



## بررسی اثرات سمی دی اتیل هگزیل فتالات با استفاده از روش تست جنین ماهی (FET) در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

نسرین حسن زاده<sup>۱\*</sup>، حسن ملوندی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه محیط‌زیست، دانشکده محیط‌زیست و منابع طبیعی، دانشگاه ملایر

<sup>۲</sup>گروه علوم و مهندسی محیط‌زیست، دانشکده جغرافیا و علوم محیطی، دانشگاه حکیم سبزواری

### نوع مقاله:

### پژوهشی

### تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۶/۰۹/۱۶

اصلاح: ۹۶/۱۱/۱۴

پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۶

### کلمات کلیدی:

تست جنین ماهی  
دی اتیل هگزیل فتالات  
غلظت کشنده  
ماهی گورخری  
LC<sub>50</sub>

### چکیده

دی اتیل هگزیل فتالات (DEHP) یکی از آلاینده‌هایی است که به‌عنوان پلاستی‌سایزر (روان کننده) کاربرد زیادی دارد. تولید، مصرف و پراکندگی وسیع این آلاینده، نگرانی‌های زیادی در مورد تأثیرات سمی این ماده بر موجودات زنده ایجاد کرده است. امروزه روش تست جنین ماهی (FET) در دانش سم‌شناسی به‌عنوان روشی جایگزین با روش‌های متداول به شمار می‌رود. هدف این مطالعه بررسی سمیت DEHP از طریق تأثیرات کشنده و غیر کشنده جنین ماهی گورخری در آزمایش ۵ روزه و با روش FET است. جنین ماهی گورخری (*Danio rerio*) (۳ ساعت پس از باروری) در مواجهه با غلظت‌هایی از DEHP شامل (۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر) به مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفت و سپس نقاط تأثیر کشنده و غیر کشنده و ناهنجاری‌های جنینی در زمان‌های مختلف، بررسی و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار Probit انجام شد. ارزش عددی شاخص‌های LC<sub>50</sub>، NOEC و LOEC برای آلاینده DEHP به ترتیب به مقدار ۴۶/۱۴، ۱۲/۰۸ و ۲۲/۰۶ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. ناهنجاری‌هایی شامل لخته شدن جنین، عدم تشکیل سومیت، جدا نشدن دم از کیسه زرده، نقص در انحنای دم و عدم تشکیل ضربان قلب دیده شد. نتایج نشان داد که DEHP آلاینده‌ای با خاصیت ناهنجاری‌زایی است و کاربرد روش (FET)، روشی جایگزین و کارآمد در پیش‌بینی سمیت آلاینده‌های نوظهور است.

### مقدمه

امروزه با افزایش تولید و مصرف پلاستیک‌ها در سراسر جهان، نگرانی در مورد سمیت این نوع از آلاینده‌ها افزایش یافته است. وجود انواع مختلفی از ترکیبات شیمیایی در ساختار پلاستیک‌ها از جمله عوامل مهم در لزوم بررسی تأثیر سمیت آلاینده‌های پلاستیکی می‌باشد (Derraik, 2002). از جمله مواد پرکاربرد در تولید پلاستیک‌ها، پلاستی‌سایزر<sup>۱</sup> می‌باشد (Parks et al., 2014; Chang et al., 2000). فتالات استرها<sup>۲</sup> (دی استرهای بنزن-۱،۲- دی کربوکسیلیک اسید) به‌طور عمده به‌عنوان پلاستی‌سایزر (روان کننده) برای افزایش انعطاف‌پذیری، کارآیی و شفافیت در ساخت پلیمرهای PVC<sup>۳</sup> و پلی وینیل استات، پلاستیک، صنایع سلولزی، پلی اتیلن استفاده می‌شوند. فتالات‌ها به‌عنوان پلاستی‌سایزر در ساخت انواع محصولات پلاستیکی، بسته‌بندی مواد غذایی، عوامل ویسکوزکننده، پایدارکننده‌ها، چسب و رنگ، آفت‌کش‌ها، مصالح ساختمانی، تجهیزات پزشکی،

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [nasrinhassanzadeh@gmail.com](mailto:nasrinhassanzadeh@gmail.com)

<sup>۱</sup> Plasticizer

<sup>۲</sup> Phthalate Esters

<sup>۳</sup> Polyvinyl chloride

شوینده‌ها، لوازم آرایشی و بهداشتی، اسباب‌بازی، داروها، منسوجات و ... به کار می‌رود و در برخی موارد حدود ۴۰ درصد از وزن نهایی یک محصول پلاستیکی از فتالات تشکیل شده است (Adams *et al.*, 1995; Foster *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2013).

فتالات استرها هیچ نوع پیوند شیمیایی با مواد اولیه تولید پلاستیک ندارند و به دلیل ماهیت منومری این ترکیبات، به راحتی قادرند از یکدیگر جدا شده و در بخش‌های مختلف محیط زیست منتشر شوند. فتالات‌ها به دلیل حجم بالای تولید، استفاده گسترده در محصولات مختلف به خصوص مواد پلاستیکی، رهاسازی، انتقال آسان و پراکنش وسیع در بخش‌های مختلف محیط‌زیست از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Moore, 2000; Kamrin, 2009). اکنون فتالات‌ها موضوع مهمی از نظر امنیت محیط‌زیست جهانی به شمار می‌روند و به همین دلیل ترکیبات مناسبی برای ارزیابی خطرات اکولوژیک<sup>۱</sup> (ERA) در اکوسیستم‌های آبی هستند (Oehlmann *et al.*, 2009; Bhatia *et al.*, 2015). فتالات استرها به دلیل حجم بالای تولید، جدا شدن از مواد پایه و پراکنش آسان و ورود پیوسته، همیشگی و ممتد به اکوسیستم‌های آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Dillingham and Autian, 1973; Guo *et al.*, 2015).

