

# Primjena punog faktorskog plana i metode odzivnih površina za određivanje ekotoksičnog učinka ksenobiotika na *Daphnia magna*

---

Kuštro, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:310790>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kuštro

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja

Marija Kuštro

Predala je izrađen diplomski rad dana: 12. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 15. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kuštro

**PRIMJENA PUNOG FAKTORSKOG PLANA I METODE ODZIVNIH  
POVRŠINA ZA ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOG UČINKA  
KSENOBIOTIKA NA *Daphnia magna***

DIPLOMSKI RAD

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Komentor:** dr. sc. Vlatka Filipović Marijić

**Članovi ispitnog povjerenstva:** izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

doc. dr. sc. Vesna Ocelić Bulatović

Zagreb, rujan 2023.



*Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekata Hrvatske zaklade za znanost „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) i „Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori“ (IP-2020-02-8502) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Institutu Ruđer Bošković.*

## **ZAHVALA**

*U prvom redu, zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što me primila pod svoje mentorstvo za izradu ovog diplomskog rada pod njezinim stručnim vodstvom, uloženom trudu i vremenu. Zahvaljujem se na svakoj ukazanoj prilici, što mi je vjerovala i time omogućila da sudjelujem na raznim skupovima i kongresima.*

*Zahvaljujem se i komentorici dr. sc. Vlatki Filipović Marijić sa Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu što me je usmjeravala i bila pomoć pri izradi eksperimentalnog djela rada, kao i ostalim članovima Laboratorija za biološke učinke metala koji su mi također pomogli pri izradi rada, posebno dr. sc. Tomislavu Kralju na pomoći oko mikroskopiranja vodenbuha.*

*Zahvaljujem se asistenticama mag. ing. oecoing. Martini Miloloži i mag. ing. oecoing. Kristini Bule Možar koje su uvijek bile tu za bilo koje pitanje i pomoć sa svojim veselim karakterom, trudom, strpljenjem i vremenom.*

*Zahvaljujem se tehničarki Marijani Vidaković na njenom uvijek prisutnom osmijehu i lijepim riječima s kojima bi me dočekala kada bih došla na Zavod za industrijsku ekologiju.*

*Veliko hvala kolegicama sa smjera s kojima sam provela najljepše trenutke studiranja i svojim najboljim i najbližim prijateljima i prijateljicama za svaku podršku tijekom studiranja.*

*I za kraj, beskrajno hvala mojim roditeljima i najužoj obitelji koji su mi bili ogromna podrška i što su vjerovali u mene tijekom cijelog studiranja.*

*Veliko HVALA svima!*

## SAŽETAK

Onečišćenje vodenog ekosustava ksenobiotcima, mikroplastikom (MP) i farmaceuticima, je u sve većem porastu zbog antropogenih utjecaja, poput prekomjernog korištenja plastične ambalaže, razvoja industrije i konzumiranja lijekova, što posljedično dovodi do njihovih ispuštanja u okoliš. MP se smatra onečišćujućom tvari jer je postala globalna prijetnja zbog svoje sveprisutnosti, bioinertnosti, opasnosti za vodene organizme i utjecaja na ljudsko zdravlje. Farmaceutici poput antibiotika i antivirusa čine skupinu onečišćujućih tvari koje mogu ozbiljno ugroziti zdravlje ne ciljanih organizama. Onečišćenje vodenog ekosustava postalo je svjetski problem, a znanstvenici, u suradnji sa zakonodavnim tijelima, traže rješenja kako spriječiti daljnje onečišćenje okoliša. U svrhu procjene toksičnosti MP-a, antibiotika i antivirusa te njihovih smjesa u vodi, u ovom radu proveli su se laboratorijski testovi toksičnosti s vodenbuhom *Daphnia magna*, uobičajenim slatkovodnim zooplanktonskim račićem. *Daphnia magna* izlagala se četirima vrstama MP-a, polistirena (PS), poli(etilen-tereftalat)a (PET), poli(vinil-klorid)a (PVC) i polietilena (PE) veličine čestica 100 – 300, 300 – 500 i 500 – 700  $\mu\text{m}$ , čime se potvrdilo da ove veličine čestica su prevelike za unos u organizam i ne dovode do toksičnog učinka. Zbog toga se ispitao utjecaj manjih čestica PS-a od 0,5 i 2  $\mu\text{m}$ , koje su primijenjene u koncentracijama 0,1; 0,5; 1; 2 i 10 mg/L. S obzirom da odgovara veličini hrane vodenbuha, potvrđen je toksični učinak čestica veličine 2  $\mu\text{m}$ , koji raste s porastom koncentracije, a učinak na 50 % vodenbuha izračunat kao  $EC_{50}$  vrijednost iznosi 0,02 mg/L. Antivirusi korišteni u pokusu su atazanavir (ATA) koncentracije 0,003 mmol/L te emtricitabin (EMT), nirmatrelvir (NIR), oseltamivir (OSE), ribavirin (RIB) i sofosbuvir (SOF) koncentracije 0,1 mmol/L, koji pri ovim okolišnim koncentracijama nisu imali toksičan učinak. Korišteni antibiotik azitromicin (AZ) ispitivao se u pet koncentracija 0,001; 0,01; 0,1; 0,25 i 0,5 mmol/L, a prema dobivenim rezultatima toksičnost je rasla s porastom koncentracije i učinak na 50 % vodenbuha izračunat kao  $EC_{50}$  vrijednost iznosi 0,6 mmol/L. U binarnim i ternarnim kombinacijama najznačajniji toksični učinak uočen je pri koncentraciji 0,5 mmol/L AZ s PE, odnosno PET, koji je rezultirao samo s 20 % pokretnih vodenbuha. Dobiveni eksperimentalni rezultati obrađeni su korištenjem statističke analize varijance (ANOVA), čime je također potvrđeno da toksični učinak ksenobiotika na *Daphnia magna* ovisi o koncentraciji i veličina čestica.

**Ključne riječi:** test toksičnosti, vodenbuha, ksenobiotici, mikroplastika

## ABSTRACT

Pollution of the aquatic ecosystem with xenobiotics, microplastics (MP) and pharmaceuticals is increasing due to anthropogenic influences, such as the excessive use of plastic packaging, industrial development and the consumption of medicines, which consequently leads to their release into the environment. MP is considered a pollutant because it has become a global threat due to its ubiquity, bioinertness, hazard to aquatic organisms, and impact on human health. Pharmaceuticals such as antibiotics and antivirals form a group of pollutants that can seriously threaten the health of non-target organisms. Pollution of the aquatic ecosystem has become a worldwide problem, and scientists, in cooperation with legislative bodies, are looking for solutions to prevent further pollution of the environment. In order to assess the toxicity of MP, antibiotics and antivirals and their mixtures in water, in this work laboratory toxicity tests were conducted with the water flea *Daphnia magna*, a common freshwater zooplankton crustacean. *Daphnia magna* was exposed to four types of MP, polystyrene (PS), poly(ethylene-terephthalate) (PET), poly(vinyl-chloride) (PVC) and polyethylene (PE) with particle sizes of 100 – 300, 300 – 500 and 500 – 700  $\mu\text{m}$ , and toxicity testing confirmed that these particle sizes are too large to be taken into the body and cause toxic effect. For this reason, the toxic effect of smaller PS particles of 0,5 and 2  $\mu\text{m}$ , which were applied in concentrations of 0,1; 0,5; 1; 2 and 10 mg/L were estimated. Given that it corresponds to the size of the water flea's food, the toxic effect of particles with a size of 2  $\mu\text{m}$  has been confirmed, which increases with increasing concentration, and the effect on 50 % of water fleas calculated as an  $\text{EC}_{50}$  value is 0,02 mg/L. The antivirals used in the experiment are atazanavir (ATA) at a concentration of 0,003 mmol/L and emtricitabine (EMT), nirmatrelvir (NIR), oseltamivir (OSE), ribavirin (RIB) and sofosbuvir (SOF) at a concentration of 0,1 mmol/L, which at these environmental concentrations did not have a toxic effect. The antibiotic azithromycin (AZ) used was tested in five concentrations of 0,001; 0,01; 0,1; 0,25 and 0,5 mmol/L, and according to the obtained results, toxicity increased with increasing concentration and the effect on 50 % of water fleas calculated as  $\text{EC}_{50}$  value is 0,6 mmol/L. In binary and ternary combinations, the most significant toxic effect was observed at a concentration of 0,5 mmol/L AZ with PE, or PET, which resulted in only 20 % of motile water fleas. The obtained experimental results were processed using statistical analysis of variance (ANOVA), which also confirmed that toxicity of xenobiotics to *Daphnia magna* depends on the concentration and particle size.

**Key words:** toxicity test, water flea, xenobiotics, microplastics



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	5
2.1. Mikroplastika.....	5
2.1.1. Vrste mikroplastike .....	7
2.1.1.1. Polistiren.....	7
2.1.1.2. Poli(etilen-tereftalat).....	8
2.1.1.3. Poli(vinil-klorid).....	9
2.1.1.4. Polietilen.....	9
2.1.2. Svojstva mikroplastike .....	10
2.1.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu i potencijalni štetni učinci.....	10
2.1.3.1. Vodeni ekosustavi .....	11
2.1.3.2. Kopneni ekosustavi .....	13
2.1.3.3. Atmosfera .....	14
2.2. Antivirolici .....	14
2.2.1. Podjela antivirusika.....	15
2.2.1.1. Atazanavir.....	16
2.2.1.2. Emtricitabin .....	17
2.2.1.3. Nirmatrelvir .....	18
2.2.1.4. Oseltamivir .....	18
2.2.1.5. Ribavirin .....	19
2.2.1.6. Sofosbuvir.....	20
2.2.2. Prisutnost antivirusika u okolišu i potencijalni štetni učinci .....	20
2.2.2.1. Vodeni ekosustav.....	21
2.2.2.2. Kopneni ekosustav.....	22
2.3. Antibiotici.....	23
2.3.1. Podjela antibiotika .....	23
2.3.1.1. Azitromicin.....	24
2.3.2. Prisutnost antibiotika u okolišu i potencijalni štetni učinci.....	25
2.3.2.1. Vodeni ekosustav.....	26
2.3.2.2. Kopneni ekosustav.....	28
2.4. Testovi toksičnosti.....	28
2.4.1. Testovi toksičnosti s <i>Daphnia magna</i> .....	29
2.5. Metode dizajna eksperimenta .....	31
2.5.1. Puni faktorski plan i metoda odzivnih površina .....	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	34

3.1. Materijali .....	34
3.1.1. Mikroplastika.....	34
3.1.2. Ksenobiotici.....	35
3.1.3. Testni organizam .....	36
3.1.4. Mediji i kemikalije .....	37
3.2. Mjerni instrumenti i oprema.....	38
3.3. Metode rada .....	39
3.3.1. Priprema mikroplastike .....	39
3.3.2. Priprema razrjeđenja ksenobiotika .....	40
3.3.3. Aktivacija jedinki <i>Daphnia magna</i> .....	42
3.3.4. Postavljanje testa toksičnosti.....	43
3.3.5. Brojanje pokretnih jedinki <i>Daphnia magna</i> .....	43
3.3.6. Mikroskopska analiza .....	44
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	45
4.1. Provjera pouzdanosti ispitnih uvjeta .....	45
4.2. Ispitivanje utjecaja mikroplastike na <i>Daphnia magna</i> .....	45
4.3. Ispitivanje utjecaja antivirotika na <i>Daphnia magna</i> .....	48
4.4. Ispitivanje utjecaja antibiotika azitromicina na <i>Daphnia magna</i> .....	49
4.5. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antiviroticima na <i>Daphnia magna</i> .....	50
4.6. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antibiotikom na <i>Daphnia magna</i> .....	52
4.7. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antiviroticima i antibiotikom na <i>Daphnia magna</i> .....	53
4.8. Mikroskopska analiza vodenbuhe <i>Daphnia magna</i> .....	54
4.9. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA) .....	55
5. ZAKLJUČAK.....	59
6. POPIS SIMBOLA .....	61
7. LITERATURA .....	63

## 1. UVOD

Razne onečišćujuće tvari, poput pesticida, teških metala, policikličkih aromatskih ugljikovodika i, u novije vrijeme, mikroplastičnih čestica i lijekova, ulaze u vodeni ekosustav kroz antropogene aktivnosti i prijete zdravlju biljaka, životinja i ljudi zbog svoje akutne toksičnosti i potencijalnog rizika od bioakumulacije. Sve one tvari koje u normalnim okolnostima ne nalazimo u okolišu i živim organizmima niti su u sastavu normalne prehrane nazivamo ksenobiotici, a tu spadaju i farmaceutici (antivirolici i antibiotici) i plastika (mikroplastika).<sup>1</sup> Svjetska proizvodnja i uporaba lijekova i dalje raste iz godine u godinu kao rezultat starenja ljudske populacije i povećanja zaraznih bolesti za sprječavanje, liječenje ili ublažavanje zdravstvenog stanja.<sup>2</sup> Porast plastike u okolišu je posljedica njezine široke primjene zbog brojnih društvenih koristi i tehnološkog napretka, no međutim dovodi do zabrinutosti njena prekomjerna upotreba i posljedično neadekvatno odlaganje i nakupljanje plastike na odlagalištima i prirodnim staništima.<sup>3</sup>

Farmaceutski proizvod je materijal koji sadrži aktivnu tvar, čija je namjena djelovanje na specifične biološke puteve organizama i primjena u medicinske svrhe.<sup>2</sup> Farmaceutici ulaze u vodeni okoliš putem biomedicinskih, veterinarskih, poljoprivrednih i industrijskih izvora. Ljudi također namjerno unose lijekove u kanalizacijske sustave ispiranjem isteklih ili neželjenih lijekova. Prema studiji koja je provedena u Njemačkoj otkriveno je ukupno 156 farmaceutika u okolišnim medijima (površinske vode, podzemne vode i pitka voda), a koncentracije većine farmaceutika pronađene u površinskim vodama bile su u rasponu 0,1–10,0 µg/L. Dokazano je da je više od 600 farmaceutika prisutno u okolišu diljem svijeta.<sup>4</sup>

Farmaceutske otpadne vode mogu se obraditi primarnim, sekundarnim i tercijarnim postupcima. Primarna obrada je kemijska ili fizikalno-kemijska, sekundarna obrada se uglavnom temelji na biološkim procesima (aktivni mulj, membranski bioreaktor, anaerobna obrada i hibridna obrada, kombinacija fizikalno-kemijske i biološke tehnike), a tercijarna obrada sastoji se najčešće od naprednih oksidacijskih procesa (NOP). U postrojenjima za obradu farmaceutskih otpadnih voda često korišten proces je biološka obrada s aktivnim muljem. Problem takve obrade je da farmaceutici inhibiraju rast mikroorganizma potrebnih za razgradnju organske tvari, stoga takva obrada nema zadovoljavajuće učinke i farmaceutici često bivaju vraćeni u površinske ili podzemne vode.<sup>5,6</sup> U konvencionalnim uređajima za pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem niske stope uklanjanja zabilježene su za klaritromicin (KLA), eritromicin (ERI) i azitromicin (AZ), odnosno manje od 20 %, 6 % i 55 % (KLA je pronađen u najvišim koncentracijama (330–600 ng/L), a slijedi ga AZ (90–380

ng/L) te ERI (60–190 ng/L)).<sup>7</sup> Učinkovitost uklanjanja farmaceutika uvelike varira, od 0 % do više od 90 %, ovisno o svojstvima molekule spoja, bez obzira na procese obrade. Pronalazimo ih u niskim koncentracijama u zaostalom mulju jer se adsorbiraju na čestice mulja, u rasponu od  $\mu\text{g/L}$  do  $\text{mg/L}$ . Takav mulj najčešće se odlaže na poljoprivredne površine radi poboljšanja svojstava tla, no farmaceutici predstavljaju ekološki problem.<sup>8</sup> Zbog štetnog učinka farmaceutika na okoliš, Europska komisija je neke od njih uvrstila na „*Watch list*“ kao nove onečišćujuće tvari objavljene u Okvirnoj direktivi o vodama (EC, 2020). Organizmi su izloženi farmaceuticima unosom putem vode i hrane, a zahvaljujući njihovoj bioakumulaciji u organizmu dolazi do toksičnog učinka te je bitno procijeniti rizike koje ti spojevi mogu predstavljati za okoliš i zdravlje ljudi.<sup>9</sup>

Plastika je materijal koji se sastoji od visokomolekularnih organskih polimera. Jeftin je, lagan, čvrst, izdržljiv materijal, otporan na koroziju, s dobrim svojstvima toplinske i električne izolacije. Iako navedena svojstva predstavljaju prednost i visok potencijal za različite primjene, plastika zbog svoje široke primjene ima negativan utjecaj na okoliš. Štetan učinak plastike ovisi o njezinoj veličini, obliku te adsorbiranim tvarima na njenoj površini.<sup>10</sup> Podjela plastike prema veličini čestica uključuje mikroplastiku (MP), odnosno sve polimerne materijale čija se veličina kreće između 1  $\mu\text{m}$  i 5 mm; mezoplastiku (MEP), veličine čestica većih od 5 mm te makroplastiku (MAP) veličine čestica većih od 1 cm. Zbog male veličine čestica MP predstavlja najveću opasnost po okoliš te se brzo širi vjetrom i vodom. Kao rezultat toga, čestice MP-a se nalaze u zraku, tlu, vodi i polarnom ledu, u dubinama mora i u živim organizmima. Prema podrijetlu MP-a razlikujemo primarnu MP, koja se ispušta u okoliš izravno u mikročestičnim veličinama, poput one u kozmetičkim proizvodima i sredstvima za čišćenje koji se svakodnevno koriste, te sekundarnu MP koja dopijeva u okoliš fragmentacijom i razgradnjom veće plastike. Nakon što čestice MP-a uđu u vodu, vodeni organizmi se njima hrane, a MP ulazi u prehrambeni lanac i tim putem dolazi i do čovjeka.<sup>11</sup> Prema različitim nalazištima plastike, odnosno MP-a, globalni je problem loše zbrinjavanje plastičnog otpada. Postoje rješenja, a neka od njih su smanjenje materijala, dizajn koji omogućava recikliranje na kraju životnog vijeka, povećani kapacitet recikliranja, razvoj sirovina na biološkoj osnovi, strategije za smanjenje bacanja plastičnog otpada u okoliš, odvojeno sakupljanje otpada, primjena analize životnog ciklusa temeljenog na zelenoj kemiji i praćenje procjene rizika otpada.<sup>3</sup> Uklanjanje MP-a u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda nije u potpunosti moguće tijekom primarnog pročišćavanja zbog malih veličina čestica, koja su manja od finih sita pročišćavača (2 – 10 mm), dok se plutajuća MP može ukloniti u koraku odvajanja masti, a teža MP će se taložiti na pijesak ili mulj.<sup>12</sup>

Procjena okolišnog rizika (engl. *environmental risk assessment* (ERA)) je proces procjene potencijalnog negativnog učinka na okoliš koji uzrokuje neka tvar, aktivnost ili prirodna pojava. Općenito je cilj zaštititi vodene i kopnene ekosustave, podzemne vode te mikroorganizme u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda.<sup>4,13</sup> Procjena rizika ksenobiotika za okoliš prolazi kroz dvije faze. Prva faza identificira one proizvode koji zahtijevaju detaljniju, eksperimentalnu procjenu, dok se u drugoj fazi osnovni skup podataka o sudbini i učincima na okoliš generira prema smjernicama za testiranje OECD-a (engl. *Organization for Economic Cooperation and Development*). Opasnost za okoliš usmjerena je na intrinzična svojstva tvari koje definiraju njezinu postojanost, potencijal bioakumulacije i toksičnosti.<sup>14</sup>

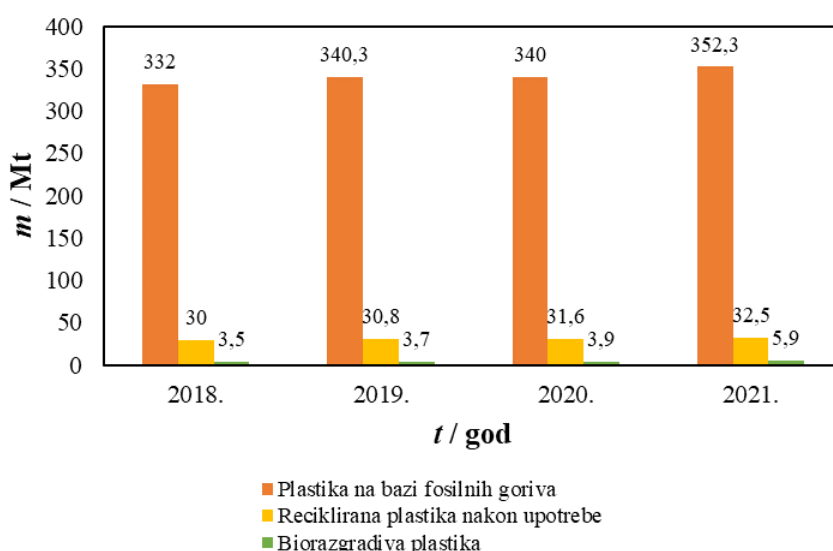
Kako bi se provela istraživanja štetnog učinka nekog spoja ili tvari provode se testovi toksičnosti. Jedan od najčešće korištenih je testiranje primjenom planktonskih račića vodenbuha (*Daphnia sp.*), koje su jedan od najstarijih i najčešće korištenih modelnih organizama. Osjetljivi bihevioralni i fiziološki odgovori ovog organizma su parametri koji se koriste kao biomarkeri učinaka izazvanih različitim čimbenicima okoliša i kemijskih tvari, stoga predstavlja jednostavan alternativni pristup u ispitivanju ksenobiotika.<sup>2</sup> U ovom radu provodio se imobilizacijski test sa slatkovodnim zooplanktonom *Daphnia magna* Straus, 1820 tijekom 48 sati, kako bi se ispitala akutna toksičnost četiri vrste MP-a: polietilena (PE), polistirena (PS), poli(vinil-klorid)a (PVC) i poli(etilen-tereftalat)a (PET) te farmaceutskih spojeva: šest vrsta antivirusa (atazanavir (ATA), emtricitabin (EMT), nirmatrelovir (NIR), oseltamivir (OSE), ribavirin (RIB) i sofosbuvir (SOF)) te antibiotika (azitromicin (AZ)). Pripremljene otopine sadržavale su pojedinačne uzorke i smjese uzoraka. Prema dobivenim rezultatima u pojedinačnim uzorcima MP-a, antivirusa i AZ-a uzorci veličina čestica koje nisu prikladne za unos u organizam te oni niskih okolišnih koncentracija nisu pokazali značajan toksični učinak na testni organizam *Daphnia magna*. Konkretno, toksičan utjecaj MP-a potvrđen je za čestice PS-a veličine 2  $\mu\text{m}$ , prikladne za unos u vodenbuhu, a toksičnost je rasla s porastom koncentracije. Isto vrijedi i za antibiotik, koji je potvrdio ovisnost toksičnosti o koncentraciji. U binarnim i ternarnim smjesama uzoraka MP-a, antivirusa i AZ-a u većini kombinacija nije uočen značajan toksični učinak, osim kod primjene antibiotika i MP-a pri koncentraciji AZ-a od 0,5 mmol/L u kombinaciji s PE, odnosno PET kada je postotak pokretnih vodenbuha iznosio samo 20 %. Prema dizajnu punog faktorskog plana odredili su se značajni čimbenici. Analiza varijance (ANOVA) u programu *Design Expert* primijenjena je kako bi se ispitao učinak pojedinih faktora (procesnih parametara) na pojedine odzive (postotak neimobiliziranih vodenbuha) u procesu ispitivanja toksičnosti na testni organizam. Koeficijent

determinacije za ispitivanje toksičnosti primjenom testnog organizma, slatkovodnog zooplanktona, *Daphnia magna* iznosio je 0,9797 što pokazuje da je model značajan. Prema dobivenim rezultatima zaključujemo da toksični učinak na testni organizam *Daphnia magna* ovisi o veličini čestica i koncentraciji MP-a/antivirotika/antibiotika.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Mikroplastika

Pojam "plastika" odnosi se na umjetne materijale koji se temelje na sintetskim ili prirodnim spojevima velike molekularne težine – polimerima.<sup>10</sup> Većina plastike izrađena je od fosilnih goriva te nije biorazgradiva i pridonosi štetnom utjecaju na okoliš. Plastika često završi na odlagalištima, gdje joj treba nekoliko godina da se razgradi i tijekom tog perioda sitne čestice plastike se mogu pomoću vjetra prenijeti ili ući u različite izvore voda i vodene ekosustave, kao što su oceani, rijeke, jezera, procjedne vode i podzemne vode te se tamo zadržati mnogo godina.<sup>15</sup> Počevši od 1950-ih, plastika se intenzivno koristi u mnogim industrijama zbog svoje ekonomske učinkovitosti, široke primjene, lakoće, čvrstoće i izdržljivosti.<sup>10</sup> Prema „*Plastics – the Facts*“ analizi, koja objavljuje najnovije podatke vezane uz proizvodnju plastike, potražnju, pretvorbu i upravljanje otpadom u Europi, te daje uvid u doprinos industrije europskom društvu, ukupna svjetska proizvodnja plastike kontinuirano raste, s izuzetkom stagnacije u 2020. godini zbog pandemije SARS-CoV-2 (375,5 milijuna tona), ali daljnjim porastom opet u 2021. godini na 390,7 milijuna tona (slika 1).<sup>16</sup> Posljedično, globalno onečišćenje plastikom raste desetljećima i takav će trend vjerojatno biti pojačan posljedicama pandemije SARS-CoV-2, uglavnom zbog raširenosti i intenzivne uporabe plastičnih materijala, neprikladnog zbrinjavanja nakon uporabe i ograničene sposobnosti rukovanja povećanim količinama otpada.<sup>1</sup> Na slici 1 se vidi da i dalje raste proizvodnja plastike na bazi fosilnih goriva, ali i proizvodnja biorazgradive plastike. Pozitivan učinak je da se povećava masa reciklirane plastike.



*Slika 1.* Prikaz godišnje svjetske proizvodnje plastike ( $m$  – masa u milijunima tona;  $t$  – vrijeme u godinama).<sup>16</sup>

MP se može definirati kao „svaka sintetička čvrsta čestica ili polimerna matrica, pravilnog ili nepravilnog oblika, veličine od 1 µm do 5 mm, primarnog ili sekundarnog proizvodnog podrijetla, koja je netopljiva u vodi”.<sup>17</sup> Kada se nađe u okolišu, MP se razgrađuje putem različitih biotičkih ili abiotičkih procesa kao što su biorazgradnja, fotooksidacija, mehanička abrazija i toplinska oksidacija.<sup>18</sup> Nekoliko različitih čimbenika uzima se u obzir pri klasifikaciji MP čestica, kao što su kemijski sastav, topljivost, oblik i struktura, boja i podrijetlo, a nomenklatura koja se najčešće upotrebljava i navodi temelji se na veličini MP-a. Podjela plastike uključuje četiri kategorije, a to su nanoplastika (NP) veličine čestica manjih od 1 µm, MP od 1 µm do 5 mm, mezoplastika (MEP) veličine čestica većih od 5 mm i makroplastika (MAP) čestica većih od 1 cm.<sup>17</sup> Podjele plastike prema veličini i usporedba s organizmima jednake veličine prikazana je u tablici 1.

