Membranska biorazgradnja ksenobiotika

Dračа, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:535421

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-12**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Drača

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Drača

MEMBRANSKA BIORAZGRADNJA KSENOBIOTIKA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Danijela Ašperger
izv. prof. dr. sc. Davor Dolar
prof. dr. sc. Marijana Hranjec

Zagreb, prosinac 2022.

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na pruženoj prilici i stručnom vodstvu prilikom izrade ovoga rada. Veliko hvala na stručnim savjetima, prenesenom znanju, strpljenju, uloženom vremenu i susretljivosti.

Veliko hvala doktorandici Bruni Babić na pružanju pomoći pri provedbi eksperimenta i izradi rada. Hvala na svim dobronamjernim savjetima, raspravama, sugestijama i velikodušnoj pomoći.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Davoru Dolaru na pruženoj prilici rada na Zavodu za fizikalnu kemiju, stručnim savjetima i pomoći prilikom izrade rada.

Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci kroz sve godine studiranja i vjeri u mene. Hvala Vam što ste uvijek bili moj oslonac.

SAŽETAK

Membranska biorazgradnja ksenobiotika

Ksenobiotici postaju sve veći problem u sustavima pročišćavanja otpadnih voda jer su relativno nove tvari i teško ih je ukloniti, a u okolišu se pojavljuju u količinama koje su neprirodne zbog ljudskog djelovanja. Posljedica njihovog neučinkovitog uklanjanja iz otpadnih voda je njihova bioakumulacija u prehrambenim lancima što čini izravnu prijetnju na ekosustave i ljudsko zdravlje.

Konvencionalna biološka metoda obrade aktivnim muljem, koja se u najvećem broju koristi u postrojenjima za obradu otpadnih voda, nije se pokazala učinkovita za uklanjanje ksenobiotika. Niska učinkovitost njihovog uklanjanja posljedica je djelomičnog zadržavanja ksenobiotika u mulju ili njihovog metabolizma u hidrofilnije i postojanije oblike koji prolaze kroz postrojenja za obradu otpadnih voda. Stoga je potrebno usmjeriti razvoj novih tehnologija koje će pospješiti njihovo uklanjanje u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda.
Alternativu konvencionalnoj obradi otpadnih voda predstavljaju membranski bioreaktori koji kombiniraju biološku obradu aktivnim muljem s membranskim procesima separacije.

Cilj ovog rada je dati pregled primjene tehnologije obrade otpadnih voda membranskim bioreaktorima te ispitati učinkovitost uklanjanja antihelmintika febantela te pesticida acetamiprida i tiakloprida membranskom biorazgradnjom. Proces biorazgradnje ksenobiotika provodio se tijekom 48 h, a analitičko praćenje ksenobiotika provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Utjecaj ksenobiotika na aktivnost aktivnog mulja ispitan je praćenjem broja razvijenih kolonija.

Membranskom biorazgradnjom ksenobitoika tijekom 48 h postignuta je najveća učinkovitost uklanjanja febantela od 98,5 %, acetamiprida 57 % te tiakloprida 42 %. Tijekom biorazgradnje detektirani su novi razgradni i/ili transformacijski produkti. Niska učinkovitost uklanjanja acetamiprida i tiakloprida posljedica je njihove toksičnosti na organizme prisutne u aktivnom mulju što ih čini neprikladnim za procese membranske biorazgradnje.

Ključne riječi:

membranska biorazgradnja, ksenobiotici, febantel, acetamiprid, tiakloprid, aktivni mulj

ABSTRACT

Membrane biodegradation of xenobiotics

Xenobiotics are becoming an increasing problem in wastewater treatment systems because they are relatively new substances and difficult to remove, and they appear in the environment in amounts that are unnatural due to human activity. The consequence of their ineffective removal from wastewater is their bioaccumulation in food chains, which poses a direct threat to ecosystems and human health.

The conventional biological method of activated sludge treatment, which is mostly used in wastewater treatment plants, is ineffective for removing xenobiotics. The low efficiency of their removal is the result of the partial retention of xenobiotics in the sludge or their metabolism into more hydrophilic and stable forms that pass through wastewater treatment plants. Therefore, it is necessary to direct the development of new technologies that will facilitate their removal in wastewater treatment systems.

An alternative to conventional wastewater treatment is represented by membrane bioreactors combining biological treatment with activated sludge and membrane separation processes.

This paper aims to provide an overview of the application of wastewater treatment technology with membrane bioreactors and to examine the effectiveness of removing the anthelmintic febantel and the pesticides acetamiprid and thiacloprid by membrane biodegradation. The process of biodegradation of xenobiotics is carried out for 48 h, and analytical monitoring of xenobiotics was carried out by high-performance liquid chromatography. The influence of xenobiotics on the activity of activated sludge was examined by monitoring the Colony Forming Units.

Membrane biodegradation of xenobiotics during 48 h achieved the highest removal efficiency of febantel at 98.5 %, acetamiprid at 57 %, and thiacloprid at 42 %. During biodegradation, new degradation and/or transformation products were detected. The low removal efficiency of acetamiprid and thiacloprid is a consequence of their toxicity to organisms present in activated sludge, which makes them unsuitable for membrane biodegradation processes.

Key words:

Membrane biodegradation, xenobiotics, febantel, acetamiprid, thiacloprid

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Ksenobiotici 2

2.1.1. Antihelmintici 3

2.1.1.1. Febantel 4

2.1.2. Pesticidi 5

2.1.2.1. Acetamiprid 6

2.1.2.3. Tiakloprid 6

2.1.3. Ksenobiotici u okolišu 7

2.2. Obrada otpadnih voda 7

2.2.1. Konvencionalne metode obrade otpadnih voda 7

2.2.1.1. Metoda biološke obrade aktivnim muljem 8

2.2.1.2. Membranska filtracija 10

2.2.2. Membranska biorazgradnja 11

2.3. Analitičko i bioanalitičko praćenje ksenobiotika 13

2.3.1. Kromatografija 15

2.3.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 15

3. EKSPERIMENTALNI DIO 17

3.1. Materijali 17

3.1.1. Ksenobiotici 17

3.1.2. Aktivni mulj 18

3.2. Instrumenti, uređaji i pribor 18

3.2.1. Aparatura za membransku biorazgradnju 18

3.2.2. Kromatograf HPLC-DAD 19

3.2.4. Ostali uređaji 20

3.3. Metode rada 20

3.3.1. Priprema standardnih otopina ksenobiotika 20

3.3.2. Membranska biorazgradnja 20

3.3.3. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje 21

3.3.4. Određivanje ukupnog ugljika nakon biorazgradnje 22

3.3.5. Mikrobiološka analiza 23

4. REZULTATI I RASPRAVA 24

4.1. Kromatografska detekcija i kvantifikacija 24

4.2. Antihelmintik febantel 24

4.3. Pesticidi 30

4.3.1. Acetamiprid 30

4.3.2. Tiakloprid 34

6. ZAKLJUČCI 39

7. LITERATURA 40

9. POPIS SIMBOLA I OZNAKA 44

10. ŽIVOTOPIS 46

1. UVOD

Uslijed rasta stanovništva, globalnog industrijskog razvoja i urbanizacije sve je veći problem nedostatka pitke vode i onečišćenja vode. S obzirom na veliko opterećenje postojećih vodnih resursa posljednjih godina pojavljuje se veliki interes oporabe vode u svrhu očuvanja prirodnih zaliha. Veliki problem u očuvanju vodnih resursa predstavljaju nova onečiščivala, odnosno prirodni i sintetski spojevi za koje trenutno ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš, ali predstavljaju potencijalnu opasnost za ekosustav. U skupinu novih onečišćivala pripada i velik broj ksenobiotika, primjerice farmaceutika i pesticida koji zbog sve većeg otpuštanja u okoliš čine izravnu štetu na ekosustav.

Konvencionalna biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem pokazala se kao učinkovito rješenje za uklanjanje biorazgradive organske tvari, ali mnoge ksenobiotike ne može ukloniti u dovoljnoj mjeri zbog njihove niske biorazgradivosti. Kao posljedica toga dolazi do njihove bioakumulacije u okolišu i prehrambenim lancima što čini izravnu prijetnju i na ljudsko zdravlje. Kako bi se rizik od onečišćenja ksenobioticima sveo na najmanju moguću mjeru potrebno je razvoj usmjeriti na nove tehnologije koje će pospješiti njihovo uklanjanje iz vode.

Membranski bioreaktori dio su razvoja nove tehnologije koja predstavlja alternativu konvencionalnoj biološkoj obradi aktivnim muljem, a karakterizira ih kombiniranje biološke obrade aktivnim muljem i membranskih procesa separacije. Na taj način postiže se duže vrijeme zadržavanja koje omogućuje prilagodbu biomase na prisutne farmaceutike, veću koncentraciju biomase te efluent visoke kvalitete.

Cilj ovoga rada je provesti preliminarna istraživanja membranske biorazgradnje različitih ksenobiotika, točnije antihelmintika febantela te pesticida acetamiprida i tiakloprida.

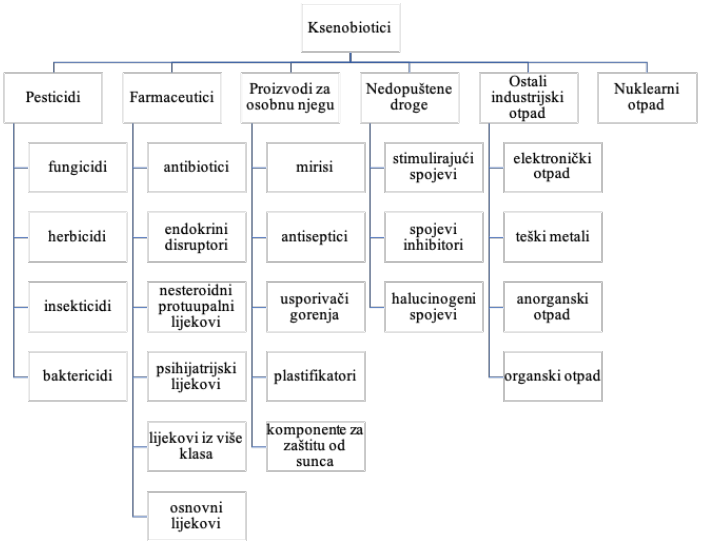
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ksenobiotici

Sve tvari u okoliš mogu dospjeti biološkim ili antropogenim putem. Antropogeni spojevi podrazumijevaju sintetske spojeve, ali i prirodne spojeve koji u okoliš ulaze ljudskim aktivnostima. Pojam ksenobiotik (**grč.** *xenos* - stran, *bios* - život) označava tvar koja se u normalnim okolnostima ne nalazi u živom organizmu te koji nije dio njegovog metabolizma. [1]

Napredak kemijske industrije doveo je do razvoja mnogih kemijskih spojeva koji se koriste za poboljšanje kvalitete svakodnevnog života (farmaceutici, pesticidi, aditivi, bojila itd.), ali je i rezultiralo otpuštanjem ogromnih količina ksenobitoika u okoliš, što postaje sve veći ekološki problem današnjice. Ksenobiotički spojevi mogu biti otrovni za organizam, a mikroorganizmi ih često ne mogu razgraditi jer sadrže strukture koje se inače ne susreću u prirodi. Posljedica njihove otpornosti na biorazgradnju je njihova postojanost u okolišu ili bioakumulacija u prehrambenim lancima što čini izravnu prijetnju i na ljudsko zdravlje. [1]

Prema Kumaru i Chopru ksenobiotici se mogu klasificirati na pesticide, farmaceutike, proizvode za osobnu njegu, nedopuštene droge, industrijske proizvode te nuklearni otpad, a njihova daljnja podjela prikazana je **Slikom 1**. [2]



Slika 1. Klasifikacija ksenobiotika [2]

2.1.1. Antihelmintici

Veterinarski farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju za liječenje i prevenciju bolesti životinja radi zdravlja te promicanja rasta i produktivnosti. Oni uključuju antiparazitike, protuupalne lijekove, kirurške lijekove i anestetike, reproduktivne lijekove, prehrambene lijekove te dodatke hrani koji se mogu koristiti kao pokretači rasta. Veterinarski farmaceutici klasificiraju se prema različitim vrstama patogena ili prema ciljanim infekcijama za koje su namijenjeni. [3]

Antihemintici pripadaju skupini antiparazitika, a koriste se za kontrolu, prevenciju i liječenje infekcija uzrokovanih parazitskim crvima (helmintima) kod ljudi i domaćih životinja. Antihelmintici usmrćuju helminte, a u kombinaciji sa sredstvima za čišćenje crijeva uzrokuju njihovo izbacivanje iz tijela, bez nanošenja značajnije štete domaćinu. Dva su glavna načina djelovanja antihelmintika, djelovanjem na ionske kanale membrane parazita što ima za posljedicu brži terapeutski učinak te drugo, sporije djelovanje na niz biokemijskih ciljnih mjesta koja se nalaze u parazitima. Ciljno mjesto (enzim ili ionski kanal) antihelmintika može biti prisutno i u domaćinu i u parazitu, stoga je bitno da se farmakološki razlikuje u parazitu kako bi se omogućilo selektivno djelovanje lijeka. Antihelmintici koji djeluju na ciljno mjesto prisutno samo u parazitima često su favorizirani zbog veće sigurnosti i selektivnosti. [4,7,8]

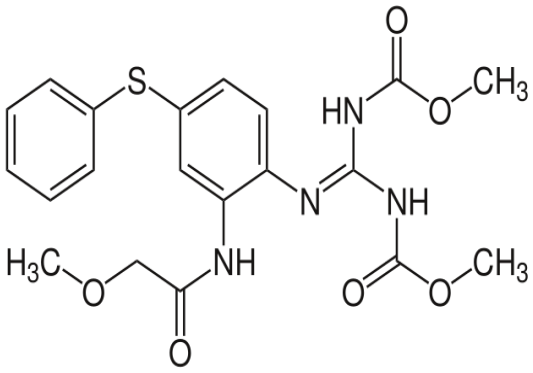
S obzirom na veliku raznolikost helminta ne postoji antihelmintik koji djeluje na sve vrste crijevnih nametnika, a kriterij za odabir odgovarajućeg antihelmintika trebao bi uzeti u obzir širok spektar djelovanja, netoksičnost za domaćina, brzo izlučivanje, jednostavnost primjene i nisku cijenu. [5]

S obzirom na kemijsku strukturu antihelmintici se najčešće dijele na: [6]

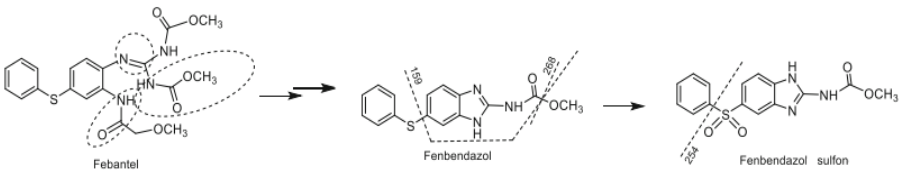
1. derivati kinolina,
2. organofosforni spojevi,
3. derivati benzimidazola,
4. derivati imidazotiazola,
5. tetrahidropiridini,
6. derivati fenola uključujući salicilamide,
7. derivati piperazina, i
8. makrociklički laktoni.

2.1.1.1. Febantel

Febantel (dalje u tekstu FEB) je probenzimidalzol prikazan **Slikom 2**. Predstavlja predlijek koji *in vivo* ciklizacijom prelazi u benzimidazolni antihelmintik fenbendazol, a kao takav se koristi za kontrolu i liječenje gastrointestinalnih glista, plućnih nametnika te trakavica. Također, oksidacija na atomu sumpora u FEB daje sulfoksid koji može podlijeći hidrolitičkom cijepanju i ciklizaciji za proizvodnju oksfendazola. Dodatno, sulfoksid se dalje može oksidirati u manje aktivan sulfon, a kao produkt oksidacije nastaje i *p*-hidroksifenbendazol koji posjeduje slabu antihelmintičku aktivnost. S obzirom da FEB ne posjeduje antihelmintička svojstva, njegova je učinkovitost određena uspješnosti njegove transformacije u fenbendazol i oksfendazol (fenbendazol sulfoksid) prema **Slici 3**.