دی اتیل هگزیل فتالات<sup>۲</sup> (DEHP) با فرمول شیمیایی  $C_{24}H_{38}O_4$  حدود ۴۰ درصد از کل تولید جهانی فتالات را به‌تنهایی به خود اختصاص داده است. این ترکیب کاربرد وسیعی در تولید پلیمرها و انعطاف‌پذیری در پلیمرهای PVC دارد و در ساخت مصالح ساختمانی، اسباب‌بازی، کفپوش، لوازم پزشکی به کار می‌رود (Koch, Preuss and Angerer, 2006). به دلیل کاربرد وسیع این ماده در تولید کالاهای مصرفی، پراکنش این آلاینده در بخش‌های مختلف محیط‌زیست بسیار زیاد است (Zeng *et al.*, 2014; Sirivithayapakorn and Thuyviang, 2010; Hassanzadeh *et al.*, 2009).

در گذشته، مطالعات سم‌شناسی بیشتر بر روش‌های آزمایش سمیت حاد (مواجهه کوتاه‌مدت با غلظت زیادی از آلاینده‌ها)، با هدف بررسی مرگ‌ومیر موجود زنده و محاسبه شاخص  $LC_{50}$  تأکید داشته است. اکنون به دلیل غیرقابل تفسیر بودن نقطه تأثیر مرگ و غیراخلاقی بودن در معرض قرارگیری حاد موجود زنده با مواد آلاینده به دلیل ایجاد درد، رنجش و مرگ، روند مطالعات به سمت مطالعات نیمه مزمن، مزمن و بررسی تأثیرات غیر کشنده آلاینده‌های سمی در مراحل خاصی از زندگی موجود زنده تغییر یافته است (Strähle *et al.*, 2012). مطالعات مختلف نشان داده است که اکثر جانداران در مراحل اولیه زندگی<sup>۳</sup> (جنین یا لارو) حساسیت بیشتری نسبت به مواجهه با آلاینده‌ها دارند و این مرحله بهترین زمان برای بررسی سم‌شناسی آلاینده‌های مختلف است (Luckenbach *et al.*, 2001).

امروزه، یکی از روش‌های نوین در مطالعات توکسیکولوژی، روش تست سم‌شناسی با استفاده از جنین ماهی<sup>۴</sup> (FET) است. اساس این روش بررسی سمیت آلاینده‌های مختلف از طریق مواجهه تخم تازه بارور شده ماهی گورخری به‌عنوان یک مدل اکولوژیک با باروری بالا و توانایی تولید تخم زیاد (Scholz *et al.*, 2008; Lammer *et al.*, 2009; Braunbeck *et al.*, 2015) و بررسی تأثیرات کشنده و غیر کشنده آلاینده در مراحل رشد جنین ماهی است. روش (FET) دارای مزایای فراوانی است که از جمله می‌توان مورد تأیید بودن آن توسط سازمان‌های معتبر، سادگی انجام آن، کم‌هزینه بودن، صرف زمان کم، امکان بررسی طیف وسیعی از آلاینده‌ها با حجم کم و همخوانی با قوانین مربوط به حمایت و رفاه حیوانات را نام برد (Nagel, 2002). لذا هدف از این مطالعه، بررسی سمیت دی اتیل هگزیل فتالات به‌عنوان یک آلاینده با پراکنش وسیع در محیط‌زیست، بر جنین ماهی گورخری به‌عنوان یک مدل اکولوژیک کارآمد در مطالعات سم‌شناسی، با استفاده از روش تست سمیت جنین ماهی (FET) است.

## مواد و روش‌ها

<sup>1</sup> Ecological Risk Assessment

<sup>2</sup> Di(2-ethylhexyl)phthalate

<sup>3</sup> Early Life Stage

<sup>4</sup> Fish Embryo Test

## تهیه و نگهداری ماهی گورخری

در این تحقیق حدود ۱۰۰ قطعه ماهی گورخری (۱:۲) نر و ماده، حدود ۳ ماهه با وزن متوسط ۰/۶۴ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان زینتی تهران تهیه شد. این ماهی‌ها در ۴ آکواریوم ۸۰ لیتری با سیستم هوادهی ممتد و فیلترینگ به مدت ۲ هفته به‌منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. آب ذخیره آکواریوم‌ها به‌طور مداوم هوادهی شده و با تعبیه سیستم چرخشی و عبور دائمی آب از یک منبع حاوی آندزیت و زئولیت، سختی آب کاهش یافت. شرایط آب آکواریوم برای نگهداری ماهیان طبق استانداردهای مربوطه تنظیم شد. تنظیم نور به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی اجرا شد. تنظیم درجه حرارت آب آکواریوم از طریق قرار دادن یک بخاری آبی و تنظیم دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ماهی‌ها روزانه ۳ مرتبه با غذای Flake و بیومار به اندازه ۳٪ وزنشان تغذیه شدند و در پایان هر روز غذای اضافی و زائدات کف آکواریوم به روش سیفون از آکواریوم حذف شد (Braunbeck *et al.*, 2015).

## تخم‌گیری از ماهی

به‌منظور تخم‌گیری از ماهی گورخری، روز قبل از تخم‌ریزی و در زمان آغاز تاریکی، نر و ماده بالغ و آماده تخم‌ریزی به نسبت ۲:۱ از آکواریوم اصلی جدا شده و در آکواریوم‌های مخصوص تخم‌ریزی با حجم ۳ لیتر، تعداد ۴ ماهی نر و ۲ ماهی ماده رهاسازی شدند. به‌منظور جلوگیری از خورده شدن تخم‌ها توسط والد، کف آکواریوم با یک پوشش توری کاملاً پوشیده شد. در روز بعد ۳۰ دقیقه پس از طلوع آفتاب تخم‌ها از کف آکواریوم با دقت کافی جداسازی و با محلول نمک رقیق ضدعفونی شدند (OECD, 2012).