**Tablica 1.** Prikaz nomenklature plastike prema veličini i usporedba s organizmima jednake veličine.<sup>17</sup>

KATEGORIJA VELIČINA	RASPON VELIČINA	ORGANIZMI JEDNAKE VELIČINE
NP	< 1 µm	Virusi
MP	1 µm – 5 mm	Bakterije, protozoe, dijatomeje, vodenbuhe
MEP	5 mm – 1 cm	Plaćtenjaci i zooplankton
MAP	> 1 cm	Meduze, mekušci, rakovi, ribe

Dva su glavna izvora mikroplastičnih čestica, koja ujedno uključuju podjelu prema podrijetlu: primarna i sekundarna mikroplastika. **Primarna mikroplastika** su namjerno proizvedene mikročestice plastike za potrošačke i industrijske svrhe, izravno ili neizravno ispuštene u vodeni ekosustav, koje mogu potjecati iz procesa pranja rublja, kozmetičkih proizvoda, tvorničkih proizvodnih procesa, čestica koje stvaraju gume vozila prilikom kočenja, abrazivi za čišćenje, polimerni nosači za isporuku lijekova, sredstva za pjeskarenje, plastificirana gnojiva i drugo.<sup>10,19</sup> Primarna MP ulazi u okoliš izravno kroz bilo koji od različitih puteva primjene, kao na primjer uporabom proizvoda u kućanstvu (proizvodi za osobnu njegu koji se ispiru u sustave otpadnih voda), nenamjernim izlivanjem tijekom proizvodnje ili transporta, abrazijom tijekom pranja (pranje odjeće od sintetičkog tekstila).<sup>20</sup> **Sekundarna mikroplastika** u vodenom ekosustavu potječe od plastičnog materijala razgrađenog UV zrakama sunca, valovima, abrazijom vjetra ili drugim fizičkim procesima, te mikroorganizmima, odnosno spontano nakon razgradnje plastičnog otpada.<sup>19,20</sup> Upravo zbog stalne fragmentacije plastike u okolišu, postoji ogromna raznolikost u veličini, obliku, boji i

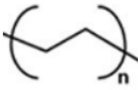
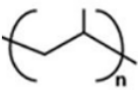
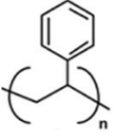
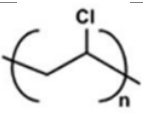
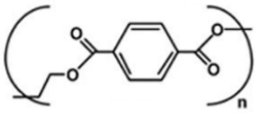


tipu polimera među sekundarnom MP, budući da mogu nastati raspadom bilo kojeg većeg plastičnog predmeta.<sup>21</sup>

### 2.1.1. Vrste mikroplastike

Oko 90 % plastičnih materijala u svijetu sastoji se od polietilena (PE), polipropilena (PP), poli(vinil-klorid)a (PVC), polistirena (PS) ili poli(etilen-tereftalat)a (PET). Ovi se materijali naširoko koriste diljem svijeta jer su jeftini, jednostavni za proizvodnju i imaju alternativna svojstva prirodnim proizvodima, uključujući drvo, kamen i staklo.<sup>19</sup> Svaki oblik MP-a može biti predstavljen različitim vrstama polimera jer proizvođači nastoje proizvesti plastiku sa specifičnim svojstvima (fleksibilnost, hrapavost, otpornost i trajnost).<sup>22</sup> U tablici 2 prikazane su strukturne formule najčešće upotrebljivanih MP-ova i njihova primjena u materijalima za svakodnevnu upotrebu.

**Tablica 2.** Prikaz najčešće upotrebljivanih vrsta MP-ova.<sup>23</sup>

IME POLIMERA	STRUKTURNA FORMULA	UPOTREBA
PE		Najčešći polimer. Koristi se u vrećicama, izolaciji žica i bocama.
PP		Vlakna, unutarnji i vanjski tepisi, boce.
PS		Stiropor, stolno posuđe, pladnjevi, kutije za video kasete, CD.
PVC		Prozirna folija za hranu, boce, sintetička koža, cijevi za vodu i odvod.
PET		Boce za pića, ambalažni materijal.

#### 2.1.1.1. Polistiren

Polistiren (PS) se sastoji od monomera stirena, međusobno povezanih u lanac.<sup>15</sup> PS je sintetski aromatski polimer koji se proizvodi kada se stiren podvrgne polimerizaciji u prisutnosti topline ili inicijatora.<sup>24</sup> Osnovna sirovina za proizvodnju PS-a je nafta. PS je lagani materijal koji se u oko 95 % svog volumena sastoji od zraka, što ga čini ekonomičnim materijalom. Zbog svoje male težine pliva na vodi i lako se prenosi vjetrom.<sup>25</sup> Jednostavan je za proizvodnju, transport i ugradnju te se zbog dobrih mehaničkih svojstava i povoljne cijene

intenzivno koristi. PS je najzastupljenija plastika koja se proizvodi diljem svijeta i uglavnom se primjenjuje u proizvodnji kutija za pakiranje hrane, građevinskim materijalima (izolacija), kutijama za kasete, kompaktnim diskovima, jednokratnim čašama, tanjurima i priboru za jelo. PS je kategoriziran u četiri vrste ovisno o primjeni te se razlikuje usmjereni PS, visoko otporni PS, istrošeni PS i PS pjena. PS je polimer visoke molekularne težine i visoke stabilnosti s hidrofobnom prirodom koja ga čini otpornim na razgradnju. Prema istraživanjima, modificirani PS mogu razgraditi *Pseudomonas aeruginosa*, rod *Curvularia*, *Rhodococcus ruberom* te ličinke *Tenebrio molitor*.<sup>26</sup> Važna prednost PS-a je mogućnost recikliranja. Kod spaljivanja kao nusprodukti nastaju brojni štetni plinovi poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, ugljikovog monoksida, stirenskih monomera i drugih, dok se u modernim spalionicama PS pretvara uglavnom u ugljikov dioksid, vodenu paru, talog i toplinu (koristi se za dobivanje struje ili pare).<sup>25</sup> Pošto spaljivanje uzrokuje onečišćenje zraka zbog nastalih nusprodukata, biorazgradnja i bioremedijacija smatraju se najboljim rješenjima razgradnje PS-a. Takva razgradnja je spora, no znanstvenici nastavljaju tražiti rješenja za ubrzavanje tih procesa.<sup>27</sup>

#### 2.1.1.2. Poli(etilen-tereftalat)

Poli(etilen-tereftalat) (PET) je linearni polukristalni termoplastični polimer. Može se reciklirati te pokazuje otpornost na udarce, vlagu, alkohole i otapala, odnosno ima dobru mehaničku, toplinsku i kemijsku otpornost kao i dimenzijsku stabilnost. Koristi se u svakodnevnom životu u pakiranju, tkaninama i tekstilnoj industriji, kao i u filmovima za oblikovanje dijelova za automobile, elektroniku.<sup>28</sup> PET se najčešće koristi za izradu boca za gazirana pića jer ima visoku čvrstoću i žilavost, dobru otpornost na abraziju i toplinu, nisko puzanje pri povišenim temperaturama, dobru kemijsku otpornost i izvrsnu dimenzijsku stabilnost. PET se koristi i za izradu umjetnih vlakana za tekstil jer ima izvanrednu otpornost na habanje, nisku sposobnost apsorpcije vlage i vrlo je izdržljiv. Tekstilne primjene uključuju deke, posteljinu, jorgane, tepihe, podstavu za presvlake i tapecirani namještaj.<sup>29</sup> Baskaran i Sathiavelu (2022.) su otkrili da nova bakterija *Ideonella sakaiensis* može u potpunosti asimilirati PET unutar 6 tjedana, za što su odgovorna dva izvanstanična enzima PETaza i MHETaza, a kao krajnji produkti nastaju tereftalna kiselina i etilen glikol. Osim *Ideonella sakaiensis*, razni mikroorganizmi razgrađuju PET kao što su *Arthrobacter sulfonivorans* (6 mjeseci) i *Streptomyces* sp. (18 dana).<sup>30</sup>

### 2.1.1.3. Poli(vinil-klorid)

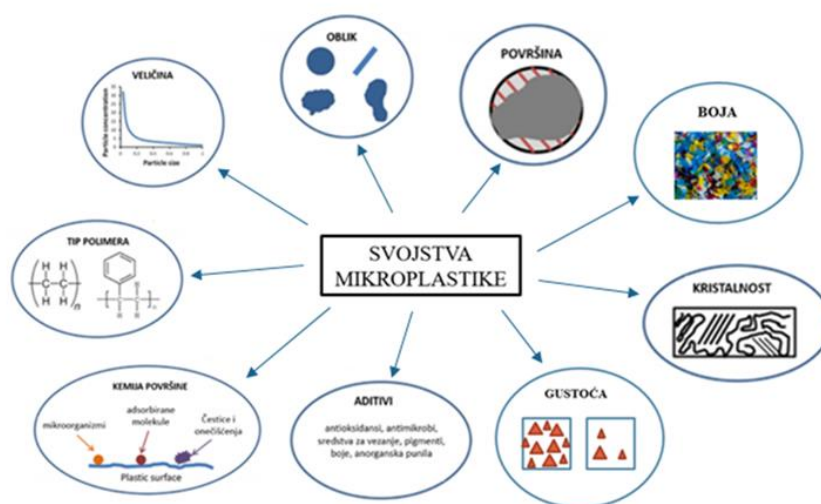
Poli(vinil-klorid) (PVC) prirodno je bijela i vrlo krta (prije dodataka plastifikatora) plastika, koja sadrži 56,77 % elementa klora, netopljiva je u vodi i alkoholu, ali je topljiva u tetrahidrofuranu.<sup>31,32</sup> PVC se proizvodi u dva opća oblika, kruti ili neplastificirani te fleksibilni polimer. Fleksibilni PVC je mekši i podložniji savijanju od krutog zbog dodatka plastifikatora poput ftalata (diizononil ftalat).<sup>31</sup> Kruta forma koristi se u izradi cijevi, vrata i prozora, pakiranju (ambalaža za neprehrambene proizvode) i karticama (bankovne ili članske iskaznice). Fleksibilni oblik koristi se u vodovodnim cijevima, imitaciji kože i mnogim drugim primjenama kao što je zamjena za gumu i izradu platna. Iako su fizikalno-kemijska svojstva PVC-a oslabljena kada je izložen toplini, sunčevoj svjetlosti ili UV-B zračenju, reakcije njegove prirodne razgradnje su spore u usporedbi s velikom potražnjom i proizvodnjom PVC-a u cijelom svijetu. Tijekom posljednjih deset godina znanstvenici su otkrili da su ličinke kukaca koji pripadaju redu kornjaša (Coleoptera), u koje spadaju *Tenebrio molitor* (veliki brašnar), *Tenebrio obscurus* (tamni brašnar) i *Zophobas atratus*, sposobne za gutanje i razgradnju PVC-a.<sup>32</sup> U radu *Giacomucci i sur. (2019.)*, istraživala se razgradnja PVC folije pomoću *Pseudomonas citronellolis* i *Bacillus flexus* te se pokazalo da bakterije djeluju na razgradnju aditiva, pokazujući nisku stopu biorazgradnje PVC-a.<sup>33</sup>

### 2.1.1.4. Polietilen

Polietilen (PE) je polimerni materijal koji se sastoji od zajedno vezanih monomera etilena i koristi se u većini danas popularno korištenih proizvoda, kao što su plastične boce za vodu, plastične vrećice i igračke.<sup>15</sup> Glavne značajke PE-a su njegova niska cijena, izvrsna električna izolacija u širokom rasponu frekvencija, vrlo dobra kemijska otpornost, dobra obradivost, žilavost i fleksibilnost.<sup>34</sup> Ova svojstva čine PE proizvode idealnima za različite primjene, od pakiranja hrane i sterilnih medicinskih uređaja do građevinskih namjena. Ipak, kemijska inertnost, makromolekularna struktura i hidrofobnost PE-a utječu na biorazgradivost, odnosno čine ih teškima za napad mikroorganizama i enzima nakon što se nađu u okolišu.<sup>35</sup> PE se klasificira prema gustoći i broju molekularnih grana na linearni polietilen visoke gustoće (HDPE), dugorazgranati polietilen niske gustoće (LDPE) i kratkorazgranati linearni polietilen niske gustoće (LLDPE). Procjene pokazuju da se oko 79 % PE otpada šalje na odlagališta. PE prolazi kroz proces oksidacije prirodnim svjetlom. Sunčeva toplina i UV zrake će fragmentirati neke od C-H veza u strukturi polimera kako bi se oslobodili aditivi i plastifikatori iz polimera u okoliš čime dolazi do stvaranja stakleničkih plinova.<sup>36</sup>

## 2.1.2. Svojstva mikroplastike

Učinci MP-a na žive organizme ovise o fizikalnoj i kemijskoj prirodi čestica (slika 2). **Kemijska svojstva** MP-a odražavaju kemijsku prirodu polimera i svojstva aditiva, odnosno inertna ili pojačavajuća punila koja plastici daju specifična svojstva, a to mogu biti plastifikatori, antioksidansi, UV stabilizatori, maziva, boje i usporivači plamena. **Fizikalna svojstva** MP-a uključuju veličinu i oblik, elastičnost, čvrstoću na smicanje i površinski naboj čestica. Prema obliku, MP se dijele na vlakna, zrna, granule, fragmente, filmove i pjene. Veliki omjer površine i volumena MP-a čini ih dobrim adsorbentima onečišćujućih tvari i mikroorganizama.<sup>10</sup>



*Slika 2.* Shematski prikaz fizikalno-kemijskih svojstava MP-a.<sup>37</sup>

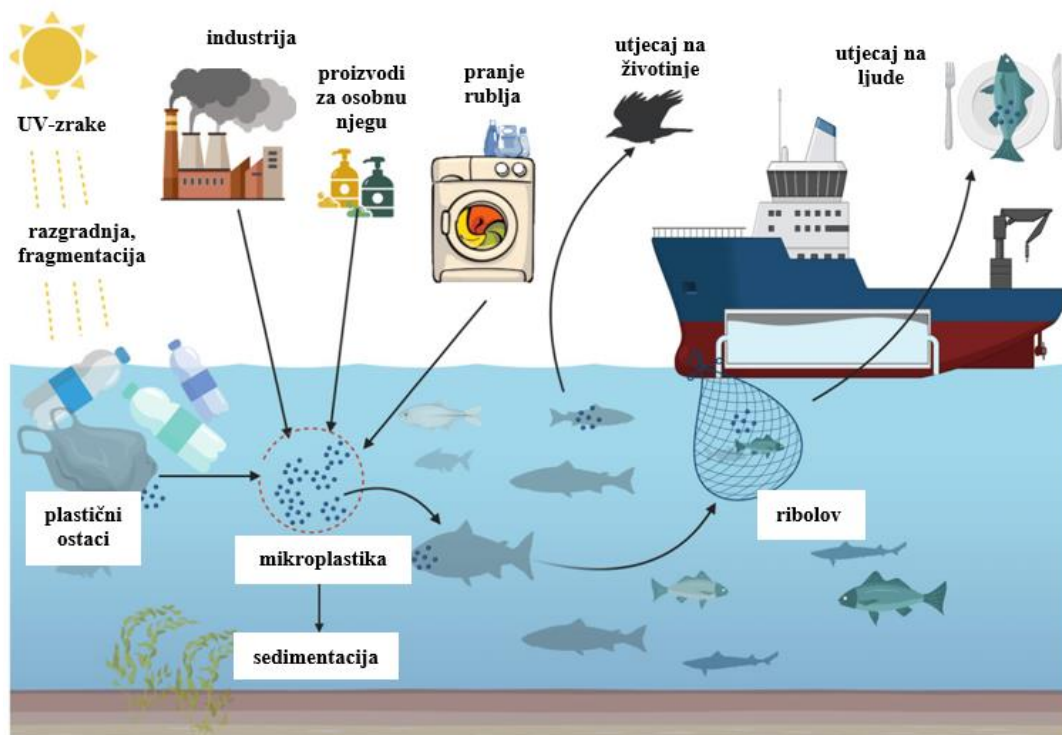
Veličina čestica je od ekološkog značaja jer je potencijalno najvažniji čimbenik koji određuje interakciju MP-a s organizmima i njezinu sudbinu u okolišu.<sup>17</sup> Fizikalno-kemijska svojstva MP-a, kao što su visoka pokretljivost, postojanost u okolišu i niska stopa razgradnje, povećavaju njezinu distribuciju u vodi i sedimentima širom svijeta.<sup>38</sup>

## 2.1.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu i potencijalni štetni učinci

U okolišu se MP može prenositi kroz atmosferske ili vodene struje, ovisno o njihovoj težini i gustoći. Lakša i manja MP može se prenositi vjetrom u zraku i posljedično biti transportirana na udaljenija područja kao što su područja ledenjaka i visoke planine, dok će se gušća MP akumulirati u tlu/sedimentu. Posljedično, MP se nalazi u površinskim i podzemnim vodama, oceanima, obalama, estuarijima, kopnenim vodama, tlu, sedimentu, atmosferi i u ledu. Gdje će se MP pohraniti, ovisi o međusobnoj povezanosti sa sastavnicama okoliša.<sup>19</sup>

### 2.1.3.1. Vodeni ekosustavi

Obilnim oborinama i površinskim otjecanjem s poljoprivrednih i urbanih područja, MP dolazi u površinske vode. U vodenom ekosustavu lakša MP će plutati na površini, dok će teža potonuti na dno. Na gustoću utječe kemijski sastav MP te biološko obraštanje.<sup>39</sup> Na slici 3 možemo vidjeti da MP nastala razgradnjom iz plastičnih ostataka, industrije, proizvoda za osobnu njegu i kućanstvo i ribolovnih aktivnosti dospijeva u vodeni ekosustav i ima direktan utjecaj na životinje i ljude.<sup>40</sup>



**Slika 3.** Unos i raspodjela MP-a u vodenom ekosustavu i njezin utjecaj na organizme.<sup>40</sup>

Otpriblike 60 – 80 % otpada prikupljenog na Zemlji sastoji se od plastike. Više od polovice plastičnog otpada završi na odlagalištu, oko jedne petine otpada zbrinjava se spaljivanjem, jedna desetina se reciklira, dok oko jedne petine nezbrinutog plastičnog otpada, završi u kopnenom i vodenom okolišu.<sup>41</sup> Gotovo 10 % globalne proizvodnje plastike završi u oceanima gdje njezina razgradnja može trajati nekoliko stotina godina.<sup>10</sup> MP može adsorbirati, zbog svoje male specifične površine, transportirati i kasnije otpuštati onečišćujuće tvari u okoliš kao što su organske onečišćujuće tvari, ksenobiotici i teški metali. MP sadrži i aditive u svom sastavu (plastifikatori, usporivači gorenja, antioksidansi i drugi) koji se otpuštaju i izazivaju toksične učinke na vodene organizme. Glavna fizikalno-kemijska svojstva MP-a koja utječu na njihovu apsorpciju su plastičnost, stupanj kristalnosti, polaritet i površina.<sup>18</sup> Prema istraživanju

Chae i sur. (2019.), pokazalo se da PE stupa u interakciju s drugim onečišćujućim tvarima kao što je cinkov oksid, što dovodi do povećanog rasta mikroalgi u morskom okolišu.<sup>42</sup> Štetni učinci mogu varirati od blažih do smrtonosnih kao posljedica gutanja MP-a i njezine bioakumulacije, odnosno biomagnifikacije kroz prehrambeni lanac, čime se povećava koncentracija i potencijalna toksičnost.<sup>15,43</sup> Prema tome, razlikuje se unos MP-a u organizme kao izravan (iz medija) ili neizravan (prijenos hranidbenim lancima). Ljudi unose MP hranom i vodom, a udišu ih i sa zrakom.<sup>10</sup>

MP često konzumiraju zooplankton i školjkaši zbog slične veličine MP-a s organskom tvari kojom se oni hrane te je prisutnost MP-a zabilježena u kozicama, škampima i kamenicama.<sup>19</sup> Kod zooplanktona, nakupljanje MP-a u tijelu između ostaloga utječe na reproduktivni sustav i porast prisutnosti nedoraslih jedinki zooplanktona. MP koja se akumulira u ribama dovodi do odgođenog rasta, smanjene reproduktivnosti, mehanička oštećenja škrge i probavila, metaboličkog, imunološkog i neurotoksičnog poremećaja. MP koja se nalazi u tkivima i mišićima riba posljedično dovodi do štetnih učinaka na ljudsko zdravlje kada se konzumira morska hrana onečišćena MP-om.<sup>19,44</sup> Istraživanja su potvrdila moguće opasnosti od plastičnih čestica trofičkim putem, odnosno MP se preko primarnih potrošača (biljožderi poput zooplanktona, rakova i manjih riba) prenosi do sekundarnih potrošača (mesožderi poput većih riba, glavonožaca i žaba) te do tercijarnih potrošača (mesožderi višeg reda poput morskih pasa, tuljana, ptica, kitova te u konačnici ljudi) i štetno može djelovati na sve sastavnice hranidbenog lanca. Konkretno, toksičnost MP-a utječe na zdravlje izloženih vodenih organizama na različite načine, uključujući smanjenje rasta, disfunkciju reproduktivnog sustava i poremećaj izlijeganja jaja, te fizička (npr. oštećenje gastrointestinalnog trakta može dovesti i do smrti), kemijska (npr. PE s teškim metalom kromom utječe na aktivnosti enzima acetilkolinesteraze) i biološka (npr. dolazi do razvoja otpornost na antibiotike i teške metale) oštećenja vodenih organizama.<sup>39</sup> Vrste rakušaca roda *Daphnia* predstavljaju važnu poveznicu između primarnih proizvođača i konzumenata viših trofičkih razina vodenog ekosustava, stoga ovi organizmi pokazuju visoku osjetljivost na različite onečišćujuće tvari iz okoliša, uključujući i MP.<sup>45</sup> Brojna istraživanja bavila su se procjenom štetnih učinaka MP-a u vodenim ekosustavima, ispitivanjem akutne i kronične toksičnosti na testnom organizmu *Daphnia magna* te drugim rodovima *Daphnia* spp., a neke od provedenih studija prikazane su u tablici 3.

**Tablica 3.** Toksičan utjecaj različitih mikroplastičnih čestica na rodove *Daphnia* spp.

Vrsta	Mikroplastika	Učinak MP-a	Literatura
<i>Daphnia pulex</i>	PS 75 nm, koncentracije 10; 50; 100; 150; 200 i 400 mg/L.	Vrijeme prvog izlijeganja je odgođeno, a ukupni broj potomaka po ženki u 21. danu smanjen (pokazatelj reproduktivne sposobnosti), povećanjem koncentracije MP-a povećava se toksični učinak.	[46]
<i>Daphnia magna</i>	PS 53 nm, koncentracije 0,32 mg/L.	Životni vijek jedinki bio je skraćen za gotovo tri puta.	[47]
<i>Daphnia magna</i>	PS 50; 200 i 500 nm.	Čestice MP-a od 50 nm uzrokuju veću smrtnost.	[48]
<i>Daphnia magna</i>	PE ~10-50 µm	Fragmenti MP-a su imali značajniji toksični učinak od kuglica MP-a zbog duljeg vremena zadržavanja i većih smetnji u probavnom traktu.	[49]
<i>Daphnia magna</i>	PVC 2 ± 1 µm i 50 ± 10 µm	Poremećaj reprodukcije i ekspresije gena povezanih s detoksikacijom i induciranjem oksidativnog stresa.	[50]
<i>Daphnia magna</i>	PET ~20-40 µm	Akutna toksičnosti, odnosno 20 %-tna imobilizacija i smrtnost uočena je pri najvišoj koncentraciji, dok kronična toksičnost uzrokuje značajno veću smrtnost.	[51]

### 2.1.3.2. Kopneni ekosustavi

U poljoprivrednim tlima glavni izvori onečišćenja MP-om su čvrste biološke tvari i komposti, kanalizacijske vode za navodnjavanje, malč folije, polimerna gnojiva i pesticidi te oborine.<sup>10</sup> Zbog manje sposobnosti migracije u tlu, koncentracija MP-a u kopnenom ekosustavu će se s vremenom povećati. Nedavne studije pokazale su da se MP može akumulirati u biljkama i imati negativne učinke na rast biljaka.<sup>52</sup> U radu *Bootsa* i sur. (2019.) trava vrste višegodišnji ljulj (*Lolium perenne*) bila je izložena različitim vrstama MP-a što je posljedično dovelo do inhibicije klijanja sjemena, a poliaktid (PLA) se pokazao kao značajniji inhibitor rasta novih sadnica od konvencionalnog polietilena visoke gustoće (HDPE).<sup>53</sup>

### 2.1.3.3. *Atmosfera*

Čestice MP-a prisutne su i u zraku. Atmosferska MP vlakna potječu od tekstila, a nevlaknaste čestice uglavnom potječu od materijala za pakiranje koji se raspadaju, dok drugi izvori uključuju istrošene gume, boje i industrijske emisije plinova.<sup>10</sup> Atmosferska MP se prenosi vjetrom na velike udaljenosti i može se taložiti u vodenim i kopnenim ekosustavima, što dovodi do ekotoksičnosti i bioakumulacije u organizmima. Izloženost organizama atmosferskim MP-ovima utječe na gutanje, metabolizam i reprodukciju. Udisanje MP-a može uzrokovati zdravstvene rizike i kod ljudi, uključujući oksidativni stres i upalna oštećenja.<sup>54</sup> MP vlakna, kuglice i MAP pronađeni su npr. u stijenci crijeva jastreba što je uzrokovalo krvarenje i začepljenje probavnog trakta.<sup>55</sup> Najnovije istraživanje *Jenner i sur. (2022.)* provedeno na 13 osoba je potvrdilo unos MP-a u ljude inhalacijom te je potvrđena prisutnost MP-a u svim dijelovima pluća 11 ispitanika, s najvećim udjelom PP-a (23 %) i PET-a (18 %).<sup>56</sup>

## 2.2. **Antiviroci**

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, brzi napredak u znanosti i tehnologiji doveo je do značajnog napretka u zdravstvenoj industriji. Međutim, mnoge zarazne virusne bolesti i dalje postoje, dovodeći do negativnih društvenih posljedica, a mnoge su i dalje uzrok smrtnosti u ljudi.<sup>57</sup> Općenito, virusi su glavni patogeni uzročnici niza teških bolesti kod ljudi, životinja i biljaka. Lijekovi koji djeluju protiv virusnih infekcija nazivaju se antivirusni lijekovi, antivirusni.<sup>58</sup> Koronavirusna bolest nazvana COVID-19, koja je započela 2019. godine, izazvala je globalnu zdravstvenu katastrofu kao posljedica teškog akutnog respiratornog sindroma Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) i brzo se proširila da bi postala pandemija 2020. godine.<sup>57</sup> Uz COVID-19, postoje mnoge druge vrste virusa kao što su virus ebole, denge, humane imunodeficijencije (HIV), Nipah (NiV), koronavirus (CoV) i virus gripe (ptičja gripa), koji uzrokuju ozbiljne zdravstvene probleme.<sup>59</sup> Iz tih razloga, potrebno je primijeniti učinkovite antivirusne terapije za liječenje virusnih infekcija. Antivirusni prirodni materijali, kao što su antivirusni peptidi i antivirusni polisaharidi, uništavaju strukturu virusa i ometaju njegov mehanizam infekcije. Međutim, zbog otpornosti patogena na većinu antivirusnih sredstava, postoji potreba za identifikaciju i razvoj novih antivirusnih materijala. Novi materijali moraju imati svojstva hipotoksičnosti, specifično djelovanje, biokompatibilnosti i visoke biorasploživosti.<sup>60</sup> Unatoč različitim zaslugama prirodnih materijala za antivirusne svrhe, oni su slabo topljivi u vodi i osjetljivi na biološku (enzimsku) razgradnju unutar tijela.<sup>57</sup> Neki



antivirusni lijekovi su i preventivni. Oni mogu zaštititi od dobivanja virusnih infekcija ili širenja virusa na druge.<sup>61</sup>

Virusi su sićušni (mikroskopski) uzročnici infekcije koji rastu i razmnožavaju se samo unutar živih stanica organizma. Virusi imaju receptore koji im omogućavaju da se vežu za zdrave stanice (domaćine) u ljudskom tijelu. Jednom kada se virus pričvrsti za stanicu domaćina i uđe u nju, može se replicirati. Stanica domaćin umire, a virus inficira druge zdrave stanice. Antivirusni lijekovi mogu blokirati receptore tako da se virusi ne mogu vezati i ući u zdrave stanice, mogu pojačati imunološki sustav, pomažući mu u borbi protiv virusne infekcije ili smanjiti virusno opterećenje u tijelu.<sup>61</sup> Virusne bolesti mogu se liječiti cjepivima ili lijekovima ovisno o njihovoj dostupnosti u određenom trenutku i opsegu izloženosti. Ključna razlika između cjepiva i antivirusnog lijeka je u tome što se cjepiva mogu primijeniti puno prije izlaganja virusu i mogu pružiti zaštitu tijekom dugog vremenskog razdoblja, dok se antivirusni lijekovi mogu koristiti u liječenju onih organizama koja su već zaražena virusom.<sup>62</sup>

### 2.2.1. Podjela antivirotika

Danas većina dostupnih antivirusnih lijekova dizajnirana je za pomoć u borbi protiv HIV-a, herpes virusa, virusa hepatitisa B i C te virusa influence A i B. Antivirolici se dijele na lijekove koji djeluju na DNA viruse (herpes simpleks 1 i 2, citomegalovirus, Varicella-zaoster virus, virus hepatitisa B), lijekove koji djeluju na RNA viruse (HIV, virus gripe, virus hepatitisa C) i ostale antivirolike.<sup>63</sup> Virusni kao što su poksvirusi, herpes, adenovirusi, papiloma virusi obično sadrže dvolančanu DNA, ostavljajući jednoznamenasti DNA. Kada DNA virus uđe u stanično središte, dovodi do otpuštanja novih virusa. RNA virusi uključuju gripu, ospice, zaušnjake, prehlade, meningitis, polio, retroviruse (AIDS, leukemija), arena viruse s pojedinačnom deskriptorskom RNA (ssRNA). RNA virus ne ulazi u stanično središte. Virusna RNA se koristi za stvaranje DNA kopija virusne RNA, koju organizira genom domaćina nakon kojeg slijede retrovirusi. Virusna infekcija uključuje ulazak virusne DNA u stanicu domaćina, replikaciju DNA i otpuštanje novih virusa.<sup>64</sup> U tablici 4 prikazani su najčešće korišteni antivirusni lijekovi i njihova uloga u liječenju virusa te osnovna fizikalno-kemijska svojstva.