Slika 2. Strukturna formula FEB [9]



Slika 3. Transformacija febantela u fenbendazol i febendazol sulfon [10]

Eksperimenti provedeni na životinjama ukazuju na to da je najčešće jetra odgovorna za oksidativni metabolizam FEB i fenbendazola, a ostaci fenbendazola i njegovih metabolita također se mogu pronaći i u bubrezima, mišićima i u manjoj mjeri u masnom tkivu. [11-13]
Primjeri komercijalnih imena FEB-a su *Rintal, Vercom, Drontal*. [9]

2.1.2. Pesticidi

Pesticidi su kemijski ili biološki agensi koji se koriste za kontrolu i suzbijanje štetočina koji uzrokuju bolesti biljaka, ali i zbog povećanja prinosa i učinkovitosti usjeva. Prva primjena pesticida započela je prije 4500 godina kada su Sumerani, Grci i Rimljani koristili kemikalije na bazi sumpora, žive, bakra te raznih biljnih ekstrakata za suzbijanje kukaca. Njihova široka primjena, kao i rast sintetičkih pesticida ubrzava se otkrićem diklordifeniltrikloretana (DDT), aldrina, dieldrina, endrina, 2,4-diklorofenoksioctene kiseline i sl. Ovi pesticidi bili su jeftini i djelotvorni, a imali su širok spektar djelovanja. Pesticidi se danas najčešće primjenjuju u poljoprivredi, javno-komunalnoj higijeni, skladištenju, transportu i veterini. [14-16]

Klasificiraju se prema upotrebi, ciljanom organizmu djelovanja, kemijskom sastavu, s obzirom na put ulaska u organizam, način djelovanja i toksičnost. Prema upotrebi mogu se klasificirati kao pesticidi korišteni u poljoprivredi, u javnom zdravstvu te u domaćinstvima. Prema ciljanom organizmu djelovanja pesticidi se mogu kategorizirati kao insekticidi (kemikalije koje se koriste za uništavanje insekata), fungicide (koriste se da inhibiraju ili ubijaju gljivice), herbicide (kemikalije koje se koriste za suzbijanje korova), rodenticidi (koriste se za ubijanje glodavaca), algicidi koji se koriste za suzbijanje rasta algi i slično. Na temelju kemijske prirode pesticidi se mogu kategorizirati kao:

- organofosfati,
- karbamati,
- klorirani ugljikovodici,
- klorofenoksi kiseline,
- sintetski piretroidi. [14]

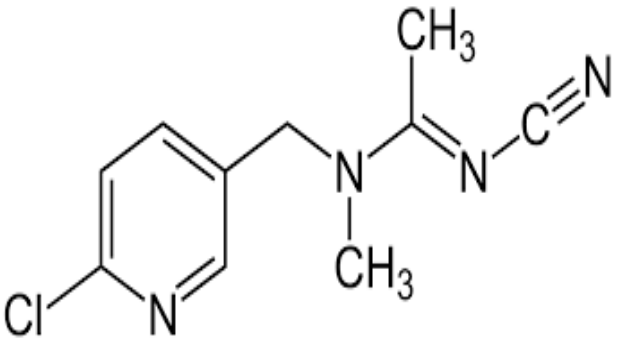
Neonikotinoidni pesticidi pripadaju skupini neuro-aktivnih insekticida, koji su kemijski slični nikotinu. Koriste se za suzbijanje insekata kao što su lisne uši, krumpirova zlatica, bijele mušice i zemljišni insekti. Mehanizam djelovanja takvih pesticida temelji se na nepovratnoj blokadi postsinaptičkih nikotinergičnih acetilholin receptora (nAChR) u živčanom sustavu insekata. Na taj način dolazi do održavanja natrijevih kanala konstantno otvorenih i do stimulacije električnih impulsa čime se ograničava prijenos podražaja u živčani sustav insekata što naposlijetku dovodi do paralize i smrti. Neonikotinoidi su topljivi u vodi i biljke ih lako apsorbiraju putem korijena ili lišća. Ne zadržavaju se samo na površini biljke, već prodiru u unutrašnjost što ih čini izuzetno toksičnih za insekte, a u manjoj mjeri i za ptice i sisavce.

Neonikotoidni spojevi posjeduju nitrometilnu, nitroiminsku ili cijanoiminsku skupinu, a najpoznatiji pesticidi koji pripadaju ovoj skupini su imidakloprid, acetamiprid, tiakloprid

kotianidin, nitenpiram i dr. Prednosti ove vrste pesticida, odnosno niska toksičnost za kralježnjake, a velika toksičnost za insekte te fleksibilna upotreba, dovele su do toga da neonikotinoidi postanu među najraširenijim pesticidima na svijetu te čine otprilike jednu četvrtinu svih korištenih insekticida. [17-19]

2.1.2.1. Acetamiprid

Acetamiprid (dalje u tekstu ACE) pripada skupini neonikotinoidnog insekticida, prikazanog **Slikom 4**. Koristi se za suzbijanje insekata koji sadrže usni sustav za griženje i sisanje, a primjenjiv je na usjevima krumpira, šećerne trske, jabukama, breskvama, krastavcima, rajčici te ukrasnom bilju.

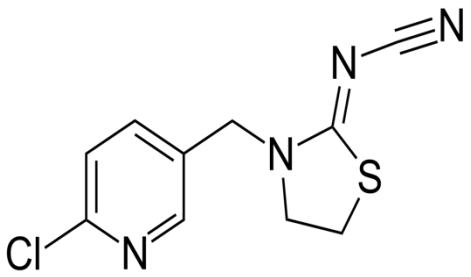


Slika 4. Strukturna formula acetamiprida [20]

Acetamiprid je spoj bez mirisa koji dolazi u obliku praška ili bijelih kristala. Topljiv je u vodi, acetonu, metanolu, etanolu, diklormetanu, kloroformu, acetonitrilu i tetrahidrofuranu. Na tržištu se nalazi pod komercijalnim imenima *Mospilan, Intruder, Polar i Active*. [20]

2.1.2.3. Tiakloprid

Tiakloprid (dalje u tekstu TIA) je spoj koji pripada skupini neonikotinoida, a njegova strukturna formula prikazana je **Slikom 5**.



Slika 5. Strukturna formula tiakloprida [21]

Tiakloprid pripada relativno novoj klasi insekticida, koji kao i ostali neonikotinoidni insekticidi djeluje selektivno na živčani sustav nametnika što ga čini vrlo primjenjivim u slučajevima kada insekti razviju otpornost na konvencionalne insekticide.
To je spoj koji dolazi u obliku kristaličnog praška bez mirisa. Topljiv je u vodi i u *n*-heksanu, a komercijalno ime mu je *Calypso*. [21]

2.1.3. Ksenobiotici u okolišu

Postojane organske onečišćujuće tvari (**eng.** *persistent organic pollutants*, POP) bile su u središtu interesa kao prioritetna zagađivala te su shodno tome bile dio intenzivnih programa praćenja sve do početka 1990.-ih godina. Posljednjih nekoliko desetljeća pozornost istraživanja okoliša pomaknula se na tzv. nova zagađivala koja podrazumijevaju spojeve kojima se do sada nije pridodavala važnost jer ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš, a koje bi mogle predstavljati potencijalnu opasnost za ekosustav.
Europska komisija izglasala je *Okvirnu direktivu o vodama* (**eng.** *Water Framework Directive,* WFD) (2000/60/EZ) kako bi se zaštitio vodeni okoliš te utvrdila prioritetna onečišćivala i načini njihove kontrole. Od donošenja direktive nastale su brojne revizije navedenog dokumenta, ali ključan korak je napravljen Odlukom 39/2013/EU (2013/39/EU,2013.) kada je predložen, a kasnije i objavljen prvi popis za praćenje (**eng.** *Watch List*, WL) zagađivala koja izazivaju zabrinutost jer predstavljaju rizik za kontaminaciju hrane, tla i vodenog ekosustava. Posljednjih godina sve se više pažnje posvećuje farmaceuticima i pesticidima, od kojih se neki već nalaze na listi prioritetnih onečišćivala. [22-24]

Ksenobiotici postaju sve veći problem u sustavima pročišćavanja otpadnih voda jer su relativno nove tvari i teško ih je ukloniti, a u okolišu se pojavljuju u količinama koje su neprirodne zbog ljudskog djelovanja.

Kako bi se rizik od onečišćenja od ksenobiotika sveo na najmanju moguću mjeru, potrebno je razvijati nove tehnologije koje bi pospješile razgradnju ovih, često biootpornih, organskih spojeva.

2.2. Obrada otpadnih voda

2.2.1. Konvencionalne metode obrade otpadnih voda

Obrada otpadnih voda predstavlja skup procesa pročišćavanja voda koji imaju cilj ponovne upotrebe te ispuštanja vode u vodotoke. Podrazumijevaju različite fizikalne, kemijske i biološke postupke obrade kojima je zadatak uklanjanje suspendiranih tvari, biorazgradivih

organskih tvari, patogenih bakterija i drugih organizama koji uzrokuju bolesti te spojeve nitrata i fosfata koji uzrokuju eutrofikaciju vodenih recipijenata.

Postupci obrade otpadne vode mogu se podijeliti u sljedeće postupke: prethodna (preliminarna) obrada, primarna obrada, sekundarna (biološka) obrada te tercijarna obrada. Preliminarna obrada ili mehaničko pročišćavanje je primarni stupanj svakog procesa pročišćavanja otpadnih voda. Ovom vrstom obrade dolazi do izdvajanja krupnih otpadaka, pijeska, masti, ulja i sl., a cilj ove obrade je ostvariti dobre estetske značajke vode prijemnika. Uređaji koji se koriste u preliminarnoj obradi sadrže sita i rešetke kojima se odstranjuju krupne, raspršene i plivajuće tvari.

Primarnom obradom dolazi do odstranjivanja zrnatih, pahuljastih i plivajućih čestica iz otpadne vode taloženjem ili isplivavanjem na površinu. Dio sustava primarne obrade otpadne vode u kojemu se odstranjuju zrnate čestice naziva se pjeskolov, dio u kojem se odstranjuju plivajuće čestice i masti se naziva mastolov, dok se dio za odvajanje suspendiranih čestica naziva primarni taložnik.

Sekundarna obrada otpadne vode obuhvaća procese za uklanjanje biorazgradivih tvari te smanjenje KPK i BPK vrijednosti, a koji se temelje na biološkim i fizikalno-kemijskim postupcima. [25,26]

Tercijarni postupci obrade otpadne vode osiguravaju daljnje uklanjanje organskog opterećenja, suspendiranih, hranjivih ili toksičnih tvari. Također, ovi postupci obrade podrazumijevaju napredne tehnologije kojima se uklanja boja, miris, okus vode te mikroorganizmi, koloidi i otrovne tvari koje mogu biti štetne za žive organizme. Ova vrsta obrade se temelji na fizikalnim, kemijskim i biološkim postupcima.

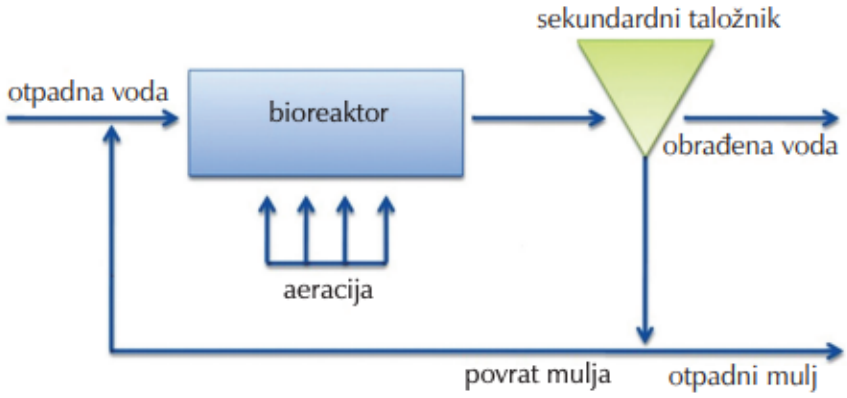
2.2.1.1. Metoda biološke obrade aktivnim muljem

Biološki procesi obrade otpadnih voda podrazumijevaju procese u kojima se raspršene i otopljene organske tvari prevode u stanično tkivo, odnosno biomasu, plinove i nerazgradivi ostatak. Navedene procese karakterizira uporaba mikroorganizama koji se hrane organskim tvarima čime dolazi do njihovog rasta, a nastala biomasa se od vode odvaja taloženjem. Procesi biološke obrade se smatraju aerobnim ukoliko mikroorganizmi za razgradnju organske tvari koriste kisik otopljen u vodi, a u slučaju nedovoljne koncentracije otopljenog kisika mikroorganizmi koriste ugljik iz organskih molekula te je tada riječ o anaerobnim procesima.

Aktivnost mikroorganizama, odnosno učinkovitost bioloških procesa obrade, uvjetovana je mnogim čimbenicima kao što su, sastav otpadne vode koju je potrebno pročistiti,

količina hranjivih tvari, količina otopljenog kisika, temperatura te pH-vrijednost. Tako je primjerice razvoj mikroorganizama razmjeran koncentraciji hranjivih tvari, dok se povećanjem udjela organske tvari u otpadnoj vodi smanjuje mogućnost razgradnje iste. Povećanje temperature utječe na ubrzanje biokemijskih procesa, a za većinu procesa idealno je slabo lužnato ili neutralno područje. Također, za rast stanične mase potrebno je osigurati da otpadne vode sadrže određene biogene elemente kao što su dušik i fosfor.

Konvencionalni proces obrade aktivnim muljem (**eng.** *Conventional Activated Sludge System*, CAS*)* jedan je od najčešće primjenjivanih postupaka biološke obrade otpadnih voda, a shematski je prikazan **Slikom 6**. Aktivni mulj podrazumijeva mikroorganizme kao što su bakterije, alge, protozoe, metazoe i dr., a nastaje međusobnim povezivanjem mikroorganizama i suspendiranih tvari u tzv. pahuljice aktivnog mulja.



Slika 6. Proces obrade vode aktivnim muljem [27]

Razgradnja organskih tvari provodi se u biorektoru s aerobnim mikroorganizmima, a kako bi se osigurala izmjena supstrata i produkata metabolizma te potrebna količina kisika za održavanje aktivnosti mikroorganizama, potrebno je provoditi aeraciju suspenzije aktivnog mulja i otpadne vode. Nakon uklanjanja organskih tvari, u sekundarnom taložniku dolazi do razdvajanja aktivnog mulja i pročišćenog izlaznog toka, gdje se dio aktivnog mulja ponovno vraća u proces gdje služi kao aktivator biološkog procesa. Učinkovitost procesa obrade aktivnim muljem ovisi o ulaznoj koncentraciji i sastavu supstrata, odnosno otpadne vode, koncentraciji mikroorganizama, vremenu kontakta supstrata s mikroorganizmima, koncentraciji otopljenog kisika, temperaturi, pH-vrijednosti, hidrauličkom vremenu zadržavanja otpadne vode te vremenu zadržavanja stanica mikroorganizma u reaktoru. [27-33]

2.2.1.2. Membranska filtracija

Membranska filtracija predstavlja proces fizičke separacije temeljen na selektivnosti membrane koja razdvaja čestice zbog međusobne razlike u veličini, obliku ili kemijskoj strukturi. Prilikom membranskih separacijskih postupaka ulazni se tok dijeli na permeat (filtrat) koji sadrži tvari koje prolaze kroz membranu i retentat (koncentrat) u kojem zaostaju koncentrirane otopljene tvari. Membrane predstavljaju tanku, čvrstu, selektivnu barijeru, a mogu se klasificirati prema mehanizmu separacije, fizičkim osobinama membrana i konstrukciji te kemijskim karakteristikama. [34]

Membranski procesi se prema veličini pora membrane mogu podijeliti na reverznu osmozu (RO), nanofiltraciju (NF), ultrafiltraciju (UF) i mikrofiltraciju (MF), a veličine pora i transmembranski tlakovi navedenih procesa prikazani su **Tablicom 1**.

Tablica 1. Veličine pora i transmembranskih tlakova za različite membranske proces [35]

Proces	Veličina pora (nm)	Tlak (bar)
RO	<1	10-100
NF	1-5	5-20
UF	5-100	1-5
MF	>100	0,1-2

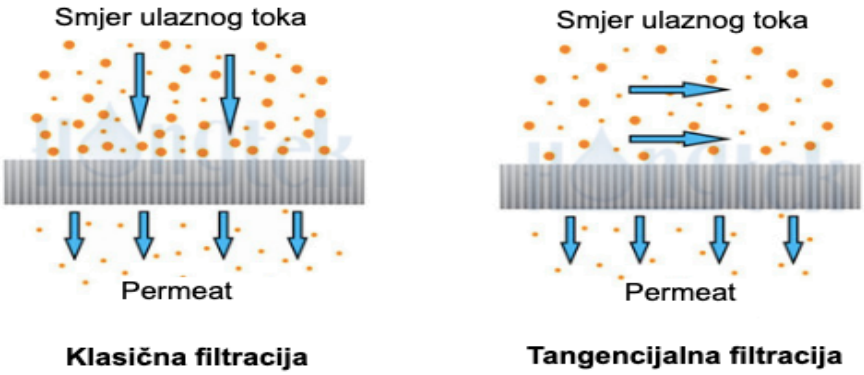
Separacijski mehanizmi se mogu podijeliti na separaciju koja se zasniva na razlici u veličini čestica i veličini pora membrane (koristi se za procese MF i UF), na separaciju koja se temelji na razlici u topljivosti i difuzivnosti materijala membrane i otopine (RO) te na separaciju koja se temelji na razlici u naboju čestica koje treba izdvojiti (NF).