## شرایط مواجهه جنین با دی‌ان‌تیل‌هگزیل‌فتالات

این بخش به‌طور کامل بر طبق پروتکل (OECD<sup>۱</sup>, 2012) با جزئیات کامل انجام شد. ابتدا تخم‌ها پس از ضدعفونی شدن به‌سرعت به آزمایشگاه منتقل شده و با استفاده از لوپ، تخم‌های سالم و بارور شده از تخم‌های بارور نشده جدا شدند. برای انجام آزمایش محلول استاندارد DEHP (تهیه شده از شرکت Sigma-aldrich) به دلیل حلالیت کم در آب، توسط حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) در غلظت‌های مختلف تهیه شد. سپس ۶ غلظت مختلف از DEHP تهیه شد. آب مورد استفاده در محلول‌سازی از ۲۴ ساعت قبل از استفاده، هوادهی و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار داده شده بود. دامنه انتخاب غلظت این آلاینده بر اساس مطالعه منابع علمی سم‌شناسی و بر اساس استانداردهای موجود سمیت این ترکیب در سایر موجودات زنده تعیین شد (Mankidy *et al.*, 2013). همچنین قبل از تست اصلی، چندین تست به‌منظور تعیین بهترین دامنه غلظت انجام شد. کمترین غلظت و بیشترین غلظت به‌گونه‌ای تعیین شد که منجر به عدم بروز هر نوع تأثیر و تأثیر ۱۰۰٪ در جنین ماهی گورخری گردد. غلظت‌های انتخاب شده شامل ۰/۵، ۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر بود. برای مواجهه جنین ماهی از میکروپلیت‌های ۲۴<sup>۲</sup> چاهکی استفاده شد. ۶ غلظت با ۳ تکرار در میکروپلیت‌ها آزمایش شد. در هر چاهک ۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد ریخته شد و تعداد ۲۰ عدد تخم بارور شده در هر چاهک قرار داده شد (۶۰ عدد تخم در هر غلظت). همچنین در این روش از ماده ۳ و ۴- دی‌کلرو آنیلین (۴ mg/l) به‌عنوان تیمار کنترل مثبت استفاده شد. تیمار کنترل منفی شامل آب و کنترل حلال شامل غلظت ۰/۱ درصد DMSO نیز در پلیت اضافه شد. بعد از قرار دادن تخم‌های بارور ماهی گورخری (حداکثر ۳ ساعت پس از باروری) در هر پلیت حاوی استاندارد فتالات‌ها، پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

## بررسی فاکتورها و امتیازدهی

<sup>1</sup> Organization for Economic Co-operation and Development

<sup>2</sup> 24- well plates

جنین‌های ماهی گورخری در میکروپلیت پس از قرار گرفتن در انکوباتور، در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از انکوباتور خارج شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری، مرگومیر و هر نوع تأثیرات کشنده، غیر کشنده<sup>۱</sup> و ناهنجاری ثبت و بررسی شد. بررسی نقطه تأثیرات کشنده و غیر کشنده بر طبق پروتکل استاندارد این روش انجام شد (OECD, 2012). به‌منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی و قارچی، در هر بار شمارش و امتیازدهی تخم‌های لخته شده و یا جنین‌های مرده از میکروپلیت خارج شدند. نقطه تأثیرات<sup>۲</sup> کشنده برای تعیین غلظت کشنده ۵۰ درصدی<sup>۳</sup> (LC<sub>50</sub>) در زمان ۹۶ ساعت و نقطه تأثیرات غیر کشنده برای تعیین غلظت تأثیرگذار ۵۰ درصدی<sup>۴</sup> (EC<sub>50</sub>) در زمان ۱۲۰ ساعت استفاده شد. جدول ۱ نقطه تأثیرات کشنده و غیر کشنده در زمان‌های مختلف در جنین ماهی گورخری را نشان می‌دهد. پس از عکس گرفتن از جنین‌ها و ثبت و شمارش مرگومیر و ناهنجاری‌های مختلف، اطلاعات به دست آمده از غلظت‌های مختلف و تعداد ناهنجاری‌ها وارد نرم‌افزار EPA Probit شد و مقادیر عددی LC<sub>1</sub>-LC<sub>99</sub> و EC<sub>1</sub>-EC<sub>99</sub>، حداکثر غلظت بی‌تأثیر<sup>۵</sup> NOAEL و حداقل غلظت تأثیرگذار<sup>۶</sup> LOAEL به دست آمد. عکس‌برداری از جنین‌ها با دوربین Olympus DP72 و با بزرگنمایی 4X انجام شد. حداکثر غلظت مجاز سمیت<sup>۷</sup> (MATC) یک ارزش عددی در سم‌شناسی محیط‌های آبی است که بعد از آزمایش‌های سم‌شناسی آلاینده‌ها محاسبه می‌شود. این شاخص با هدف تنظیم قوانین کیفیت آب برای حفاظت از حیات جانداران آبی برای آلاینده‌های مختلف قابل استفاده است. از نظر عددی این شاخص حد واسط مقدار عددی حداقل غلظت مؤثر LOEC و غلظت بی‌تأثیر NOEC است. محاسبه این شاخص با تعیین مقدار LC<sub>50</sub> 96h و در نظر گرفتن یک فاکتور کاربردی<sup>۸</sup> که برای آلاینده‌های صنعتی این فاکتور ۱/۰ است، لحاظ می‌گردد (Brannen et al., 2010). از دیگر شاخص‌های مهم و قابل محاسبه در آزمایش‌های سم‌شناسی آبی، شاخص تراژوژنی<sup>۹</sup> (TI) است. این شاخص معیاری برای محدوده تأثیرگذاری ناهنجاری‌های تراژوژنی آلاینده‌های صنعتی می‌باشد و از طریق رابطه  $TI = LC_{25} / NOEC$  محاسبه می‌شود. ارزش  $TI > 10$  نشان‌دهنده تأیید خاصیت تراژوژنی آلاینده‌ها می‌باشد.