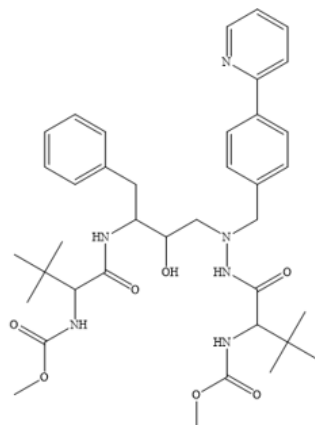
**Tablica 4.** Prikaz najčešće korištenih antivirusnih lijekova s osnovnim fizikalno-kemijskim svojstvima te njihova primjena.

Naziv spoja	Kratica	Molekulska formula	Mr / g/mol	Čistoća	Liječenje
Atazanavir	ATA	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	704,90	96,20 % ± 0,70 %	HIV
Emtricitabine	EMT	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	247,25	99,93 % ± 0,22 %	HIV, hepatitis B
Nirmatrelvir	NIR	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	499,50	≥ 95,00 %	COVID-19
Oseltamivir	OST	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	312,40	99,60 % ± 0,30 %	Gripa
Ribavirin	RIB	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	224,20	99,50 % ± 0,60 %	RSV infekcija, hepatitis C
Sofosbuvir	SOF	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>9</sub> P	529,50	≥ 99,00 %	Hepatitis C

### 2.2.1.1. Atazanavir

Godine 1981. u Sjedinjenim Američkim Državama prepoznata je prva osoba koja je bolovala od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS). Od tada je AIDS privukao pažnju medicinske zajednice i brzo se pojavio kao prijetnja javnom zdravstvu. Otprilike 25 milijuna ljudi umrlo je do sada od ove bolesti. Virus humane imunodeficijencije (HIV) slabi imunološki sustav bolesnika s AIDS-om, što dovodi do toga da ti pacijenti postaju ranjiviji na različite vrste oportunističkih bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija i nekih vrsta raka. Atazanavir (ATA) je peptidomimetički inhibitor proteaze koji je odobren u mnogim zemljama za liječenje odraslih osoba oboljelih od HIV-1. ATA se obično koristi kao prva linija terapije, a u nekim slučajevima se primjenjuje s pojačivačem, ritonavinom, i obično se primjenjuje jednom dnevno.<sup>65</sup> Djelatna tvar, ATA, inhibitor je proteaze. Djeluje tako da blokira enzim naziva proteaza, koji je virusu HIV-a potreban za umnožavanje. Blokiranjem enzima sprječava se umnožavanje virusa, što usporava širenje infekcije. Uz ATA se dodaje i mala doza ritonavira, da pospješi njegovo djelovanje. Ritonavir smanjuje stopu razgradnje ATA, čime se povećava razina ATA u krvi. To omogućava da manja doza ATA postiže isti antivirusni učinak. Kad se uzima u kombinaciji s drugim lijekovima protiv HIV-a, omogućuje smanjenu koncentraciju HIV-a u krvi i održava je na niskoj razini. Lijek ATA ne liječi infekciju HIV-om ni AIDS, ali kada se primjenjuje u kombinaciji s drugim protuvirusnim lijekovima, može odgoditi oštećenje imunskog sustava te

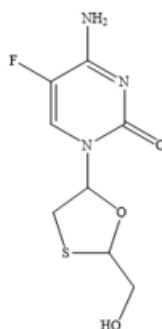
razvoj infekcija i bolesti povezanih s AIDS-om.<sup>66</sup> Na slici 4 možemo vidjeti strukturnu formulu molekule ATA.



**Slika 4.** Strukturna formula molekule atazanavira (ATA).

### 2.2.1.2. Emtricitabin

Emtricitabin (EMT) je nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze, a djeluje tako da ometa normalan rad enzima (reverzne transkriptaze) koji je ključan za reprodukciju virusa. EMT djeluje i protiv virusa HIV-a i protiv virusa hepatitisa B. EMT je indiciran u kombinaciji s drugim antiretrovirusnim lijekovima.<sup>67</sup> Na slici 5 je prikazana strukturna formula molekule EMT.

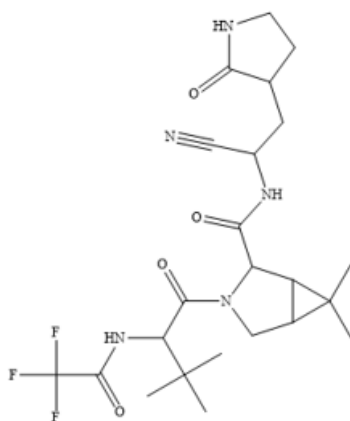


**Slika 5.** Strukturna formula molekule emtricitabina (EMT).

EMT, na mnogo načina sličan lamivudinu, ima *in vitro* djelovanje protiv HIV-1 koje je četiri do deset puta jače od djelovanja lamivudina.  $EC_{50}$  za EMT je u rasponu od 0,0013–0,64  $\mu\text{mol/L}$  za laboratorijske i kliničke izolate HIV-1 u kulturi stanica. Protiv HIV-2,  $EC_{50}$  je u rasponu od 0,007 do 1,5  $\mu\text{mol/L}$ . EMT se brzo i opsežno apsorbira nakon oralne primjene.<sup>68</sup>

### 2.2.1.3. Nirmatrelvir

Nirmatrelvir (NIR) je antivirusni lijek koji djeluje kao oralno aktivni inhibitor proteaze slične 3C (3CLpro) ili glavne proteaze (Mpro). Dio je kombinacije nirmatrelvir/ritonavir koja se koristi za liječenje COVID-19 i prodaje se pod markom Paxlovid. Antivirusni lijek NIR može spriječiti replikaciju SARS-CoV-2 putem inhibicije Mpro. U ovoj kombinaciji ritonavir djeluje kao farmakološki pojačivač jer produžuje poluživot NIR-a. NIR pokazuje snažnu antivirusnu aktivnost protiv trenutnih varijanti koronavirusa, unatoč značajnim promjenama u virusnom genomu SARS-CoV-2.<sup>69</sup> Na slici 6 je prikazana strukturna formula NIR-a.

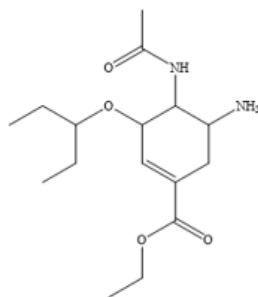


**Slika 6.** Strukturna formula molekule nirmatrelvira (NIR).

NIR je lijek koji inhibira enzim 3CLpro kod SARS-CoV-2, dok je ritonavir inhibitor HIV proteaze. Ritonavir inhibira enzim odgovoran za metabolizam NIR-a, što produljuje prisutnost NIR-a u tijelu i pojačava njegovu aktivnost.<sup>70</sup> NIR je pokazao značajno antivirusno djelovanje protiv SARS-CoV-2. Citotoksični učinci nisu uočeni pri dozama nižim od 3  $\mu\text{mol/L}$ . Znanstvenici su zarazili mišji model SARS-CoV-2 kako bi procijenili učinkovitost NIR-a *in vivo*. NIR je značajno smanjio gubitak težine kao i stopu smrtnosti u usporedbi s kontrolom.<sup>71</sup>

### 2.2.1.4. Oseltamivir

Oseltamivir (OST) je lijek za gripu, odnosno za liječenje i sprječavanje influence A i B te je siguran i učinkovit lijek svih poznatih tipova virusa influence. Ublažuje i skraćuje trajanje simptoma te smanjuje učestalost karakterističnih komplikacija nakon gripe (bronhitis, pneumonija, otitis). Liječenje OST znatno smanjuje uporabu antibiotika, hospitalizaciju bolesnika i stopu smrtnosti.<sup>72</sup> Na slici 7 je prikazana strukturna formula OST-a-

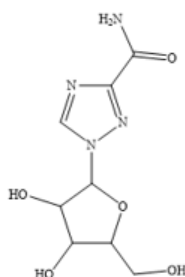


**Slika 7.** Strukturna formula molekule oseltamivira (OST).

Danas je u širokoj uporabi inhibitor neuraminidaze OST, koji se nakon peroralne (gutanje) primjene dobro resorbira i dospijeva u sve dijelove dišnoga sustava.<sup>73</sup> Enzimski aktivnost neuraminidaze očituje se djelovanjem na sialičnu kiselinu koja razgrađuje staničnu stijenu i tako omogućuje izlazak i širenje virusa iz inficirane stanice. Blokiranjem virusne neuraminidaze onemogućuje se oslobađanje virusa iz stanice, i to upravo radi OST.<sup>72</sup> Enzimi neuraminidaze pojavljuju se u svim organizmima, od virusa do bakterija, gljiva i sisavaca.<sup>74</sup>

#### 2.2.1.5. Ribavirin

Ribavirin (RIB), poznat i kao tribavirin, je antivirusni lijek koji se koristi za liječenje RSV infekcije (respiratorni sincicijski virus), hepatitisa C i nekih virusnih hemoragijskih groznica.<sup>75</sup> Tijekom posljednja tri desetljeća, *in vitro* i kliničke studije s ispitivanjem RIB-a pokazale su da djeluje protiv brojnih RNA i DNA virusa.<sup>76</sup> Metabolit koji nastaje razgradnjom RIB-a ima veći udio pri mokrenju nakon oralne, nego nakon intravenske primjene, što ukazuje da se udio lijeka smanjuje u probavnom traktu i jetri.<sup>77</sup> Eliminacija RIB-a odvija se metabolizmom i eliminacijom putem bubrega.<sup>73</sup> RIB se opisuje kao prvi antivirusni lijek koji može smanjiti smrtnost u vrlo smrtonosnoj sistemskoj bolesti za više od 90 %.<sup>78</sup> Na slici 8 je prikazana strukturna formula RIB-a.

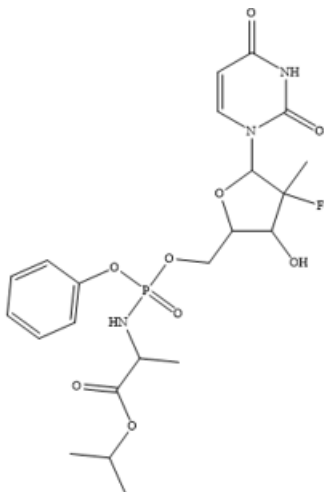


**Slika 8.** Strukturna formula molekule ribavirina (RIB).

Brzo širenje koronavirusne bolesti 2019. godine povećalo je potrošnju nekih antivirusnih lijekova, pri čemu se oni ispuštaju u otpadne vode, što predstavlja rizik za ekosustav i zdravlje ljudi. Razvoj NOP-a omogućava uklanjanje nepoželjnih lijekova. U radu Wu i sur. (2022.) sustavno je istražena evolucija toksičnosti antivirusnog lijeka RIB-a tijekom njegove razgradnje putem UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NOP-a. Pod optimalnim uvjetima, RIB je gotovo potpuno eliminiran unutar 20 minuta, iako je stopa mineralizacije bila neadekvatna.<sup>79</sup>

### 2.2.1.6. Sofosbuvir

Sofosbuvir (SOF) je klinički odobren lijek protiv virusa hepatitisa C te je sposoban suzbiti druge obitelji virusa s pozitivnim lancem RNA. Koronavirusi su obitelj virusa s pozitivnim lancem RNA s očuvanom polimerazom, tako da je vrlo vjerojatno da će SOF učinkovito inhibirati SARS-CoV-2.<sup>80</sup> Na slici 9 je prikazana strukturna formula SOF-a.



**Slika 9.** Strukturna formula molekule sofosbuvira (SOF).

SOF je spoj visoke topljivosti i niske propusnosti. Lijek pokazuje snažno antivirusno djelovanje, čak više od 90 %.<sup>80</sup> Neke od karakteristika SOF-a su da ima visoku stopu izlječenja, niske nuspojave, značajnu učinkovitost, kratko razdoblje primjene, dobru podnošljivost i snažnu otpornost.<sup>81</sup>

### 2.2.2. Prisutnost antivirotika u okolišu i potencijalni štetni učinci

Tijekom proteklih nekoliko godina, kontinuirano ispuštanje i postojanost antivirusnih lijekova u okolišu, čak i u koncentracijama u tragovima, postalo je novi ekološki problem koji može izazvati toksični utjecaj na organizme prisutne u okolišu.<sup>62</sup> S obzirom na toksičnost prema algama, planktonskim račićima vodenubhama te ribama navodi se da su antivirusni lijekovi

među najopasnijim terapijskim klasama.<sup>82</sup> Antivirolici uneseni različitim putevima u okoliš pronalaze svoj put do hranidbenog lanca i mogu ometati ili interferirati s prirodnim biološkim sustavima živih organizama. Antivirusni lijekovi u okolišu privukli su pozornost zbog nemogućnosti potpune razgradnje u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda te posljedično pronalaze svoj put do površinskih i podzemnih izvora. Na svjetskoj razini, antivirolici su slabo istraženi, odnosno nedostaju saznanja o upotrebi i ispuštanju u okoliš, stoga je cilj znanstvenika istražiti sudbinu, učinke i utjecaj antivirusnih lijekova na okoliš.<sup>62</sup> Nakon unošenja antivirusnika u okoliš, mogu se pojaviti različite strukturne promjene koje su rezultat biotičkih i abiotičkih procesa.<sup>83</sup>

### 2.2.2.1. Vodeni ekosustav

Antivirolici najčešće dospiju u vodeni ekosustav nakon što se ispuste iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda zbog nedovoljne učinkovitosti konvencionalnih metoda obrade pri njihovu uklanjanju iz vode. *Straub* (2009.) je utvrdio da je OST postojan, ali na temelju standardnih testova kronične toksičnosti zaključio da OST ne predstavlja značajan rizik za postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ili okolišnih površinskih voda.<sup>74</sup> *Kummerer* (2009.) je predložio moguće mjere za smanjenje opterećenja okoliša farmaceutskim proizvodima. Jedna od mjera je obrada otpadnih voda farmaceutске industrije prije njihovog ispuštanja u okoliš korištenjem NOP-a ili adsorpcije.<sup>84</sup> Farmaceutska industrija također bi trebala objavljivati podatke o utjecajima aktivnih farmaceutskih sastojaka na komponente okoliša. Potrebne su stroge zakonske mjere za pravilno zbrinjavanje lijekova kojima je istekao rok trajanja. Antivirusni lijekovi uvelike se razlikuju po svojoj molekularnoj težini i kemijskoj strukturi, pa stoga postoji mogućnost da će pokazati različitu prirodu ponašanja u okolišu.<sup>62</sup>

Podaci o akutnoj ekotoksičnosti famciklovira i ritanovira u vodi ukratko pokazuju visok potencijal ekotoksičnosti.<sup>85,86</sup> Zidovudin, antiretrovirusni lijek, ima karcenogeni potencijal i klasificiran je u skupinu koja predstavlja moguće kancerogene tvari kod ljudi.<sup>87</sup> Lijekovi u visokim koncentracijama mogu imati toksične učinke na vodene organizme, poput algi, bakterija, zooplanktona, riba, a u konačnici i na ljude.<sup>83</sup> Antivirusni spojevi didanozin, famciklovir, stavudin i zalcitabin nisu akutno toksični na *Daphnia* spp. na razinama ispod 820 mg/L.<sup>88</sup> U tablici 5 je prikazana toksičnost raznih antivirusnih lijekova pronađenih u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda i u površinskim vodama.

**Tablica 5.** Toksičnost antivirusnih lijekova na različite testne organizme.

Vrsta	Antivirotik	Učinak	Literatura
<i>Daphnia magna</i>	Lamivudin, koncentracije 10 i 100 µg/L	Smrtnosti od 100 % pri izloženosti od 100 µg/L, te pri 10 µg/L smrtnost od 45 % nakon 48-satnog izlaganja. Nema mutagenog učinka.	[89]
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Aciklovir, lamivudin i zidovudin koncentracije 20 mg/L te efavirenz koncentracije 1 mg/L	Zidovudin (IC <sub>50</sub> = 5,442 mg/L) < aciklovir (IC <sub>50</sub> = 3,612 mg/L) < lamivudin (IC <sub>50</sub> = 3,013 mg/L) < efavirenz (IC <sub>50</sub> = 0,034 mg/L).	[90]
<i>Raphidocelis subcapitata</i>		Zidovudin (EC <sub>50</sub> = 5,671 mg/L) < aciklovir (EC <sub>50</sub> = 3,062 mg/L) < lamivudin (EC <sub>50</sub> = 1,345 mg/L) < efavirenz (EC <sub>50</sub> = 0,026 mg/L).	
<i>Daphnia magna</i>	Aciklovir	Tijekom biološke obrade otpadnih voda, aciklovir se pretvara u karboksi-aciklovir i kao takav smanjuje razinu reprodukcije (za 40 % pri 102 mg/L).	[91]
<i>Danio rerio</i>	Lopinavir i ritonavir, koncentracije 10 mg/L	Lopinavir uzrokuje ozbiljne probleme, uključujući edem perikarda i skraćivanje repa, što utječe na ponašanje, dok ritonavir nije pokazao toksičan učinak.	[92]
<i>Allivibrio fischeri</i>		Lopinavir utječe na oksidativni stresa, a ritonavir nije pokazao toksičan učinak.	

#### 2.2.2.2. Kopneni ekosustav

Antivirusni lijekovi najčešće dospiju u tlo, uglavnom na poljoprivredna tla, putem aktivnog mulja nakon obrade otpadnih ili farmaceutskih voda jer nemaju mogućnost potpunog uklanjanja, kao i navodnjavanjem onečišćenom vodom. Tenofovir se izlučuje urinom te putem kanalizacijskog sustava dolazi do sustava obrade voda i ostaje nepromijenjen u aktivnom mulju. *Al-Rajab* i sur. (2010.) izvijestili su da je tenofovir u tragovima postojan u tlu, ali ga biorazgrađuju aerobni mikroorganizmi.<sup>93</sup> Do sada postoji mali broj istraživanja o pronalasku antivirusnih lijekova u sedimenatima, mulju i tlu.<sup>94</sup> U istraživanju kojeg su proveli znanstvenici iz Ujedinjenog Kraljevstva i Kenije s antivirusnim lijekovima evirapin, lamivudin i efavirenz, koji se koriste za liječenje i prevenciju HIV-a te lijekom OSE, koji zaustavlja širenje virusa gripe, otkriveno je da je zelena salata izložena višim koncentracijama ove četiri vrste antivirusnika za više od trećine manja u biomasi od one uzgojene u okruženju bez farmaceutika.<sup>95</sup>



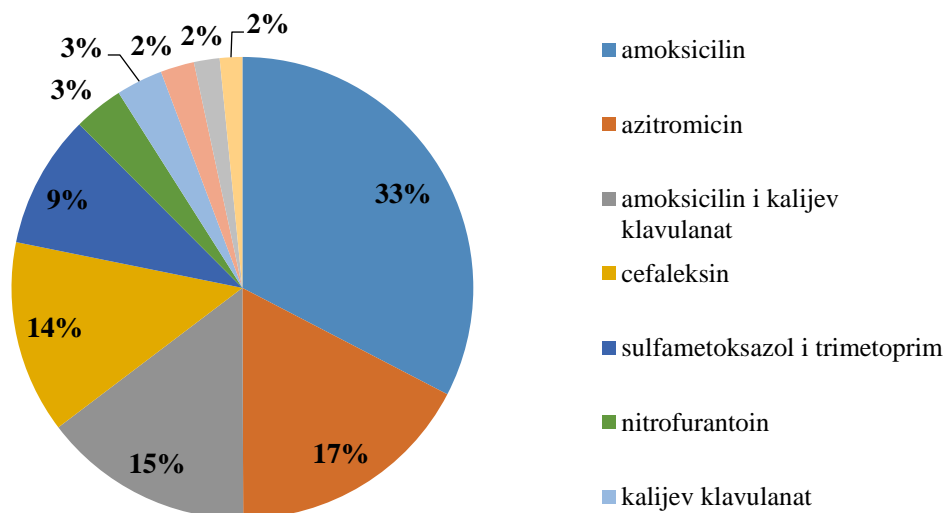
## 2.3. Antibiotici

Globalna uporaba antibiotika u stalnom je porastu tijekom proteklih desetljeća, kako zbog povećanja upotrebe antibiotika u humanoj medicini tako i u drugim sektorima komercijalne djelatnosti.<sup>96</sup> Antibiotici su naširoko korištena klasa lijekova koji su učinkoviti u liječenju bakterijskih infekcija kod ljudi i životinja, ubijanjem bakterija ili sprječavanjem njihovog rasta i razmnožavanja zbog njihove funkcionalne skupine.<sup>78</sup> Razvoj antibiotika seže od otkrića penicilina, kojeg je otkrio Alexander Fleming 1929. godine. Ovo se često opisuje kao jedno od najvažnijih medicinskih otkrića 20. stoljeća jer je omogućilo zaustavljanje zaraznih patogena kao što je *Staphylococcus aureus*, vodeći uzrok smrti u europskim bolnicama u to vrijeme.<sup>96</sup>

### 2.3.1. Podjela antibiotika

Antibiotici se klasificiraju prema antibakterijskom djelovanju i kemijskoj strukturi. S obzirom na broj bakterija na koje imaju učinak, antibiotici koji djeluju na pojedine vrste bakterija nazivamo antibiotici uskoga spektra djelovanja, a oni koji djeluju na više vrsta bakterija su antibiotici širokoga spektra djelovanja. Prema mehanizmu djelovanja, antibiotici bakterijama mogu onemogućavati sintezu stanične stijenke (penicilini, cefalosporini), inhibirati DNA-girazu (ciprofloksacin, norfloksacin), DNA-ovisnu RNA-polimerazu (rifampicin) ili biosintezu proteina (tetracikilini, azitromicin) i djelovati na metabolizam folne kiseline (sulfonamidi, trimetoprim).<sup>97</sup> Antibiotici se koriste za liječenje raznih oboljenja, od bolnog grla ili upale uha, do infekcija raznih organa, kao i npr. svrbeža kože. Antibiotici su jedni od najčešće korištenih lijekova u medicini. Tvrtka „*Definitive Healthcare*“ iz Sjedinjenih Američkih Država (SAD) predstavila je podatak o deset najčešće korištenih antibiotika u 2022. godini, te se među njima ističe amoksisilin, koji je činio 29 % ukupno propisanih antibiotika (slika 10). Amoksisilin se koristi za liječenje bakterijskih infekcija kao što su upala pluća, bronhitis, određena stanja kože te infekcije bubrega i krvi. Amoksisilin pripada skupini lijekova penicilina. Na drugom mjestu je AZ, koji je činio 15,4 % svih propisanih antibiotika u 2022. godini u SAD-u. AZ pripada skupini antibiotika makrolida i često se koristi za liječenje kožnih bolesti poput akni, spolno prenosivih infekcija i određenih respiratornih infekcija. Pacijentima se često propisuje AZ ako su alergični na penicilin. Kombinirani antibiotik, amoksisilin-klavulanat kalij, bio je treći najčešće propisivani antibiotik, čineći 13,1% recepata u 2022. godini u SAD-u. Klavulanat kalij pomaže u sprječavanju da određene bakterije postanu otporne

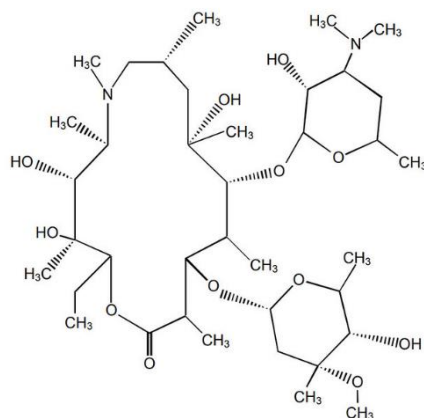
na amoksicilin. Dodavanjem ove kemikalije, amoksicilin može ostati aktivan dulje vrijeme u tijelu.<sup>98</sup>