Postoje dva načina na koja se može provoditi membranska filtracija, a shematski su prikazani **Slikom 7**:

- Klasična filtracija (**eng.** *dead end filtration*) – vrsta filtracije kod koje se ulazni tok dovodi na membranu pod pravim kutom, pri filtraciji dolazi do stvaranja naslaga filtriranog materijala tzv. filterskog kolača, a sav tok prolazi kroz membranu. Nastali filtracijski kolač je nužno redovito uklanjati, a ovaj tip filtracije se koristi kada je filtracijski medij skup, a membrana relativno jeftina.

- Tangencijalna filtracija (**eng.** *cross-flow filtration*) – vrsta filtracije pri kojoj dio ulaznog toka prolazi kroz membranu, dok se dio odvaja zajedno sa filtriranom tvari. Na taj način

nastaju filtrat (permeat) i koncentrat (retentat), a ovaj tip filtracije koristi se u slučajevima skupih membrana.



Slika 7. Klasična i tangencijalna filtracija [36]

Membranska filtracija predstavlja jednu od značajnih metoda obrade voda, a neki od razloga njezine primjenjivosti su kakvoća dobivene vode te činjenica da se na malenom prostoru može obraditi velika količina vode.

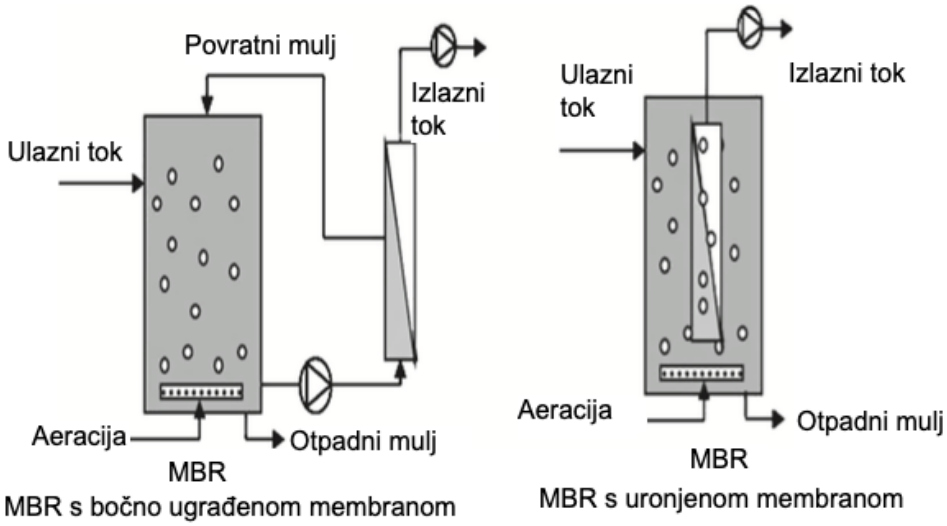
2.2.2. Membranska biorazgradnja

Sve restriktivnije zakonske regulative u vezi zahtjeva za pročišćavanje otpadnih voda uvjetuju brzi razvoj tehnologija i primjenu tehnoloških inovacija za obradu otpadnih voda. Kao posljedica toga razvija se i **M**embranski **B**iološki **R**eaktor (dalje u tekstu **MBR**).

Membranska biorazgradnja podrazumijeva tehnologiju koja kombinira biološku obradu otpadne vode (aktivni mulj) s membranskim procesom seperacije (ultrafiltracija i mikrofiltracija). Kao i u ostalim procesima biološke obrade otpadnih voda, mikroorganizmi služe za razgradnju i uklanjanje organske tvari iz otpadnih voda, dok membrana služi kao sekundarni taložnik koji odvaja biomasu i veće organske i anorganske tvari od pročišćene vode.

Prema konfiguraciji, MBR može imati membrane koje su uronjene u reaktore ili membrane koje su ugrađene izvan reaktora. U slučaju kada je membrana ugrađena izvan reaktora, mulj se iz MBR-a pumpa na membranski modul što stvara poprečni tok na površinu membrane te nastaje permeat, a koncentrirani mulj koji je membrana odbacila reklicira se u MBR. Ovakva izvedba MBR-a predstavlja tangencijalnu filtraciju, a dovod mulja na membranu osigurava se pomoću recirkulacijske pumpe. U drugom slučaju, membrana je uronjena izravno u reaktor i ovakva vrsta konfiguracije ne zahtjeva cirkulacijsku pumpu, već samo usisnu ili

vakuumsku pumpu potrebnu za stvaranje transmembranskog tlaka. Usporedba konfiguracije dviju izvedbi MBR-a prikazana je **Slikom 8** te **Tablicom 2**.



Slika 8. Usporedba različitih konfiguracija MBR-a [37]

Tablica 2. Usporedba različitih konfiguracija MBR-a [37]

Parametar	MBR s bočnom ugrađenom membranom	MBR s uronjenom membranom
Kompleksnost	Složeno	Jednostavno
Fleksibilnost	Fleksibilan	Manje fleksibilan
Robusnost	Robustan	Manje robustan
Gustoća pakiranja membrane	Niska	Visoka
Potrošnja energije	Visoka (2-10 kW h/m^3)	Niska (0,2-0,4 kW h/m^3)

Nadalje, membrana je jedan od važnijih dijelova MBR-a pa učinkovitost procesa u velikoj mjeri ovisi o njenim karakteristikama kao što veličina pora i materijali membrane. Prema poroznosti presjeka membrana one se dijele na izotropne ukoliko je poroznost ista te na anizotropne membrane ukoliko je poroznost različita. Postoje dvije vrste membranskih materijala, polimerni i keramički, a uglavnom je riječ o anizotropnim membranama. Kako bi bio primjenjiv za MBR tehnologiju, materijal se mora oblikovati tako da omogući prolaz vode kroz njega, a gotovo svi materijali se sastoje od tankog površinskog sloja koji osigurava potrebnu polupropusnost (permselektivnost) i od donjeg debljeg sloja sačinjenog od jednog ili više materijala. Također, materijal od kojeg je sačinjena membrana mora imati određenu

mehaničku otpornost te otpornost na toplinske i kemijske uvjete, primjerice pri čišćenju membrane. [37-40]

Parametri koji najviše djeluju na učinkovitost MBR procesa su hidrauličko vrijeme zadržavanja, vrijeme zadržavanja mulja, karakteristike biomase, koncentracija otopljenog kisika, pH-vrijednost i temperatura otpadne vode.

Hidrauličko vrijeme zadržavanja (**eng.** *Hydraulic Retention Time*, HRT) podrazumijeva vrijeme koje otpadna voda provede u bioreaktoru, odnosno u kontaktu s aktivnim muljem , a računa se prema formuli (1)

$$HRT\ (h) = \frac{hidraulički\ volumen\ reaktora\ (L)}{protok\ permeata\ (L\ h^{-1})} \qquad (1)$$

U slučaju visoke vrijednosti HRT-a mikroorganizmi prisutni u aktivnom mulju se lakše prilagođavaju uvjetima reaktora, što obično rezultira boljim učinkom uklanjanja.

Vrijeme zadržavanja mulja (**eng.** *Sludge Retention Time*, SRT) je vrijeme koje biomasa aktivnog mulja provede u bioreaktoru, a još se naziva i starost mulja. SRT vrijednost utječe na razvoj mikrobne raznolikosti zbog rasta sporo rastućih bakterijskih kultura čime se poboljšava biorazgradnja.

Za razliku od konvencionalnih uređaja za pročišćavanje voda s aktivnim muljem (CAS) gdje se koriste gravitacijski, odnosno naknadni taložnici koji čine otprilike 30 % od ukupne površine uređaja, primjenom MBR-a značajno se smanjuje površina uređaja što je nekada ključno kod izbora lokacije i polažaja uređaja. Također, koncentracija korištenog aktivnog mulja kod MBR uređaja dostiže vrijednosti i do 40 g/L, što je mnogo veća koncentracija nego kod klasičnih CAS procesa, što u konačnici rezultira manjom količinom aktivnog mulja koju je potrebno koristiti, odnosno smanjuje se prinos biomase. [37-40]

2.3. Analitičko i bioanalitičko praćenje ksenobiotika

Kako bi se identificirali ksenobiotici i odredila njihova koncentracija u otpadnim vodama te u konačnici ocijenila učinkovitost metoda obrade otpadnih voda potrebno je koristiti se raznim analitičkim metodama. Neke od najučestalijih tehnika koje se koriste u ocjeni metoda obrade su kromatografija, biokemijska potrošnja kisika (BPK), kemijska potrošnja kisika (KPK) i ukupni organski ugljik (TOC).

Biokemijska potrošnja kisika ili BPK (**eng.** *biochemical oxygen demand*, BOD) je jedan od najčešće korištenih parametara određivanja organskog onečišćenja prirodnih i otpadnih

voda. Glavni cilj ovakve analize je određivanje količine biorazgradljive organske tvari što nije moguće učiniti izravno te se umjesto toga koristi kisikov ekvivalent organske tvari određen preko biokemijske potrošnje kisika u BPK testu. BPK predstavlja količinu kisika potrebnu za biološku razgradnju organskih tvari u vodi djelovanjem mikroorganizama pri 20 °C, a izražava se u mg O_2/L vode. [41,42]

Kemijska potrošnja kisika, KPK, (**eng.** *chemical oxygen demand*, COD) je mjera kisikovog ekvivalenta sadržaja organskih i anorganskih tvari koje su podložne oksidaciji s jakim oksidansom, a izražava se u mg O_2/L vode. Obuhvaća sve spojeve koji se mogu oksidirati jakim kemijskim oksidansom, odnosno sve topljive organske tvari u vodi bez obzira jesu li biorazgradljive te prisutne anorganske soli. [41,42]

Ukupni organski ugljik (**eng.** *total organic carbon*, TOC) je analiza koja se primjenjuje kao kvantitativni pokazatelj prisutnosti organske tvari, to jest mjera je prisutnosti organskog ugljika u vodi koja ne daje informaciju o prirodi ili strukturi organske tvari. Može se koristiti za detekciju raznih onečišćujućih spojeva kao što su naftni derivati, organske kiseline, pesticidi i dr. Tehnika se primjenjuje kao metoda praćenja organskog ugljika, a pokazala se vrlo korisnom u industriji jer u vrlo kratkom vremenu od svega nekoliko minuta daje rezultate u stvarnom vremenu što omogućuje vrlo učinkovitu kontrolu procesa i brzo djelovanje u slučaju detekcije onečišćenja. [41,42]

Nadalje, za potpunu ocjenu stanja otpadnih voda nužno je provesti i testove toksičnosti koji se koriste kako bi se istražio mogući štetni utjecaj onečišćivala na žive organizme. Testovi toksičnosti mogu biti akutni i kronični testovi. Akutni testovi se koriste za određivanje koncentracije ili uvjeta pri kojima ispitivani uzorak izaziva štetni učinak na skupinu testnih organizama tijekom kratkotrajne izloženosti, dok kronični testovi određuju koncentraciju ispitivanog uzorka koja ima negativan utjecaj na testne organizme tijekom dugotrajne izloženosti pri kontroliranim uvjetima. Test organizmi na kojima se prati djelovanje različitih toksičnih tvari su biološki modeli, odnosno bioindikatori, a najčešće korišteni test temeljen je na mortalitetu. Testovi toksičnosti temelje se na različitim pojavama kao što su ihibicija rasta, inhibicija pokretljivosti, bioluminiscencija, a koriste se na test organizmima kao što su bakterije *Vibrio fischeri, Photobacterium phosphoreum, Vibrio harveyi i Pseudomonas fluorescens*.[43]

2.3.1. Kromatografija

Kromatografija označava tehniku separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna faza, koja se kreće u određenom smjeru. Podrazumijeva širok raspon tehnika koje su svoju primjenu našle u dijagnostici, istraživanju i razvoju, osiguranju kvalitete i slično. Kromatografski sustav se sastoji od dvije faze, pokretne i nepokretne te ispitivane tvari koja se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između dviju faza. Narušavanjem dinamičke ravnoteže ispitivana tvar počinje putovati s pokretnom fazom, zadržavajući se s vremenom na nepokretnoj fazi. Za uspješno odjeljivanje sastojaka smjese, nepokretna faza mora selektivno djelovati na sastojke smjese.

Kromatografske tehnike se mogu podijeliti s obzirom na:

- prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze (razdjelna, adsorpcijska, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna kromatografija te kromatografija isključenjem);
- sastav pokretne faze (plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC), fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (SFC));
- prema obliku sustava (kromatografija u stupcu, plošna kromatografija).

Princip kromatografskog razdvajanja temelji se na različitom vremenu zadržavanja komponenti smjese na nepokretnoj fazi kromatografskog sustava. Detektor daje signal koji je obično proporcionalan koncentraciji svake komponente, a prikaz signala u vremenu se naziva kromatogram.

Najvažniji parametri kromatograma su vrijeme zadržavanja, odnosno vrijeme koje prođe od unosa uzorka do njegova maksimalnog odziva (t_R), vrijeme putovanja molekula pokretne faze kroz kolonu (t_M), širina kromatografske krivulje na baznoj liniji (w), širina kromatografske krivulje na polovici visine ($w_{1/2}$) te visina pika (h). [44,45]

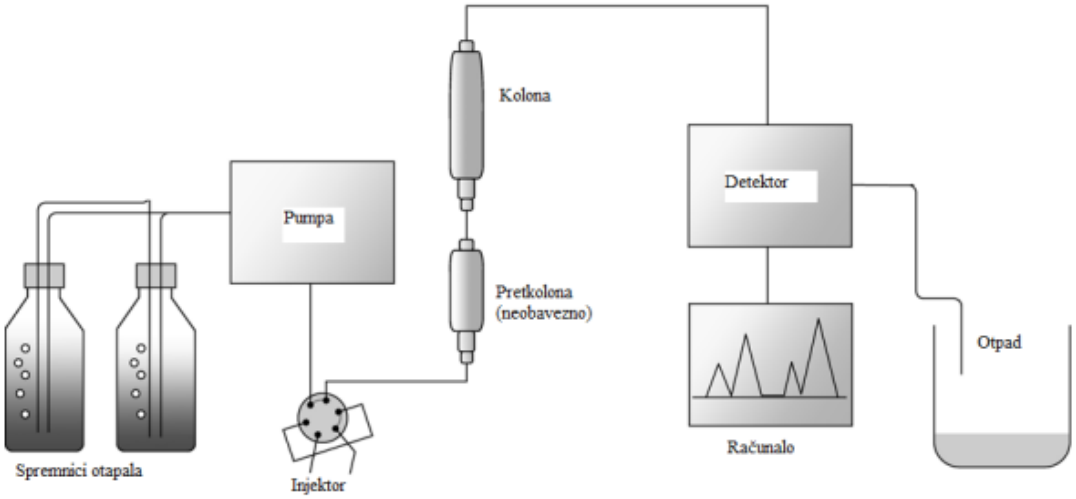
2.3.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (**eng.** *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je visoko učinkovita kromatografska metoda, a razvijena je kao podvrsta tekućinske kromatografije. Svoju primjenu pronalazi za separaciju raznih spojeva, analizu nečistoća, hlapljivih i nehlapljivih sastojaka, separaciju usko povezanih spojeva te mnoge kvalitativne i kvantitativne analize.

Osnovni dijelovi svakog HPLC uređaja su spremnik otapala pokretne faze, pumpa, injektor, predkolona, kolona, detektor, spremnik za otpad, računalo, integrator ili pisač, a uređaj je shematski prikazan **Slikom 9**.

Sami procesi separacije odvijaju se u kolonama koje su obično sačinjene od nehrđajućeg čelika, dimenzija u rasponu od 10 do 25 cm duljine te unutarnjeg promjera 3 do 9 mm.

Za detekciju otopljenih tvari koje su eluirane iz kolone zadužen je detektor koji proizvodi električni signal proporcionalan određenom svojstvu pokretne faze ili otopljenih tvari. Detektori korišteni u tekućinskoj kromatografiji mogu biti razni poput spektrometra masa, spektrofotometrijskih detektora u UV/VIS području elektromagnetskog zračenja, detektori na temelju molekulse fluorescencije, indeksa loma i sl. Detektor s nizom dioda (**eng.** *Diode-Array Detector,* DAD) omogućuje praćenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja na svim valnim duljinama istovremeno.