جدول ۱. نقطه تأثیرات کشنده و غیر کشنده در زمان‌های مختلف در جنین ماهی گورخری در غلظت‌های مختلف

	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	۱۲۰ ساعت
نقطه تأثیرات کشنده	-	-	-	-	-
لخته شدن تخم	•	•	-	-	-
جدا نشدن دم	•	•	-	-	-
عدم تشکیل سومیت	•	•	•	-	-
عدم وجود ضربان قلب	-	•	•	•	-
هیچ نشدن	-	-	•	•	-
نقطه تأثیرات غیر کشنده					
نقص در ستون فقرات	•	•	-	-	-
عدم وجود رنگدانه	-	-	•	•	•
ادم کیسه زرده	•	•	•	•	•
انحنای دم	-	-	•	•	•
- عدم وجود نقطه تأثیر			• وجود نقطه تأثیر		

## نتایج

<sup>1</sup> Lethal & sub-lethal Endpoint

<sup>2</sup> Endpoints

<sup>3</sup> Lethal Concentration

<sup>4</sup> Effect Concentration

<sup>5</sup> No-Observed-Adverse-Effect Level

<sup>6</sup> Low-Observed Adverse-Effect Level

<sup>7</sup> Maximum Acceptable Toxicant Concentration

<sup>8</sup> Application factor

<sup>9</sup> Teratogenic Index

نتایج مواجهه جنین ماهی گورخری با DEHP نشان داد کمترین غلظت DEHP منجر به بروز مرگ‌ومیر در هیچ‌یک از جنین‌ها نشد، اما سایر غلظت‌ها به مرگ‌ومیر جنینی منجر شد. در دوزهای بالاتر از ۳۵ میکروگرم بر لیتر بیشترین تعداد مرگ‌ومیر در ۲۴ ساعت اول مواجهه ثبت و غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر DEHP منجر به مرگ‌ومیر ۱۰۰٪ جنین‌ها در ۲۴ ساعت اول مواجهه شد. بیشترین تأثیرات کشنده ایجاد شده به ترتیب شامل متلاشی شدن تخم، سیاه‌شدگی جنین، عدم تشکیل سومیت، تأخیر در تفریح تخم بعد از ۷۲ ساعت و جدا نشدن دم از بدن بود. جدول ۲ تعداد مرگ‌ومیر جنین در غلظت‌های مختلف DEHP در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد. در جدول ۳ مقادیر DEHP LC<sub>1</sub>-LC<sub>99</sub> بر مرگ‌ومیر جنین ماهی گورخری نشان داده شده است.

نتایج جدول ۳ در قسمت زیر مقادیر غلظت کشنده حداقل ۵۰٪ جمعیت (LC<sub>50</sub>=46.14)، حداقل غلظت مؤثر (LOEC=22.06) و غلظت بی‌تأثیر (NOEC=12.08) را نشان می‌دهد. توجه به مقادیر LC<sub>50</sub> نشان می‌دهد که با افزایش مدت‌زمان مواجهه جنین ماهی گورخری با DEHP، غلظت کمتری از این آلاینده منجر به بروز مرگ‌ومیر در ۵۰٪ جمعیت می‌شود. به‌طورکلی افزایش غلظت آلاینده و افزایش مدت‌زمان مواجهه منجر به مرگ‌ومیر بیشتر در جنین‌ها شد. شکل ۱ نمونه‌هایی از تصاویر جنین ماهی گورخری در مواجهه با DEHP در زمان‌های مختلف را نشان می‌دهد.

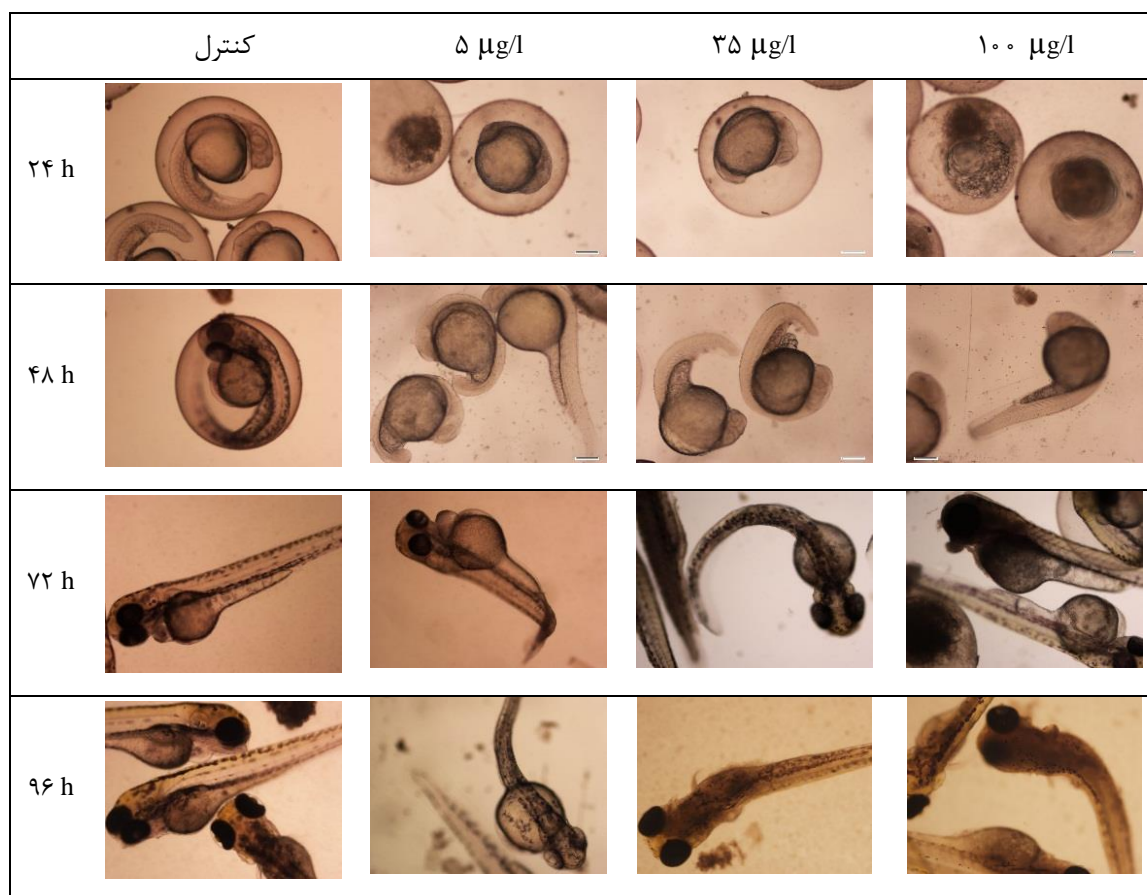
جدول ۲. تعداد مرگ‌ومیر جنین ماهی گورخری در غلظت‌های مختلف DEHP در زمان‌های مختلف