**Slika 10.** Grafički prikaz 10 najčešće korištenih antibiotika u 2022. godini u SAD-u.<sup>98</sup>

### 2.3.1.1. Azitromicin

Azitromicin (AZ) je polusintetski makrolidni antibiotik s 15-članim prstenom, što možemo vidjeti na slici 11, koji se veže na podjedinicu ribosoma 50s osjetljivih mikroorganizama te ometa njihovu sintezu proteina i ubija patogene bakterije.<sup>99</sup> AZ ima ulogu antibakterijskog lijeka te je koristan za liječenje bakterijskih infekcija poput respiratornih bolesti (upala pluća), akutne infekcije sinusa i uha, akutnog pogoršanja kroničnog bronhitisa i infekcije grla i krajnika te infekcije kože. AZ se smije koristiti samo za liječenje ili prevenciju infekcija za koje je dokazano ili se sumnja da su uzrokovane osjetljivim bakterijama kako bi se spriječio razvoj antimikrobne rezistencije i održala učinkovitost AZ-a.<sup>100</sup>



**Slika 11.** Strukturna formula molekule azitromicina (AZ).<sup>101</sup>

AZ se eliminira putem jetre te upravo ima toksičan utjecaj na ovaj organ. U ispitivanjima na životinjama nisu primijećeni štetni učinci na fetus. Nisu provedena dugotrajna ispitivanja na životinjama za proučavanje karcinogenog potencijala. AZ nije pokazao mutagenu toksičnost u standardnim laboratorijskim ispitivanjima ni negativan učinak na plodnost.<sup>100</sup> Utvrđeno je da se AZ nalazi u bolničkim otpadnim vodama, otpadnim vodama u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, gradskim otpadnim vodama i jezerima, što ukazuje da je AZ česta vrsta onečišćujuće tvari u vodama.<sup>99</sup> Prema Soasa i sur. (2019.) iz prikupljenih 120 okolišnih uzoraka, AZ je identificiran analitičkim metodama u površinskim vodama rijeka Ave i Sousa.<sup>102</sup>

Prisutnost mikroonečišćujućih tvari u okolišu uzrokovana njihovim kontinuiranim i nekontroliranim ispuštanjem u okoliš te otpornosti na razgradnju može uzrokovati neželjene učinke na ekosustave kao rezultat dugotrajne izloženosti i razvoja rezistentnih bakterija.<sup>102</sup> AZ je uvršten na EU „*Watch List*“ u okviru praćenja vodne politike Odlukom (EU, 2020.), odnosno to je popis praćenja novih onečišćujućih tvari (engl. *Watch list contaminants of emerging concern*). Popis sadrži 10 grupa spojeva, odnosno ukupno 17 organskih spojeva.<sup>103</sup> Još uvijek postoji nedostatak znanja o toksikološkim učincima AZ. Ovaj makrolid pojavljuje se u visokim koncentracijama u vodenom okolišu i može predstavljati prijetnju vodenim organizmima, stoga je u tablici 6. prikazan utjecaj AZ na različite vrste vodenih organizama.<sup>104</sup>

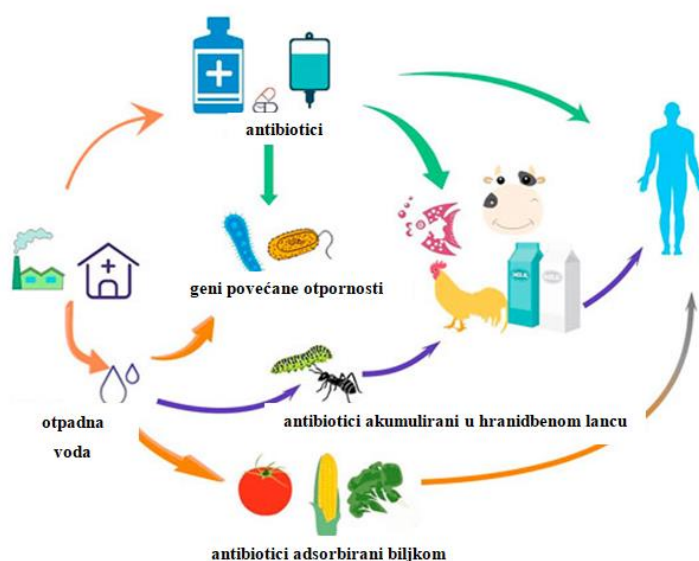
**Tablica 6.** Prikaz utjecaja azitromicina na različite vrste organizama.

Vrsta	Učinak / EC <sub>50</sub>	Literatura
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Negativan utjecaj na proces fotosinteze, brzinu rasta i veličinu stanica mikroalge, uzrokuje oksidativni stres.	[104]
<i>Danio rerio</i>	Smanjenje ukupnih razina proteina, fiziološke promjene, oksidativni stres i neurotoksičnost.	[105]
<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50</sub> za primijenjeni AZ iznosio je 30,26×10 <sup>-5</sup> mol/L. Pokazalo se da je toksičnost veća za različite smjese AZ s drugim antibioticima u odnosu na pojedinačnu toksičnost.	[106]
<i>Daphnia magna</i>	Inhibicija hranjenja, smanjenje aktivnosti amilaze i tripsina, povećan oksidativni stres.	[107]

### 2.3.2. Prisutnost antibiotika u okolišu i potencijalni štetni učinci

Otkako je penicilin prvi put korišten za liječenje bakterijskih infekcija, stotine antibiotika razvijeni su za očuvanje zdravlja ljudi i životinja. Zbog njihovog pozitivnog učinka,

uporaba antibiotika uvelike poboljšava razinu prevencije kod liječenja ljudskih i životinjskih zaraznih bolesti, što je bilo korisno za zaštitu zdravlja ljudi i razvoja industrije za uzgoj životinja. Zbog velike potrošnje antibiotika, povećala se i količina odbačenih antibiotika u okoliš kroz urin, izmet, otpadne vode s poljoprivrednih farmi te drugi poljoprivredni otpad.<sup>99</sup> Antibiotici ulaze u mora, rijeke i jezera putem otpadnih voda i nakupljaju se u sedimentu i tlu, gdje ih unose biljke i životinje, kao što je prikazano na slici 12.<sup>108</sup> Onečišćenje antibioticima slabo je regulirano na lokalnoj i globalnoj razini te se molekule antibiotika sve više nalaze u kopnenom, slatkovodnom i morskom okolišu.<sup>96</sup>



Slika 12. Put prijenosa antibiotika u okolišu.<sup>108</sup>

### 2.3.2.1. Vodeni ekosustav

Danas se posvećuje velika pažnja utjecaju antibiotika na vodene organizme koji žive u različitim vodenim ekosustavima. Antibiotici se samo djelomično uklanjaju putem konvencionalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda i prema tome, ostatak antibiotika se kontinuirano oslobađa u okoliš te zatim dolaze do površinskih voda, podzemnih voda ili sedimenata.<sup>18</sup>

Razine toksičnosti za ljude često su poznate, no postoji relativno malo informacija o toksičnim koncentracijama za životinje, posebno manjih i osjetljivijih organizama.<sup>109</sup> Pokazalo se da niske koncentracije uobičajenih antibiotika kao što su streptomycin i eritromicin imaju toksični učinak na preživljavanje i ponašanje *Daphnia magna* i *Artemia* u laboratorijskim uvjetima.<sup>110</sup> Daljnje studije otkrile su da se toksičnost antibiotika može pojačati nakon izlaganja UV zračenju, što dovodi do poteškoća u procjeni rizika povezanog s onečišćenjem antibioticima

u prirodnom okolišu kada se testira u laboratorijskim uvjetima.<sup>111</sup> *Brain* i sur. (2008.) otkrili su da tetraciklinski i sulfonamidni antibiotici inhibiraju rast algi utječući na njihovu replikaciju kloroplasta, transkripciju/translaciju i metaboličke putove.<sup>112</sup> Alge su najosjetljivija trofička skupina na antibiotike.<sup>1</sup> Toksičnost antibiotika u vodenim ekosustavima ovisi o njihovoj koncentraciji, vremenu izloženosti, prisutnosti drugih antibiotika ili drugih onečišćujućih tvari te vrsti akvatičkih organizama na koje djeluju.<sup>113</sup> U tablici 7 prikazani su različiti antibiotici i njihovi učinci na različite okolišne organizme u vodenom okolišu. *Välitalo* i sur. (2017.) su u svom radu prezentirali antibiotike visokog ekotoksikološkog značaja i maksimalne koncentracije pronađene u uzorcima vode. Tako je maksimalna koncentracija norfloksacina izoliranog iz riječnog ekosustava u Australiji bila 1,15 g/L, a u Kini iz otpadnih voda 3,7 g/L, dok je visoka koncentracija antibiotika sulfametoksazola od 13,8 g/L određena u Keniji. AZ je u studijama iz SAD-a i Slovačke pronađen u koncentracijama od 1,5 g/L, odnosno 1,2 g/L. Navedeni antibiotici pripadaju skupini penicilina, sulfonamida, makrolida i kinolona te čine najveći udio antibiotika koje konzumiraju ljudi na globalnoj razini.<sup>114</sup> Prema istraživanju *Desbiollesa* i sur. (2018.) prosječna koncentracija AZ u vodi prije COVID 19 iznosila je 2 ng/L zimi, odnosno 1 ng/L ljeti, dok je nakon COVID 19 iznosila ~7 ng/L i zimi i ljeti.<sup>115</sup> *Hanamoto* i sur. (2019.) također su potvrdili povećanje koncentracije AZ, ali u sedimentu, s 1 ng/g na 5 ng/g zimi i 2 ng/g do 7 ng/g ljeti.<sup>116</sup>

**Tablica 7.** Prikaz učinaka antibiotika na vodene okolišne organizme.

<b>Vrsta</b>	<b>Antibiotik</b>	<b>Učinak</b>	<b>Literatura</b>
6 različitih vrsta riba ( <i>Salmo trutta</i> , <i>Lepomis macrochirus</i> , i dr.)	Akriflavin, nitrofurazon i loracarbef	Sve su ribe podjednako osjetljive na ova tri spoja. EC <sub>50</sub> u rasponu od 13,5 do 48 mg/L.	[117]
<i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Daphnia magna</i> , i <i>Musca domestica</i>	Nitrofurazon	Alge su osjetljivije od beskralješnjaka ili riba.	[118]
<i>O. mykiss</i> , <i>Salvelinus namaycush</i> i <i>Salmo trutta</i>	Timerosal	Toksičan za sve ribe. EC <sub>50</sub> u rasponu od 2,1 do 54 mg/L.	[117]
<i>Chlorella</i> sp. i <i>Selenastrum capricornutum</i>	Metronidazol	EC <sub>50</sub> u rasponu od 12,5 do 39,1 mg/L.	[119]
<i>Daphnia magna</i>	Oksolinska kiselina	EC <sub>50</sub> je 4,6 mg/L.	[120]

### 2.3.2.2. *Kopneni ekosustav*

Otpuštanje sve veće količine antibiotika u tlo stvara potencijalnu prijetnju svim mikroorganizmima na tom području. Ovo predstavlja svjetski javnozdravstveni problem zbog pojave bakterijske rezistencije na antibiotike. Kada antibiotici dospiju u tlo, glavni procesi koji određuju njihovu postojanost su sorpcija na organske čestice i razgradnja, a njihova postojanost ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima, karakteristikama tla i klimatskim čimbenicima (temperatura, količina padalina i vlažnost zraka).<sup>121</sup> Antibiotici smanjuju brzinu klijanja sjemena biljaka, inhibiraju rast korijena, štetno djeluje na razmnožavanje te utječu na fiziološke i biokemijske pokazatelje biljaka, a učinak ovisi o vrsti antibiotika i koncentraciji te kombiniranom učinku s drugim onečišćujućim tvarima. *Ji i sur. (2015.)* su utvrdili da klortetraciklina i oksitetraciklina pri koncentraciji od 100 mg/kg inhibiraju rast glista.<sup>122</sup> Istraživački tim *Danilova i sur. (2020.)* je dokazao da antibiotik oksitetraciklin nije imao nikakav negativan učinak na broj gljiva u tlu, ali se značajno smanjio broj bakterijskih kultura.<sup>123</sup>

## 2.4. Testovi toksičnosti

Ekotoksikologija je znanost koja istražuje štetne učinke ksenobiotika na pojedinačne organizme ili složene zajednice. Rezultati ekotoksikoloških istraživanja koriste se za predviđanje opasnosti i rizika za okoliš uzrokovane određenim kemijskim tvarima. Opasnost od kemijskih tvari proizlazi iz njihove strukture, njihovih intrinzičnih fizikalno-kemijskih, bioloških i ekoloških svojstava, ali prije svega njihove bioraspoloživosti i potencijalnog štetnog učinka na žive organizme. Onečišćujuće tvari obično su složene mješavine različitih kemijskih oblika i vrsta, koje pokazuju varijabilnu bioraspoloživost i interakcije s biotičkim i abiotičkim dijelovima okoliša.<sup>124</sup> Kako bi se utvrdili toksični učinci određene onečišćujuće tvari provode se testovi toksičnosti na organizmima poput morske bakterije (*Vibrio fischeri*; ISO 11348:2007), kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*; ISO 19040-1:2018), slatkovodnih i morskih algi (*Skeletonema* sp. i *Phaeodactylum tricornutum*; ISO 10253:2016; OECD 201:1984) te drugih beskralješnjaka poput planktonskog račića vodenbuhe (*Daphnia magna*; ISO 6341:20122) i kralješnjaka poput manjih riba odnosno njihovih embrija (*Danio rerio*; ISO 15088:2007; ISO 21115:RTgill-W1). Svi testovi toksičnosti moraju biti standardizirani, stoga se provode prema ISO i OECD normama.<sup>125</sup>

Razlikujemo *in vivo* i *in vitro* testove toksičnosti. Testovi toksičnosti na živim organizmima (*in vivo*) provode se u laboratorijima, na točno određenim testnim modelima i u dobro kontroliranim uvjetima. Vrsta testnog organizma odabire se prema potrebama i ciljevima

eksperimenta.<sup>126</sup> Testovi toksičnosti *in vitro* mogu se općenito definirati kao testiranja na dijelovima organizama koji su izolirani i uzgajani ili održavani u kontroliranim uvjetima. To uključuje dijelove tkiva, izolirane organe, izolirane primarne stanične kulture, kulture eksplantata, stanične linije, pa čak i substanične frakcije poput mitohondrija, mikrosoma, čak i membrana.<sup>127</sup> Vrste štetnih učinaka mogu biti akutna, subkronična i kronična toksičnost, mutagenost, kancerogenost, genotoksičnost, teratogenost, reproduktivna toksičnost, ekotoksičnost i ostali štetni učinci.

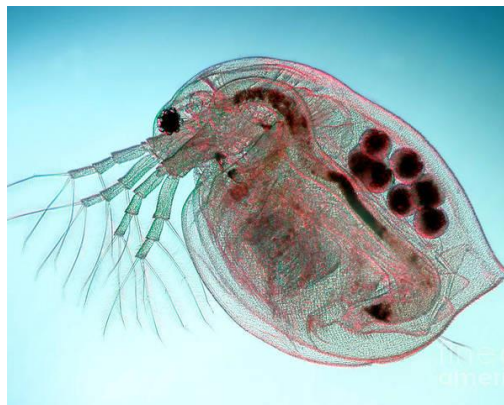
Postoje tri osnovne vrste interakcija, a to su aditivnost, sinergizam i antagonizam. Toksičnost kao rezultat kombinacije dviju tvari koja je jednaka zbroju toksičnosti svake od njih nazivamo aditivnost.<sup>128</sup> Svako odstupanje od aditivnosti klasificira se kao sinergizam ili antagonizam. Sinergizam se može definirati kao kombinirani učinak koji je veći od aditivnog učinka, dok je antagonizam kombinirani učinak koji je manji od aditivnog učinka. Sinergizam se smatra negativnijim učinkom, dok antagonizam može predstavljati pozitivan učinak u kombinaciji dviju tvari.<sup>129</sup> Kada se koriste u kombinaciji, lijekovi međusobno djeluju na mnoge neočekivane načine i pokazuju mnoštvo različitih ishoda. Sinergističke kombinacije lijekova imaju cilj povećati učinkovitost lijeka i pokazale su se visoko učinkovitima. Nasuprot tome, antagonizam lijekova uglavnom je nepoželjan, ali bi mogao biti koristan u selekciji protiv mutacija otpornih na lijekove.<sup>130</sup> Prema *Huangu* i sur. (2019.) 24-satnim izlaganjem nanočesticama srebra, Ag (~10 nm) i nanočesticama PS-a (~20 nm) sinergistički se stimulira toksičnost kod slatkovodnih algi, *Chlamydomonas reinhardtii* i *Ochromonas danica*.<sup>131</sup> *Davarpanah* i *Guilhermino* (2019.) otkrili su da smjese koje sadrže niže i srednje koncentracije nanočestica zlata, Au i MP-a nisu izazvale značajno smanjenje brzine rasta, dok su smjese koje sadrže visoke koncentracije nanočestica Au i MP-a bile toksične i značajno su smanjile brzinu rasta morske alge, *Tetraselmis chuii*. Zajedničko izlaganje nanočesticama Au (~5 nm) i MP-a (1–5 µm) tijekom 21-dnevnog kroničnog testa na *Daphnia magna* rezultiralo je višom toksičnošću koja je izazvala poremećaj rasta i reprodukcije te smrtnost, u odnosu na njihovo pojedinačno izlaganje. Veća toksičnost, koju pokazuje smjesa, rezultat je ovisnosti koncentracija nanočestica Au i MP-a i njihovih interakcija, što pokazuje sinergistički učinak.<sup>131</sup>

#### 2.4.1. Testovi toksičnosti s *Daphnia magna*

Primjena *Daphnia magna* u toksikološkim studijama započela je 1944. godine kada je Anderson upotrijebio planktonske račiće za procjenu toksičnosti tvari pronađenih u industrijskim otpadnim vodama. Nakon toga su 1960-ih godina objavljeni protokoli testova

akutne toksičnosti s *Daphnia magna*, te danas predstavljaju jedno od najčešće korištenih testova u procjeni toksičnosti različitih kemijskih spojeva.<sup>2</sup>

Rod *Daphnia* (vodenbuhe) uključuje više od 100 različitih vrsta slatkovodnih planktonskih račića iz podreda rašljoticalaca (*Cladocera*), od kojih se velika vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) najčešće koristi u testovima toksičnosti. Vodenbuhe se hrane filtrirajući bakterije, alge, cijanobakterije, protozoe i druge male lebdeće čestice u vodi, te imaju ključnu ulogu kao primarni potrošači u slatkovodnom hranidbenom lancu, a služe i kao hrana za druge grabežljive beskralješnjake i ribe. Vodenbuhe su bezbojne životinje zbog prozirnog hitinskog oklopa koji štiti prsni koš i trbuh, veličine od 0,5 do 6 mm, odnosno odrasla jedinka obično od 5 do 6 mm. Imaju udove s nastavcima koji služe kao aparat za hranjenje i disanje jer stvaraju vodenu struju koja usmjerava hranu izravno u usta, a zatim u donju čeljust gdje se hrana mehanički obrađuje. Karakteristične značajke vodenbuha su jedno veliko složeno oko i dva para jako razgranatih antena koje služe za kretanje, što možemo vidjeti na slici 13.<sup>131</sup> Za vodenbuhe je karakteristična izmjena spolnog i nespolnog načina razmnožavanja, ciklička partenogoneza, kada se u povoljnim uvjetima potomci razvijaju iz neoplođenih jajnih stanica vodenbuhe, a kao odgovor na pogoršanje okolišnih uvjeta nastupa spolno razmnožavanje i razvoj jaja obavijenih debelim zaštitnim ljuskama, koja su sposobna preživjeti nepovoljne vanjske uvjete.



**Slika 13.** Prikaz testnog organizma vodenbuhe *Daphnia magna*.<sup>132</sup>

(preuzeto iz <https://fineartamerica.com/featured/water-flea-daphnia-magna-ted-kinsman.html?product=poster>)

*Daphnia magna* ima brojne prednosti koje je čine prikladnim modelnim organizmom u testovima toksičnosti, kao što su veličina i prozornost tijela, kratak životni ciklus, visoka plodnost i partenogenetska reprodukcija te jednostavan uzgoj. Pokretljivost vodenbuhe je lako uočiti, stoga se ova značajka koristi kao krajnja točka toksičnosti jer pomoću detaljne analize



moгуće je razlikovati njezine plivačke mogućnosti i fiziološke parametre. Prozirno tijelo omogućuje mjerenje različitih fizioloških parametara istovremeno, korištenjem neinvazivnih optičkih metoda kao što je videomikroskopija i digitalna obrada slike, odnosno prate se otkucaji srca, hranjenje, brzina filtracije i stopa gutanja, aktivnost oka, aktivnost postabdominalnih kandži, aktivnost torakalnih udova, kretanje mandibule ili cijelog organizma. Štoviše, parametri plivačkog ponašanja kao što su aktivnost plivanja, vrijeme plivanja, brzina plivanja, snaga ponašanja i učestalost skakanja predloženi su kao parametri za visoku osjetljivost na onečišćujuće tvari, ksenobiotike.<sup>2</sup>

Primjena *Daphnia magna* obuhvaća testove procjene onečišćenja vodenih ekosustava, ali i toksičnosti širokog spektra lijekova kao što su antibiotici, antiviroci, lijekovi protiv raka, antidepresivi, protuupalni lijekovi, beta-blokatori i sredstva za regulaciju lipida. Trenutno su studije o toksičnosti s *Daphnia magna* uglavnom usmjerene na akutnu toksičnost, toksičnost gutanja i reproduktivnu toksičnost. Onečišćujuće tvari mogu utjecati na *Daphnia magna* unosom u organizam putem filtracije i gutanja. Promjene u probavnom sustavu i sustavu oksidativnog stresa kod *Daphnia magna* analizirane su kako bi se razumio potencijalni mehanizam toksičnog učinka onečišćujućih tvari kroz različite puteve izloženosti.<sup>99</sup> Testovi toksičnosti uglavnom temelje na određivanju imobilizacije (smanjene pokretljivosti) i smrtnosti jedinki i standardizirani su od strane OECD-a za toksikološka ispitivanja. Konkretno, test uključuje razlikovanje ponašanja plivanja i fizioloških krajnjih točaka *Daphnia magna* kao što su brzina plivanja, prijeđena udaljenost, učestalost skakanja, otkucaji srca, brzina gutanja, brzina hranjenja, potrošnja kisika, aktivnost torakalnih udova u svrhu procjene toksičnih učinaka. Dodatno, toksični učinci mogu se procijeniti pomoću enzimskih i neenzimskih biomarkera toksičnosti.<sup>2</sup>

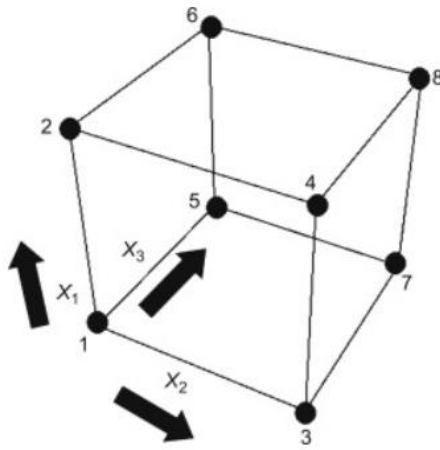
## 2.5. Metode dizajna eksperimenta

Znanstvena istraživanja se temelje na provedbi eksperimentalnog istraživanja uzimajući u obzir ranije postavljenu hipotezu. Počevši od 1920-ih godina, razvijena je statistička metodologija za dizajn i analizu pokusa, tako da većina izvješća trenutnih istraživanja u mnogim područjima uključuju statističke analize podataka.<sup>133</sup> Statistička metoda planiranja eksperimenta koristi se kod ispitivanja velikog broja varijabli kako bi se uz što manje eksperimenata dobilo što više potrebnih informacija. Upotreba takvih metoda omogućuje točnost i efikasnost procesa istraživanja. Statističko planiranje eksperimenata, ili dizajn eksperimenata, koristi se radi izrade plana eksperimenata i statističke obrade podataka metoda

dizajniranog eksperimentiranja, u kojoj se upravljanjem čimbenicima koji se mogu kontrolirati (nezavisne varijable) na različitim razinama može uočiti njihov učinak na neku varijablu odgovora (zavisna varijabla).<sup>134,135</sup> Dizajn eksperimenta je proces provođenja istraživanja na objektivan i kontroliran način kako bi se mogli donijeti specifični zaključci vezani uz postavljenu hipotezu. Općenito, svrha je utvrditi koji faktor, odnosno nezavisna varijabla, ima učinak na zavisnu varijablu. Točnim i preciznim empirijskim mjerenjem i kontrolom, eksperimentalni dizajn povećava sposobnost istraživača da utvrdi uzročne odnose i donese uzročne zaključke.<sup>136</sup> U ovom radu koristio se puni faktorski plan (engl. *Full factorial*) i metoda odzivnih površina.

### 2.5.1. Puni faktorski plan i metoda odzivnih površina

Kod metode punog faktorskog plana organizacija pokusa temelji se na promatranju kombinacija čimbenika, odnosno provođenju svih mogućih kombinacija razina čimbenika kako bi se odredio utjecaj međudjelovanja. Puni faktorski plan je jednostavna metoda temeljena na ukupnom broju prema  $N = 2^k$ , gdje  $k$  predstavlja broj čimbenika. Prilikom definiranja nelinearnog sustava (nelinearni odziv), potrebno je utvrditi funkciju odziva, za što se koristi statistička metoda odzivne plohe (engl. *Response Surface Methodology*). Za tu svrhu najčešće se odziv aproksimira polinomom drugog reda. Jedna od metoda koja se može primjeniti je puni faktorski plan s varijacijom čimbenika na više od dvije razine, međutim to znatno (eksponencijalno) povećava broj pokusa. U praksi se često koristi puni faktorski plan s varijacijom čimbenika na tri razine.<sup>134</sup> Dobiveni rezultati analiziraju se metodom analize varijance - ANOVA (engl. *Analysis of Variance*). Cilj je utvrditi koji od pojedinačnih faktora i koja od međudjelovanja za svaki faktor ima značajan utjecaj na zavisnu varijablu.<sup>135</sup> U eksperimentalnom dizajnu punog faktorskog plana su svi ulazni faktori postavljeni na dvije razine koje se nazivaju visokim (+ 1) i niskim (- 1) razinama. Kada se uzme u obzir puni faktorski dizajn za tri ulazna čimbenika, svaki na dvije razine, imat će osam redaka.<sup>137</sup> Grafički dizajn takvog punog faktorskog plana možemo označiti kockom prikazanom na slici 14. Metodu odzivne površine su prvi predstavili *Box* i *Wilson* (1951.). To je metoda statističkih i matematičkih tehnika korištenih za razvoj, poboljšanje i optimizaciju procesa te bi se mogla učinkovito koristiti za procjenu učinaka višestrukih čimbenika i njihove interakcije na jednu ili više varijabli odgovora.<sup>138</sup>



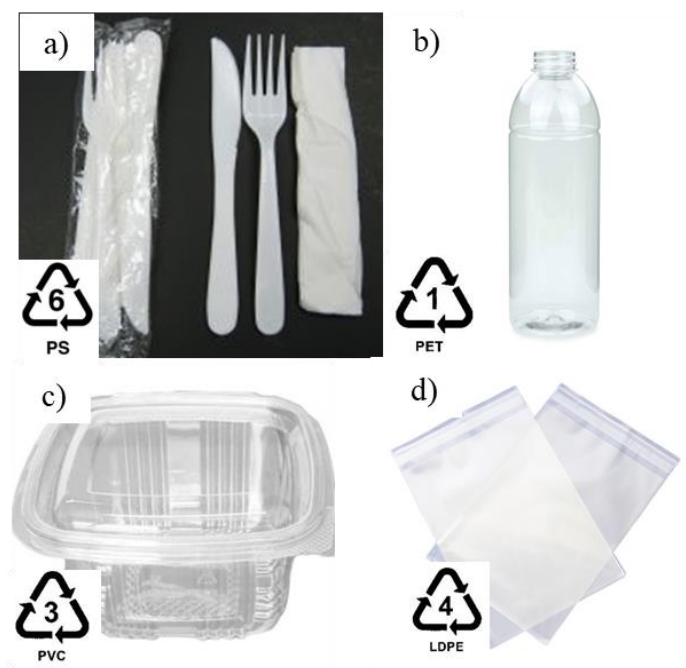
**Slika 14.** Prikaz primjera punog faktorskog plana s tri ulazna čimbenika.<sup>137</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

Za određivanje ekotoksičnosti MP-a primjenom slatkovodnog zooplanktona *Daphnia magna* koristile su se četiri vrste MP-a različitih veličina čestica. Vrste MP-a koje su se koristile su PS, PET, PVC i PE, a svaku smo priredili usitnjavanjem makroplastike (MAP) pomoću blendera. Za dobivanje PS-a usitnjen je jednokratni plastični pribor za jelo, za PET plastične boce, za PVC jednokratna plastična ambalaža i za PE plastične vrećice, a korišteni materijali prikazani su na slici 15.



