for the estrogenic effects of the bioactive fractions, different compounds with known estrogenic activity were detected, including, bisphenol A (1452 ng/L), butylparaben (37 ng/L), diuron (3.2 ng/L) and progesterone (52 ng/L).*

*Keywords: endocrine disrupting compounds, effect-directed analysis, hospital effluent, emerging contaminants*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Azken mendeotan giza biztanleriaren aktibitatearen gorakadaren eraginez, zenbait produktu kimikoen ekoizpen eta erabilerak sekulako igoera jasan du. Izan ere, produktu kimikoen produkzio globalaren hazkuntza nabaria izan da: 30. hamarkadan urtean 1 milioi tona ekoiztetik 400 milioi tonako zifrak lortzera mende honen hasieran (Bijlsma et al., 2016). Horren eraginez, kutsatzaileak etengabe isurtzen dira ekosistemarentzat edota gizakion osasunerako kaltegarriak suertatu daitezkeelarik.

Azken urteetara arte, zientzialarien kezka lehenetsuak kutsatzaile iraunkorrei bideratuta egon da, eta erakunde desberdinek (Europako Ingurumen Agentziak, EEAK, eta Estatu Batuetako Ingurumenaren Babeserako Agentziak, EPAk, esaterako) euren ezaugarri fisiko-kimikoetan, iraunkortasunean, bioakumulazioan eta eragin ditzaketen arriskuaren oinarrituta konposatu horiek zerrendatu eta legezatu dituzte. Bestetik, zehazki uraren segurtasunari dagokion legedirik garrantzitsuenak Europar Batasuneko Uraren Zuzentzarauak (*Water Framework Directive* delakoa, WFD 2013/39/CE) biltzen ditu. Gaur egun, ordea, urgaineratutako kutsatzaile edo kutsatzaile emergenteak dira ikerketa gehien jomuga. Kutsatzaile talde heterogeneo honetako parte dira gaur egun horrenbeste erabiltzen diren farmakoak eta zaintza pertsonalerako produktuak (*pharmaceuticals and personal care products*, PPCPak), disruptore endokrinoak, pestizidak, erabilera industrialeko desinfektatzaile eta

produktuak eta nanomaterialak, besteak beste. Kutsatzaile emergenteek lehenasunezkoek baino toxikotasun eta iraunkortasun baxuagoa duten arren, euren etengabeko baliatze eta izaera kimiko polarragatik ingurune akuatikoa erraz sakabanatzeak egiten ditu hain erakargarri analisirako. Araututa ez dauden arren, euren ezinbesteko monitorizazioa dela eta, aipatutako ingurumen erakundeek konposatu hauen zerrenda dinamikoak garatu eta argitaratu dituzte, zeinetara aldiro-aldiro kutsatzaileak gehitzen diren.

Sarritan tratatu gabeko ur-isurketetan aurki daitezkeen kutsatzaile hauek hirietako ur-hondakinekin batera araztegiatara iristen dira. Ohiko araztegiatiko tratamenduen bitartez euren erabateko eliminazioa ematen ez denez, ekosistema akuatikora heltzen dira organismo desberdinetan kalte ekotoxikologikoak eraginez (Verlicchi et al., 2010). Ur-araztegiatiko ingurumenara isurtzen den uraren monitorizazioa egitea ohikoa bada ere, ospitaleen efluentek ere arreta berezia behar dute. Herrialde gehienetan gertatzen den bezala, farmako eta garbiketa produktuen kontzentrazio arbuigarria ez duten ospitaletako efluente horiek hirietako ur-hondakin gisa tratatzen dira (Orias et al., 2014), kontuan izan gabe ur horietan aurki daitezkeen kutsatzaile kontzentrazio nabarmen handiagoa izan daitekeela (Verlicchi et al., 2010). Beraz, azpimarratzekoa da ospitale efluente hauetan presente dauden urgaineratutako kutsatzaileen arrisku-ebaluazioaren beharra.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Urgaineratutako kutsatzaileek organismo desberdinetan eragin ditzaketen efektuen artean, sistema endokrinoa erasotzen duten konposatuak (*endocrine disrupting compounds* delakoak, EDCak) nabarmentzen dira. Asko dira EDC bezala sailkatu diren konposatu kimikoak; hala ere, gutxi batzuen aktibitatea soilik ikertu da. Horien artean, Europar Komisioak garatutako zerrendan, alkilfenolak, A bisfenola (BPA) eta ftalato esterrak, zenbait pestizida, estrogeno eta PPCP aurki daitezke (Ros et al., 2016).