تعداد مرگ‌ومیر					غلظت DEHP (µg/l)
تعداد کل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
۶۰	۰	۰	۰	۰	۰
۶۰	۰	۰	۰	۰	۰/۰۵
۶۰	۰	۳	۷	۱۲	۵
۶۰	۸	۲۳	۲۶	۵۲	۲۰
۶۰	۲۰	۳۲	۴۷	۶۰	۳۵
۶۰	۲۱	۳۹	۶۰	۶۰	۵۰
۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۱۰۰

جدول ۳. مقادیر DEHP LC<sub>1</sub>-LC<sub>99</sub> بر مرگ‌ومیر جنین ماهی گورخری

غلظت دی اتیل هگزیل فتالات (µg/l) با محدوده اطمینان ۹۵٪				غلظت کشنده DEHP
۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت	
۱۲/۰۸	۳/۳۶	۲/۷۱	۲/۰۰	LC <sub>1</sub> میانگین
۲۲/۰۶	۸/۶۹	۶/۱۷	۳/۸۹	LC <sub>10</sub>
۲۸/۴۲	۱۲/۹۷	۸/۷۱	۵/۱۵	LC <sub>20</sub>
۳۴/۱۲	۱۷/۳۲	۱۱/۱۸	۶/۳۰	LC <sub>30</sub>
۳۹/۸۸	۲۲/۱۷	۱۳/۸۳	۷/۴۸	LC <sub>40</sub>
۴۶/۱۴	۲۷/۹۲	۱۶/۸۷	۸/۷۹	LC <sub>50</sub>
۵۳/۳۹	۳۵/۱۷	۲۰/۵۹	۱۰/۳۲	LC <sub>60</sub>
۶۲/۴۱	۴۵/۰۲	۲۵/۴۸	۱۲/۲۶	LC <sub>70</sub>
۷۴/۹۱	۶۰/۱۰	۳۲/۶۹	۱۵/۰۰	LC <sub>80</sub>
۸۶/۵۰	۷۴/۷۲	۴۶/۱۸	۱۹/۸۳	LC <sub>90</sub>
۹۳/۰۵	۸۲/۹۴	۶۱/۵۷	۳۹/۵۳	LC <sub>99</sub>
۶/۲۴	۱۱/۴۸	۸/۶۳	۶/۰۶	خطای استاندارد

همچنین جدول ۴ تأثیرات غیر کشنده این آلاینده در غلظت‌های مختلف را ارائه می‌دهد. تأثیرات غیر کشنده ایجاد شده در جنین ماهی گورخری در مواجهه با ۶ غلظت DEHP به ترتیب شامل پارگی زود هنگام کوریون، ادم در ناحیه کیسه زرده و قلب، انحنای دم، نقص در ستون فقرات، سیاه‌شدگی دم جنین و ... بود. نتایج جدول ۵ مقادیر غلظت غیر کشنده حداقل ۵۰٪ جمعیت ( $EC_{50}=59.07$ )، حداقل غلظت مؤثر ( $LOEC=29.12$ ) و غلظت بی‌تأثیر ( $NOEC=16.36$ ) را نشان می‌دهد.



شکل ۱. نمونه‌هایی از تصاویر جنین ماهی گورخری در مواجهه با DEHP در زمان‌های مختلف

جدول ۴. تأثیرات غیر کشنده DEHP بر جنین ماهی گورخری در غلظت‌های مختلف

غلظت DEHP ( $\mu\text{g/l}$ )	تعداد افراد دارای ناهنجاری‌های غیر کشنده				
	تعداد کل	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
۰	۶۰	۰	۰	۱	۳
۰/۰۵	۶۰	۰	۱	۳	۵
۵	۶۰	۰	۳	۳	۵
۲۰	۶۰	۱	۳	۳	۷
۳۵	۶۰	۸	۱۱	۱۲	۶۰
۵۰	۶۰	۱۱	۱۲	۶۰	۶۰
۱۰۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰

با توجه به داده‌های به دست آمده از این قسمت از تحقیق، شاخص MATC به مقدار ۰/۰۸۷۳ برای DEHP محاسبه شد. همچنین در این مطالعه شاخص TI برای DEHP به مقدار ۱۶ به دست آمد.

جدول ۵. مقادیر DEHP EC<sub>1</sub>-EC<sub>99</sub> بر ناهنجاری‌های جنین ماهی گورخری

غلظت دی اتیل هگزیل فتالات (µg/l) با محدوده اطمینان ۹۵٪	غلظت غیر کشنده DEHP				
	۱۲۰ ساعت	۹۶ ساعت	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
۰/۸۵	۱/۷۵	۲/۰۹	۵/۰۰	۱۶/۳۶	میانگین
۲/۹۸	۴/۸۲	۷/۰۷	۱۵/۵۰	۲۹/۱۲	۱. EC
۵/۰۶	۷/۳۹	۱۱/۷۹	۲۴/۹۴	۳۷/۱۳	۲. EC
۷/۴۲	۱۰/۰۵	۱۷/۰۶	۳۵/۱۶	۴۴/۲۳	۳. EC
۱۰/۲۹	۱۳/۰۷	۲۳/۳۸	۴۲/۱۳	۵۱/۳۶	۴. EC
۱۳/۹۶	۱۶/۷۲	۳۱/۴۰	۴۵/۹۹	۵۹/۰۷	۵. EC
۱۹/۳۱	۲۴/۸۱	۳۸/۳۹	۴۸/۴۸	۶۱/۲۵	۶. EC
۲۱/۱۲	۳۰/۴۷	۴۱/۹۸	۵۳/۶۹	۶۷/۱۴	۷. EC
۲۴/۴۳	۳۴/۰۸	۴۶/۴۷	۶۰/۱۴	۷۳/۰۵	۸. EC
۲۹/۱۴	۳۶/۳۰	۵۱/۴۷	۶۵/۳۱	۸۱/۱۸	۹. EC
۳۶/۰۵	۴۱/۴۹	۶۰/۵۱	۷۱/۱۹	۹۲/۱۶	۹۹ EC
۶/۳۸	۵/۱۲	۷/۹۱	۵/۲۴	۷/۸۱	خطای استاندارد