**Slika 15.** MAP korištena za dobivanje MP-a: a) pribor za jelo od PS-a, b) PET boca za jednokratnu upotrebu, c) jednokratna kutija od PVC-a za spremanje hrane i d) vrećica za smrzavanje od LDPE.

Za ispitivanje toksičnosti MP-a s obzirom na veličinu koristio se PS veličine čestica 0,5  $\mu\text{m}$  i 2  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, Njemačka, proizvod opisan kao perle od lateksa, polistiren modificiran karboksilatom, fluorescentno crvena, vodena suspenzija, srednja veličina čestica 0,5  $\mu\text{m}$  i 2,0  $\mu\text{m}$ ) (slika 16). Ovako obojene suspenzije dodatno su služile i za izlaganje, mikroskopski pregled i potvrdu unosa MP-a u jedinke vodenbuha.



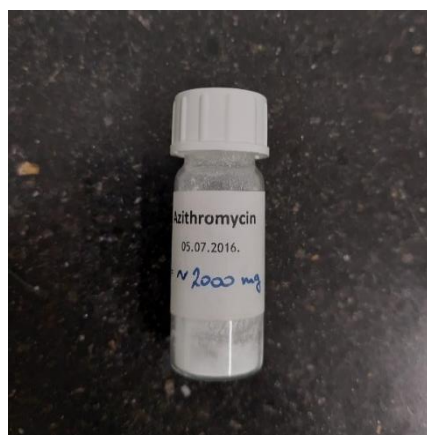
**Slika 16.** Vodene suspenzije PS-a srednje veličine čestica 0,5  $\mu\text{m}$  i 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2. Ksenobiotici

Korišteni ksenobiotici u ovom radu su antivirusici i antibiotik. Od antivirusika primijenjeni su atazanavir (ATA), emtricitabin (EMT), nirmatrelvir (NIR), oseltamivir (OST), ribavirin (RIB) i sofosbuvir (SOF), prikazani na slici 17, a korišteni antibiotik je azitromicin (AZ), prikazan na slici 18. Proizvođač navedenih ksenobiotika je Sigma-Aldrich, Njemačka, osim za SOF Biosynth, Švicarska.



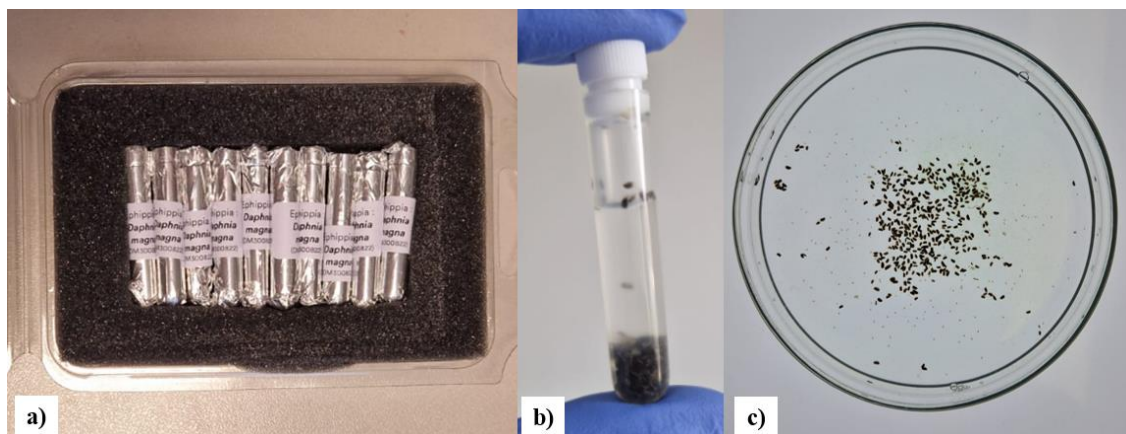
**Slika 17.** Pripremljene otopine antivirusika.



**Slika 18.** Prah azitromicina.

### 3.1.3. Testni organizam

Za provedbu ekotoksikološkog istraživanja korišten je testni organizam *Daphnia magna*, slatkovodni planktonski račić velika vodenbuha. Ovaj biotest razvio je istraživački tim prof. dr. G. Persoone u Laboratoriju za biološka istraživanja onečišćenja vode (danas Laboratorij za toksikologiju okoliša i vodenu ekologiju) na Sveučilištu Ghent u Belgiji. Ovakva vrsta biotestova provodi se radi potrebe za izvođenjem jednostavnih, brzih, osjetljivih i ponovljivih testova toksičnosti po niskoj cijeni. Koriste se za ispitivanje kemikalija i drugih onečišćujućih tvari ispuštenih u vodene ekosustave.<sup>139</sup> Navedena kultura vodenbuha kupljena je komercijalno od kompanije MicroBio-Tests Inc. (Mariakerke, Belgija) i pohranjena u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Organizmima se rukovalo prema smjernicama navedenima u Daphtokit F™ (Gent, Belgija, [www. microbiotests. com](http://www.microbiotests.com))<sup>139</sup>, a ispitivala se akutna toksičnost, odnosno određivala inhibicija pokretljivosti nakon 48 sati prema ISO 6341:2012<sup>140</sup>. Na slici 19 prikazan je način čuvanja jajašaca *Daphnia magna* prije provođenja pokusa te jedinke nakon izlijevanja i hranjenja algom *Spirulinom* (MicroBio-Tests Inc., Mariakerke, Belgija), što je preduvjet za provođenje akutnog imobilizacijskog testa.



**Slika 19.** Prikaz početka provedbe pokusa: a) jajašca *Daphnia magna* se čuvaju u ampulici obloženoj aluminijskom folijom u mraku u frižideru na +4 °C, b) izgled jajašaca u ampulici bez aluminijske folije; c) aktivirane i nahranjene jedinke *Daphnia magna* nakon držanja u mediju 72 h na 20-22 °C i konstantnom osvjetljenju od 6000 lx u inkubatoru.

### 3.1.4. Mediji i kemikalije

- Mineralni medij

Za potrebe uzgoja i izvođenja testa toksičnosti s *Daphnia magna*, prema ISO 6341:2012<sup>140</sup> pripremao se mineralni medij kemijskog sastava prikazanog u tablici 8. Pripremljeni mineralni medij mora biti pH-vrijednosti  $7,8 \pm 0,2$ , a za pripremu 1 L otopine mineralnog medija pomiješano je po 25 mL svake otopine soli i zatim dopunjeno do oznake s deioniziranom vodom u odmjernoj tikvici. Otopina se izmiješala i pohranila u hladnjak na +4 °C, a prije upotrebe bilo ju je potrebno dobro aerirati miješanjem te temperirati na sobnu temperaturu (20-22 °C). Tijekom provođenja testa toksičnosti, u svaku jažicu je dodano 10 mL medija i 5 jedinki vodenbuha.

**Tablica 8.** Prikaz sastava otopine mineralnog medija potrebnog za provođenje testa toksičnosti.

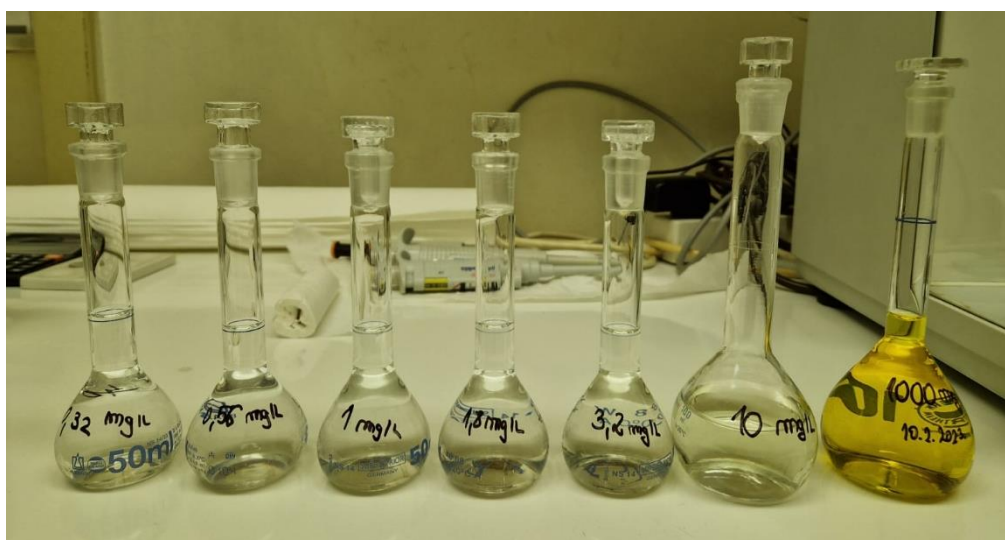
Osnovne otopine	$\gamma$ , g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	11,76
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	4,93
$\text{NaHCO}_3$	2,59
KCl	0,23

- Referentna otopina  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Kako bi se provjerila pouzdanost ispitnih uvjeta i osjetljivost pokusnog organizma *Daphnia magna*, bilo je potrebno provesti referentni test s kalijevim dikromatom ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Iz početne otopine 10 mg/L  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , priređene s deioniziranom vodom, ostala razrjeđenja su priređena s mineralnim medijem u koncentracijama kako slijedi (mg/L): 0,32, 0,56, 1, 1,8, 3,2 (tablica 9 i slika 20). Svaka koncentracija dodana je u volumenu od 10 mL u četiri jažice, u svrhu dodatne kontrole. Nakon 24 sata određena je pokretljivost jedinki *Daphnia magna* za svaku pojedinu koncentraciju  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  te je određen  $\text{EC}_{50}$ , odnosno koncentracija koja izaziva nepokretnost 50 % vodenbuha unutar navedenoga vremena izlaganja. Test s *Daphnia magna* je valjan ako se nakon 24 sata provođenja testa vrijednost  $\text{EC}_{50}$  nalazi u području između 0,6 i 1,7 mg/L.

**Tablica 9.** Prikaz volumena 10 mg/L  $K_2Cr_2O_7$  i mineralnog medija za pripremu 50 mL  $K_2Cr_2O_7$  u koncentracijskom rasponu 0,32-3,2 mg/L.

$\gamma$ ( $K_2Cr_2O_7$ ), mg/L	V (10 mg/L $K_2Cr_2O_7$ ), mL	V (minerlani medij), mL
3,2	16	32
1,8	9	18
1	5	10
0,56	2,8	5,6
0,32	1,6	3,2



*Slika 20.* Serija razrjeđenja referentne otopine kalijeva dikromata.

### 3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- blender (Philips, Nizozemska) za usitnjavanje plastičnih materijala
- uređaj za tresenje sita i pripadajuća sita veličine pora 100-300  $\mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$ , 500-700  $\mu\text{m}$  (W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA) za prosijavanje MP
- analitička vaga (Mettler Toledo model AE240, Švicarska) koristila se za vaganje kalijeva kemikalija i MP-a
- Malo sito veličine pora od 100  $\mu\text{m}$  za ispiranje jajašaca vodenbuha i pločice s jažicama za provođenje testa toksičnosti (MicroBio-Tests Inc., Mariakerke, Belgija)
- Petrijeve zdjelice za izlivanje jajašaca vodenbuhe
- Inkubator (Aqualytic, model TC 135 S, Njemačka), potreban za aktiviranje jedinki vodenbuha iz jajašaca na temperaturi 20-22  $^{\circ}\text{C}$ , pod svjetlom konstantnog intenziteta od 6 000 lx te za izlaganje tijekom 48h trajanja testa toksičnosti na 20  $^{\circ}\text{C}$  u mraku

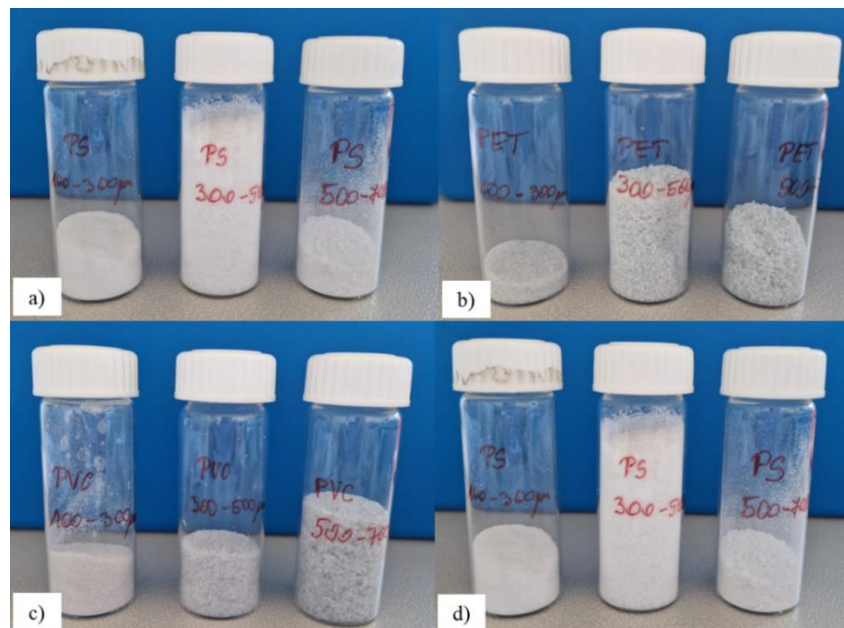


- stereo lupa (model PLTL 2400D) i svjetlosni mikroskop opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus model SZX10, Japan) jedinki vodenbuhe *Daphnia magna*
- vorteks (IKA MS3 digital, Merck, Njemačka) za miješanje algi *Spirulina* s mineralnim medijem i pripremu hrane koja se dodavala aktiviranim jedinkama vodenbuha dva sata prije početka testa
- pH-metar (SenTix® 940) za određivanje pH vrijednosti prilikom pripreme mineralnog medija za uzgoj *Daphnia magna*
- Svjetlosna ploča (LightPad® 930 LX, Artograph, SAD) za prebrojavanje imobiliziranih jedinki *Daphnia magna*

### 3.3. Metode rada

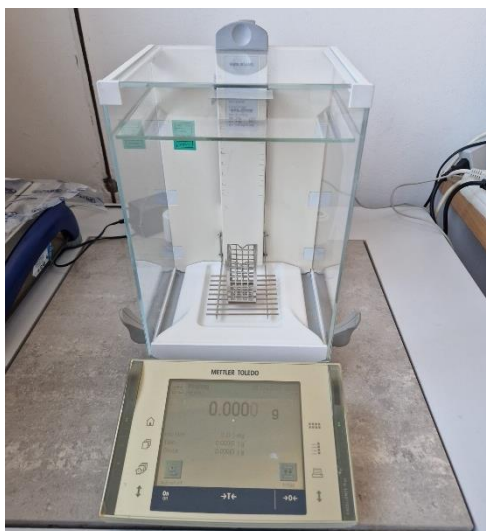
#### 3.3.1. Priprema mikroplastike

MAP (PS, PET, PVC i PE), prikazana na slici 15, je usitnjena škarama na manje komade te se dodatno usitnjavala u blenderu uz dodatak mokrog leda, odnosno suhog leda za PE. Dobivene usitnjene čestice MP sušile su se na zraku 24 – 48 sati pri sobnoj temperaturi, te su se zatim prosijavale mehanički koristeći sita određenih veličina pora u svrhu dobivanja čestica sljedećih veličina ( $\mu\text{m}$ ): 100 – 300, 300 – 500 i 500 – 700. Tako pripremljena MP za ispitivanje toksičnosti prikazana je na slici 21.



**Slika 21.** Pripremljena MP za provođenje testa toksičnosti.

Pripremljene MP različitih veličina čestica bilo je potrebno točno izvagati u svrhu ispitivanja toksičnosti MP-a iste koncentracije. Prema tome, vaganje svih vrsta MP-a provedeno je precizno na analitičkoj vagi (slika 22), a odvagana masa je u mediju odgovarala konačnoj koncentraciji od 500 mg/L.



**Slika 22.** Prikaz vaganja MP-a na analitičkoj vagi.

### 3.3.2. Priprema razrjeđenja ksenobiotika

U slučajevima kada je poznata približna toksičnost ispitivanog kemijskog spoja na *Daphnia magna*, odmah se može provesti akutni test toksičnosti. Ako takve informacije nisu dostupne, moraju se provesti dva uzastopna testa:

- a) test određivanja raspona tolerancije od 0 – 100 %;
- b) definitivni test za određivanje koncentracije učinka od 50 % (EC<sub>50</sub>).

Priprema serije razrjeđenja ksenobiotika uključivala je uzoraka svih ksenobiotika, a razrjeđivale su se s mineralnim medijem. Razrjeđenja su se pripremala direktno u pločicama s jažicama koje se koriste za provođenje testa toksičnosti, a uz svaku jažicu je prethodno označena koncentracija. Radne otopine pripremale su se od temeljne standardne otopine tako da je u jednu jažicu dodano 10 mL nerazrijeđene temeljne standardne otopine, dok je u drugu jažicu dodano 1 mL temeljne standardne otopine i 9 mL mineralnog medija, a u treću jažicu 0,1 mL temeljne standardne otopine i 9,9 mL mineralnog medija. Takva priprema predstavlja pripremu razrjeđenja ksenobiotika, a dobivene koncentracije ksenobiotika prikazane su u tablici 10. MP se nije razrjeđivala, u 10 mL otopine mineralnog medija ili pripremljenih otopina farmaceutika različitih koncentracija dodana je MP: PS, PET, PVC ili PE, različitih veličina čestica.

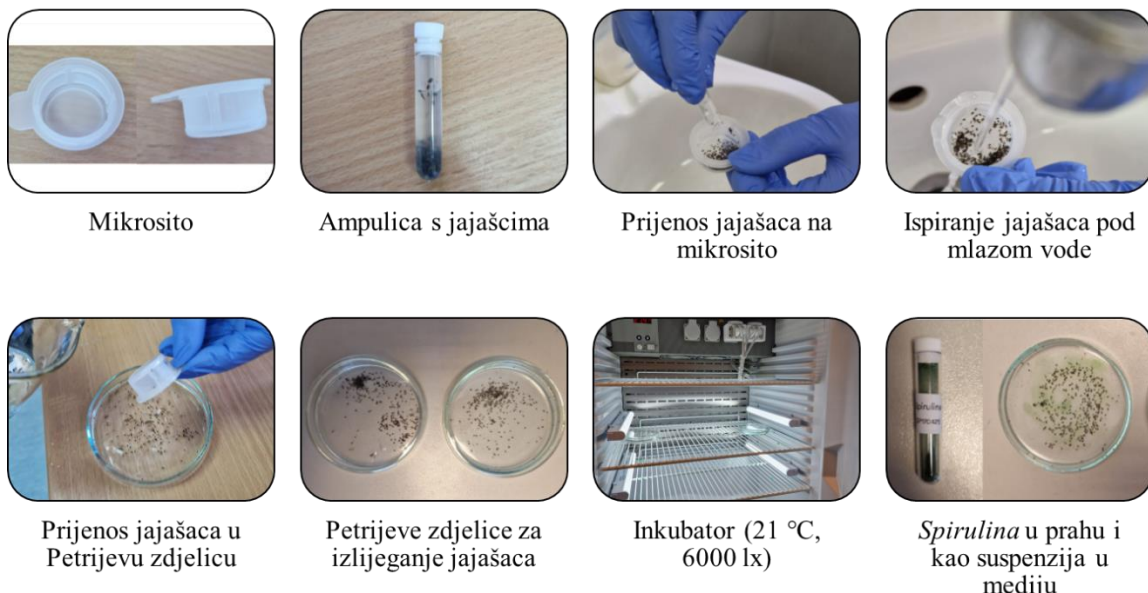
**Tablica 10.** Početni uvjeti provedbe testa toksičnosti s *Daphnia magna*.

	<b>MP</b>		<b>PS, PET, PVC, PE</b>		<b>PS</b>
	veličina MP-a / $\mu\text{m}$		100 – 300; 300 – 500; 500 – 700		0,5; 2
	koncentracija / mg/L		500		0,1; 0,5; 1; 2; 10
<b>Pojedinačna otopina</b>	<b>antivirolici</b>		<b>ATA</b>		<b>EMT, NIR, OST, RIB, SOF</b>
	temeljna standardna otopina / mmol/L		0,003		0,1
	radne koncentracije / mmol/L		0,003		0,1
			0,0003		0,01
			0,00003		0,001
	<b>antibiotik</b>		<b>AZ</b>		
	temeljna standardna otopina / mmol/L		0,1	0,25	0,5
radne koncentracije / mmol/L		0,1	/	/	
		0,01	/	/	
		0,001	/	/	
<b>Binarne otopine</b>	<u>kombinacija MP s jednim antivirusikom</u>			<u>kombinacija MP s jednim antibiotikom</u>	
vrsta	PS (100 – 300 $\mu\text{m}$ )	ATA	EMT, NIR, OST, RIB, SOF	PS, PET, PVC, PE (100 – 300 $\mu\text{m}$ )	AZ*
koncentracija	500 mg/L	0,003 mmol/L	0,1 mmol/L	500 mg/L	0,1; 0,25; 0,5 mmol/L (*osim 0,5 mmol/L s PVC)
<b>Ternarne otopine</b>	<u>kombinacija MP s dva antivirusika</u>			<u>kombinacija MP s jednim antivirusikom i antibiotkom</u>	
vrsta	PS (100 – 300 $\mu\text{m}$ )	EMT, NIR / EMT, SOF / SOF, NIR / OST, ATA / ATA, RIB / OST, RIB		PS (100 – 300 $\mu\text{m}$ )	ATA, EMT, NIR, OST, RIB, SOF AZ
koncentracija	500 mg/L	ATA 0,003 mmol/L; ostali 0,1 mmol/L		500 mg/L	ATA 0,003 mmol/L; ostali 0,1 mmol/L

### 3.3.3. Aktivacija jedinki *Daphnia magna*

Na slici 19 prikazane su ampulice u kojima se nalaze jajašca vodenbuhe *Daphnia magna*. Ta su jajašca zaštićena hitinskom čahurom koja se zove efipij i mogu se čuvati dulje vrijeme bez gubitka održivosti. Efipiji se mora čuvati u tami na 5 °C ( $\pm$  2 °C), kako bi se omogućila njihova održivost, te su pohranjeni u frižideru na +4 °C i prekriveni aluminijskom folijom. Aktivacija jedinki iz ovakvih jajašaca traje oko 3 dana te se one zatim mogu odmah koristiti za ispitivanja toksičnosti.

Aktivacija započinje ispiranjem jajašaca pod mlazom vode kroz mikrosito veličine pora 100  $\mu$ m u trajanju od jedne minute, kako bi se uklonili svi tragovi medija u koji su jajašca pohranjena u ampulama. Nakon ispiranja, jajašca su prebačena u Petrijevu zdjelicu u kojoj se već nalazio mineralni medij, standardna otopina za razvoj vodenbuhe *Daphnia magna*, koja je prethodno temperirana na sobnu temperaturu i aerirana snažnim miješanjem. Petrijeve zdjelice s jajašcima su prenesene u inkubator na temperatura od 21 °C i osvjetljenje intenziteta 6000 lx tijekom 72 sata jer je to period potreban za embrionalni razvoj. Nakon isteka 72 sata, jedinke *Daphnia magna* su nahranjene suspenzijom alge *Spirulina* u prahu, u koju je dodano oko 1-2 mL mineralnog medija i dobro izmiješano, te su ostavljene još 2 sata u inkubatoru prije postavljanja testa toksičnosti. Na slici 23 se može vidjeti proces aktivacije jedinki *Daphnia magna* za izvođenje testa toksičnosti.



**Slika 23.** Prikaz aktivacije jedinki *Daphnia magna* prije izvođenja testa toksičnosti.

### 3.3.4. Postavljanje testa toksičnosti

Mineralni medij, kao kontrolna otopina, te navedene koncentracije kalijevog dikromata, kao referentne otopine, dodane su svaka u četiri jažice. Zatim je dodano po 10 mL mineralnog medija u koji su prebačene prethodno odvagane vrste MP-a, a ostali ksenobiotici, pojedinačno ili u kombinaciji, su pripremljeni direktno u jažice prema planu pokusa. U svaku jažicu je zatim stavljeno po pet jedinki račića *Daphnia magna* pomoću Pasterove pipete, a sve se provodilo na svjetlosnoj ploči. Nakon što je pokus postavljen, slika 24, pripremljena pločica s jažicama je stavljena u inkubator u mrak na 21 °C. Nakon 24 i 48 sati određen je broj pokretnih i živih jedinki vodenbuhe *Daphnia magna*.



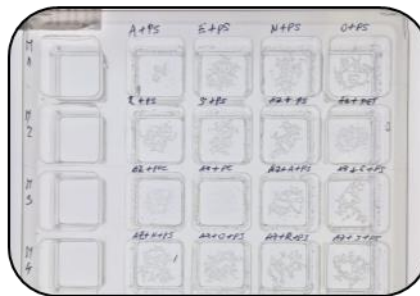
Priprema jažica



*Daphnia magna* pripremljena za provođenje testa toksičnosti



Uzimanje *Daphnia magna* pomoću Pastuer pipete i prenošenje u jažicu



Postavljen pokus

**Slika 24.** Prikaz postavljanja pokusa.

### 3.3.5. Brojanje pokretnih jedinki *Daphnia magna*

Za vizualno promatranje, nakon 24 sata i 48 sati inkubacije, ploča s jažicama je postavljena na postolje svjetlosne ploče. Bilježio se broj živih i pokretnih, odnosno aktivno plivajućih testnih jedinki u svakoj jažici. Nepokretne jedinke karakterizira nemogućnost plivanja nakon laganog trzanja tekućine 15-ak sekundi, čak i ako još uvijek mogu pomicati

svoje antene. Na temelju izbrojanih jedinki *Daphnia magna* u različitim koncentracijama MP-a i ksenobiotika te njihovih kombinacija, izračunao se postotak pokretnih jedinki prema formuli (1), prikazanoj jednadžbom:

$$\text{postotak pokretnih jedinki} = \frac{\text{ukupan broj živih jedinki}}{\text{max.broj jedinki}} \times 100\%.$$

(1)

### 3.3.6. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom analizom dodatno je po potrebi potvrđena pokretljivost jedinki *Daphnia magna* kao rezultat štetnih učinaka ksenobiotika i MP-a. Osim toga, mikroskopski su pregledane i jedinke izložene 10 mg/L PS-a veličine čestica 0,5 i 2  $\mu\text{m}$ , koji je obojan u ružičasto, što je omogućilo da se vizualno provjeri i dokaže unos MP-a u jedinku. Jedinke *Daphnia magna* prebačene su Pasterovom pipetom iz jažice zajedno s 10 mL mineralnog medija u Petrijevu zdjelicu te su zatim promatrane pod povećanjem 3 $\times$ . Na slici 25 prikazana je stereo lupa kojom se mikroskopirala *Daphnia magna*.