Aipatutako konposatu horiek eragin ditzaketen kalte ekotoxikologikoak azaltzeko asmotan ezinbestekoa da kimika eta biologia arloen bateratzea. Bateratze honen adibide dugu azken urteotan garrantzi handia hartu duen estrategia: Efektuei Bideratutako Analisisia (*Effect-Directed Analysis* delakoa, EDA), hain zuzen. EDAk kausa-efektu erlazioen azalpena errazteaz gain, laginaren zatikatzearen bidez matrizearen konplexutasuna murriztea du helburu (Brack et al., 2016). Prozesu iteratibo bat izanik, nahi adina aldiz zatikatzen da lagina, konposatu estrogenikoen isolamendua hobetzeko, eta era horretan, haien identifikazioa errazteko. Bestetik, toxikotasuna eragiten duten kutsatzaileak analisi bideratuarekin bakarrik identifikatzea erronka latza denez, EDAREN estrategian susmagarrien analisisa erabiltzen da ezagunak diren sustantziak biltzen dituen zerrendez baliatuz (Brack et al., 2016).

Laginaren toxikotasuna aztertzeko biosaio andana (*in-vitro* edo *in-vivo*) erabili daitezke, neurtu nahi dugun erantzun biologikoaren arabera egokiena aukeratuz beti ere (Brack et al., 2016). EDAn, orokorrean, *in-vitro* biosaioak erabiltzen dira, espezifikoagoak izateaz gain, errepikakorragoak, denboraz motzagoak eta merkeagoak direlako (Brack et al., 2011). Haatik, *in-vivo* biosaioen kasuan lortutako emaitzak kutsatzaileek organismoetan edota ekosisteman eragin ditzaketen kalteekin alderatuta errealagoak direla ez dago zalantzarik. Disruptore endokrinoen identifikaziorako gehien erabili den biosaioa legamia bidezko estrogenoen screening *in-vitro* biosaioa (*yeast estrogen screening* delakoa, YES) da (Rutishauser et al., 2004). Biosaio hau aktibitate estrogenikoa neurtzeko espezifikoa, azkarra eta erraza izateagatik, hainbat EDA ikerketetan erabili da (Chen et al., 2016; Smital et al., 2011).

Orain arte aipatutakoa kontuan hartuta, lan honen helburua Bizkaiko ospitale batean disruptzio endokrinoaren eragile izan daitezkeen konposatuen identifikazioa da, horretarako EDA estrategiaz baliatuz.

### 3. Ikerketaren muina

#### 3.1. Laginketa eta laginen analisisia

Laginketarako fase solidozko erauzketan oinarritzen den bolumen handitarako lagin-bilgailu automatiko bat erabili da, 45 L lagin hartu eta aurre-kontzentratu direlarik. Aurrekontzentrazio faktore hori *relative enrichment factor* (REF) bezala ezagutzen da.

Laginaren aktibitate toxikologikoa neurtzeko A-YES biosaioa aplikatu da laginaren aurre-kontzentrazio desberdinetan, era honetan, kontzentrazio efektiboak (ECak) aurkitzeko. Lan honetan, *Arxula adenivorans* legamiaren modifikatutako andui bat erabili da. 96 putzuko plakak 48 orduz inkubatzen dira, 30 °C-tan kanpайдun irabiagailu orbital batean, 420 bira minutuko abiaduran. Behin inkubazio-denbora pasata, aktibitate estrogenikoa espektrofotometria bidez determinatzen da absorbantzia uhin-luzera desberdinetan neurtuz. Laginaren aktibitate estrogenikoa neurtzeaz gain, frakzio guztiak biltzen dituen lagin bateratuaren aktibitatea neurtu da kontzentrazio maila berdinetan, zatikatzeak laginaren berezko toxikotasunean eraginik ez duela frogatzeko.