Slika 9. Shematski prikaz HPLC uređaja [46]

Kako bi se injektirali u uređaj, uzorci moraju biti u tekućem agregatnom stanju te stoga kruti uzorci zahtijevaju prethodno otapanje u odgovarajućem otapalu koje mora biti kompatibilno s pokretnom i nepokretnom fazom. Volumen uzorka za injektiranje je od 1 do 100 µL, što ovisi o osjetljivosti korištenog detektora, a vrijeme trajanja analize u rasponu je od 5 min do 2 h.

HPLC karakterizira dobra osjetljivost, linearnost, pouzdanost i lakoća korištenja, a glavni nedostatci su teško postizanje razlučivosti kompleksnih spojeva, nemogućnost analize više uzoraka istovremeno, priprema uzorka te dugotrajno vrijeme analize. [44,45]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

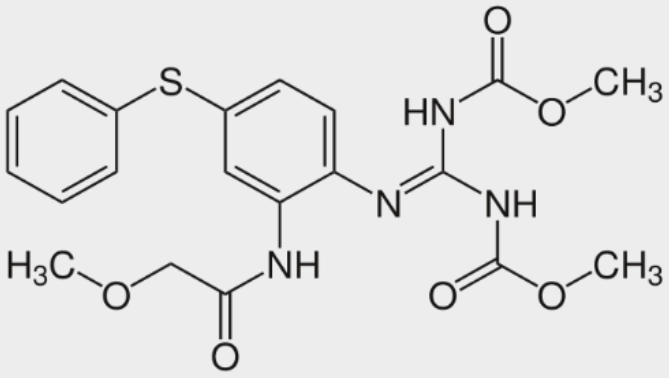
U eksperimentalnom dijelu ovog rada provedena su istraživanja uklanjanja triju ksenobiotika, antihelmintika FEB-a te pesticida ACE i TIA u membranskom bioreaktoru. Ispitivanje je provedeno na radnim otopinama analita koncentracije 10 mg L^{-1}, pri koncentraciji aktivnog mulja od 14,60 ± 0,03 g L^{-1}. Svaki proces razgradnje pojedinog ksenobiotika provođen je u vremenskom razdoblju od 48 h.

3.1. Materijali

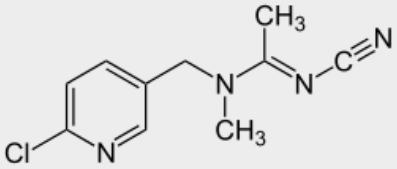
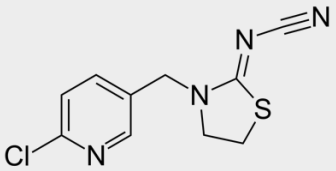
3.1.1. Ksenobiotici

U eksperimentalnom radu korišten je antihelmintik febantel te pesticidi acetamiprid i tiakloprid čije su fizikalno-kemijske karakteristike prikazane **Tablicama 3** i **4**.

Tablica 3. Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanog antihelmintika

Ksenobiotik	**FEB**
Strukturna formula	
CAS broj	58306-30-2
Kemijska formula	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$
Molekulska masa, g mol^{-1}	446,48
Proizvođač i čistoća standarda	Veterina ≥ 99 %
log*K*ow	1,95
K_H, atm m^3 mol^{-1}	4,191 · 10^{-15}

Tablica 4. Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih pesticida

Ksenobiotik	**ACE**	**TIA**
Strukturna formula		
CAS broj	160430-64-8	111988-49-9
Kemijska formula	$C_{10}H_{11}ClN_4$	$C_{10}H_9ClN_4S$
Molekulska masa, g mol^{-1}	222,67	252,72
Proizvođač i čistoća standarda	Sigma-Aldrich 99 %	Sigma-Aldrich 99 %
log*K*ow	0,80	1,26
K_H, atm m^3 mol^{-1}	$6{,}92 \cdot 10^{-8}$	$1{,}08 \cdot 10^{-14}$

3.1.2. Aktivni mulj

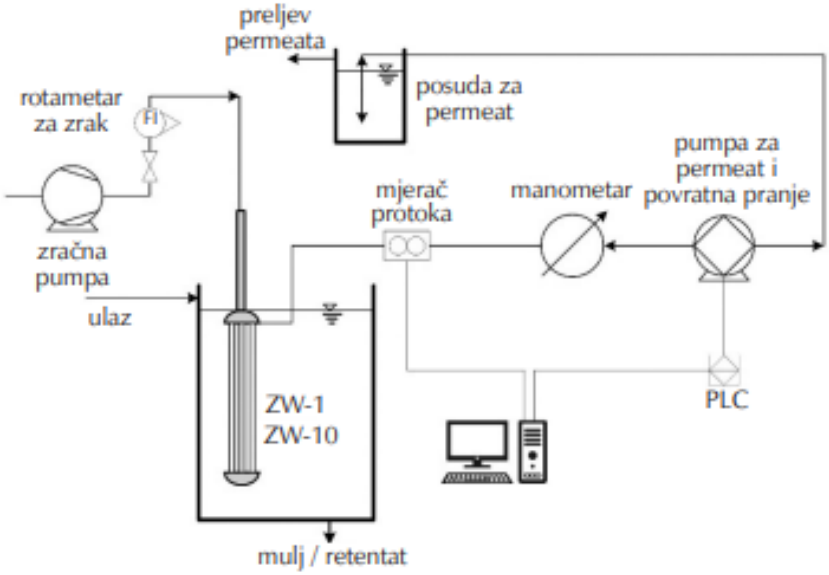
Za svaki eksperiment membranske biorazgradnje određenih ksenobiotika korišten je svježi mulj koji se homogenizirao te po potrebi uguščivao na željenu koncentraciju od otprilike 10 g L^{-1}.

3.2. Instrumenti, uređaji i pribor

3.2.1. Aparatura za membransku biorazgradnju

Proces membranske biorazgradnje ksenobiotika proveden je na laboratorijskom MBR uređaju shematski prikazanim **Slikom 10**. MBR je opremljen ultrafiltracijskom (UF) membranom u obliku šupljih vlakana. Korištena je ZeeWeed 1 (ZW-1) membrana površine 0,046 m^2 i nominalne veličine pora 0,02 μm proizvođača GE Water & Process Technologies, Mađarska. Osim s ultrafiltracijskom membranom, MBR je dodatno opremljen i odgovarajućim senzorima za tlak, temperaturu, protok i razinu, a za prikupljane podataka korišten je Alpha

Programming (SW0D5-ALVLS-EU) sustav proizvođača Mitsubishi Electric Corporation, Japan.



Slika 10. Shematski prikaz laboratorijskog MBR-a [47]

3.2.2. Kromatograf HPLC-DAD

Identifikacija i kvantifikacija ksenobiotika u uzorcima provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države. Instrument je opremljen ProStar 330 detektorom s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarnom pumpom, ProStar 410 uređajem za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatiranim držačem kolone, bocama za pokretnu fazu, bocom za otpad te osobnim računalom s programom STAR 5.2. koji služi za upravljanje, prikupljanje i obradu podataka. Za analizu je korištena kolona InertSustain C18 (GL Sciences, Japan), dimenzija 250 mm x 4,6 mm i veličine čestica 5 µm.

Ispitivani uzorci injektirani su dva puta, volumenom injektiranja od 30 µL pri temperaturi od 20-25 ºC. Prije i nakon analize uzoraka kolona se prala 65 %-tnim acetonitrilom (ACN) protokom od 0,5 mL min^{-1} u ukupnom vremenu od jednog sata, a volumen injektrianog ACN je 10 µL.

Pokretna faza sastojala se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu), a snimanje kromatograma provedeno je pri valnim duljinama od 210 do 265 nm.

3.2.4. Ostali uređaji

- Analizator ugljika, TOC-Vws (Shimadzu, Japan), korišten za određivanje ukupnog organskog ugljika, TC-a (mg L^{-1}).
- Precizna analitička vaga XA105 DualRange proizvođača Mettler Toledo, Švicarska. Korištena je za odvage standarada potrebnih za eksperiment.
- Ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10P proizvođača Bandelin, Njemačka. Kupelj ima sučelje na kojem se programira vrijeme, temperatura, snaga i degaziranje, a ima mogućnost spremanja 10 različitih programa. Ultrazvučna kupelj korištena je za pripremu ispitivnih otopina ksenobiotika kako bi ubrzao proces otapanja standarda u čvrstom stanju
- Najlonski filtri za filtriranje uzoraka aktivnog mulja, FilterBio, Labex Ltd., Kina, promjera 25 mm i veličine pora 0,22 μm.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema standardnih otopina ksenobiotika

Zadane masene koncentracije temeljnih standardnih otopina (TSO) iznosile su 2000 mg L^{-1} za sve ispitivane uzorke. TSO ispitivanih uzoraka pripremljene su otapanjem odvaga od 100 mg farmaceutika (FEB) u metanolu te otapanjem pesticida (ACE, TIA) u vodi u tikvicama od 50 mL. Kako bi se poboljšao proces otapanja ispitivanih tvari, tako pripremljene tikvice uranjane su u ultrazvučnu kupelj. Iz početnih TSO pripremljene su radne otopine masene koncentracije 10 mg L^{-1} te volumena 20 L za svaki ispitivani ksenobiotik.

3.3.2. Membranska biorazgradnja

Membranska biorazgradnja provedena je u laboratorijskom MBR uređaju. Radni volumen sastojao se od radne otopine ispitivanog uzorka koncentracije 10 mg L^{-1} pomiješane sa aktivnim muljem koncentracije 10 g L^{-1}. Pripremljena radna otopina cirkulirala je kroz MBR određenim protokom, gdje je membrana selektivno zadržavala retentat, a propuštala permeat. Protok zraka u MBR iznosio je 15 L min^{-1}, a zbog bolje kontrole vremena zadržavanja nakon

svake 4 min obrade efluenta uslijedila bi jedna minuta povratnog pranja. Proces MBR provođen je tijekom 48 h za svaku ispitivanu tvar a procesni parametri prikazani su **Tablicom 5**.

Tablica 5. Procesni parametri membranske biorazgradnje pojedinih ksenobiotika

	FEB	**ACE**	**TIA**
Membrana	ZW-1	ZW-1	ZW-1
Hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT), h	20,68	8,58	9,77
Koncentracija aktivnog mulja, g L^{-1}	12,21	15,28	15,58
Protok zraka, L min^{-1}	15	15	15

Za kromatografsku analizu uzorci permeata i retentata uzimani su nakon 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 25, 26, 27, 28, 29 i 48 h, te zbirni uzorak permeata nakon 5, 24, 29 i 48 h. Za TOC analizu uzorkovani su uzorci permeata nakon 5, 24, 29 i 48 h te dodatno uzorci radne otopine na početku mjerenja, kao i uzorak aktivnog mulja i radne otopine iz reaktora. Za provođenje mikrobiološke analize uzorkovani su uzorci aktivnog mulja na početku procesa (0 h) te nakon završetka procesa membranske biorazgradnje (48 h).

3.3.3. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje

Nakon uzorkovanja te završetka procesa membranske biorazgradnje provedena je kromatografska analiza pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti.

Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu) uz gradijentno eluiranje, a gradijent pokretne faze tijekom snimanja kromatograma pojedinih komponenata na HPLC-DAD sustavu prikazan je **Tablicom 6**.

Tablica 6. Gradijent pokretne faze za analizu pojedinačnih komponenti na HPLC-DAD kromatografskom sustavu

t_R, min	A, %	B, %
0	100	0
2,3	92	8
6,0	90	10
11,0	70	30
15,0	40	60
18,0	5	95
28,0	5	95
28,06	100	0
30,0	100	0

Tijekom kromatografske analize na HPLC-DAD sustavu ispitivani farmaceutici određivani su pomoću kvalitativnih i kvantitavnih parametara. Kvalitativni parametri koji su korišteni za detekciju bili su vrijeme zadržavanja (t_R) te apsorpcijski spektar karakterističan za pojedinu ispitivanu tvar. Na temelju snimljenih apsorpcijskih spektara određeni su maksimumi apsorbancije koji za FEB iznosi 210 nm, za ACE 245 nm te za TIA 241 nm. Kao kvantitativni parametar služila je površina ispod kromatografske krivulje izražena u jedinicama mAUs (mili apsorbancijske jedinice x sekunda).

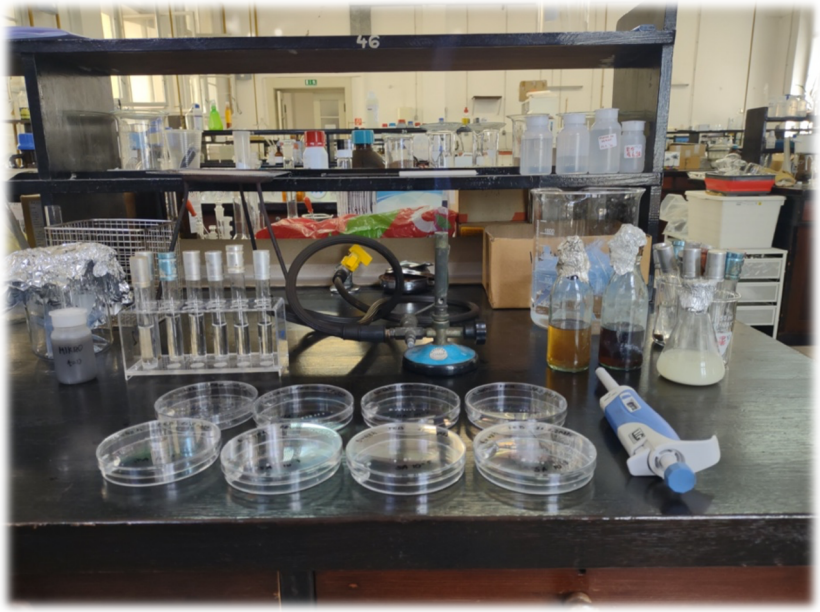
3.3.4. Određivanje ukupnog ugljika nakon biorazgradnje

Za određivanje ukupnog ugljika korišten je Analizator ugljika, TOC-Vws (Shimadzu, Japan). Uzorci su snimani pod rasponom 200-1000 mg L^{-1} za FEB, te 5–75 mg L^{-1} za ACE i TIA. Zbog velike masene koncentracije ugljika u uzorcima FEB-a, uzorke je bilo potrebno prethodno razrijediti.

3.3.5. Mikrobiološka analiza

Kako bi se odredila mikrobiološka aktivnost korištenog aktivnog mulja provedeno je određivanje broja bakterija i kvasaca, CFU (**eng.** *colony forming units*). Za provođenje metode pripremljena su razrjeđenja na način da je 1 mL aktivnog mulja dodan u epruvetu s pripremljenom fiziološkom otopinom, a svako iduće razrjeđenje pripremljeno je dodatkom 1 mL prethodno pripremljenog razrjeđenja. Zatim se po 1 mL svakog razrjeđenja izlijeva na podlogu s hranjivim agarom (HA) koji se koristi za rast bakterija te na podlogu sa sladnim agarom (SA) pogodnim za rast kvasaca. Hranjive podloge za rast bakterija inkubiraju se na 37 ºC tijekom 24 h, dok se hranjive podloge za kvasce inkubiraju na 28 ºC tijekom 3-5 dana, nakon čega su izbrojane izrasle kolonije.

Uzorci aktivnog mulja za mikrobiološku analizu uzeti su prije (0 h) te nakon završetka provođenja membranske biorazgradnje (48 h*)* za svaku pojedinu ispitivanu tvar, a sam postupak provođenja analize prikazan je **Slikom 11**.



Slika 11. Postupak određivanja ukupnog broja organizama

4. REZULTATI I RASPRAVA

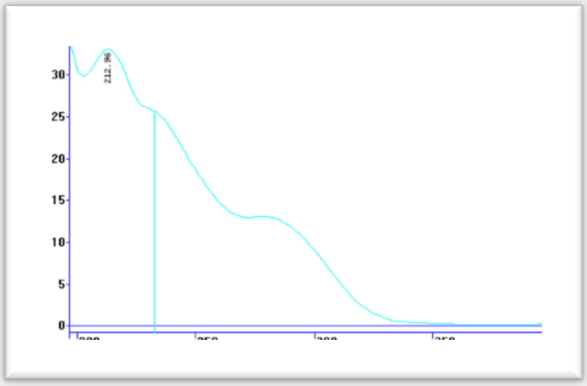
4.1. Kromatografska detekcija i kvantifikacija

Kako bi se rezultati dobiveni kromatografskom analizom na HPLC-DAD sustavu mogli interpretirati bilo je potrebno snimiti apsorpcijski spektar svake pojedine komponente i odrediti maksimum apsorbancije. Zatim je kod maksimuma apsorbancije integrirana površina kromatografske krivulje za sve ispitivane analite, a za praćenje analita i interpretaciju rezultata nužno je poznavanje i vremena zadržavanja kako bismo sa što većom sigurnošću bili sigurni da krivulje na kromatogramu odgovaraju analitu od interesa.