**Slika 25.** Stereo lupa za određivanje pokretljivosti *Daphnia magna* i provjere unosa MP-a u jedinke.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

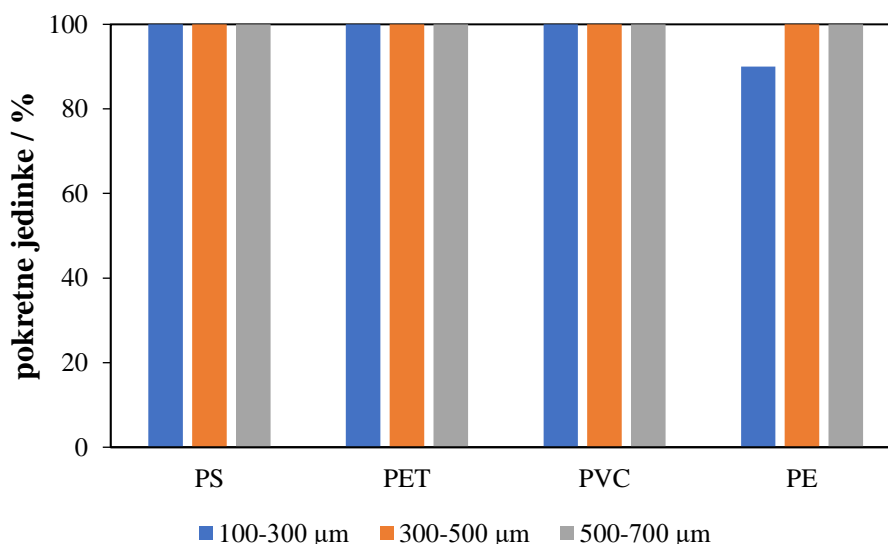
U ovom radu ispitivao se toksični utjecaj ksenobiotika – antivirotika i antibiotika te MP-a na testni organizam vodenbuha. Proveo se pokus ispitivanja ekotoksičnosti antibiotika (AZ), zatim antivirotika (ATA, EMT, NIR, OSE, RIB i SOF) te MP-a (PS, PET, PVC i PE) na jedinke *Daphnia magna* tijekom 48 sati, u skladu sa standardnim protokolom, ISO 6341:2012<sup>140</sup>. Načini provedbe pokusa opisani su u poglavlju 3. *Eksperimentalni dio*. Tijekom pokusa pratio se broj živih i neimobiliziranih jedinki u odnosu na broj mrtvih i imobiliziranih, odnosno aktivno plivajućih testnih jedinki vodenbuha u svakoj jažici te se postotak pokretnih jedinki izračunao prema jednadžbi (1). Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 26 – 34. Postupak provođenja pokusa na temelju kojeg su dobiveni rezultati opisani su u poglavlju 3.3.4. Statističkom obradom u programu *Desgin Export* prema punom faktorskom planu određeni su uvjeti koji su se pokazali značajnim za proces ispitivanja toksičnog učinka na testni organizam *Daphnia magna*.

### 4.1. Provjera pouzdanosti ispitnih uvjeta

Ispitivanjem referentne tvari kalijevog dikromata određen je EC<sub>50</sub>, za koji je poznato da se nakon 24 sata provođenja testa toksičnosti s *Daphnia magna* njegova vrijednost nalazi u području između 0,6 i 1,7 mg/L. Vrijednost EC<sub>50</sub> u našim ispitnim uvjetima iznosila je 0,88 mg/L, čime smo potvrdili pouzdanost provođenja testova. Osim toga, u kontrolnim skupinama gdje je dodan samo mineralni medij nije niti u jednom slučaju bilo nepokretno više od 10 % vodenbuha, što je također potvrda pouzdanog testiranja.

### 4.2. Ispitivanje utjecaja mikroplastike na *Daphnia magna*

Tijekom 48 sati praćen je utjecaj četiri vrste MP-a (PS, PET, PVC i PE) na testni organizam *Daphnia magna*. Sve vrste MP-a primijenjene su u koncentraciji od 500 mg/L, a njihove čestice bile su grupirane po veličinama 100 – 300, 300 – 500 i 500 – 700 µm, te su rezultati toksičnosti grafički prikazani na slici 26.

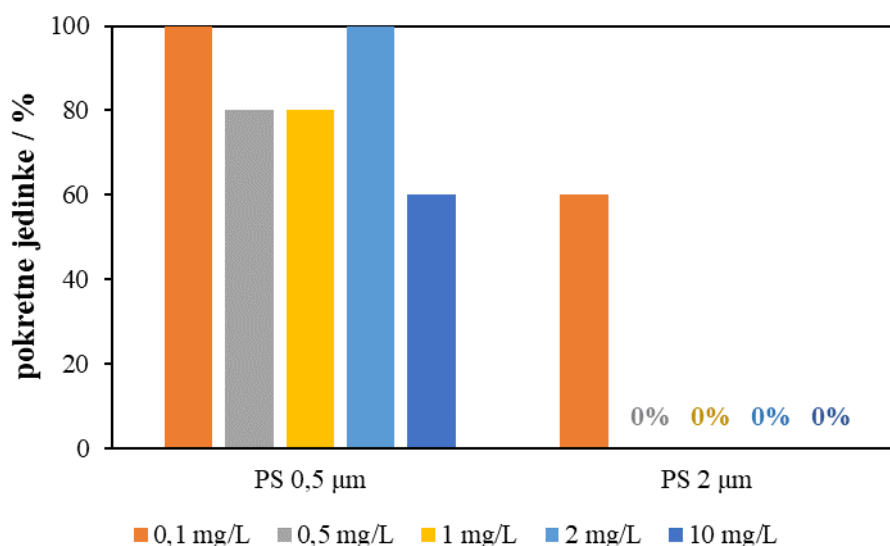


**Slika 26.** Utjecaj MP-a različitih veličina čestica pri koncentraciji od 500 mg/L na testni organizam *Daphnia magna*.

Očigledno je da za sve veličine čestica svih vrsta MP-a nije bilo štetnog utjecaja na jedinke *Daphnia magna*, odnosno preživljenje je 100 %, osim za PE najmanje veličine čestica 100 – 300 µm koje je rezultirao s 90 % pokretnih jedinki. Rehse i sur. (2016.) istraživali su akutnu toksičnost MP-a promjera 1 i 100 µm na *Daphnia magna* i pokazali da MP od 1 µm vodenbuha može progutati, što u konačnici dovodi i do smrtnosti, dok MP veličine čestica 100 µm ne može progutati te nema značajnog toksičnog učinka.<sup>144</sup> U skladu s ovim istraživanjem možemo potvrditi da korištene veličine čestica MP-a u ovom pokusu nemaju toksičan utjecaj na *Daphnia magna* jer su čestice prevelike da dovedu do toksičnog učinka ili smrtnosti. Čestice manjih veličina imaju veću specifičnu površinu i sposobnije su adsorbirati druge onečišćujuće tvari, a time imaju i veći toksični učinak na *Daphnia magna*.<sup>145</sup>

Poznato je da se *Daphnia magna* hrani neselektivno u rasponu čestica veličine 1 – 50 µm. Na temelju navedenoga, proveli smo pokus s PS-om veličine čestica 0,5 i 2 µm, od kojih je svaki primijenjen u koncentracijama 0,1; 0,5; 1; 2 i 10 mg/L. Rezultati toksičnosti na *Daphnia magna* prikazani su na slici 27 i potvrđuju da toksičnost ovisi o koncentraciji te da veličina čestica mora biti prikladna za unos u organizam kako bi izazvala toksični učinak.



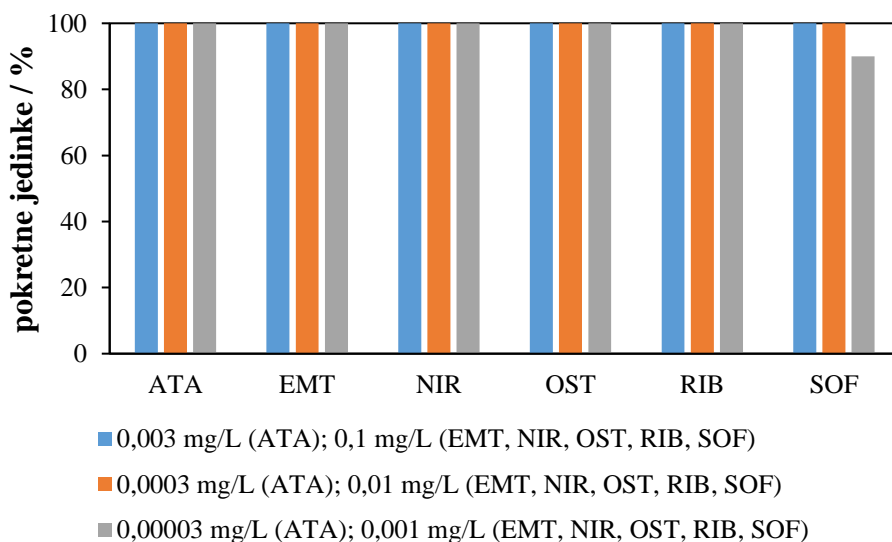


**Slika 27.** Utjecaj PS-a različitih koncentracija (0,1; 0,5; 1; 2 i 10 mg/L) i veličine čestica (0,5 i 2 µm) na *Daphnia magna*.

Naši rezultati ukazuju da su štetniji učinak imale čestice PS-a od 2 µm nego manje od 0,5 µm. To potvrđuje i izračunati EC<sub>50</sub>, koji ukazuje da koncentracija koja izaziva nepokretnost 50 % vodenbuha unutar 48 sati izlaganja PS-u veličine čestica 0,5 µm iznosi 33,62 mg/L, dok za PS veličine čestica 2 µm iznosi 0,02 mg/L. Slične rezultate prikazali su *Rist i sur. (2017.)* proučavajući unos PS kuglica (1 mg/L) dviju veličina (0,1 i 2 µm) tijekom 24 sata u *Daphnia magna* starima tjedan dana te zaključili da je unesena masa čestica od 2 µm bila pet puta veća nego za čestice od 0,1 µm.<sup>146</sup> *Gambardella i sur. (2017.)* proučavali su učinke 0,1 µm PS kuglica tijekom 48 sati na ličinački stadij račića *Amphibalanus amphitrite* i *Artemia franciscana*. Rezultati su pokazali da se MP ove veličine nakuplja u ispitivanim rakovima, ali bez utjecaja na smrtnost.<sup>147</sup> Eksperimentalne laboratorijske studije pokazale su da zooplankton ima sposobnost lakog gutanja MP čestica odgovarajuće veličine. Dakle, postoji očekivani raspon veličine MP-a koji mogu progutati različiti zooplanktonski organizmi, a za većinu vrsta prema dostupnim informacijama taj je raspon između 2 - 32 µm.<sup>17</sup> S obzirom na literaturne podatke možemo pretpostaviti da su veličine MP od 0,5 µm u našem pokusu premale i u tim veličinama nemaju toksičan učinak na račiće *Daphnia magna*. U konačnici, *Eltemsah i Bohn (2019.)* su pokazali da MP nije akutno toksična ni za mlade ni za odrasle jedinke *Daphnia magna* unutar 48 sati. Međutim, nakon 96 i 120 sati, kod relativno visoke koncentracije MP-a došlo je do toksičnog učinka<sup>148</sup>, što također može objasniti visoko preživljenje *Daphnia magna* u našem pokusu.

### 4.3. Ispitivanje utjecaja antivirusika na *Daphnia magna*

Tijekom 48 sati praćen je utjecaj antivirusika ATA, EMT, NIR, OST, RIB i SOF na testni organizam *Daphnia magna*, te su rezultati prikazani grafički na slici 28. Antivirusici su pripremljeni serijom razrjeđenja opisanih u poglavlju 3.3.2. od temeljne standardne otopine koncentracije 0,003 mmol/L za ATA, odnosno 0,1 mmol/L za EMT, NIR, OST, RIB i SOF, te su radne koncentracije u pokusu za ATA iznosile 0,003; 0,0003 i 0,00003 mmol/L, dok su za EMT, NIR, OST, RIB i SOF radne koncentracije iznosile 0,1; 0,01 i 0,001 mmol/L.



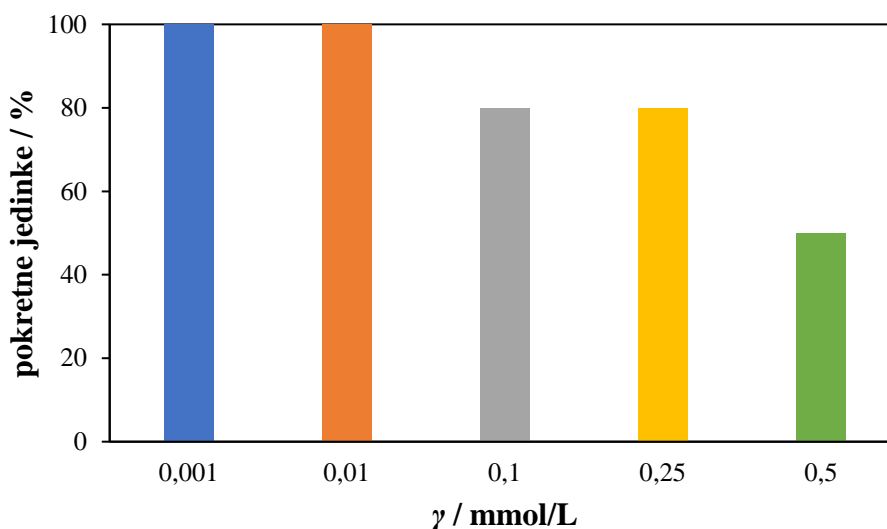
**Slika 28.** Utjecaj antivirusika pri različitim serijskim razrjeđenjima na testni organizam *Daphnia magna*.

Na slici 28 možemo primjetiti da svi antivirusici u svim primijenjenim koncentracijama nisu doveli do imobilizacije jedinki. Izuzetak je samo SOF koncentracije 0,00003 mmol/L, koji je rezultirao učinkom od 90 % pokretnih vodenbuha, odnosno u ovom slučaju jedna jedinka nije pokazivala znakove pokretljivosti od ukupno postavljenih 10 živih jedinki. U navedenoj seriji koncentracija, najveći toksični učinak očekuje se pri najvišoj koncentraciji, ali vidimo da u ovom pokusu to nije uočeno vjerojatno iz razloga što su antivirusici pripremljeni u okolišnim koncentracijama, koje ipak ne pokazuju toksične učinke. ATA i EMT su antiretrovirusni (ARV) lijekovi koji se koriste za liječenje bolesti virusa humane imunodeficijencije (HIV) i sve se više otkrivaju u vodenom okolišu, a malo se zna o njihovom utjecaju na vodene organizme. U istraživanju kojeg su proveli Mahaye i Musee (2022.) s ARV, efavirenz (EFV) i tenofovir (TFV), u koncentracijama od 62,5 – 1000 µg/L u riječnoj vodi s račićem *Daphnia magna*, smrtnost tijekom 48 sati je uočena za koncentracije od 500 i 1000 µg/L.<sup>142</sup> ATA je pronađen u

postrojenjima za obradu otpadne vode.<sup>141</sup>, a vrlo su ograničeni eksperimentalni podatci o njegovoj sudbini ili toksičnosti u okolišu.<sup>61</sup> U istraživanju *Cid i sur. (2021.)* ispitala se akutna toksičnost na morskom ježincu *Echinometra lucunter* provođenjem testova oplodnje i razvoja embrija i ličinki. Srednja koncentracija ATA koja je inhibirala oplodnju u 1 satu iznosila je  $IC_{50}$  73,04 mg/L, a za inhibiciju razvoja embrija i ličinki je  $IC_{50}$  0,63 mg/L. Koeficijent raspodjele oktanol-voda ( $K_{ow}$ ), odnosno  $\log K_{ow}$  iznosio je 4,54, a rezultat veći ili jednak 3, predstavlja toksičan učinak na okoliš.<sup>149</sup> Otpuštanje antivirusnih lijekova kao što je OST u okoliš može predstavljati rizike, koji uključuju sigurnost vode za piće, ekološki zdravstveni rizik, razvoj antivirusne rezistencije, destabilizaciju mikrobnih biofilmova te utjecaj na izvedbu i funkciju pročišćivača otpadnih voda. To često može dovesti do stvaranja metabolita ili nusproizvoda razgradnje, koji mogu biti štetniji od svojih matičnih spojeva i teže ih je ukloniti iz otpadne vode. OST i peramivir inhibirali su stvaranje biofilma na mikrobnj zajednici poput *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>62</sup>  $EC_{50}$  u provedenom ekperimentu u ovom diplomskom radu nije izračunat za akutni biološki test s račićem *Daphnia magna* jer imobilizacija ili smrtnost nisu dosegli 50 %, što je i očekivano jer su primijenjene okolišne koncentracije antivirotika puno niže od koncentracija koje su dokazane kao toksične u navedenim literaturnim podacima.

#### **4.4. Ispitivanje utjecaja antibiotika azitromicina na *Daphnia magna***

Tijekom 48 sati praćen je utjecaj antibiotika AZ na testni organizam *Daphnia magna*. Antibiotik je pripremljen serijom razrjeđenja od temeljne standardne otopine 0,1 mmol/L te su primijenjene radne koncentracije iznosile 0,1; 0,01 i 0,001 mmol/L i one odgovaraju okolišnim uvjetima. Uz okolišne, primijenjene su i koncentracije od 0,25 i 0,5 mmol/L koje se uglavnom ne očekuju u prirodnim uvjetima, ali su testirane za usporedbu toksičnog učinka, što se može vidjeti na slici 29.

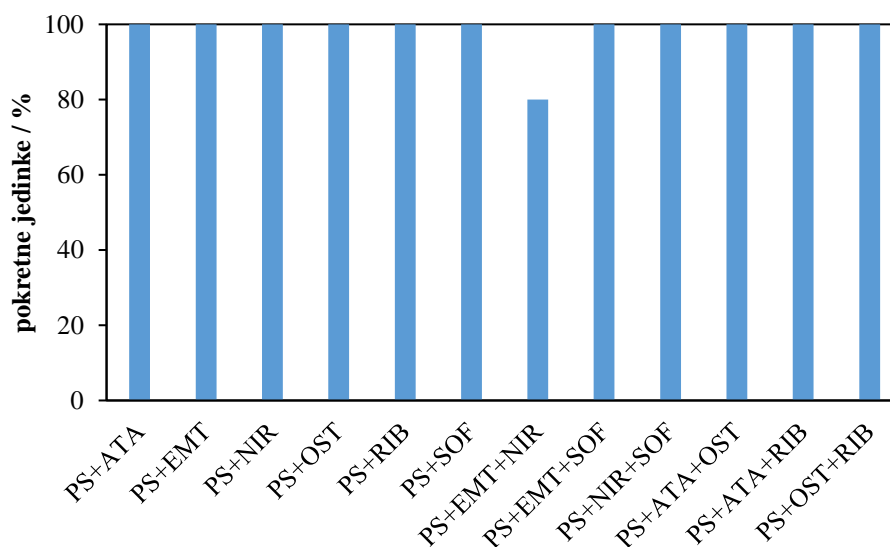


**Slika 29.** Utjecaj različitih koncentracija (0,001; 0,01; 0,1; 0,25 i 0,5 mmol/L) AZ na *Daphnia magna*.

Rezultati potvrđuju ovisnost toksičnog učinka AZ o koncentraciji. Postotak pokretnih jedinki vodenbuha nakon izlaganja antibiotiku AZ kod koncentracija 0,001 i 0,01 mmol/L iznosi 100 %, odnosno nema toksičnog učinka i pri ovim niskim okolišnim koncentracijama preživjele su sve jedinke. Primjenom viših koncentracija uočava se porast toksičnog učinka, odnosno kod koncentracije AZ od 0,1 i 0,25 mmol/L preživljenje je 80 %, a od 0,50 mmol/L preživljenje je 50 %.  $EC_{50}$  prema dobivenim rezultatima ukazuje da koncentracija AZ-a koja izaziva nepokretnost 50 % vodenbuha unutar 48 sati izlaganja iznosi 0,6 mmol/L. AZ nalazimo u prirodnim vodama, te je dokazano da tijekom dugotrajne izloženosti vodenih organizama AZ-u dolazi do subletalnih učinaka, čak i pri niskim koncentracijama. Prema Li i sur. (2020.) AZ utječe na aktivnosti probavnih enzima i oksidativni stres, što u konačnici dovodi do promjene načina hranjenja *Daphnia magna*.<sup>99</sup>

#### **4.5. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antivirusima na *Daphnia magna***

U svrhu procjene toksičnosti MP-a u kombinaciji s antivirusima korišten je PS, kao jedna od vrsta MP-a s najčešćom primjenom, u binarnim i ternarnim kombinacijama s jednim ili dva antivirusa. Učinak binarnih i ternarnih otopina PS-a (500 mg/L, veličina čestica 100-300 μm) u različitim kombinacijama sa šest vrsta antivirusa (0,003 mmol/L ATA te 0,1 mmol/L EMT, NIR, OST, RIB i SOF) prikazan je na slici 30.

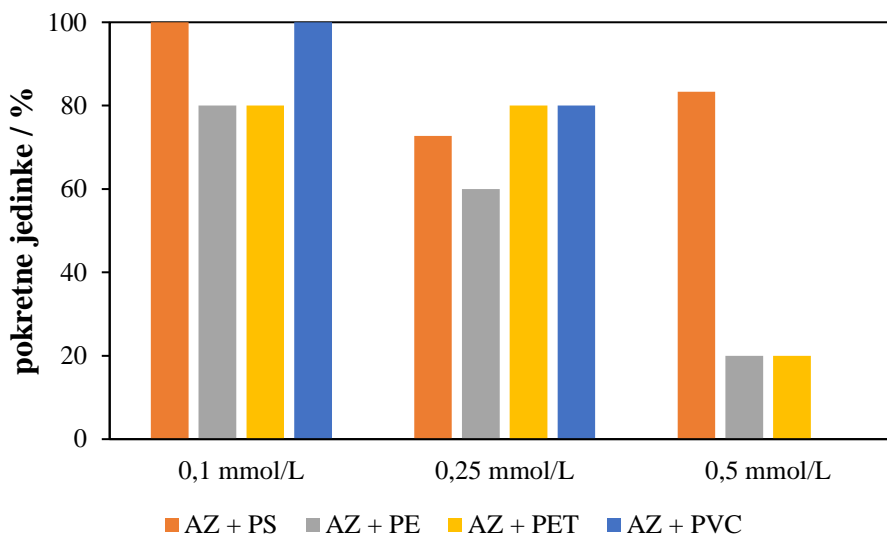


**Slika 30.** Utjecaj PS-a (500 mg/L, veličina čestica 100 – 300  $\mu\text{m}$ ) u binarnim i ternarnim kombinacijama sa šest vrsta antivirusnika (0,003 mmol/L ATA te 0,1 mmol/L EMT, NIR, OST, RIB i SOF).

Rezultati pokazuju da za sve kombinacije nema toksičnog učinka i preživljenje vodenbuha je 100 %, osim za PS-a u ternarnoj kombinaciji s EMT i NIR, gdje je postotak preživljenja 80 %. Iako su koncentracije odabranih ksenobiotika u vodenim ekosustavima prilično niske, kronična izloženost organizama kao i promjene u njihovom genetskom materijalu mogu predstavljati zabrinutost za okoliš, posebno kada se pojavljuju u mješavinama. Utjecaj kombiniranih ksenobiotika može se izraziti kao aditivnost, sinergizam ili antagonizam.<sup>150</sup> Aditivna interakcija je kada međusobno reagiraju dvije tvari koje imaju isto djelovanje na organizam, pri čemu se ukupni učinak može prikazati zbrojem pojedinačnih učinaka. Sinergistička interakcija se pojavljuje između dvije tvari s istim učinkom, ali istovremena prisutnost i međudjelovanje u organizmu ima za posljedicu ukupni učinak veći od zbroja pojedinačnih tvari. Antagonistički učinak je djelovanje jedne tvari na smanjenje djelovanja druge tvari jer se kemijski sastojci međusobno ne preklapaju. Gledajući toksični učinak EMT i NIR pojedinačno, pokretni broj *Daphnia magna* je bio 100 %, dok je u kombinaciji s PS-om iznosio 80 % te možemo reći da jedni na druge djeluju sinergistički. Ipak generalno, naši rezultati ukazuju da okolišne koncentracije antivirusnika niti u kombinaciji s MP-om ne dovode do toksičnih učinaka na *Daphnia magna*.

#### 4.6. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antibiotikom na *Daphnia magna*

Daljnja procjena toksičnosti MP-a u kombinaciji s ksenobioticima uključivala je binarnu kombinaciju četiri vrste MP-a s antibiotikom AZ. Konkretno, primijenjena je kombinacija PS, PE, PET i PVC (500 mg/L, veličina čestica 100-300  $\mu\text{m}$ ) i AZ (0,1, 0,25, 0,5 mmol/L), a rezultati su prikazani na slici 31.

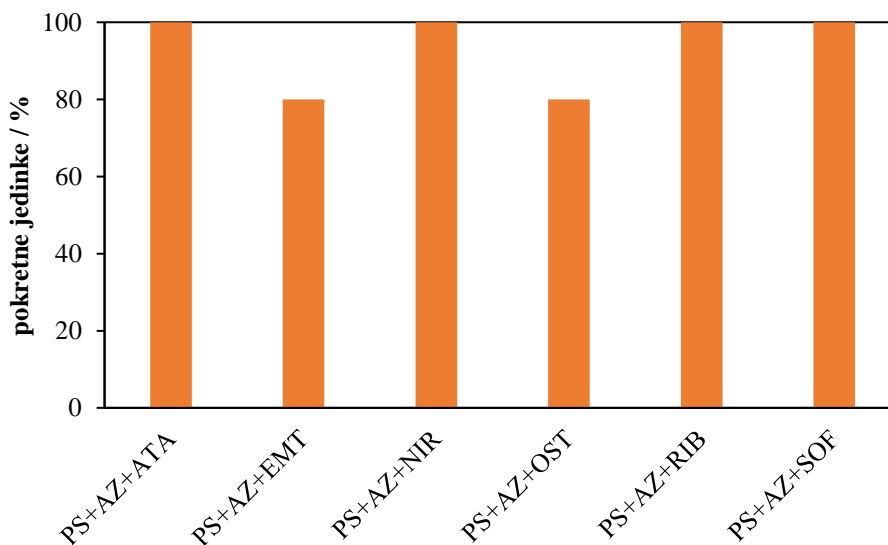


**Slika 31.** Utjecaj binarnih kombinacija MP (500 mg/L, veličina čestica 100 – 300  $\mu\text{m}$ ) i antibiotika AZ (0,1; 0,25 i 0,5 mmol/L) na *Daphnia magna*.