## بحث

تا کنون مطالعات زیادی اثرات سمی فتالات‌های مختلف را بر موجودات زنده مورد مطالعه قرار داده‌اند (Metcalf *et al.*, 1973; Liu *et al.*, 2009). مرور مطالعات سم‌شناسی حاد فتالات استرها بیشتر بر بی‌مهرگان آبی، جلبک‌ها، دافنی و گاماروس انجام و مطالعه بر ماهی مدل گورخری بسیار محدود و در مورد فقط تعداد اندکی از فتالات‌ها انجام شده است. مطالعه Mayer و همکاران در سال ۱۹۷۳ اولین مطالعه سم‌شناسی حاد دو فتالات استر DBP و DEHP بر دافنی و گاماروس است. این مطالعه سمیت بیشتر<sup>۱</sup> DBP نسبت به DEHP را نشان داد و همچنین عدم بروز هر نوع سمیت حاد توسط DEHP بر دافنی تأیید شد. نتیجه این تحقیق ترکیب DEHP را با سمیت ناچیز بر دافنی، به‌عنوان یک ماده ایمن و غیرقابل تأثیر در محیط آبی معرفی کرد (Mayer and Sanders, 1973; Urien *et al.*, 2015).

مطالعه تأثیر سمیت ۱۸ فتالات استر بر بی‌مهرگان آبی، جلبک و ماهی‌های آب شیرین و دریا نشان داد ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی فتالات استرها تأثیر معنی‌داری بر سمیت آن‌ها دارد (Staples *et al.*, 1997).

بروز سمیت فتالات استرها در مواجهات کوتاه‌مدت به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن‌ها ارتباط دارد. به‌طور کلی فتالات‌های سبک با زنجیره آلکیلی کوتاه‌تر و وزن مولکولی کمتر حلالیت بیشتری در آب دارند و حتی در مقادیری کمتر از مقدار حلالیت در آب نیز منجر به بروز واکنش‌های سمی می‌شوند، به همین دلیل بروز سمیت حاد این ترکیبات زیاد است. از طرف دیگر فتالات‌های با زنجیره آلکیلی بلندتر با تعداد کربن بیشتر، دارای وزن مولکولی بیشتری هستند و به‌طور کلی حلالیت این گروه از فتالات‌ها کمتر از ۱ میلی‌گرم بر لیتر است. این ترکیبات فقط در غلظتی بیشتر از مقدار حلالیت در آب منجر به بروز سمیت می‌شوند (Bradlee and Thomas, 2003; Magdoui *et al.*, 2013). حلالیت کم در آب و قدرت متابولیزه شدن سریع فتالات‌های سنگین سمیت حاد کمی از این ترکیبات را در مواجهات کوتاه‌مدت ایجاد می‌کند، ولی در مواجهات بلندمدت (نیمه مزمن و مزمن) به دلیل تولید متابولیت‌های زیست فعال در مراحل مختلف، سمیت بیشتری را ایجاد می‌کند. مطالب فوق را می‌توان دلیلی بر سمیت DEHP کمتر نسبت به سایر فتالات استرها در تست سمیت جنینی عنوان کرد. علاوه بر این مطالعات تأثیر آلاینده‌های مختلف، به‌جز فتالات‌ها، بر جنین ماهی گورخری نشان می‌دهد که پرده کوریون اطراف جنین قبل از تفریح، از عبور مواد با وزن مولکولی بالا به داخل جنین جلوگیری می‌کند که این خود عاملی برای تأثیرگذاری کمتر

<sup>1</sup> Di-buthyl Phthalate

آلاینده‌ها است (Kais *et al.*, 2013). البته در این مطالعه استفاده از دی متیل سولفوکسید به‌عنوان یک حامل کمک زیادی در افزایش حلالیت در آب DEHP و تسهیل عبور از پرده کوریون کرد.

شناخت دقیق و جزئی مکانیسم تأثیر فتالات استرها نیاز به بررسی متابولیت‌های زیست‌فعال آن‌ها دارد. فتالات استرها پس از ورود به بدن در فاز اول انتقال زیستی در کبد به منواستر تبدیل می‌شوند و بعد از این مرحله نیز برخی از فتالات استرها با توجه به ماهیت ساختاری، در فاز ۲ انتقال زیستی با اسید گلوکرونیک<sup>۱</sup> کبد واکنش داده و محصولات نهایی با حلالیت بیشتر در آب، نسبت به مواد مادری تولید می‌کنند که این متابولیت‌ها، عامل اصلی سمیت فتالات استرها می‌باشند (Bang, Lee and Lee, 2011). مواجهه با فتالات استرها در دوزهای کم به دلیل متابولیسه شدن و دفع سریع از بدن منجر به بروز عوارض قابل مشاهده‌ای در جانوران نمی‌شود. این در حالی است که مواجهات مزمن و متوالی با این ترکیبات در دوره‌های زمانی طولانی با غلظت‌های بیشتر، عوارض زیادی از جمله آسیب تولیدمثلی را ایجاد خواهد کرد (Mahood *et al.*, 2007). فتالات DEHP پس از ورود به بدن در چندین مرحله انتقال زیستی به متابولیت‌های مختلفی تبدیل می‌شود که مهم‌ترین این متابولیت‌ها، MEHP می‌باشد و تأثیر سمیت این متابولیت بر تولیدمثل موجودات مختلف به‌عنوان یک ترکیب آنتی اندروژن بررسی شده است (Treinen, Dodson and Heindel, 1990).

متابولیت‌ها از نظر زیستی متعلق به گروهی از مواد شیمیایی هستند که به آن‌ها تکثیرکننده پروکسیزوم (PP)<sup>۲</sup> گفته می‌شود. این متابولیت‌ها، منجر به فعال شدن گیرنده‌های تکثیرکننده پروکسیزومی (PPARs)<sup>۳</sup> در بافت زنده می‌گردند. PPARs گروهی از پروتئین‌ها هستند که نقش مهمی در کنترل هومئوستازی، برنامه تمایز سلولی، تنظیم بیان ژن، توسعه و متابولیسم چربی، کربوهیدرات و هورمون دارند و خود شامل ۳ نوع ایزوفرم  $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\gamma$  هستند. توزیع ایزوفرم‌های مختلف در بافت‌ها و سلول‌های مختلف، متفاوت است (Lovekamp-Swan, Jetten and Davis, 2003). مطالعات گسترده نشان می‌دهد که مکانیسم سمیت متابولیت‌های فتالات استر نیز از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنال PPARs است. به این ترتیب که آلاینده‌های EDCs از طریق تأثیر بر گیرنده‌های هسته و فعال کردن PPARs منجر به تغییر فعالیت بسیاری از گیرنده‌های سلولی می‌شوند که این گیرنده‌ها، نقش مهمی در فرآیندهای حیاتی زیستی و پاتولوژیک مثل استروئیدوزن، هپاتوکارسینوژنز و ... دارند (Andrade *et al.*, 2006).