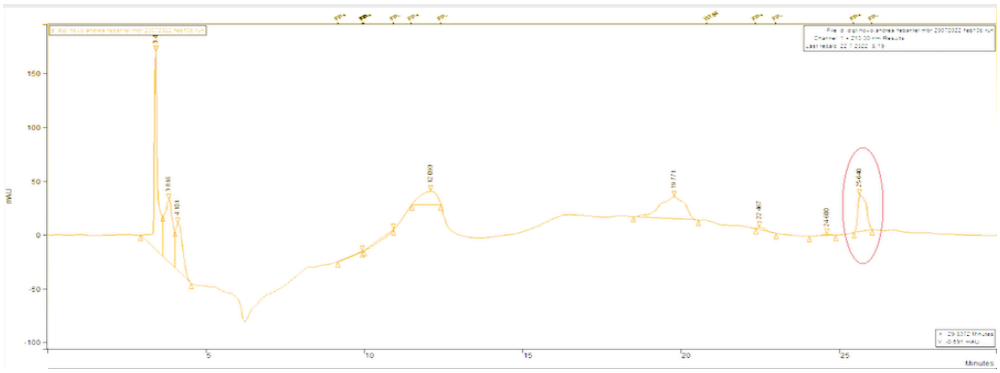
4.2. Antihelmintik febantel

Parametri potrebni za detekciju febantela (FEB) prikazani su **Tablicom 7**, a dobiveni su snimanjem spektra radne otopine febantela masene koncentracije 10 mg L^{-1}.

Tablica 7. Kvalitativni i kvantitativni parametri potrebni za detekciju FEB-a izmjereni mjerenjem radne otopine FEB-a koncentracije 10 mg L^{-1}.

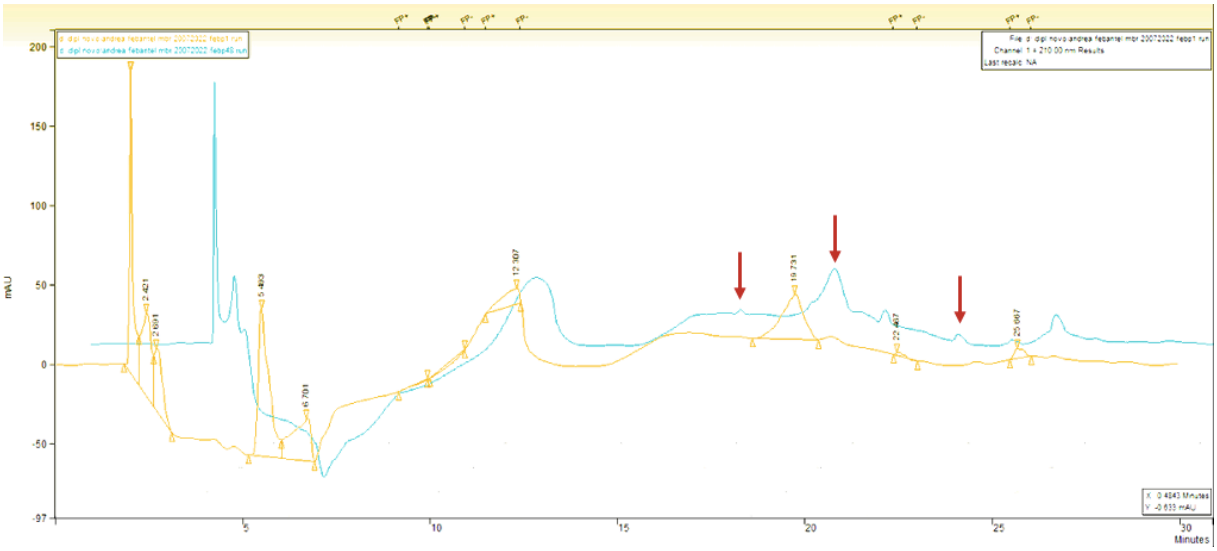
Ksenobiotik	FEB
Apsorpcijski spektar	
λ, nm	210
t_R, min	25,653

Na temelju dobivenih parametara detekcije FEB se može detektirati u svim uzorcima uzetim u realnom vremenu. **Slika 12** prikazuje kromatogram snimljen analiziranjem radne otopine FEB-a koncentracije 10 mg L^{-1} iz koje je vidljivo da se FEB pojavljuje pri vremenu zadržavanja od 25,653 min, dok površina ispod njegove kromatografske krivulje iznosi 619 mAUs.

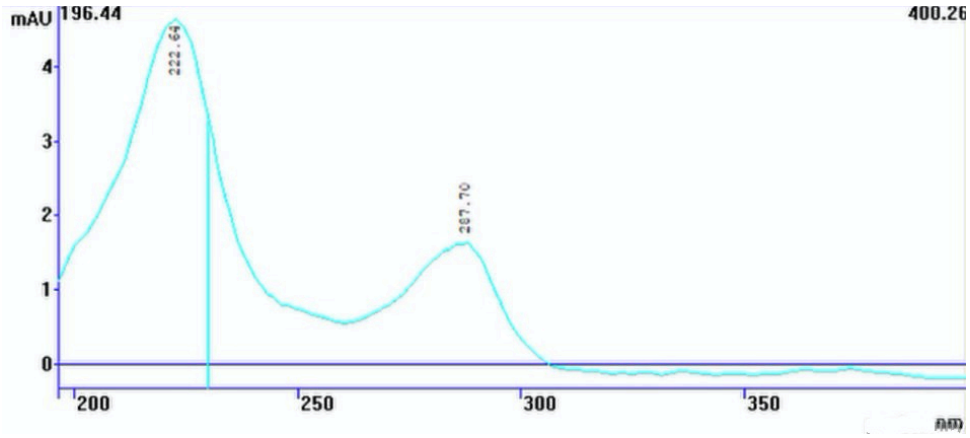


Slika 12. Kromatogram radne otopine FEB-a masene koncentracije 10 mg L^{-1}

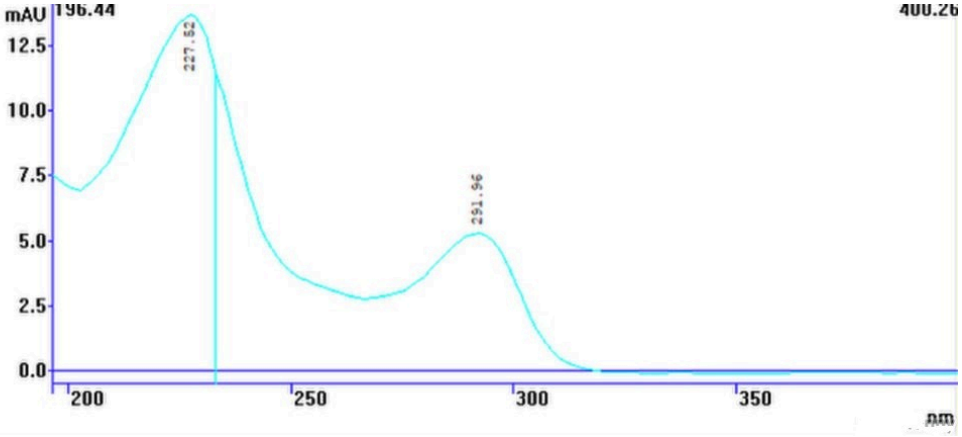
Slika 13 prikazuje usporedbu kromatograma uzoraka permeata nakon prvog sata provođenja biorazgradnje (označeno žutom bojom) i nakon 48 h, odnosno nakon završetka procesa (označeno plavom bojom). Na slici je vidljivo smanjenje površine ispod kromatografske krivulje FEB-a nakon procesa biorazgradnje, međutim na kromatogramu uzorka permeata nakon 48 h pojavljuju se tri nove kromatografske krivulje s vremenima zadržavanja t_{R1} = 17,347 min, t_{R2} = 21,211 min te t_{R3} = 23,1730 min čiji su apsorpcijski spektri prikazani **Slikama 14-16**. S obzirom na različito vrijeme zadržavanja i različite apsorpcijske spektre može se pretpostaviti da je riječ o razgradnim produktima FEB-a, međutim HPLC-DAD ne može identificirati ni kvantificirati nove spojeve, već samo potvrditi njihovu pojavu stoga bi se za daljnju identifikaciju trebao koristiti kromatografski sustav sa spektrometrom masa kao detektorom (MS/MS).



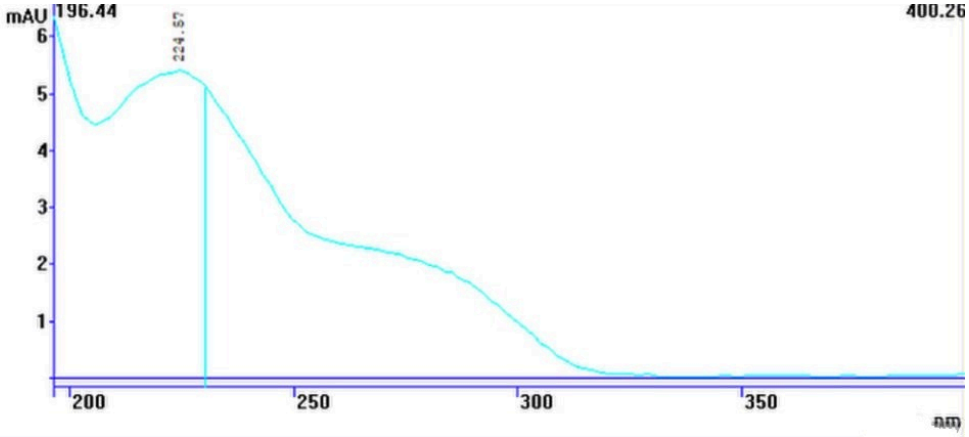
Slika 13. Usporedba kromatograma uzoraka permeata nakon 1 h (žuta krivulja) i 48 h (plava krivulja) membranske biorazdgradnje FEB-a



Slika 14. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 17,347 min



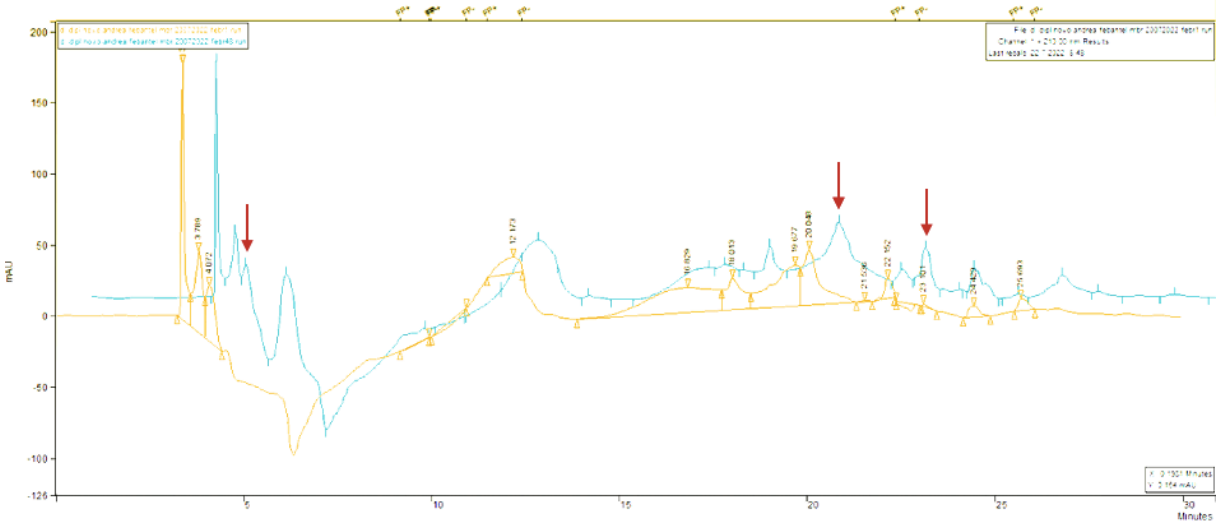
Slika 15. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 21,211 min



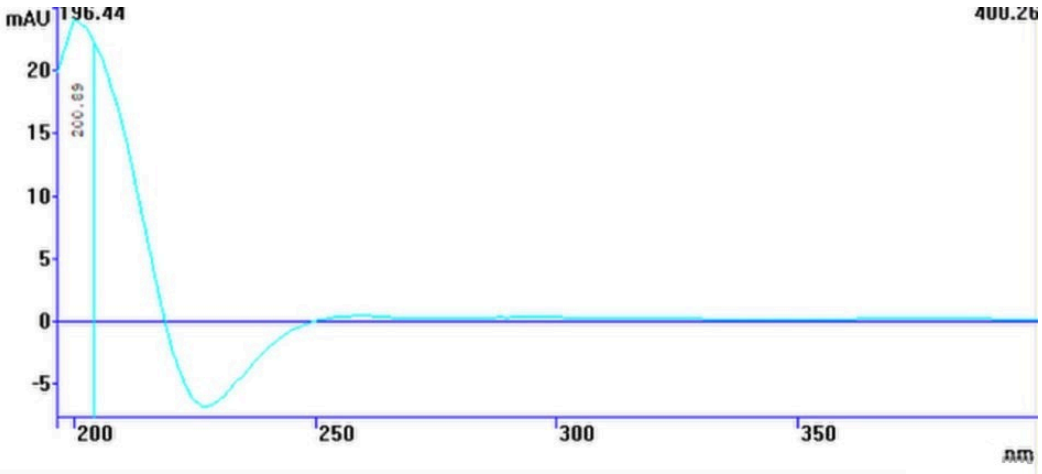
Slika 16. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 23,1730 min

Na **Slici 17** prikazana je usporedba kromatograma uzoraka retentata nakon prvog (označeno žutom bojom) i posljednjeg sata (označeno plavom bojom) procesa membranske

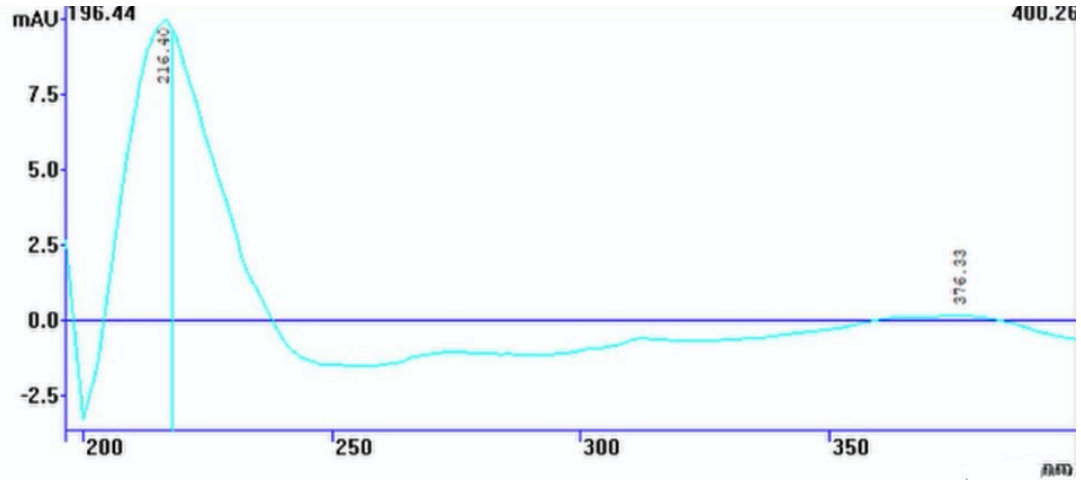
razgradnje FEB-a. Kao i u slučaju kromatograma uzoraka permeata i ovdje su uočene pojave novih kromatografskih krivulja s vremenima zadržavanja t_{R1} = 5,198 min, t_{R2} = 21,607 min te t_{R3} = 23,558 min, a njihovi apsorpcijski spektri prikazani su **Slikama 18-20**.