Generalno, učinak MP u kombinaciji s AZ pokazuje veću smrtnost pri višim koncentracijama AZ. Tako za PS u kombinaciji s 0,1 mmol/L AZ nema smrtnosti, dok broj preživjelih *Daphnia magna* pri 0,25 i 0,5 mmol/L AZ opada na 72,7 % i 83,3 %. Još je očitiji učinak za kombinaciju PET-a i PE-a s antibiotikom, za koje je postotak pokretnih jedinki vodenbuha iznosio 80 % pri 0,1 mmol/L AZ i opao na 20 % pri 0,5 mmol/L AZ. Prema González-Pleiter i sur. (2021.) MP pokazuje sposobnost adsorpcije AZ-a, koja se povećava s koncentracijom u otopini, što je potvrđeno i u provedenom pokusu, posebno za PET i PE.<sup>18</sup> Zhang i sur. (2019.) proučavali su učinke uzrokovane PS-om veličine 1  $\mu\text{m}$  s roksitromicinom (antibiotski lijek), te dokazali značajne akutne i kronične učinke na *Daphnia magna*.<sup>151</sup> U radu González-Pleiter i sur. (2021.) MP nije bila otrovna za cijanobakteriju *Anabaena* sp., no MP u kombinaciji s AZ značajno su inhibirali rast i sadržaj klorofila cijanobakterije.<sup>18</sup>

#### 4.7. Ispitivanje utjecaja mikroplastike u kombinaciji s antivirusicima i antibiotikom na *Daphnia magna*

Ispitan je i mogući toksični učinak ternarnih otopina, koje su pripremljene kombinacijom PS-a (500 mg/L, veličina čestica 100-300  $\mu\text{m}$ ), AZ-a koncentracije 0,1 mmol/L, i antivirusika koncentracije 0,003 mmol/L za ATA i 0,1 mmol/L za EMT, NIR, OST, RIB i SOF, a rezultati su prikazani grafički na slici 32.

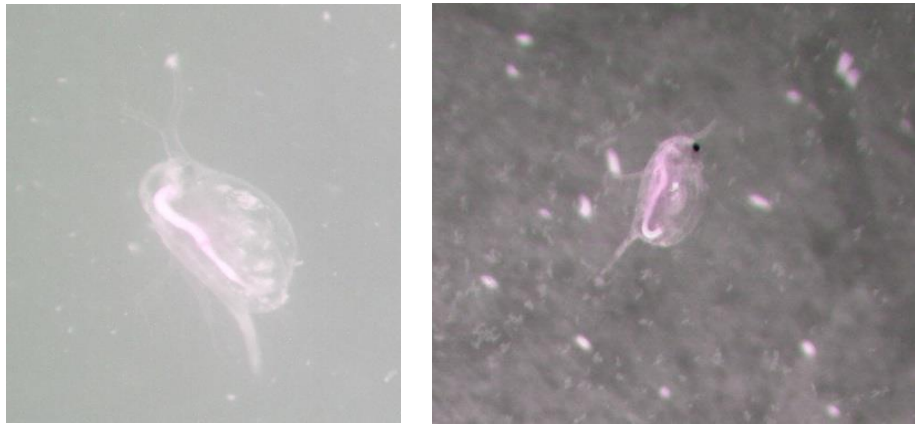


**Slika 32.** Utjecaj kombinacija PS (500 mg/L, veličina čestica 100 – 300  $\mu\text{m}$ ), 0,1 mmol/L AZ i različitih vrsta antivirusika (0,003 mmol/L ATA te 0,1 mmol/L EMT, NIR, OST, RIB i SOF).

U ternarnoj kombinaciji opet je izabran PS kao često korištena vrsta MP-a, a uzeta je i najmanja veličina čestica od 100 – 300  $\mu\text{m}$ , jer se toksičan učinak, prema prethodnom pokusu i literaturnim podacima, može eventualno očekivati od čestica MP-a najmanje veličine od primijenjenih. Prema grafu na slici 32 vidimo da je pokretljivost vodenbuha 100 %, osim 80 % za kombinaciju PS+AZ+EMT te PS+AZ+OST. PS veličine čestica 100 – 300  $\mu\text{m}$  pokazuje u pojedinačnom pokusu postotak pokretnih vodenbuha 100 %, AZ koncentracije 0,1 mmol/L 80 %, a EMT i OST koncentracije 0,1 mmol/L 100 %, a u njihovoj ternarnoj kombinaciji pokretljivost iznosi 80 % te možemo vidjeti da toksični učinak ima jedino AZ, a da PS, OST i EMT ne utječu na toksičnost vodenbuhe *Daphnia magna*.

#### 4.8. Mikroskopska analiza vodenbuhe *Daphnia magna*

Na slici 33 prikazane su mikrofotografije slatkovodnog zooplanktonskog račića *Daphnia magna* nakon 48 sati izlaganja fluorescentno crvenoj vodenoj suspenziji PS-a, veličine čestica 2  $\mu\text{m}$  i koncentracije u mediju 10 mg/L. Postupak mikroskopske analize opisan je u poglavlju 3.3.6.



**Slika 33.** Mikrofotografije *Daphnia magna* snimljene pod stereo lupom s ugrađenom kamerom nakon 48 sati izlaganja fluorescentno crvenoj vodenoj suspenziji PS-a, veličine čestica 2  $\mu\text{m}$  i koncentracije u mediju 10 mg/L.

Na mikrofotografijama se vidi da nema fizikalnih deformacija na vodenbuhi *Daphnia magna*, no vidljivo je kako se unutar njezina tijela nalazi ružičasto obojenje koje potvrđuje unos čestica PS-a u probavni sustav. Ovime smo potvrdili da se veličine PS-a od 2  $\mu\text{m}$  mogu unijeti u organizam *Daphnia magna*, što je u skladu s rezultatima testova toksičnosti, koji su potvrdili i njihovu toksičnost (slika 27). Upravo se na ovaj način u okolišnim uvjetima čestice MP-a prenose dalje kroz hranidbeni lanac. *Daphnia magna* je primarni potrošač i čini vezu između primarnih proizvođača (alge) i tercijarnih potrošača (ribe) u prehrambenom lancu. Štetni učinci na vodene beskraljeznjake bi mogli izazvati potencijalne štetne implikacije poput neravnoteže ekosustava. Razumijevanje učinaka ksenobiotika na nižim trofičkim razinama moglo bi pomoći u predviđanju njihovih potencijalnih rizika za organizme te ljudsko zdravlje.<sup>142</sup>

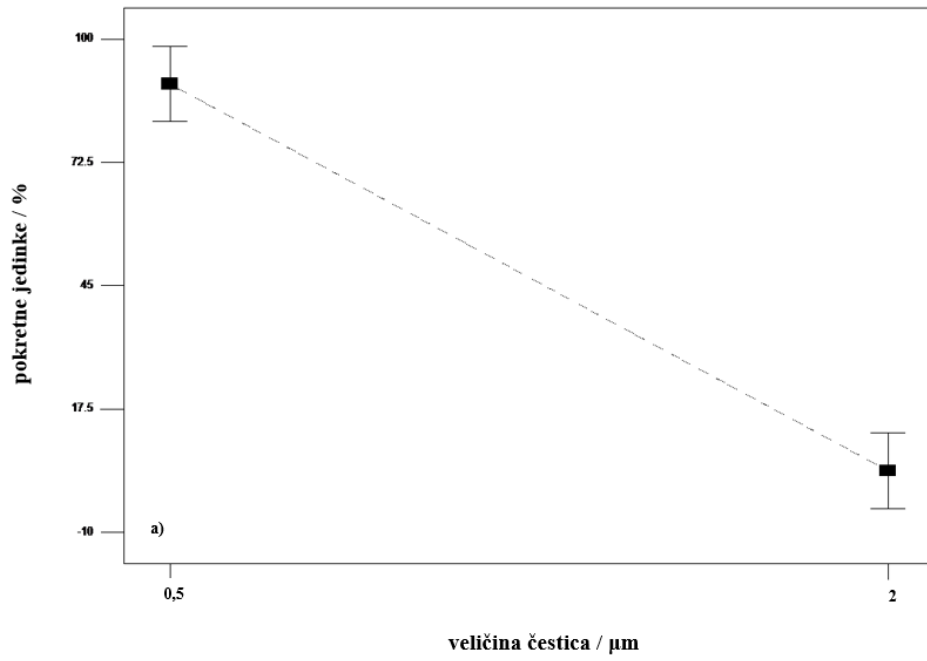


#### 4.9. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)

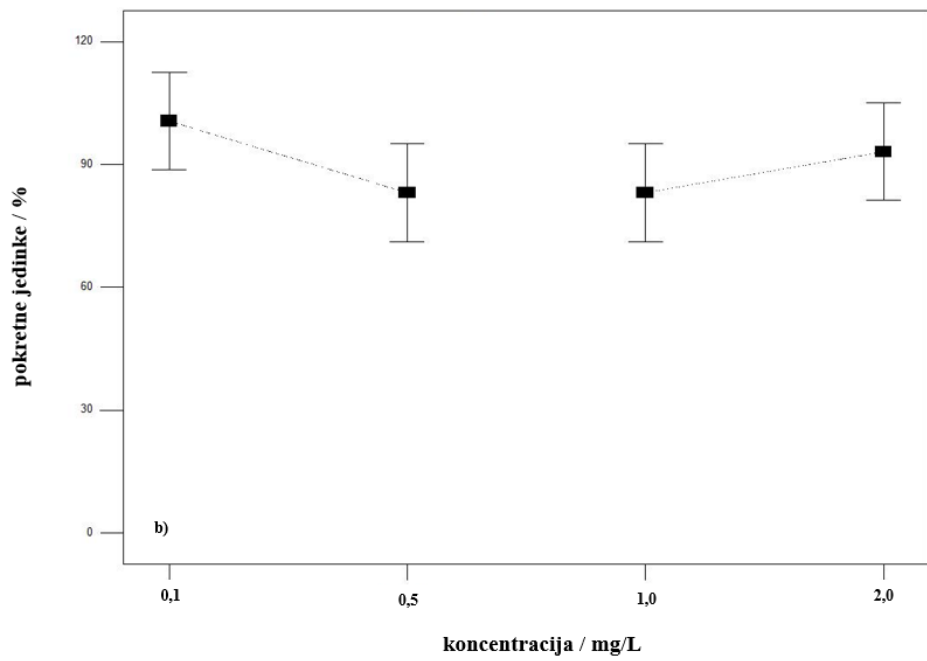
U tablici 11 prikazani su rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* modulom ANOVA, a na slici 33 je 2D prikaz odzivne površine u međuovisnosti čimbenika.

**Tablica 11.** Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za test toksičnosti s *Daphnia magna*.

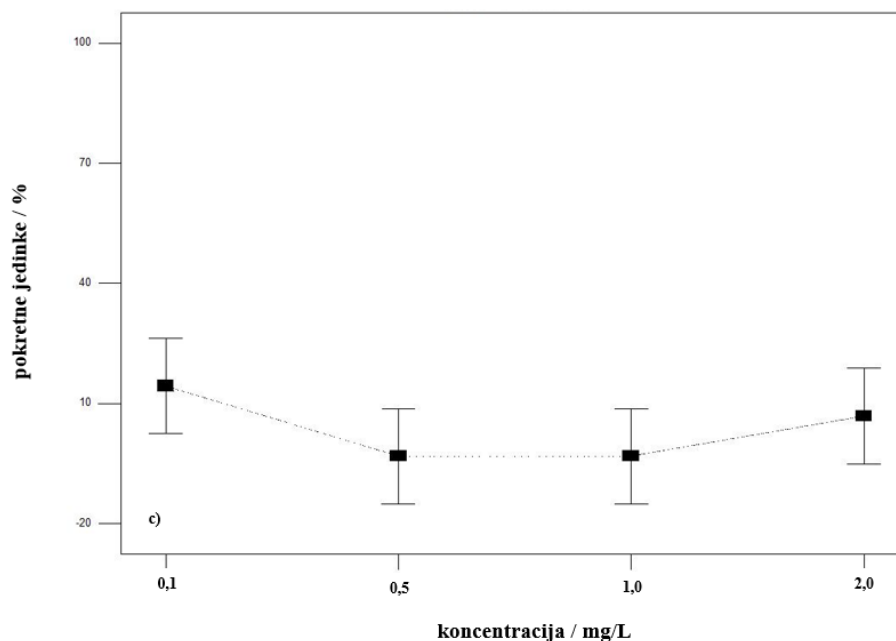
	<b>Zbroj kvadrata</b>	<b>df</b>	<b>Srednji kvadrat</b>	<b>F-vrijednost</b>	<b>p-vrijednost Vjv.&gt;F</b>
<b>Model</b>	15312,50	4	3828,13	85,47	0,0020
<b>A-A</b> (A-veličina čestica / μm)	14878,13	1	14878,13	332,16	0,0004
<b>B-B</b> (B-koncentracija / mg/L)	434,38	3	144,79	3,23	0,1805
<b>Ostatak</b>	134,37	3	44,79		
<b>Ukupno</b>	15446,88	7			



a)



b)



c)

**Slika 34.** 2D prikaz odzivne površine u međuovisnosti čimbenika: a) AA (veličina čestica); b) AB (veličina čestica 0,5 µm i koncentracija); (c) AB (veličina čestica 2 µm i koncentracija).

U ovom radu provodila se statistička analiza u svrhu određivanja uvjeta u kojima dolazi do značajnog toksičnog učinka ksenobiotika na testni organizam *Daphnia magna*. Prema provedenim pokusima utvrđeno je da okolišne koncentracije farmaceutika i veličine čestica MP-a iznad 100 µm nemaju značajan toksični učinak na testni organizam *Daphnia magna*. Statistička analiza provodila se prema potpunom faktorskom dizajnu (engl. *Full Factorial design*) kao što je opisano u poglavlju 2.5.1. Neki od matematičkim modela koji su se koristili u istraživanjima toksičnog učinka različitih onečišćujućih tvari na testni organizam *Daphnia magna* su na primjer Weibullova jednadžba u radu *Santojanni i sur. (2003.)*, gdje su uzeli u obzir dva parametra  $S_0$  (heterogenost) i  $\omega$  (maksimalni životni vijek jedinke), na temelju kojih se ispitala krivulja preživljavanja vodenbuha<sup>152</sup>; Sinko–Streiferov model korišten u radu *Ruttera i sur. (2017.)* koji opisuje kontinuirano vrijeme dinamike populacije s parametrima  $u$  (dob) i  $t$  (vrijeme)<sup>153</sup>; Tukeyjev post hoc test s Bonferronijevom korekcijom u radu *Grzesiuk i sur. (2020.)*, gdje se pratio utjecaj farmaceutika na parametre životnog ciklusa vodenbuha, kao i postotak deformiranih embrija<sup>154</sup> te mnogi drugi. Najčešće promatrani parametri u radovima s *Daphnia magna* su rast, plodnost i smrtnost.<sup>153</sup> U tablici 9 prikazani su rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* modulom ANOVA. U situacijama kada je naglasak na

otkrivanju faktora koji imaju utjecaja na proces ili na procjenu samog utjecaja najčešće se koristi potpuni faktorski dizajn. Ispitivao se učinak nezavisnih varijabli (veličina čestica i koncentracija) s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (postotak pokretnih vodenbuha) u testu toksičnosti analizom varijance (ANOVA) korištenjem programa *Design Expert*, s razinom značajnosti  $p > 0,05$ . F-vrijednost modela manja od 0,0500 ukazuje na to da su čimbenici modela značajni. Provedbom analize kao značajni čimbenik pokazao se model A, odnosno veličina čestice. Dobivene vrijednosti veće od 0,1000 označavaju da parametri modela nisu značajni, te ih je potrebno promijeniti. Model se može prikazati u obliku dvodimenzionalnih grafova površine odziva. Dvodimenzionalni (2D) prikaz odzivnih površina prikazuje nam površinu prema kojoj se može vidjeti utjecaj promatranih parametara na postotak pokretnih vodenbuha. Prema 2D grafu ovisnosti nezavisne (veličina čestica) i zavisne (postotak pokretnih vodenbuha) varijable na slici 33 uočava se da se postotak pokretnih vodenbuha smanjuje s povećanjem veličina čestica od 0,5 do 2  $\mu\text{m}$ . Promatrajući ovisnost nezavisne varijable (koncentracija) i zavisne (postotak pokretnih vodenbuha) obzirom na veličinu čestica od 0,5 i 2  $\mu\text{m}$  možemo vidjeti da postotak pokretnih vodenbuha opada pri srednjim vrijednostima koncentracija, ali su pri 2  $\mu\text{m}$  vrijednosti postotka pokretnih vodenbuha puno manje, odnosno dolazi do značajnog toksičnog učinka na testni organizam *Daphnia magna*. Generalno se uočava da veličina čestica MP od 2  $\mu\text{m}$  ima značajno toksičniji učinak od čestica veličine 0,5  $\mu\text{m}$ , te da s porastom koncentracije dolazi do povećanog toksičnog učinka. U programu dobiveni  $R^2$  iznosi 0,9797, što također pokazuje da je model dobro postavljen. Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u tablici 12 uvjeti koji su se pokazali značajnim za proces ispitivanja toksičnog učinka na testni organizam *Daphnia magna* su najmanja veličina čestica (0,5  $\mu\text{m}$ ) i najmanja koncentracija (0,1 mg/L), odnosno uvjeti koji nemaju negativan toksičan učinak.

**Tablica 12.** Uvjeti u kojima ne dolazi do značajnog toksičnog učinka na testni organizam *Daphnia magna* dobiveni pomoću *Design Expert*-a.

<b>veličina čestica / <math>\mu\text{m}</math></b>	0,5
<b>koncentracija / mg/L</b>	0,1

## 5. ZAKLJUČAK

Ispitivanje akutne toksičnosti na testnom organizmu *Daphnia magna* ima mnogobrojne prednosti kao što su niska cijena, jednostavnost, brz i osjetljiv test s mogućnošću mnogobrojnih ponavljanja. Cilj ovog rada bio je ispitati toksični učinak MP-a (PS, PET, PVC i PE), antivirusika (ATA, EMT, NIR, OST, RIB i SOF) i antibiotika (AZ) kao pojedinačnih okolišnih ksenobiotika te u kombinaciji (binarne i ternarne mješavine) tijekom 48 sati. Na temelju provedenih pokusa može se zaključiti sljedeće:

- prije postavljanja pokusa potvrđena je pouzdanost provedbe testova toksičnosti pomoću referentne tvari kalijeva dikromata, odnosno  $EC_{50}$  vrijednost iznosila je 0,88 mg/L što je u skladu s referentnim vrijednostima;
- u pojedinačnom pokusu četiri vrste MP-a različite veličine čestica (500 mg/L; 100 – 300, 300 – 500, 500 – 700  $\mu$ m) s vodenbuhom *Daphnia magna* nije primijećen toksični učinak, što ukazuje da čestice veličina koje nisu dostupne za unos u organizam nemaju toksičan učinak;
- u ispitivanju toksičnog učinka PS-a veličine čestica 2  $\mu$ m i 0,5  $\mu$ m na vodenbuhu *Daphnia magna*, pokazao se značajan toksičan učinak, ovisno o veličini čestica i koncentracijama vodene suspenzije. Čestice PS-a veličine 2  $\mu$ m imaju toksičniji utjecaj od čestica 0,5  $\mu$ m, odnosno pokretljivost jedinki iznosila je 0 % za koncentracije 0,5; 1; 2 i 10 mg/L PS-a od 2  $\mu$ m, što je u skladu s činjenicom kako vodenbuhe unose u organizam čestice raspona veličina 1 – 50  $\mu$ m;
- $EC_{50}$  vrijednost za čestice PS-a 0,5  $\mu$ m iznosi 33,62 mg/L, a za čestice PS-a 2  $\mu$ m 0,02 mg/L, što nam potvrđuje značajan toksični učinak PS-a veličine čestica od 2  $\mu$ m;
- u pojedinačnom pokusu antivirusika EMT, NIR, OST, RIB i SOF (0,001; 0,01 i 0,1 mmol/L) i ATA (0,003; 0,0003 i 0,00003 mmol/L) s vodenbuhom *Daphnia magna* nije primijećen toksični učinak, što ukazuje da okolišne koncentracije antivirusika ne pokazuju toksični učinak;
- u pojedinačnom pokusu antibiotika AZ s vodenbuhom *Daphnia magna* primijećen je toksični učinak koji je rastao s porastom koncentracije, te je pokretljivost vodenbuha *Daphnia magna* počela opadati pri koncentraciji 0,1 i 0,25 mmol/L na 80 %, odnosno pri 0,5 mmol/L na 50 %, a izračunata  $EC_{50}$  vrijednost iznosi 0,6 mg/L;
- binarne i ternarne mješavine PS-a (500 mg/L; 100 – 300  $\mu$ m) s antivirusicima (0,003 mmol/L ATA te 0,1 mmol/L EMT, NIR, OST, RIB i SOF) nisu pokazale toksični učinak na vodenbuhu *Daphnia magna* jer je pokretljivost vodenbuha bila 100 %, osim za je

kombinaciju PS+ EMT+NIR koja je rezultirala s 80 % pokretnih jedinki vodenbuha *Daphnia magna*;

- binarne mješavine MP-a (PS, PE, PET i PVC, 500 mg/L; 100 – 300 µm) s AZ (0,1; 0,25 i 0,5 mmol/L) pokazale su značajan toksični učinak na vodenbuhu *Daphnia magna* povećanjem koncentracije, gdje su kombinacije AZ s PE, odnosno PET pokazale značajan pad pokretnih jedinki s 80 % pri 0,1 mmol/L AZ na 20 % pri 0,5 mmol/L AZ;
- ternarne mješavine PS-a (500 mg/L; 100 – 300 µm) s AZ (0,1 mmol/L) i antivroticima (0,003 mmol/L ATA te 0,1 mmol/L EMT, NIR, OST, RIB i SOF), nisu pokazale značajan toksični učinak, najveću inhibiciju pokretljivosti jedinki imale su kombinacije PS+AZ+EMT te PS+AZ+OST, iako ne značajnu jer je 80 % jedinki vodenbuhe *Daphnia magna* bilo pokretno;
- statističkom analizom utvrđeno je da veličina čestica od 0,5 µm i koncentracija od 0,1 mg/L nemaju negativan toksični učinak na testni organizam *Daphnia magna*;
- potvrdili smo da značajni toksični učinci ksenobiotika na *Daphnia magna* ovise o koncentracijama i veličini čestica te da značajno mogu utjecati na okoliš, akvatičke organizme i zdravlje ljudi.

## 6. POPIS SIMBOLA

AIDS – engl. *acquired immune deficiency syndrome*

ANOVA – engl. *Analysis of Variance*

ATA – atazanavir

AZ – azitromicin

CoV – koronavirus

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EMT – emtricitabin

ERA – engl. *environmental risk assessment*

ERI – eritromicin

HDPE – polietilen visoke gustoće

HIV – virus humane imunodeficijencije

KLA – klaritromicin

LDPE – polietilen niske gustoće

LLDPE – kratkorazgranati polietilen niske gustoće

MAP – makroplastika

MEP – mezoplastiku

MP – mikroplastika

NIR – nirmatrelvir

NiV – virus Nipah

NOP – napredni oksidacijski proces

NP – nanoplastika

OECD – engl. *Organization for Economic Cooperation and Development*

OSE – oselfamivir

PE -polietilena

PET – poli(etilen-tereftalat)

PLA – poliaktid

PP – polipropilen

PS – polistirena

PVC – poli(vinil-klorid)

RIB – ribavirin

RNA – ribonukleinska kiselina

SAD – Sjedinjene Američke Države

SOF – sofosbuvir



## 7. LITERATURA

- [1] Hejna, M., Kapuścińska, D. i Aksmann, A., Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review on Eco-Toxicology and the Remediation Potential of Algae, *Int J Environ Res Public Health*, **19** (2022).
- [2] Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K. i Ślaska, B., *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review, *Science of the Total Environment*, (2020).
- [3] Duis, K. i Coors, A., Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects, *Environ Sci Eur*, **28** (2016).
- [4] Küster, A. i Adler, N., Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **369** (2014).
- [5] Flaherty, C.-M. i Dodson, S.-I. (2005). Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction, *Chemosphere*, **61** (2005), 0–207.
- [6] khalidi-idrissi, K., Madinzi, A., Anouzla, A., Pala, A., Mouhir, L., Kadmi, Y. i Souabi, S., Recent advances in the biological treatment of wastewater rich in emerging pollutants produced by pharmaceutical industrial discharges, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, (2023).
- [7] Shearer, L., Pap, S. i Gibb, S.W., Removal of pharmaceuticals from wastewater: A review of adsorptive approaches, modelling and mechanisms for metformin and macrolides, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **10** (2022).
- [8] Sellier, A., Khaska, s. i Le Gal La Salle, C., Assessment of the occurrence of 455 pharmaceutical compounds in sludge according to their physical and chemical properties: A review, *Journal of Hazardous Materials*, **426** (2022).
- [9] Gómez-Regalado, M.C., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. i Zafra-Gómez, A., Bioaccumulation/bioconcentration of pharmaceutical active compounds in aquatic organisms: Assessment and factors database, *Science of The Total Environment*, **861** (2023).
- [10] Zolotova, N., Kosyreva, A., Dzhalilova, D., Fokichev, N. i Makarova, O., Harmful effects of the microplastic pollution on animal health: a literature review, *PeerJ*, **10** (2022).
- [11] Vivekanand, A.C., Mohapatra, S. i Tyagi, V.K., Microplastics in aquatic environment: Challenges and perspectives, *Chemosphere*, **282** (2021).
- [12] Thompson, R.C., Moore, C.J., vom Saal, F.S., Swan, S.H., Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **364** (2019), 2153-2166.
- [13] <https://www.efsa.europa.eu/hr/glossary/era>, pristupljeno 23. lipnja 2023.