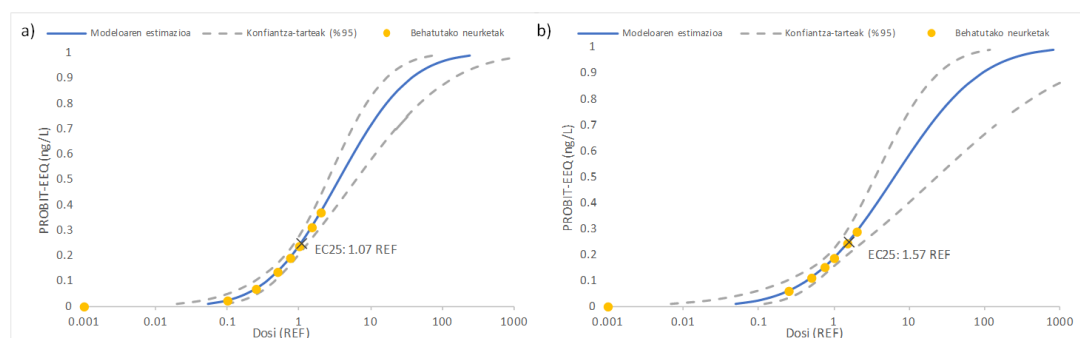
Laginaren aktibitate estrogenikoa frogatuta, laginaren bi zatikatze ortogonal burutu dira konposatuak euren polaritatearen arabera 18 (1. zatikatzean) eta 16 (2. zatikatzean) frakziotan banatuz. EDA estrategiari jarraiki, frakzio bakoitzaren estrogenizitatea neurtu da A-YES biosaioaren bitartez, frakzio ez-aktiboak alde batera utziz. Aktibitate estrogenikoa erakutsi duten frakzioak dira kimikoki analizatu direnak.

Analisi kimikorako, lagina bera zein frakzio desberdinak likido-kromatografia-masa-espektrometriaren bidez analizatu dira. Susmagarrien analisirako, eta baita ondoren konposatuak konfirmatzeko egin den analisi bideraturako, bereizmen altuko tandem masa-espektrometria erabili da, Thermo Scientific etxeko Q Exactive Focus kuadrupolo-Orbitrap masa-espektrometro hibridoari lotutako Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 ultrabereizmeneko likido-kromatografoan.

#### 3.2. Konposatu estrogenikoen identifikazioa

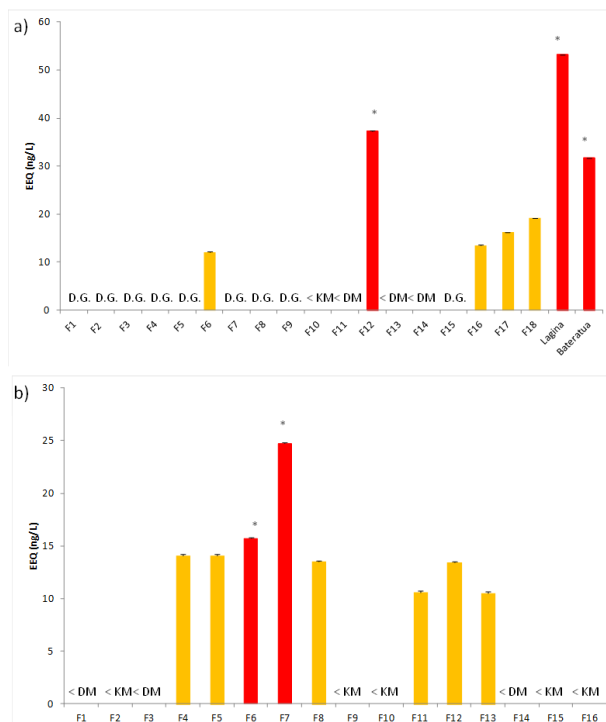
1. irudian ikus daitekeenez, ospitaleko efluenteak aktibitate estrogenikoa erakutsi du aztertutako aurrekontzentrazio maila guztietan. Emaidza horien arabera, kontzentrazio efektiboa %25ean edo 1.07 REF balioan dagoela determinatu da. Hori kontuan izanda, esan daiteke ospitaleko lagina hartzerako orduan jada aktibitate estrogenikoa eragiten zuela EC<sub>25</sub> mailan. Bestetik, lagin bateratuarentzat EC<sub>25</sub> maila 1.57 REF-ean lortu da 1. irudian ikus daitekeen bezala. Bi laginen balioak alderatuta, esan daiteke antzeko balioak direla % 25-eko leiho barruan, eta beraz, laginaren zatikatzean ez dagoela toxikotasun galera esanguratsurik.