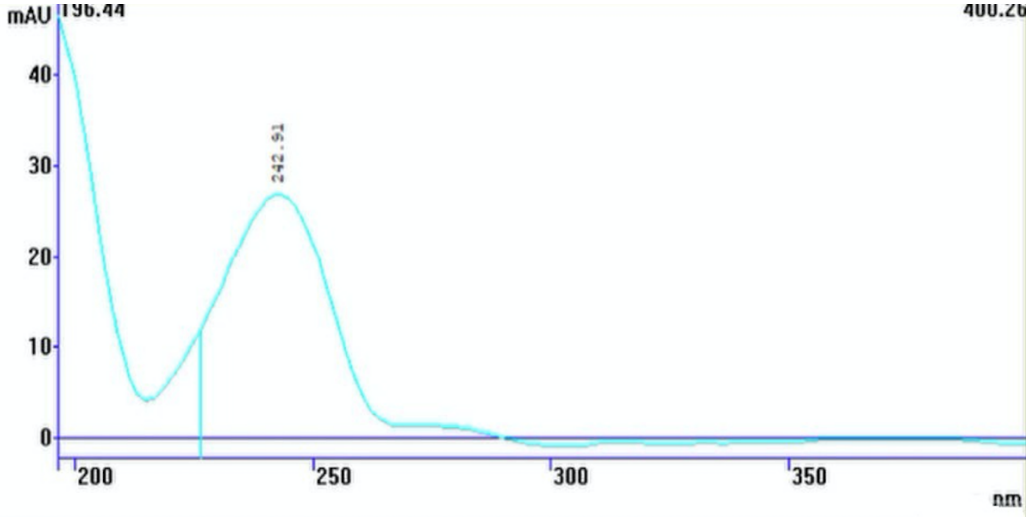
Slika 17. Usporedba kromatograma uzoraka retentata u prvom (žuta krivulja) i posljednjem satu (plava krivulja) procesa membranske biorazgradnje FEB-a



Slika 18. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u retentatu s vremenom zadržavanja t_R = 5,198 min



Slika 19. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u retentatu s vremenom zadržavanja t_R = 21,607 min



Slika 20. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta FEB u retentatu s vremenom zadržavanja t_R = 23,558 min

Tablicom 8 prikazani su rezultati određivanja ukupnog ugljika (TC), a rezultati mikrobiološke analize prikazani su **Tablicom 9**. Ulaz predstavlja uzorke uzete direktno iz MBR-a, to jest mješavinu aktivnog mulja i radne otopine, dok izlaz označava uzorak permeata nakon završetka procesa u slučaju TC analize, odnosno uzorak aktivnog mulja nakon provedenog procesa u slučaju mikrobiološke analize. U **Tablici 8** je vidljiv porast masene koncentracije ukupnog ugljika u vremenu. Visoka vrijednost masene koncentracije ukupnog ugljika radne otopine posljedica je prisutnosti metanola u radnoj otopini. Stoga povećanjem

koncentracije FEB-a u permeatu dolazi i do povećanja masene koncentracije ukupnog ugljika u uzorcima permata u vremenu.

Tablica 8. Određivanje ukupnog ugljika (TC) uzoraka FEB-a

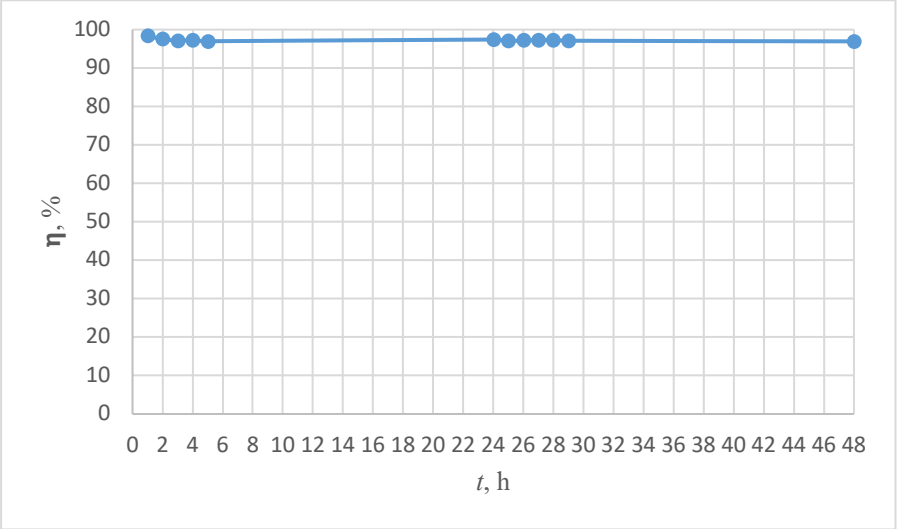
Uzorak	Masena konentracija, γ / mg L^{-1}
Aktivni mulj (SP)	1292
Radna otopina FEB (10 mg L^{-1})	4737,5
Zbirni uzorak permeata – 5 h	1676
Zbirni uzorak permeata – 24 h	1834,5
Zbirni uzorak permeata – 29 h	1834
Zbirni uzorak permeata – 48 h	1518

Rezultati mikrobiološke analize prikazani **Tablicom 9** pokazuju smanjenje broja kolonija bakterija što ukazuje na lošu biorazgradnju, što može biti posljedica prisutstva metanola u radnoj otopini. S obzirom da vrijednost log$K_{O/W}$ FEB-a iznosi 1,95 može se pretpostaviti adsorpcija febantela na mulj što može rezultirati smanjenjem površine ispod kromatografske krivulje čak i kad ne dolazi do potpune razgradnje. Međutim, pojava novih kromatografskih krivulja čiji su spektri različiti od apsorpcijskog spektra FEB-a ukazuju da do djelomične razgradnje ipak dolazi.

Tablica 9. Broj kolonija bakterija i kvasaca uzoraka FEB-a i mikroorganizama na ulazu i izlazu iz MBR-a

Parametar	jedinica	Ulaz	Izlaz
broj kolonija bakterija	CFU 1 mL^{-1}	$3{,}77 \cdot 10^6$	$1{,}96 \cdot 10^6$
broj kolonija kvasaca	CFU 1 mL^{-1}	$9 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$

Učinkovitost uklanjanja FEB-a u ovisnosti o vremenu grafički je prikazana **Slikom 21**. Na temelju navedenog grafičkog prikaza može se zaključiti da do biorazgradnje FEB-a dolazi već u prvom satu provođenja procesa, a zatim učinkovitost uklanjanja stagnira do završetka provođenja membranske biorazgradnje te poprima vrijednosti od 97-98,5 %.



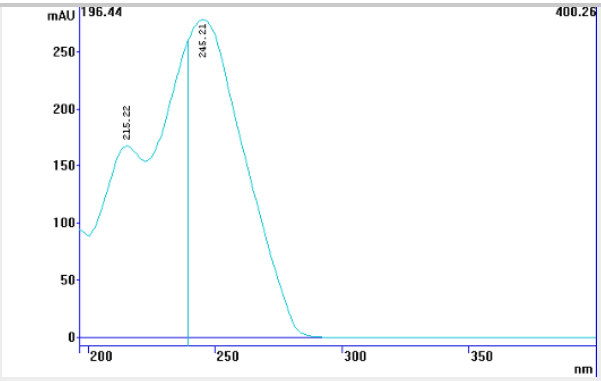
Slika 21. Učinkovitost uklanjanja FEB s vremenom

4.3. Pesticidi

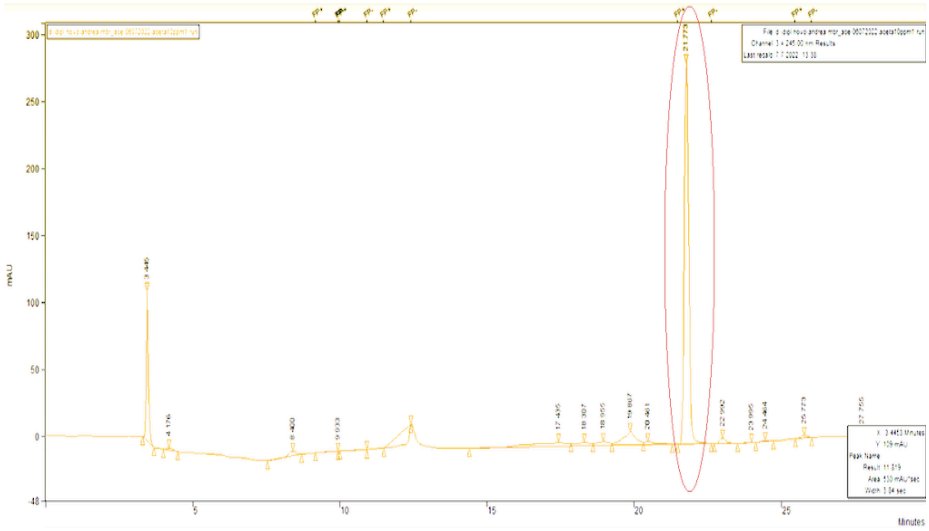
4.3.1. Acetamiprid

Tablicom 10 prikazani su parametri potrebni za detekciju acetamiprida (ACE), a dobiveni su snimanjem spektra radne otopine acetamiprida masene koncentracije 10 mg L^{-1}.

Tablica 10. Kvalitativni i kvantitativni parametri potrebni za detekciju ACE

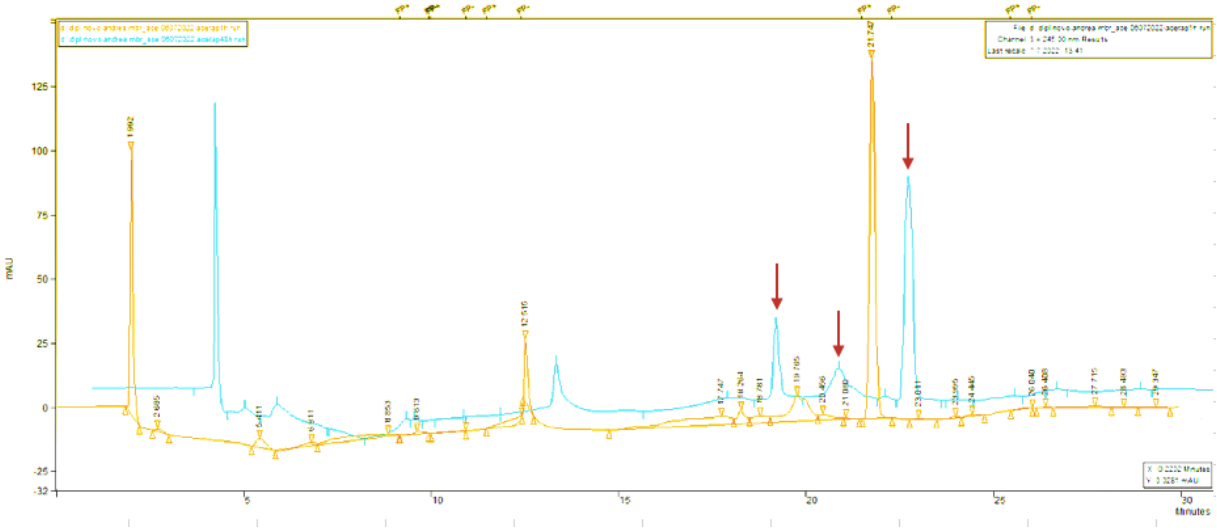
Ksenobiotik	ACE
Apsorpcijski spektar	
λ, nm	245
t_R, min	21,773

Slikom 22 prikazan je kromatogram radne otopine ACE masene koncentracije 10 mg L^{-1} na kojem je vidljivo da se kromatografska krivulja acetamiprida pojavljuje pri vremenu zadržavanja od 21,773 min, dok površina ispod kromatografske krivulje iznosi 2985,5 mAUs.

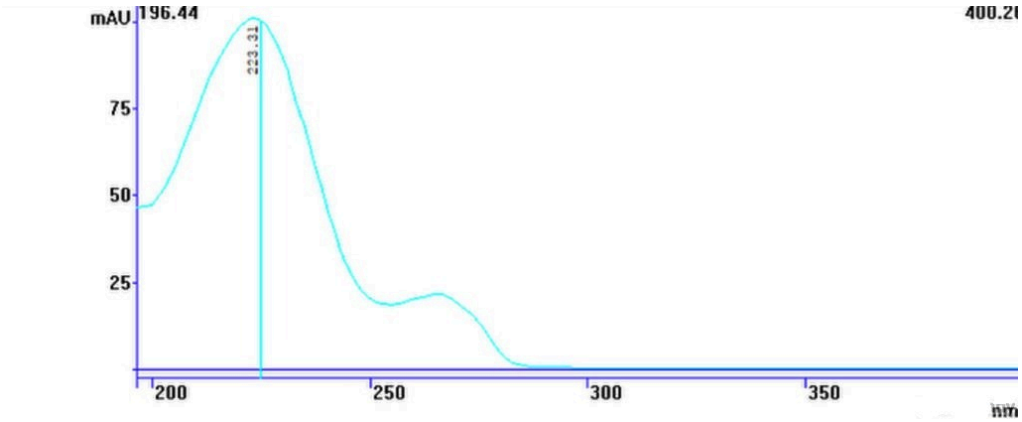


Slika 22. Kromatogram radne otopine ACE masene koncentracije 10 mg L^{-1}

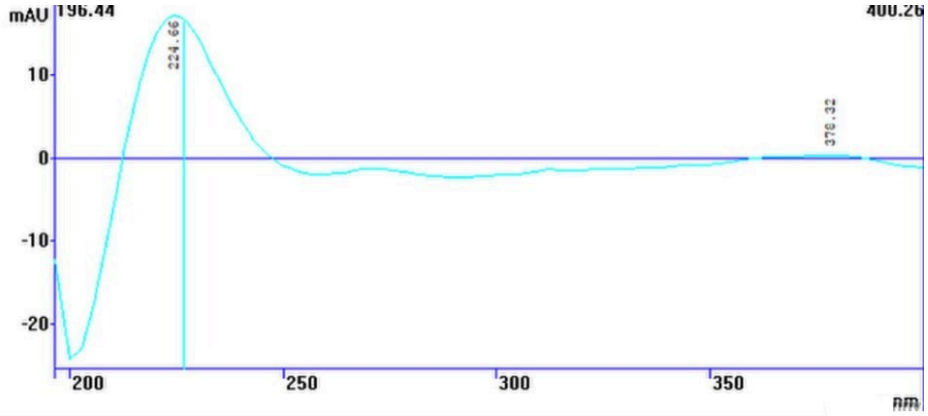
Slika 23 prikazuje usporedbu kromatograma uzoraka permeata u prvom (označeno žutom bojom) i posljednjem satu (označeno plavom bojom) biorazgradnje ACE. Na slici je uočena pojava novih kromatografskih krivulja na vremenima zadržavanja t_{R1} = 18,272 min, t_{R2} = 21,197 min te t_{R3} = 22,779 min za koje se pretpostavlja da su razgradni produkti ACE, a čiji su apsorpcijski spektri prikazani **Slikama 24-26**.