بررسی تأثیر سم‌شناسی DEHP بر جنین ماهی گورخری تاکنون مشاهده نشده است، به همین دلیل مبنایی برای مقایسه این تحقیق با مطالعات مشابه وجود نداشت؛ اما مطالعات پراکنده‌ای در مورد سم‌شناسی تأثیر DBP بر ماهی گورخری انجام شده است که البته هیچ‌یک از این مطالعات در غالب استفاده از روش FET نبوده است و مربوط به مواجهه این گونه با DBP از آغاز جنینی تا مرحله‌ای از بلوغ بوده است. تأثیر مواجهه جنین ماهی گورخری از زمان ۴ ساعت پس از باروری با DBP به مدت ۳ هفته، علاوه بر ایجاد پروکسیزوم کبد، به هایپرتروفی در کیسه زرده جنین و دفرمه شدن ستون فقرات جنین تا قبل از ۵ روز منجر شده است (Ortiz-Zarragoitia and Cajavaville, 2005). همچنین مطالعه بررسی تأثیرات ناهنجاری‌زایی DBP بر جنین ماهی گورخری نشان داد که این آلاینده با تأثیر بر بیان ژنوم مؤثر بر محور پشتی- شکمی<sup>۴</sup> از جمله مسیر سیگنال *Wnt $\beta$ -catenin* منجر به بروز نقص در تشکیل ستون مهره‌ها و بدشکلی در جنین می‌شود (Fairbairn, Bonthius and Cherr, 2012).

در مطالعه حاضر نیز بدشکلی و دفرمه شدن ستون مهره‌ها در تیمار DEHP دیده شد.

تأثیر سمیت DBP در مواجهه جنین از ۷۲ ساعت پس از باروری و به مدت ۲۱ روز بر ماهی گورخری نیز نشان داد که این آلاینده با خاصیت استرس اکسیداتیو، با تولید گونه اکسیژن فعال<sup>۵</sup> (ROS) منجر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی اکسیدان می‌شود (Xu and Li, 2008). سمیت ایمنی مواجهه مزمن جنین ماهی گورخری تا مرحله بلوغ با DBP نیز نشان داد که این ترکیب به‌عنوان یک بازدارنده تشکیل نوتروفیل و ماکروفاژ، نقش مهمی در کاهش کارکرد سیستم ایمنی ماهی گورخری دارد. تولید رادیکال اکسیژن فعال و تأثیر بر سیستم ایمنی در مراحل جنینی خود منجر به بروز تأثیرات زیادی

<sup>1</sup> Glucuronic Acid

<sup>2</sup> Peroxisome Proliferators (PP)

<sup>3</sup> Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs)

<sup>4</sup> Dorsal-Ventral axis

<sup>5</sup> Reactive Oxygen Specie

می‌شود. هر تغییر در جنین در مراحل اولیه رشد منجر به شکل‌گیری تغییرات بزرگ‌تری در سلول، گیرنده‌های سلولی، بافت و اندام‌های مختلف می‌شود که این تغییرات به شکل نقاط‌تاثیر کشنده، غیر کشنده و یا ناهنجاری در جنین ظاهر می‌شود (Scholz *et al.*, 2008).

همان‌طور که نتایج نشان داد، ارزش عددی  $LC_{50}$  96h برای سمیت کشنده و شاخص  $EC_{50}$  96h برای سمیت غیرکشنده جنین ماهی گورخری در مواجهه با DEHP به مقدار ۸/۷۹ و ۱۶/۷۲ به ترتیب به دست آمد. همچنین مقادیر حداکثر غلظت بدون تأثیر (NOEC) و حداقل غلظت با کمترین تأثیر (LOEC) نیز نتایج فوق را تأیید کرد.

حداکثر غلظت مجاز سمیت<sup>۱</sup> (MATC) یک ارزش عددی در سم‌شناسی محیط‌های آبی است که بعد از آزمایش‌های سم‌شناسی آلاینده‌ها محاسبه می‌شود (Brannen *et al.*, 2010). شاخص‌های MATC و TI محاسبه شده در مطالعه حاضر سمیت DEHP را در اکوسیستم‌های آبی و از نظر شاخص تراژونی نشان داد. به دلیل عدم بررسی سم‌شناسی این دو ترکیب با روش اختصاصی FET، دو شاخص MATC و TI محاسبه شده در مطالعه حاضر، برای اولین بار با استفاده از روش FET به دست آمده است و می‌تواند کاربرد زیادی در ارزیابی خطرات اکولوژیکی اکوسیستم‌های آبی که مقادیر DEHP در آب و رسوب آن‌ها مشخص شده است، داشته باشد. در ایران تنها مطالعه انجام شده در مورد آلودگی فتالات استرها در محیط آبی، مطالعه آلودگی آب و رسوبات تالاب انزلی به DEHP و DBP بوده است (Hassanzadeh *et al.*, 2014).

به علت حساسیت زیاد جنین ماهی گورخری و بروز هر نوع تأثیر کمی از آلاینده‌ها به‌صورت تغییرات ظاهری، استفاده از این روش برای بررسی آلاینده‌های مختلفی که تا کنون مطالعات سم‌شناسی آن‌ها به‌طور کامل انجام نشده است، ضروری است. لذا نتایج حاصل می‌تواند در ارزیابی خطرات اکولوژیکی این گروه از آلاینده‌ها که در ایران هنوز مطالعات زیادی بر آن‌ها صورت نگرفته است، کاربردی باشد.