- [14] Moermond, C.T.A., Janssen, M.P.M., de Knecht, J.A., Montforts, M.H.M.M., Peijnenburg, W.J.G.M., Zweers, P.G.P.C. i Sijmy, D.T.H.M., PBT Assessment using the revised Annex XIII of REACH: a comparison with other regulatory frameworks, *Integr. Environ. Assess. Manag.*, **8** (2011), 359–371.
- [15] Fabricant, L., Edelstein, O., Dispigno, J. i Weseley, A., The effect of microplastics on the speed, mortality rate, and swimming patterns of *Daphnia Magna*, *Journal of Emerging Investigators*, **4** (2021).
- [16] <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>, pristupljeno 18. svibnja 2023.
- [17] Bermúdez, J.R. i Swarzenski, P.W., A microplastic size classification scheme aligned with universal plankton survey methods, *MethodsX*, **8** (2021).
- [18] González-Pleiter, M., Pedrouzo-Rodríguez, A., Verdú, I., Leganés, F., Marco, E., Rosal, R., i Fernández-Piñas, F., Microplastics as vectors of the antibiotics azithromycin and clarithromycin: Effects towards freshwater microalgae, *Chemosphere*, **268** (2021).
- [19] Huang, C.-H., Chu, T.-W., Kuo, C.-H., Hong, M.-C., Chen, Y.-Y. i Chen, B., Effects of Microplastics on Reproduction and Growth of Freshwater Live Feeds *Daphnia magna*, *Fishes*, **7** (2022), 181.
- [20] Rogers, K., "microplastics", *Encyclopedia Britannica*, (2022). <https://www.britannica.com/technology/microplastic>, pristupljeno 18. svibnja 2023.
- [21] Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A. i Setälä, O., Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators., *Food Webs*, **17** (2018).
- [22] Khalid, N., Aqeel, M., Noman, A., Mulk Khan, S. i Akhter, N., Interactions and effects of microplastics with heavy metals in aquatic and terrestrial environments, *Environmental Pollution*, **290** (2021)
- [23] <https://www.sciencehistory.org/science-of-plastics>, pristupljeno 2. lipnja 2023.
- [24] Ali Ashter, S., Chapter Five - Low performance demand plastics and elastomers for medical devices, *Applications of Polymers and Plastics in Medical Devices*, (2022), 79-89.
- [25] <http://www.arhiteko.hr/menu.html?http://www.arhiteko.hr/polistiren.html>, pristupljeno 29. svibnja 2023.
- [26] Sharma, R., Kumar Sharma, A., Sharma, B. i Sarkar, A., Chapter 6 - Biodegradability of synthetic plastics: effective degradation mechanisms, *Biodegradability of Conventional Plastics*, (2023) 101-120.

- [27] Rybak, J., Stojanowska, A. i Zeynalli, F., Chapter 9 - Biodegradability and bioremediation of polystyrene-based pollutants: An overview of biological degradation of polystyrene and modified polystyrene for future studies, *Biodegradability of Conventional Plastics*, (2023), 179-200.
- [28] <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic>, pristupljeno 30. svibnja 2023.
- [29] Tin Sin, L. i Soo Tuen, B., 1 - Plastics and environmental sustainability issues, *Plastics and Sustainability*, (2023), 1-43.
- [30] Baskaran, S. i Sathiavelu, M., Chapter 2 - Bioaugmentation and biostimulation of dumpsites for plastic degradation, *Cost Effective Technologies for Solid Waste and Wastewater Treatment*, (2022), 9-23.
- [31] <https://www.creativemechanisms.com/blog/everything-you-need-to-know-about-pvc-plastic>, pristupljeno 30. svibnja 2023.
- [32] Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S. i Zhang, Y., Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) larvae, *Environment International*, **145** (2020).
- [33] Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., i Fava, F., Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnology*, **52** (2019), 35-41.
- [34] Ronca, S., Chapter 10 – Polyethylene, *Brydson's Plastics Materials (Eighth Edition)*, (2017), 247-278.
- [35] Peng, B.-Y., Xu, Y., Sun, Y., Xiao, S., Sun, J., Shen, Z., Chen, J., Zhou, X. i Zhang, Y., Biodegradation of polyethylene (PE) microplastics by mealworm larvae: Physiological responses, oxidative stress, and residual plastic particles, *Journal of Cleaner Production*, **402** (2023).
- [36] Yao, Z., Seong, H.J. i Jang, Y.S., Environmental toxicity and decomposition of polyethylene, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **242** (2022).
- [37] Lambert, S., Scherer, C. i Wagner, M., Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties, *Integrated Environmental Assessment and Management*, **13** (2017), 470-475.
- [38] Vieira, Y., Lima, E. C., Foletto, E. L., i Dotto, G. L., Microplastics physicochemical properties, specific adsorption modeling and their interaction with pharmaceuticals and other emerging contaminants, *Science of The Total Environment*, **753** (2020).

- [39] Haque, F. i Fan, C., Fate and Impacts of Microplastics in the Environment: Hydrosphere, Pedosphere, and Atmosphere, *Environments*, **10** (2023), 70.
- [40] Ziani, K., Ioniță-Mîndrican, C.-B., Mititelu, M., Neacșu, S.M., Negrei, C., Moroșan, E., Drăgănescu, D. i Preda, O.T., Microplastics: A Real Global Threat for Environment and Food Safety: A State of the Art Review, *Nutrients*, **15** (2023), 617.
- [41] Thakur, S., Mathur, S., Patel, S. i Paital, B., Microplastic Accumulation and Degradation in Environment via Biotechnological Approaches, *Water*, **14** (2022).
- [42] Chae, Y., Kim, D. i An, Y.J., Effects of micro-sized polyethylene spheres on the marine microalga *Dunaliella salina*: Focusing on the algal cell to plastic particle size ratio, *Aquat. Toxicol.*, **216** (2019).
- [43] Brown, E., MacDonald, A., Allen, S. i Allen, D., The potential for a plastic recycling facility to release microplastic pollution and possible filtration remediation effectiveness, *Journal of Hazardous Materials Advance*, **10** (2023).
- [44] Bhuyan, S., Effects of Microplastics on Fish and in Human Health, *Sec. Toxicology, Pollution and the Environment*, **10** (2022).
- [45] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651322012738#bib28>
- [46] Liu, Z., Yu, P., Cai, M., Wu, D., Zhang, M., Huang, Y. i Zhao, Y., Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater Cladoceran *Daphnia pulex*, *Chemosphere*, **215** (2019), 74-81.
- [47] Kelpsiene, E., Torstensson, O., Ekvall, M.T., Hansson, L. i Cedervall, T., Long-term exposure to nanoplastics reduces life-time in *Daphnia magna*, *Sci. Rep.*, **10** (2020), 5977-5979.
- [48] Frankel, R., Ekvall, M.T., Kelpsiene, E., Hansson, L. i Cedervall, T., Controlled protein mediated aggregation of polystyrene nanoplastics does not reduce toxicity towards *Daphnia magna*, *Environ. Sci.: Nano.*, **7** (2020), 1518-1524.
- [49] An, D., Na, J., Song, J. i Jung, J., Size-dependent chronic toxicity of fragmented polyethylene microplastics to *Daphnia magna*, *Chemosphere*, **271** (2021).
- [50] Liu, Y., Zhang, J., Zhao, H., Cai, J., Sultan, Y., Fang, H., Zhang, B. i Ma, J., Effects of polyvinyl chloride microplastics on reproduction, oxidative stress and reproduction and detoxification-related genes in *Daphnia magna*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **254** (2022).
- [51] Han, B., Geon, P., Yoo, S., Kim, C. i Jung, J., Effect of Chronic Toxicity by Waste Microplastics (PET) on *Daphnia magna*, *Ecology and Resilient Infrastructure*, (2021), 281-289.

- [52] Yu, Z.F., Song, S., Xu, X.L, Ma, Q. i Lu, Y., Sources, migration, accumulation and influence of microplastics in terrestrial plant communities, *Environmental and Experimental Botany*, **192** (2021).
- [53] Boots, B., Russell, C.W. i Green, D.S., Effects of microplastics in soil ecosystems: above and below ground, *Environ. Sci. Technol.*, **53** (2019), 11496-11506.
- [54] Yao, X., Luo, X.-S., Fan, J., Zhang, T., Li, H. i Wei, Y., Ecological and human health risks of atmospheric microplastics (MPs): a review, *Environ. Sci.: Atmos.*, **2** (2022), 921-942.
- [55] Wang, L., Nabi, G., Yin, L., Wang, Y., Li, S., Hao, Z. i Li, D., Birds and plastic pollution: recent advances, *Avian Res*, **12** (2021).
- [56] Jenner, L.C., Rotchell, J.M., Bennett, R.T., Cowen, M., Tentzeris, V. i Sadofsky, L.R., Detection of microplastics in human lung tissue using  $\mu$ FTIR spectroscopy, *Science of The Total Environment*, **831** (2022).
- [57] Homaeigohar, S., Liu, X. i Elbahri, M., Antiviral polysaccharide and antiviral peptide delivering nanomaterials for prevention and treatment of SARS-CoV-2 caused COVID-19 and other viral diseases, *Journal of Controlled Release*, **358** (2023), 476-497.
- [58] Vardanyan, R. i Hruby, V., Chapter 34 - Antiviral Drugs, *Synthesis of Best-Seller Drugs*, (2016), 687-736.
- [59] Chakravarty, M. i Vora, A., Nanotechnology-based antiviral therapeutics, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **11** (2021), 748-787.
- [60] Stan, D., Enciu, A.-M., Mateescu, A.-L., Ion, A.-C., Brezeanu, A.-C. i Tanase, C., Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation, *Front. Pharmacol.*, **12** (2021).
- [61] <https://my.clevelandclinic.org/health/drugs/21531-antivirals>, pristupljeno 30. svibnja 2023.
- [62] Jain, S., Kumar, P., Vyas, R.K., Occurrence and Removal of Antiviral Drugs in Environment: A Review, *Water Air Soil Pollut.*, **224** (2013).
- [63] Kausar, S., Said Khan, F., Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M., Akram, M., Riaz, M., Rasool, G., Hamid Khan, A., Saleem, I., Shamim, S. i Malik, A., A review: Mechanism of action of antiviral drugs, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **35** (2021).
- [64] Ryu, W-S., Virus life cycle, *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, (2017), 31–45.
- [65] Yoosefian, M., Zeraati Moghani, M. i Juan, A., In silico evaluation of atazanavir as a potential HIV main protease inhibitor and its comparison with new designed analogs, *Computers in Biology and Medicine*, **145** (2022).

- [66] Atazanavir Krka (atazanavir), Pregled informacija o lijeku Atazanavir Krka i zašto je odobren u EU-u, European Medicines Agency, 2019. Reproduction is authorised provided the source is acknowledged, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/atazanavir-krka-epar-medicine-overview\\_hr.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/atazanavir-krka-epar-medicine-overview_hr.pdf), pregledano 31. svibnja 2023.
- [67] Scholar, E., Emtricitabine, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, (2009), 1-5.
- [68] Paintsil, E. i Cheng, Y-C., Antiviral Agents, *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, (2009), 223-257.
- [69] Hashemian, S.M.R., Sheida, A., Taghizadieh, M., Memar, M.Y., Hamblin, M.R., Baghi, H.B., Nahand, J.S., Asemi, Z. i Mirzaei, H., Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy?, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **162** (2023).
- [70] Hammond, J., Leister-Tebbe, H., Gardner, A., Abreu, P., Bao, W., Wisemandle, W., Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with covid-19, *N. Engl. J. Med.*, **386** (2022), 1397-1408.
- [71] Owen, D.R., Allerton, C.M.N., Anderson, A.S., Aschenbrenner, L., Avery, M., Berritt, S., An oral SARS-CoV-2 M(pro) inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19, *Science*, **374** (2021), 1586-1593.
- [72] Kuzman, I. i Curić, I., Oseltamivir: farmakokinetika, klinička učinkovitost i važnost u pandemiji influence, *Infektološki glasnik*, **26** (2006), 31-38.
- [73] Oxford, J., Oseltamivir in the management of influenza, *Expert Opin Pharmacother*, **6** (2005), 2493–500.
- [74] Straub, J. O., An environmental risk assessment for oseltamivir (Tamiflu®) for sewage works and surface waters under seasonal-influenza- and pandemic-use conditions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72** (2009), 1625–1634.
- [75] <https://www.drugs.com/monograph/ribavirin.html>, pristupljeno 1. lipnja 2023.
- [76] Glue, P., Schenker, S., Gupta, S., Clement, R.P., Zambas, D. i Salfi, M., The single dose pharmacokinetics of ribavirin in subjects with chronic liver disease, *Br J Clin Pharmacol*, **49** (2000), 417-21.
- [77] Huggins, J-W., Hsiang, C-M. i Cosgriff, T-M., Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome, *The Journal of Infectious Diseases*, **164** (1991), 1119–1127.
- [78] Fernandez, H., Banks, G., i Smith, R., Ribavirin: A clinical overview, *European Journal of Epidemiology*, **2** (1986), 1–14.

- [79] Wu, X., Zhang, J., Hu, S., Zhang, G., Lan, H., Peng, J. i Liu, H., Evaluation of degradation performance toward antiviral drug ribavirin using advanced oxidation process and its relations to ecotoxicity evolution, *Sci Total Environ*, (2022).
- [80] Scholar, E., Atazanivir, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, (2009), 1-7.
- [81] Hezode, C., Reau, N., Svarovskaia, E.S., Doehle, B.P., Shanmugam, R., Dvory-Sobol, H., Hedskog, C., McNally, J., Osinusi, A., Brainard, D.M., Miller, M.D., Mo, H., Roberts, S.K., O'Leary, J.G., Shafran, S.D. i Zeuzem, S., Resistance analysis in patients with genotype 1-6 HCV infection treated with sofosbuvir/velpatasvir in the phase III studies, *J. Hepatol*, **68** (2018), 895-903.
- [82] Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Chapman, R., Lapen, D. R., i Topp, E., Fate of the antiretroviral drug tenofovir in agricultural soil, *Science of the Total Environment*, **408** (2010), 5559–5564.
- [83] Kummerer, K., Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks, (2008).
- [84] Kummerer, K., The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges, *Journal of Environmental Management*, **90** (2009), 2354–2366.
- [85] Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., i Roden, N., Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps, *Environmental Science and Technology*, **40** (2006), 3456–3462.
- [86] Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., i McArdell, C. S., Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater, *Water Research*, **45** (2011), 75–92.
- [87] Bottoni, P., Caroli, S., i Caracciolo, A. B., Pharmaceuticals as priority water contaminants, *Toxicological and Environmental Chemistry*, **92** (2010), 549–565.
- [88] M. Whitacre, D., Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, **218**
- [89] Omotola, E.O., Genthe, B., Ndlela, L. i Olatunji, O.S., Environmental Risk Characterization of an Antiretroviral (ARV) Lamivudine in Ecosystems, *Int J Environ Res Public Health*, **18** (2021).
- [90] Almeida, L.C., Mattos, A.C., Dinamarco, C.P.G., Figueiredo, N.G. i Bila, D.M., Chronic toxicity and environmental risk assessment of antivirals in *Ceriodaphnia dubia* and *Raphidocelis subcapitata*, *Water Sci Technol*, **84** (2021), 1623–1634.

- [91] Schlüter-Vorberg, L., Prasse, C., Ternes, T.A., Mückter, H. i Coors, A., Toxification by Transformation in Conventional and Advanced Wastewater Treatment: The Antiviral Drug Acyclovir, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, **2** (2015), 342–346.
- [92] Czech, B., Krzyszczak, A., Boguszewska-Czubara, A., Opielak, G., Joško, I. i Hojamberdiev, M., Revealing the toxicity of lopinavir- and ritonavir-containing water and wastewater treated by photo-induced processes to *Danio rerio* and *Allivibrio fischeri*, *Science of The Total Environment*, **824** (2022).
- [93] Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Chapman, R., Lapen, D. R., i Topp, E., Fate of the antiretroviral drug tenofovir in agricultural soil, *Science of the Total Environment*, **408** (2010), 5559–5564.
- [94] Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., i Lambropoulou, D., Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity, *Science of The Total Environment*, **699** (2019).
- [95] <https://www.plymouth.ac.uk/news/drugs-used-to-treat-hiv-and-flu-can-have-detrimental-impact-on-crops>, pristupljeno 20. kolovoza 2023.
- [96] Kraemer, S.A., Ramachandran, A. i Perron, G.G., Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy, *Microorganisms*, **7** (2019).
- [97] antibiotici. *Hrvatska enciklopedija*, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, (2021), pristupljeno 2. lipnja 2023.
- [98] <https://www.definitivehc.com/resources/healthcare-insights/most-prescribed-antibiotics>, pristupljeno 8. lipnja 2023.
- [99] Yang, L., Yunfeng, M., Likun, Y., Shengzi, D., Fanqi, Z., Jianqiu, C., Yanhua, L. i Bin, Z., Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **197** (2020).
- [100] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azithromycin#section=NLM-Curated-PubMed-Citations>, pristupljeno 2. lipnja 2023.
- [101] <https://www.flickr.com/photos/191856080@N06/50856022293/>, pristupljeno 2. lipnja 2023.
- [102] Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Ribeiro, C., Tiritan, M. E., Pereira, M. F. R., i Silva, A. M. T., Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers, *Science of The Total Environment*, **649** (2019), 1083-1095.
- [103] Miklec, K., Toth, S., Loborec, J. i Grčić, I., Mikroonečišćivala u površinskim i podzemnim vodama Europe, *Hrvatske vode*, **30** (2022), 95-106.



- [104] Almeida, A.C., Gomes, T., Lomba, J.A.B. i Lillicrap, A., Specific toxicity of azithromycin to the freshwater microalga *Raphidocelis subcapitata*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **222** (2021).
- [105] Mendonça-Gomes, J.Mm, da Costa Araújo, A.P., da Luz, T.M., Charlie-Silva, I., Braz, H.L.B., Jorge, R.J.B., Ahmed, M.A.I., Nóbrega, R.H., Vogel, C.F.A. i Malafaia, G., Environmental impacts of COVID-19 treatment: Toxicological evaluation of azithromycin and hydroxychloroquine in adult zebrafish, *Sci Total Environ*, **10** (2021).
- [106] Dong, Y., Fang, Z., Xu, Y., Wang, Q. i Zou, X., The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*, *Emerging Contaminants*, **5** (2019), 297-302.
- [107] Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Duan, S., Zhou, F., Chen, J., Liu, Y. i Zhang, B., Effects of azithromycin on feeding behavior and nutrition accumulation of *Daphnia magna* under the different exposure pathways, *Ecotoxicol Environ Saf.*, **197** (2020).
- [108] Liu, C., Tan, L., Zhang, L., Tian, W. i Ma, L., A Review of the Distribution of Antibiotics in Water in Different Regions of China and Current Antibiotic Degradation Pathways, *Front. Environ. Sec. Toxicology, Pollution and the Environmen*, **9** (2021).
- [109] Rosi-Marshall, E.J., Snow, D., Bartelt-Hunt, S.L., Paspalof, A. i Tank, J.L., A review of ecological effects and environmental fate of illicit drugs in aquatic ecosystems, *J. Hazard. Mater.*, **282** (2015), 18–25.
- [110] Flaherty,, C.M. i Dodson, S.I., Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction, *Chemosphere*, **61** (2005), 200–207.
- [111] Jung, J., Kim, Y., Kim, J., Jeong, D.H. i Choi, K., Environmental levels of ultraviolet light potentiate the toxicity of sulfonamide antibiotics in *Daphnia magna*, *Ecotoxicology*, **17** (2008), 37–4
- [112] Brain, R. A., Hanson, M. L., Solomon, K. R., i Brooks, B. W., Aquatic Plants Exposed to Pharmaceuticals: Effects and Risks. *Rev. Environ. Contam. T.*, **192** (2008), 67–115.
- [113] Grenni, P., Ancona, V., i Barra Caracciolo, A., Ecological Effects of Antibiotics on Natural Ecosystems: A Review, *Microchemical J.*, **136** (2018), 25–39.
- [114] Väitalo, P., Kruglova, A., Mikola, A. i Vahala, R., Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: A mini-review, *Int J Hyg Environ Health*, **220** (2017), 558-569.
- [115] Desbiolles, F., Malleret, L., Tiliacos, C., Wong-Wah-Chung, P. i Laffont-Schwob, I., Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?, *Sci. Total Environ*, **639** (2018), 1334–1348.

- [116] Hanamoto, S. i Ogawa, F., Predicting the sorption of azithromycin and levofloxacin to sediments from mineral and organic components, *Environ. Pollut.* **255** (2019).
- [117] Wilford, W.A., Toxicity of 22 therapeutic compounds to six fishes, US Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, Bureau of Sports Fisheries and Wildlife, 1966.
- [118] Macri, A. i Sbardella, E., Toxicological evaluation of nitrofurazone and furazolidone on *Selenastrum capricornutum*, *Daphnia magna* and *Musca domestica*, *Ecotoxicol Environ Saf*, **8** (1984), 115–105.
- [119] Lanzky, P.F., i Halling-Sorenson, B., The toxic effects of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms, *Chemosphere*, **35** (1997), 2553–2561.
- [120] Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B. i Kusk, K., Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*, *Chemosphere*, **40** (2000), 723–730.
- [121] Cycoń, M., Mroziak, A. i Piotrowska-Seget, Z., Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity, *Sec. Microbiotechnology*, **10** (2019).
- [122] Gao, F., Cui, S., Li, P., Wang, X., Li, M., Song, J., Li, J. i Song, Y., Ecological toxicological effect of antibiotics in soil, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, **186** (2018).
- [123] Danilova, N., Galitskaya, P. I Selivanovskaya, S., Veterinary antibiotic oxytetracycline's effect on the soil microbial community, *J. Ecology. Environ.*, **44** (2020).
- [124] Gruiz, K., Fekete-Kertész, I., Kungléné-Nagy, Z., Hajdu, C., Feigl, V., Vaszita, E., i Molnár, M., Direct toxicity assessment — Methods, evaluation, interpretation, *Science of The Total Environment*, **563-564** (2016), 803–812.
- [125] Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J., Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, **3** (2017), 51–82.
- [126] <https://www.bioinstitut.hr/blog/biologija/testovi-toksicnosti-zivim-organizmima-102/>, pristupljeno 8. lipnja 2023.
- [127] Singh, S., Khanna, V. K., i Pant, A. B., Development of In Vitro Toxicology, *In Vitro Toxicology*, (2018), 1–19.
- [128] [http://www.toxicologyschools.com/free\\_toxicology\\_course1/a42.htm](http://www.toxicologyschools.com/free_toxicology_course1/a42.htm), pristupljeno 29. lipnja 2023.
- [129] Roell, K.R., Reif, D.M. i Motsinger-Reif, A.A., An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy—Perspectives from Across Disciplines, *Sec. Cancer Molecular Targets and Therapeutics*, **8** (2017).

- [130] Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C. i Lai, L., Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology, *PLoS One.*, **9** (2014).
- [131] Thiagarajan, V., Alex, S. A., Seenivasan, R., Chandrasekaran, N., i Mukherjee, A., Interactive effects of micro/nanoplastics and nanomaterials/pharmaceuticals: Their ecotoxicological consequences in the aquatic systems, *Aquatic Toxicology*, **232** (2021).
- [132] <https://fineartamerica.com/featured/water-flea-daphnia-magna-ted-kinsman.html?product=poster>, pristupljeno 18. kolovoza 2023.
- [133] Eberhardt, L. L. i Thomas, J. M., Designing environmental field studies, *Ecological Monographs*, **61** (1991), 53-73.
- [134] Ukrainczyk, M., Planiranje pokusa u industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **5** (2010), 96-105.
- [135] Pfaff, S. i Salopek, B., Primjena planiranja eksperimenata u oplemenjivanju mineralnih sirovina, *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, **16** (2004), 97-106.
- [136] Bell, S., Experimental Design, *International Encyclopedia of Human Geography*, (2009), 672–675.
- [137] Das, A. K., i Dewanjee, S., Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation, *Computational Phytochemistry*, (2018), 75–106.
- [138] Liu, X. F., Liu, L., Wang, Y. G., Leng, F. F., Wang, S. W. i Li, Y. C., Optimization of Total Flavonoids Extraction from *Coreopsis tinctoria* Nutt. By Response Surface Methodology, *Kem. Ind.*, **63** (2014), 391–396.
- [139] Microbiotests, Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater, [https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/daphnia-toxicity-test\\_daphtoxkit-f\\_standard-operating-procedure.pdf](https://www.microbiotests.com/wp-content/uploads/2019/07/daphnia-toxicity-test_daphtoxkit-f_standard-operating-procedure.pdf)
- [140] International-Standard (ISO 6341:2012), Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test, 2012.
- [141] Nannou, C., Ofrydopoulou, A., Evgenidou, E., Heath, D., Heath, E., i Lambropoulou, D., Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity, *Science of The Total Environment*, **699** (2019).
- [142] Mahaye, N. i Musee, N., Effects of Two Antiretroviral Drugs on the Crustacean *Daphnia magna* in River Water, *Toxics*, **423** (2022).
- [143] Koivisto, S., Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?, *Environmental Pollution*, **90** (1995), 263-267.

- [144] Rehse, S., Kloas, W., i Zarfl, C., Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*, *Chemosphere*, **153** (2016), 91-99.
- [145] Yin, J., Long, Y., Xiao, W., Liu, D., Tian, Q., Li, Y., Liu, C., Chen, L. i Pan, Y., Ecotoxicology of microplastics in *Daphnia*: A review focusing on microplastic properties and multiscale attributes of *Daphnia*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **249** (2023).
- [146] Rist, S., Baun, A., i Hartmann, N. B., Ingestion of micro-and nanoplastics in *Daphnia magna*—Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environ. Pollut.*, **228** (2017), 398-407.
- [147] Gambardella, C., Morgana, S., Ferrando, S., Bramini, M., Piazza, V., Costa, E. i Faimali, M., Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **145** (2017), 250-257.
- [148] Sayed Eltemsah, Y. i Bøhn, T., Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*, *Environ. Pollut.*, **254** (2019).
- [149] Cid, R.S., Roveri, V., Vidal, D.G., Dinis, M.A.P., Cortez, F.S., Salgueiro, F.R., Toma, W., Cesar, A. i Guimarães, L.L., Toxicity of Antiretrovirals on the Sea Urchin *Echinometra lucunter* and Its Predicted Environmental Concentration in Seawater from Santos Bay (Brazilian Coastal Zone), *Resources*, **10** (2021), 114.
- [150] Nugnes, R., Russo, C., Lavorgna, M., Orlo, E., Kundi, M. i Isidori, M., Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*, *Environmental Pollution*, **313** (2022).
- [151] Zhang, P., Yan, Z., Lu, G. i Ji, Y., Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **26** (2019), 17010-17020.
- [152] Santojanni, A., Rossolini, G., Gorbi, G., Piantanelli, L., i Sartore, F., Use of a mathematical model in the analysis of survival curves of *Daphnia magna* exposed to toxicants, *Water Research*, **37** (2003), 2357–2364.
- [153] Rutter, E. M., Banks, H. T., LeBlanc, G. A., i Flores, K. B., Continuous Structured Population Models for *Daphnia magna*, *Bulletin of Mathematical Biology*, **79** (2017), 2627–2648.
- [154] Grzesiuk, M., Pijanowska, J., Markowska, M., i Bednarska, A., Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen, *Environmental Pollution*, **261** (2020).

## Životopis

Marija Kuštro [REDACTED] Završila je srednju Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga za ekološkog tehničara. Upisuje 2017. godine Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije preddiplomski studij Ekoinženjerstvo, a zatim 2021. godine diplomski studij Ekoinženjerstvo. Završni rad radila je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dajane Kučić Grgić na temu „Utjecaj veličine čestica mikroplastike na toksičnost mikroalge *Scenedesmus* sp.“. Od 2020. godine je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te svojim doprinosom sudjeluje u organizaciji projekata. Dobitnica je „Rektorove nagrade 2021./2022. za individualni znanstveni i umjetnički rad“ te „Nagrade Tomislav Cvitaš za najbolju poster prezentaciju“. Svojim radom doprinosi u znanstvenim istraživanjima na Zavodu za industrijsku ekologiju te sudjeluje na stručnim skupovima i kongresima.