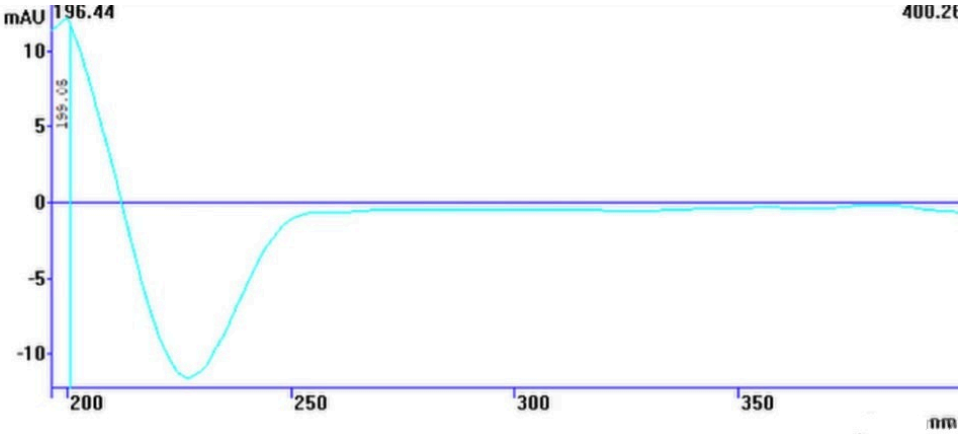
Slika 23. Usporedba kromatograma uzoraka permeata u prvom (žuta krivulja) i posljednjem satu (plava krivulja) biorazdgradnje ACE



Slika 24. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta ACE u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 18,272 min

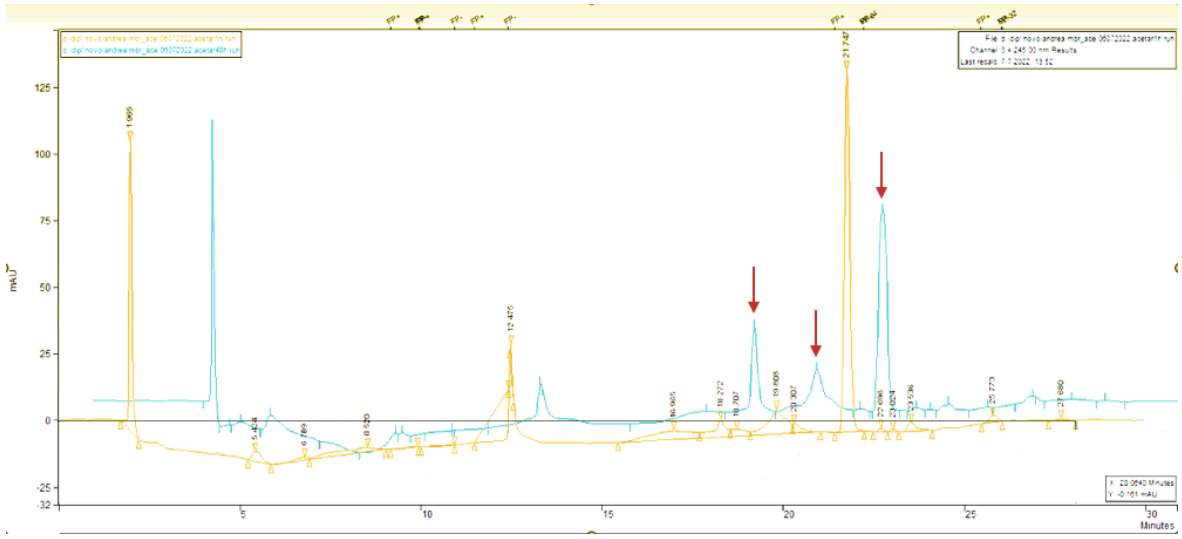


Slika 25. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta ACE u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 21,197 min



Slika 26. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta ACE u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 22,779 min

Slikom 27 prikazana je usporedba kromatograma uzoraka retentata u prvom (označeno žutom bojom) i posljednjem satu (označeno plavom bojom) procesa membranske biorazgradnje ACE. Kromatogram retentata nakon 48 h također sadrži nove kromatografske krivulje uočene u permeatu.



Slika 27. Usporedba kromatograma uzoraka retentata u prvom (žuta krivulja) i posljednjem satu (plava krivulja) procesa membranske biorazgradnje ACE

U **Tablici 11** prikazani su rezultati TC analize. Za razliku od rezultata masenih koncentracija ukupnog ugljika kod FEB-a, u slučaju ACE dolazi do znatno sporijeg rasta koncentracije ukupnog ugljika u vremenu što je očekivano s obzirom da u radnoj otopini nema prisutnosti metanola.

Tablica 11. Određivanje ukupnog ugljika (TC) uzoraka ACE

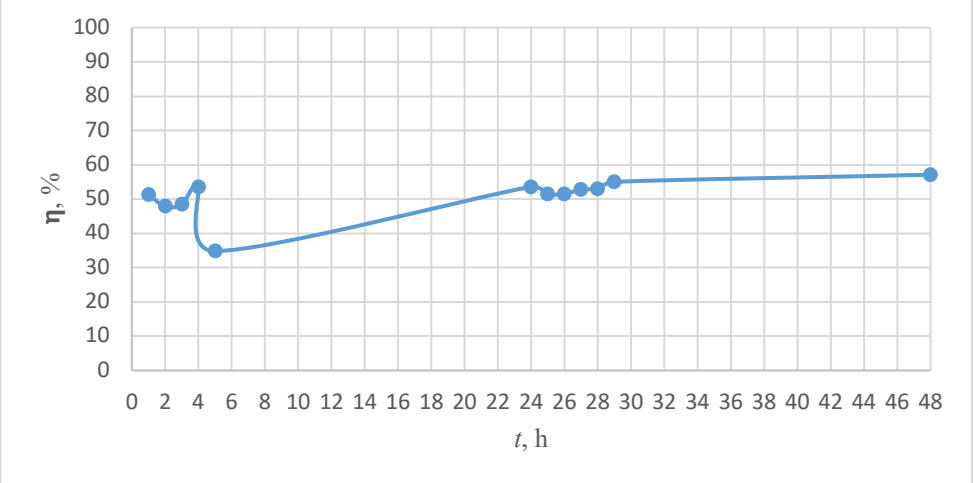
Uzorak	**Masena konentracija, γ/ mg L^{-1}**
Aktivni mulj (SP)	106,2
Radna otopina ACE (10 mg L^{-1})	6,462
Zbirni uzorak permeata – 5 h	25,28
Zbirni uzorak permeata – 24 h	32,07
Zbirni uzorak permeata – 29 h	60,38
Zbirni uzorak permeata – 48 h	26,99

Tablicom 12 prikazani su rezultati mikrobiološke analize. Primijećeno je veliko smanjenje broja kolonija bakterija na kraju procesa koje se može povezati s toksičnosti ACE za mikroorganizme. Međutim, zbog pojave novih kromatografskih krivulja različitih spektara od apsorpcijskog spektra ACE može se zaključiti da dolazi do djelomične razgradnje.

Tablica 12. Broj kolonija bakterija i kvasaca uzoraka ACE

Parametar	**jedinica**	**Ulaz**	**Izlaz**
broj kolonija bakterija	CFU 1 mL^{-1}	$3{,}16 \cdot 10^7$	$6{,}5 \cdot 10^5$
broj kolonija kvasaca	CFU 1 mL^{-1}	$1{,}24 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$

Na temelju grafičkog prikaza učinkovitosti uklanjanja ACE u vremenu (**Slika 28**) uočeno je da učinkovitost uklanjanja opada nakon određenog vremena, a zatim opet počinje usporeno rasti te stagnira nakon 24 h od početka biorazgradnje. Učinkovitost uklanjanja ACE dostiže vrijednosti u rasponu od 35-57 % što je bitno niža učinkovitost nego u slučaju FEB-a. S obzirom da bi najniža vrijednost $\log K_{O/W}$ od svih ispitivanih ksenobiotika trebala ukazivati na nisku tendenciju sorpciji te samim time bolje uklanjanje, može se pretpostaviti da je mala učinkovitost uklanjanja posljedica toksičnog djelovanja na mikroorganizme.

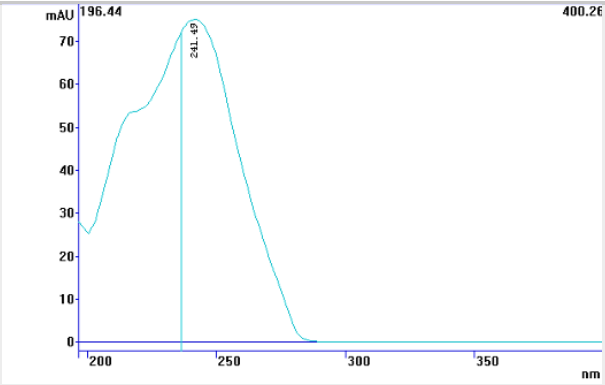


Slika 28. Uklanjanje ACE s vremenom

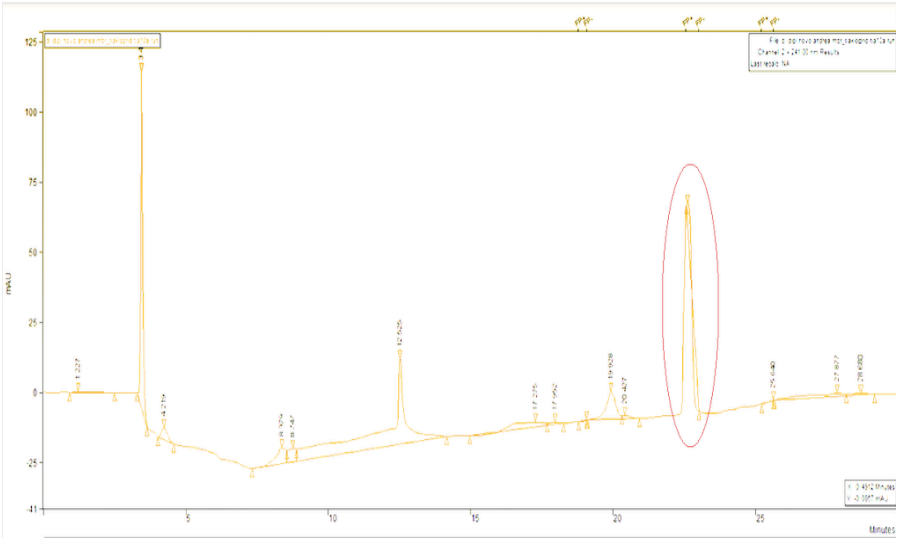
4.3.2. Tiakloprid

Parametri potrebni za detekciju TIA prikazani su **Tablicom 13**, a dobiveni su snimanjem spektra radne otopine tiakloprida masene koncentracije 10 mg L^{-1}.

Tablica 13. Kvalitativni i kvantitativni parametri potrebni za detekciju TIA

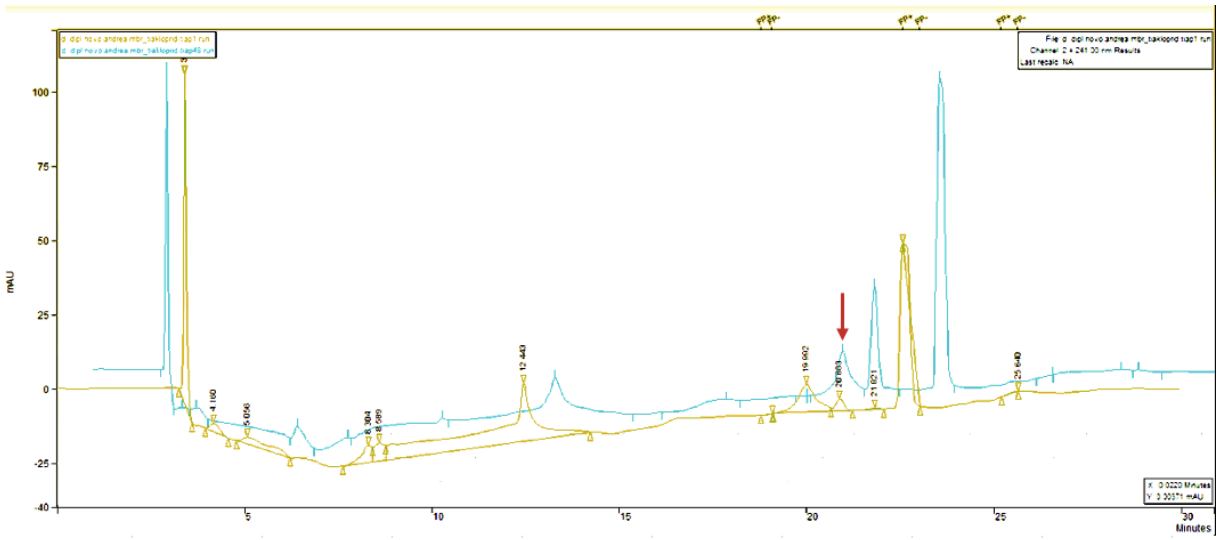
Ksenobiotik	TIA
Apsorpcijski spektar	
λ, nm	241
t_R, min	22,6

Slika 29 prikazuje kromatogram radne otopine TIA masene koncentracije 10 mg L^{-1} na kojem je vidljivo da se kromatografska krivulja TIA pojavljuje pri vremenu zadržavanja od 22,6 min, dok površina ispod kromatografske krivulje iznosi 1329 mAUs.

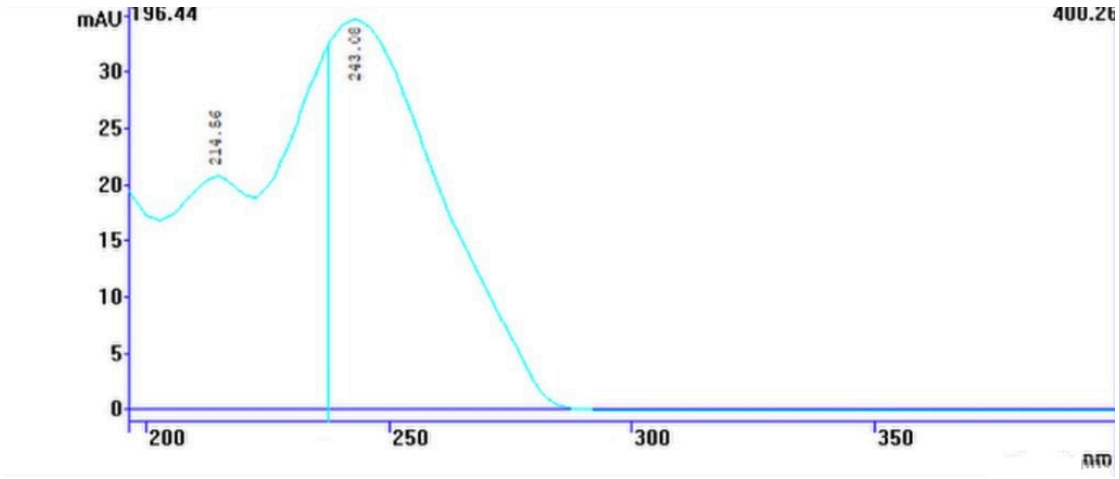


Slika 29. Kromatogram radne otopine TIA masene koncentracije 10 mg L^{-1}

Slika 30 prikazuje usporedbu kromatograma uzoraka permeata nakon prvog sata provođenja biorazgradnje (označeno žutom bojom) i nakon 48 h, odnosno nakon završetka procesa (označeno plavom bojom). Uočena je pojava novog razgradnog produkta na vremenu zadržavanja t_R = 20,869 min čiji je spektar prikazan **Slikom 31**.

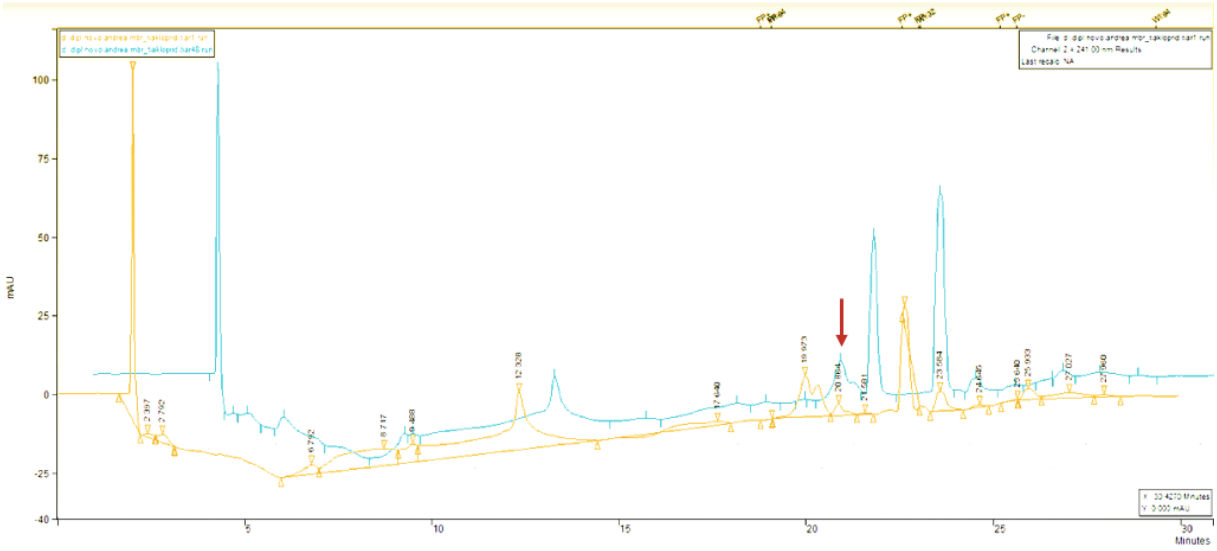


Slika 30. Usporedba kromatograma uzoraka permeata u prvom (žuta krivulja) i posljednjem satu (plava krivulja) biorazdgradnje TIA



Slika 31. Apsorpcijski spektar razgradnog/transformacijskog produkta TIA u permeatu s vremenom zadržavanja t_R = 20,869 min

Također, isti razgradni produkt primijećen je i na kromatogramu retentata nakon 48 h, što je vidljivo na **Slici 32**.