## منابع

- Adams, W.J., Biddinger, G.R., Robillard, K.A., Gorsuch, J.W. 1995. A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14(9): 1569-1574.
- Andrade, A.J., Grande, S.W., Talsness, C.E., Gericke, C., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A., Chahoud, I. 2006. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology*. 228(1): 85-97.
- Bang, D.Y., Lee, I.K., Lee, B.M. 2011. 'Toxicological characterization of phthalic acid', *Toxicological Research*. 27(4): 191-203.
- Bhatia, H., Kumar, A., Chapman, J.C., McLaughlin, M.J. 2015. Long-term exposures to di-n-butyl phthalate inhibit body growth and impair gonad development in juvenile Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Journal of Applied Toxicology*. 35(7): 806-816.
- Bradlee, C.A., Thomas, P. 2003. Aquatic toxicity of phthalate esters. In *Series Anthropogenic Compounds* (pp. 263-298). Springer. Berlin, Heidelberg.
- Brannen, K.C., Panzica-Kelly, J.M., Danberry, T.L., Augustine-Rauch, K.A. 2010. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 89(1): 66-77.
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., Strecker, R. 2015. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(21): 16247-16261.
- Chang, J.W., Yan, B.R., Chang, M.H., Tseng, S.H., Kao, Y.M., Chen, J.C., Lee, C.C. 2014. Cumulative risk assessment for plasticizer-contaminated food using the hazard index approach. *Environmental Pollution*. 189: 77-84.
- Derraik, J.G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 44(9): 842-852.

<sup>1</sup> Maximum Acceptable Toxicant Concentration

- Dillingham, E.O., Autian, J. 1973. Teratogenicity, mutagenicity, and cellular toxicity of phthalate esters. *Environmental Health Perspectives*. 3: 81-89.
- Fairbairn, E.A., Bonthuis, J., Cherr, G.N. 2012. Polycyclic aromatic hydrocarbons and dibutyl phthalate disrupt dorsal-ventral axis determination via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*. 124: 188-196.
- Foster, P.M.D., Mylchreest, E., Gaido, K.W., Sar, M. 2001. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Apmis*. 109(S103): S272-S277.
- Guo, Y., Yang, Y., Gao, Y., Wang, X., Zhou, B. 2015. The impact of long term exposure to phthalic acid esters on reproduction in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Pollution*. 203: 130-136.
- Hassanzadeh, N., Sari, A.E., Khodabandeh, S., Bahramifar, N. 2014. Occurrence and distribution of two phthalate esters in the sediments of the Anzali wetlands on the coast of the Caspian Sea (Iran). *Marine Pollution Bulletin*. 89(1-2): 128-135.
- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T. 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic Toxicology*. 140: 229-238.
- Kamrin, M.A. 2009. Phthalate risks, phthalate regulation, and public health: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 12(2): 157-174.
- Koch, H.M., Preuss, R., Angerer, J.D. 2006. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure—an update and latest results. *International Journal of Andrology*. 29(1): 155-165.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 149(2): 196-209.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W., Zhang, X. 2009. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology*. 18(3): 293-303.
- Lovekamp-Swan, T., Jetten, A.M., Davis, B.J. 2003. Dual activation of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 201(1-2): 133-141.
- Luckenbach, T., Kilian, M., Triebkorn, R., Oberemm, A. 2001. Fish early life stage tests as a tool to assess embryotoxic potentials in small streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*. 8(3-4): 355-370.
- Magdouli, S., Daghbir, R., Brar, S.K., Drogui, P., Tyagi, R.D. 2013. Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: a critical review. *Journal of Environmental Management*. 127: 36-49.
- Mahood, I.K., Scott, H.M., Brown, R., Hallmark, N., Walker, M., Sharpe, R.M. 2007. In utero exposure to di (n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity. *Environmental Health Perspectives*. 115(Suppl 1): 55-61
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., Giesy, J.P. 2013. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*. 217(1): 50-58.
- Mayer, jr F.L., Sanders, H.O. 1973. Toxicology of phthalic acid esters in aquatic organisms. *Environmental Health Perspectives*. 3: 153-157.
- Metcalf, R.L., Booth, G.M., Schuth, C.K., Hansen, D.J., Lu, P.Y. 1973. Uptake and fate of Di-2-ethylhexyl phthalate in aquatic organisms and in a model ecosystem. *Environmental Health Perspectives*. 4: 27-34
- Moore, N.P. 2000. The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reproductive Toxicology*. 14(3): 183-192.
- Nagel, R. 2002. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*. 19(Suppl 1): 38-48.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J., Tyler, C.R. 2009. A critical analysis of the

- biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364(1526): 2047-2062.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaravilla, M.P. 2005. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 141(2): 133-144.
- Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., Gray, jr L.E. 2000. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicological Sciences*. 58(2): 339-349.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*. 15(5): 394-404.
- Sirivithayapakorn, S., Thuyviang, K. 2010. Dispersion and ecological risk assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in the surface waters of Thailand. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 84(5): 503-506.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*. 33(2): 128-132.
- Sun, J., Huang, J., Zhang, A., Liu, W., Cheng, W. 2013. Occurrence of phthalate esters in sediments in Qiantang River, China and inference with urbanization and river flow regime. *Journal of Hazardous Materials*. 248: 142-149.
- Staples, C.A., Adams, W.J., Parkerton, T.F., Gorsuch, J.W., Biddinger, G.R., Reinert, K.H. 1997. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16(5): 875-891.
- Treinen, K.A., Dodson, W.C., Heindel, J.J. 1990. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono (2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 106(2): 334-340.
- Urien, N., Uher, E., Billoir, E., Geffard, O., Fechner, L.C., Lebrun, J.D. 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: influence of water chemistry and in situ validation. *Environmental Pollution*. 203: 22-30.
- Xu, X.R., Li, X.Y. 2008. Adsorption behaviour of dibutyl phthalate on marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 57(6-12): 403-408.
- Zeng, F., Wen, J., Cui, K., Wu, L., Liu, M., Li, Y., Lin, Y., Zhu, F., Ma, Z., Zeng, Z. 2009. Seasonal distribution of phthalate esters in surface water of the urban lakes in the subtropical city, Guangzhou, China. *Journal of Hazardous Materials*. 169(1-3): 719-725.