- 1. irudia. PROBIT bidez lortutako dosi-erantzun kurba eskala logaritmikoan ospitaleko efluenteko laginarentzat (a) eta lagin bateratuarentzat (b) neurtutako E2 kontzentrazio baliokidean (EEQ, ng/L). Lerro jarraiak kontzentrazio efektibo (EC) balioak irudikatzen ditu, lerro etenek aldiz, konfiantza maila (% 95).**



Lehenengo zatikatzean lortutako frakzioak laginaren EC<sub>25</sub> baliorako kontzentrazioa abiapuntu bezala hartuta aztertu dira, kasu honetan, REF 2-ko kontzentrazioan. Aztertutako frakzio desberdinen aktibitate estrogenikoa 2. irudian ikus daiteke. Frakzio estrogenikoen artean 12. frakzioa gailendu da, lagina eta lagin bateratuaz gain, besteekiko estrogenizitate esanguratsua erakutsiz (p balioa > 0.05, Kruskal-Wallis) (2. irudia, a). Frakzio estrogenikoaren eta bi bizilagunen arteko nahastea berriro zatikatu ondoren lortutako 16 frakzio desberdinen aktibitate estrogenikoa neurtzerakoan aldiz, 6. eta 7. frakzioek erakutsi dituzte aktibitate esanguratsua (p balioa > 0.05, Kruskal-Wallis) (2. Irudia, b).

**2. irudia. Burututako zatikatzeetan lortutako frakzioetan neurtutako E2 baliokide kontzentrazioak (EEQ, ng/L) eta desbideratze estandarrek: lehenengo zatikatzea, REF 2 (a) eta bigarren zatikatzea, REF 5 (b). Izartxodun frakzioak aktibitate estrogeniko esanguratsua aurkeztu dutenak. D.G., detektatu gabea;DM, detekzio-muga; and KM, kuantifikazio-muga.**



Analisi kimikoa, beraz, frakzio estrogenikoetan zein laginean eta lagin bateratuan aurrera eramán da, era horretan, estrogenizitatea eragiten zuten konposatu hautagaiak identifikatzeko.

Susmagarrien analisisian detektatu diren hautagai guztietatik, 33 izan dira identifikazio irizpideak gainditu dituztenak. Gainera, bi frakzionamenduetan aktibitatea erakutsi duten frakzioetan presente egotea ere aintzakotzat hartu da. Schymanski eta lankideek adierazitako identifikazio-mailetan (Schymanski et al., 2014) oinarrituta identifikatutako hautagaiei identifikazio-mailak ezarri zitzaizkien, 1. maila identifikazio maila gorena eta 5. maila baxuena izanik.

Estrogenizitatearen erantzule potentzialak berresteko hautagaien analisi bideratua burutu da, horrela laginean kuantifikatu ahal izateko. Kuantifikatutako kutsatzaileak osotara lau izan dira: BPA plastifikatzaile ezaguna izan da kontzentrazio altuenean detektatutakoa (1452 ng/L), janari aditibo edota kosmetikoetan erabiltzen den butilparabenoa 37 ng/L-ko kontzentrazioan, diuron herbizida 3,2 ng/L-tan eta azkenik, progesterona sexu hormona 52 ng/L-tan. Aipatu beharra dago lau konposatu hauek disruptore endokrino bezala nabarmenduta agertzen direla bibliografian (Hashmi et al., 2020; Liu et al., 2018; Rutishauser et al., 2004; Kamarudin et al., 2020).

#### 4. Ondorioak

Lan honetan efektuei bideratutako analisisa (EDA) burutu da Bizkaiko ospitale baten efluenteko disruptore endokrino potentzialen analisisirako, fase solidozko erauzketan oinarritzen den bolumen handitarako lagin-bilgailu automatiko bat, bi frakzionamendu ortogonal, A-YES biosaioa eta susmagarrien analisisia elkar konbinatuz. Lortutako emaitzekin argi ikusten da EDA estrategia egokia dela aktibitate estrogenikoaren erantzule izan daitezkeen konposatuen detekziorako, izan ere, A-YES biosaioaren bitartez frakzio estrogenikoenak identifikatu dira. Aldi berean, susmagarrien analisiak laginean eta frakzio aktiboetan aurkitzen diren konposatu estrogeniko potentzialak identifikatzea ahalbidetu du, konposatu horien artean BPA, butilparabenoa, diurona eta progesterona aurkitzen direlarik. Bestetik, aipatu beharra dago garatutako EDA protokoloak ingurumenarentzat toxikoak izan daitezkeen konposatu orokorren identifikazioa ahalbidetzen duela hain zehatzak ez diren biosaioen erabileraren bitartez, hala nola, itsas-triku enbrioien edota zebra arrain enbrioien biosaioak erabiliz.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan hau amaitutzat jotzeko laginaren aktibitate estrogenikoaren erantzule nagusiak identifikazio kimiko bitartez konfirmatzea eta hautagai bakoitzaren estrogenizitate osoarekiko ekarpena determinatzea falta da. Bestetik, matrize konplexu hauetan hain ohikoak diren efektu sinergiko eta antagonikoak aztertzea beharrezkoa dela nabarmendu da, horrela toxikotasunaren erantzule guztiak baieztatzeko.