Slika 32. Usporedba kromatograma uzoraka retentata u prvom (žuta krivulja) i posljednjem satu (plava krivulja) procesa membranske biorazgradnje TIA

Tablicom 14 dani su rezultati TC analize uzoraka. Kao i u slučaju acetamiprida i ovdje je vidljivo smanjenje masene koncentracije ukupnog ugljika na izlazu što je posljedica puno manje TC vrijednosti radne otopine u odnosu na TC vrijednost aktivnog mulja. Također, u **Tablici 15** koja prikazuje rezultate mikrobiološke analize vidljivo je da dolazi do značajnog smanjenja broja kolonija bakterija i kvasaca na ulazu što se može pripisati toksičnosti TIA na mikroorganizme te samim time nedovoljno učinkovitom biorazgradnjom.

Tablica 14. Određivanje ukupnog ugljika (TC) uzoraka TIA

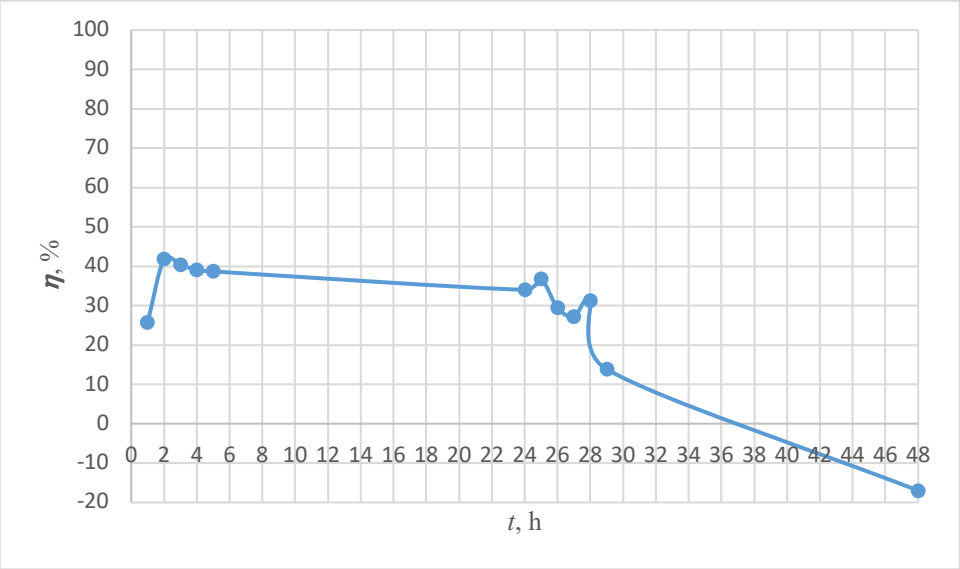
Uzorak	**Masena konentracija, γ/ mg L^{-1}**
Aktivni mulj (SP)	99,53
Radna otopina TIA (10 mg L^{-1})	5,027
Zbirni uzorak permeata – 5 h	36,38
Zbirni uzorak permeata – 24 h	12,18
Zbirni uzorak permeata – 29 h	16,30
Zbirni uzorak permeata – 48 h	12,73

Tablica 15. Broj kolonija i bakterija uzoraka TIA

Parametar	**jedinica**	**Ulaz**	**Izlaz**
broj kolonija bakterija	CFU 1 mL^{-1}	$1{,}56 \cdot 10^6$	$4{,}6 \cdot 10^5$
broj kolonija kvasaca	CFU 1 mL^{-1}	$1 \cdot 10^4$	$<1 \cdot 10^4$

Učinkovitost uklanjanja tiakloprida poprima vrijednosti od 25-42 % što je ujedno i najmanji raspon učinkovitosti uklanjanja od svih ispitanih ksenobiotika. Učinkovitost uklanjanja rasla je prva dva sata provođenja procesa membranske biorazgradnje nakon čega počinje usporeno opadati što je prikazano grafičkim prikazom učinkovitosti uklanjanja TIA na **Slici 33**. Nagli pad učinkovitosti uklanjanja koji se dogodio nakon 28-og satanog provođenja procesa posljedica je naglog povećanog dotoka radne otopine u MBR zbog prestanka rada senzora razine.

Unatoč tomu, niski raspon učinkovitosti posljedica je toksičnosti TIA na mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju.



Slika 33. Učinkovitost uklanjanja tiakloprida s vremenom

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja membranske razgradnje ispitivanih ksenobiotika može se zaključiti sljedeće:

1) FEB – tijekom razgradnje febantela dolazi do pojave novih spojeva, odnosno razgradnih/transformacijskih produkata koje je moguće detektirati, ali ne i identificirati. Postignuta je visoka učinkovitost uklanjanja FEB-a u rasponu učinkovitosti od 97-98,5 %. Do uklanjanja dolazi vrlo brzo unutar prvog sata provođenja procesa nakon čega dolazi do usporenog pada učinkovitosti koje se može objasniti zasićenjem aktivnog mulja. Mikrobiološkom analizom utvrđeno je da biorazgradnjom FEB-a dolazi do najmanje promjene u broju kolonija bakterija i kvasaca (CFU) u odnosu na ACE i TIA na temelju čega se može zaključiti da je od ispitivanih spojeva FEB najmanje toksičan.

2) ACE – tijekom razgradnje acetamiprida detektirani su novi razgradni produkti. Mikrobiološkom analizom uočeno je veliko smanjenje vrijednosti CFU bakterija i kvasaca čime se može potvrditi njegovo toksično djelovanje. Učinkovitost uklanjanja ACE dostiže vrijednosti u rasponu od 35–57 %, a raste tijekom 24 h nakon čega počinje stagnirati. Niža učinkovitost u odnosu na FEB rezultat je toksičnijeg djelovanja ACE na mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju, ali i različitih procesnih parametara kao što je niža vrijednost hidrauličkog vremena zadržavanja u membranskom bioreaktoru.

3) TIA – kao i u prethodno ispitivanim spojevima, razgradnjom TIA detektirana je pojava novih razgradnih produkata. Znatno smanjenje vrijednosti CFU bakterija i kvasaca upućuje na njegovu toksičnost prema mikroorganizmima prisutnim u aktivnom mulju što ima za posljedicu smanjenu učinkovitost biorazgradnje. Učinkovitost uklanjanja TIA raste prva dva sata provođenja procesa nakon čega počinje opadati, a u cijelom trajanju procesa dostiže vrijednosti u rasponu od 25–42 % što je ujedno najmanja učinkovitost uklanjanja od svih ispitanih spojeva. Na temelju svega navedenog, može se zaključiti da proces membranske biorazgradnje nije adekvatna metoda za uklanjanje TIA .

7. LITERATURA

[1] I. S. Thakur, Xenobiotics: Pollutants and their degradation-methane, benzene, pesticides, bioabsorption of metals, School of Environmental Sciences, Jawaharlal Nehru University New Delhi, 2006, str. 1-3

[2] D. Kumar, S. Chopra, Xenobiotic Compounds in the Environment: their Fate, Transport and Removal, 3rd National Conference on Medical Instrumentation, Biomaterials and Signal Processing (NCMBS-20), 2020, str. 96-102

[3] C. Meseko, O. Makanju, D. Ehizibolo, I. Muraina, Veterinary Pharmaceuticals and Antimicrobial Resistance in Developing Countries, Veterinary Pharmaceuticals, 2019, str. 1-4

[4] R. J. Martin, A. P. Robertson, H. Bjorn, Target sites of anthelmintics, Parasitology , Volume 114 , Issue 7 , June 1997 , pp. 111 - 124

[5] M. Abongwa, R. J. Martin, A. P. Robertson, A brief review on the mode of action of antinematodal drugs, Acta Veterinaria-Beograd 2017, 67

[6] N. T. Crosby, Determination of veterinary residues in food, Woodhead Publishing Limited, 2007, str. 240-245

[7] Antihelmintik: https://www.britannica.com/science/anthelmintic (pristup: 20. srpnja 2022.)

[8] N. de Silva, H. Guyatt, D. Bundy, Anthelminthics, A Comparative Review of Their Clinical Pharmacology, Drugs 1997 May; 53 (5): 769-788

[9] Febantel: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Febantel#section=FDA-Green-Book (pristup: 20. srpnja 2022.)

[10] S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, M. Biošić, D. Ašperger, I. Škorić, M. Runje, Fate of febantel in the aquatic environment—the role of abiotic elimination processes, Environmental Science and Pollution Research, 29 (2018) 28917-28927

[11] J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy, Benzimidazole carbamate residues in milk, Detection by Surface Plasmon Resonancebiosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction, Analytica Chimica Acta 654 (2009) 111-119.

[12] Febantel: https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v29je03.htm (pristup: 20. srpnja 2022.)

[13] Febantel: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/febantel-extrapolation-all-ruminants-summary-report-4-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (pristup: 20. srpnja 2022.)

[14] L. Rani, K. Thapa, N. Kanojia, N. Sharma, S. Singh, A. S. Grewal, A. L. Srivastav, J. Kaushal, An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment, Journal of Cleaner Production, 2020, str. 1-18

[15] I. Md Meftaul, K. Venkateswarlu, R. Dharmarajan, P. Annamalai, M. Megharaj, Pesticides in the urban environment: a potential threat that knocks at the door, Science of the Total Environment (2019), str. 11-20

[16] T. Santos de Almeida Lopes, R. Heßler, C. Bohner, G. B.Athayde, R. Felix de Sena, Pesticides removal from industrial wastewater by a membrane bioreactor and post-treatment with either activated carbon, reverse osmosis or ozonation, Journal of Environmental Chemical Engineering (2020), str. 1-5

[17] D. Goulson, An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides, Journal of Applied Ecology 2013, 50, 977–987

[18] A. Brandt , A. Gorenflo, R. Siede, M. Meixner, R. Büchler, The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (Apis mellifera L.), Journal of Insect Physiology 86 (2016) 40–47

[19] B. F. Abramović, N. D. Banić, D. V. Šojić, Degradation of thiacloprid in aqueous solution by UV and UV/H2O2 treatments, Chemosphere 81 (2010) 114–119

[20] Acetamiprid: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid (pristup: 27. srpnja 2022.)

[21] Tiakloprid: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiacloprid (pristup: 27. srpnja 2022.)

[22] M. Periša i S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske , Vol. 65 (9-10) (2016) 471−482

[23] Okvirna direktiva o vodama:
https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32000L0060 (pristup: 07. rujna 2022.)

[24] Okvirna direktiva o vodama:
https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:226:0001:0017:en:PDF (pristup :07.rujna 2022.)

[25] M. Glancer-Šoljan, T. L. Dragičević, V. Šoljan, 2002. Biotehnologija u zaštiti okoliša – Interna skripta, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 194

[26] S. Tedeschi, Zaštita voda, Građevinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1997.

[27] M. Vuković Domanovac, Osvježimo znanje, Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske , Vol. 70 (3-4) (2021) 192–193

[28] U. Wiesmann, I. S. Choi, E.-M. Dombrowski*,* Fundamentals of Biological Wastewater Treatment**,** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007, 1-20

[29] X. Min, W. Li, Z. Wei, R. Spinney, D.D. Dionysiou, Y. Seo, C-J. Tang, R. Xiao, Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study, Chemical Engineering Journal (2018), str. 1-17

[30] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode 24 (96), 119-136, 2016

[31] J. Rodrigues Pires da Silva et al*.,* Study of effects of pharmaceuticals on the activated sludge process combining advanced oxidation using ultraviolet/hydrogen peroxide to increase their removal and mineralization of wastewater, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2020.**,** str. 1-6

[32] C. Grandclement, I. Seyssiecq, A. Piram, P. Wong-Wah-Chung, G. Vanot, et al.. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. Water Research, IWA Publishing, 2017, str. .297-317

[33] M. Tobajas, V. Verdug, A. Polo, J. Rodriguez, A. F. Mohedano, Assessment of toxicity and biodegradability on activated sludge of priority and emerging pollutants, Environmental Technology, 37(6), 713–721., 2015

[34] A. Basile, F. Gallucci, Membranes for Membrane Reactors, Preparation, Optimization and Selection, 2011, str. 1-11

[35] M. Rukavina, Utjecaj transmembranskog tlaka na kakvoću vode obrađene nanofiltracijom, Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa StrossMayera u Osijeku, 2015.

[36] Membranska filtracija: https://www.hongtekfiltration.com/news/comparison-of-dead-end-and-cross-flow-filtration.html (pristup: 17. rujna 2022.)

[37] A. Basile, A. Cassano, N. K. Rastogi, Advances in Membrane Technologies for Water Treatment, 162-166, 2015

[38] A. Serdarević , Razvoj i primjena MBR tehnologije u procesu prečišćavanja otpadnih voda, Građevinski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, 2014, str. 1-11

[39] G. Belfort, Membranes and bioreactors: A technical challenge in biotechnology. Biotechnology and Bioengineering, 33(8), str. 1047–1066

[40] J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barceló, Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, Anal Bioanal Chem (2007) 387:1365–1377

[41] M. Damjanović, Validacija analitičke metode za određivanje ukupng organskog ugljika u vodi, Diplomski rad, 2018.

[42] S. Korunić-Košćina, M. Mioč, V. Bobić, Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, Goriva i maziva, 42, 3:153-176, 2003

[43] S. Babić, Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša, Toksičnost, – Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, str. 19

[44] I. Bak, Modern analytical techniques in the pharmaceutical and bioanalysis, Faculty of Pharmacy, Debrecen, 2011., str. 23, 25-29, 41-42, 58.

[45] F. Settle, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997. str. 147-152, 650.

[46] Lj. Nikolaš, Optimiranje razdvajanja pesticida u HPLC analizi, Diplomski rad, Fakultet Kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.

[47] D. Dolar, M. Racar, K. Košutić, N. Čavarović, K. Karadakić, Obrada komunalne otpadne vode membranskim procesima, , Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske , Vol. 68 (9-10) (2019) 547−552

9. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

A	Površina ispod kromatografske krivulje, mAUs
ACE	Acetamiprid
ACN	Acetonitril
BPK	Biokemijska potrošnja kisika, **eng.** Biochemical Oxygen Demand, BOD
CAS	Konvencionalni sustav s aktivnim muljem, engl. Conventional Activated Sludge System
CFU	Broj razvijenih kolonija, **eng.** *Colony Forming Unit*
DAD	Detektor s nizom dioda, **eng.** D*iode-Array Detector*
DDT	Diklordifeniltrikloretan
FEB	Febantel
GC	Plinska kromatografija, **eng.** *Gas Chromatography*
h	Visina pika kromatografske krivulje
HA	Hranjivi agar
HPLC	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, **eng.** *High Performance Liquid Chromatography*
HRT	hidrauličko vrijeme zadržavanja, **eng.** *Hydraulic Retention Time*, h
K_H	Henrijeva konstanta
KPK	Kemijska potrošnja kisika, **eng.** *Chemical Oxygen Demand, COD*
LC	Tekućinska kromatografija, **eng.** *Liquid Chromatography*
log $K_{O/W}$	logaritam koeficijenta razdvajanja oktanol vode
MBR	Membranski bioreaktor, **eng.** *Membrane bioreactor*
MF	Mikrofiltracija
NF	Nanofiltracija
POP	Postojane organske onečišćujuće tvari, **engl** *Persistent Organic Pollutants*
RO	Reverzna osmoza
SA	Sladni agar
SFC	Superkritična fluidna kromatografija, **eng.** *Supercritical Fluid Chromatography*
SRT	vrijeme zadržavanja mulja, **eng.** *Sludge Retention Time*, h

t_R	Vrijeme zadržavanja analita, min
TC	Ukupni ugljik, **eng.** *Total Carbon*
TIA	Tiakloprid
TOC	Ukupni organski ugljik, **eng.** *Total Organic Carbon*
TSO	Temeljna standardna otopina
UF	Ultrafiltracija
WFD	Okvirna direktiva o vodama, **eng.** *Water Framework Directive*
WL	Lista za praćenje zagađivala, **eng.** *Watch list*
γ	Masena koncentracija, mg L^{-1}
λ	Lista za praćenje zagađivala, **eng.** Watch list

10. ŽIVOTOPIS

Andrea Drača [redacted] Osnovnoškolsko obrazovanje završila sam u OŠ Smiljevac u Zadru, a srednjoškolsko obrazovanje u Gimnaziji Franje Petrića u Zadru.
2020. godine završavam sveučilišni preddiplomski studij kemijskog inženjerstva, obranom završnog rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Gordana Matijašić, na temu: ”*Ispitivanje stabilnosti farmaceutskih dozirnih oblika”* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. U rujnu 2020. upisujem diplomski studij kemijskog inženjerstva (modul: Kemijsko-procesno inženjerstvo). Tijekom preddiplomskog studija, odradila sam studentsku stručnu praksu u tvrtki Pliva Hrvatska d.o.o. na odjelu Istraživanja i razvoja.