#### 6. Erreferentziak

- Bijlsma, N.; Cohen, M. M. (2016) : Environmental Chemical Assessment in Clinical Practice: Unveiling the Elephant in the Room. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, 13 (2), 181.
- Brack, W.; Ankley, G. T. (2011) : *The Handbook of Environmental Chemistry: Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*. Springer, Heidelberg.
- Brack, W.; Ait-Aissa, S.; Burgess, R. M.; Busch, W.; Creusot, N.; Di Paolo, C.; Escher, B. I.; Mark Hewitt, L.; Hilscherova, K.; Hollender, J.; Hollert, H.; Jonker, W.; Kool, J.; Lamoree, M.; Muschket, M.; Neumann, S.; Rostkowski, P.; Ruttkies, C.; Schollee, J.; Schymanski, E. L.; Schulze, T.; Seiler, T.-B.; Tindall, A. J.; De Aragão Umbuzeiro, G.; Vrana, B.; Krauss, M. (2016) : Effect-Directed Analysis Supporting Monitoring of Aquatic Environments – An in-Depth Overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073-1118.
- Chen, X.-W.; Zhao, J.-L.; Liu, Y.-S.; Hu, L.-X.; Liu, S.-S.; Ying, G.-G. (2016) : Evaluation of Estrogenic Activity in the Pearl River by Using Effect-Directed Analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (21), 21692-21702.
- Hashmi, M. A. K.; Krauss, M.; Escher, B. I.; Teodorovic, I.; Brack, W. (2020) : Effect-Directed Analysis of Progestogens and Glucocorticoids at Trace Concentrations in River Water. *Environ. Toxicol. Chem.* 39 (1), 189-199.
- Kamarudin, N. A.; Zulkifli, S. Z.; Azmai, M. N. A.; Abdul Aziz, F. Z.; Ismail, A. (2020) : Herbicide Diuron as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) through Histopathological Analysis in Gonads of Javanese Medaka (*Oryzias Javanicus*, Bleeker 1854). *Animals*. 10 (3), 525.
- Liu, Y.-Y.; Lin, Y.-S.; Yen, C.-H.; Miaw, C.-L.; Chen, T.-C.; Wu, M.-C.; hsieh, C.-Y. (2018) : Identification, Contribution, and Estrogenic Activity of Potential EDC sin a River Receiving Concentrated Livestock Effluent in Southern Taiwan. *Sci. Total Environ.* 636, 464-476.
- Orias, F.; Perrodin, Y. (2014) : Pharmaceuticals in Hospital Wastewater: Their Ecotoxicity and Contribution to the Environmental Hazard of the Effluent. *Chemosphere*. 115, 31-39.

- Ros, O.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Prieto, A. (2016) : Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Fish Liver, Brain, and Muscle Using Focused Ultrasound Solid-Liquid Extraction and Dispersive Solid Phase Extraction as Clean-up Strategy. *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (21), 5689-5700.
- Rutishauser, B. V.; Pesonen, M.; Escher, B. I.; Ackermann, G. E.; Aerni, H.-R.; Suter, M. J.-F.; Eggen, R. I. L. (2004) : Comparative Analysis of Estrogenic Activity in Sewage Treatment Plant Effluents Involving Three In Vitro Assays and Chemical Analysis of Steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (4), 857-864.
- Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. (2014) : Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48 (4), 2097-2098.
- Smital, T.; Terzic, S.; Zaja, R.; Senta, I.; Pivcevic, B.; Popovic, M.; Mikac, I.; Tollefsen, K. E.; Thomas, K. V.; Ahel, M. (2011) : Assessment of Toxicological Profiles of the Municipal Wastewater Effluents Using Chemical Analysis and Bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (4), 844-851.
- Verlicchi, P.; Galletti, A.; Petrovic, M.; Barceló, D. (2010) : Hospital Effluents as a Source of Emerging Pollutants: An Overview of Micropollutants and Sustainable Treatment Options. *J. Hydrol.* 389 (3-4), 416-428.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzak diruz lagundu du CTM2017-84763-C3-1-R proiektuaren bitartez. Bestalde, N. Lopez-Herguedas eta B. González-Gaya ikerlariak eskerrak eman nahi dizkiete Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministeritzari euren doktoretza aurreko eta ondorengo laguntzengatik, hurrenez hurren.