

Određivanje toksičnosti binarnih smjesa farmaceutika i pesticida

Radin, Edi

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:149:587268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Edi Radin

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Edi Radin

ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI BINARNIH SMJESA FARMACEUTIKA I
PESTICIDA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, srpanj 2020.

Zahvaljujem se dragom mentoru izv. prof. dr. sc. Šimi Ukiću na strpljenju, trudu te uloženom vremenu kako bih izradio ovaj diplomski rad.

Velika zahvala dragoj asistentici Mariji Sigurnjak na nesebičnom trudu i pomoći te uloženom vremenu pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se asistentu i prijatelju Matiji Cvetniću na nesebičnom dijeljenju svojega znanja i pomoći tijekom ovih pet godina studiranja.

Zahvaljujem se dr. sc. Lidiji Furač na trudu, pomoći i savjetovanju koje mi je pružila tijekom cijelog mog studiranja.

Posebna zahvala mojim dragim prijateljima na velikoj podršci koju su mi pružili prilikom studiranja.

Zahvalio bih se mojoj Nini što je bila uz mene u svim trenucima i bila mi velika podrška sve ovo vrijeme.

Na kraju, velika zahvala mojim dragim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno i nesmetano školovanje i bili mi velika podrška.

SAŽETAK

Intenzivan gospodarski rast praćen porastom svjetske populacije, rezultirao je povećanjem onečišćenja voda. S ciljem očuvanja relativno ograničenih vodenih resursa, dolazi do povećanog interesa za praćenje tvari čija prisutnost u vodama predstavlja opasnost po vodeni okoliš. Među ostalim, javila se i potreba za praćenjem farmaceutika i pesticida čiji je štetni utjecaj na okoliš očekivan, a njihova kontinuirana intenzivna upotreba dovodi do povećane koncentracije u vodama.

Vodeni mediji najčešće kokteli raznih onečišćivala čije zajedničko djelovanje može rezultirati antagonističkim ili sinergističkim odstupanjem s obzirom na čisti aditivnim efekt. Neovisno o tome, procjena rizika i dalje se uglavnom provodi na temelju rezultata ispitivanja toksičnosti zasebnih onečišćivala.

Za potrebe istraživanja, odabrano je šest farmaceutika: azitromicin, eritomicin, karbamazepin, oksitetraciklin, deksametazon i diklofenak te četiri pesticida: alaklor, izoproturon, diuron i klorfenvinfos te je analizirana njihova zasebna toksičnost, ali i toksičnost njihovih binarnih smjesa. Toksičnost je određena prema bakterijama *Vibrio fischeri*, a za opis toksičnosti binarnih smjesa primijenjena su dva matematička modela: aditivni model (engl. *Concentration Addition model*) i model neovisnog djelovanja (engl. *Independent Action model*).

Ključne riječi: toksičnost, farmaceutici, pesticidi, binarne smjese, aditivni model, model neovisnog djelovanja

ABSTRACT

Intensive economic growth, followed by global population growth, has resulted with increased water pollution. In order to preserve relatively limited water resources, countries all over the world have started with monitoring of potentially dangerous substances in aquatic environment. This especially relates pharmaceuticals and pesticides whose concentration in the environment is increasing due to their continuous use..

Water pollutants are mostly mixtures comprised of different pollutants whose combined impact might result with antagonistic or synergistic deviation from pure additive toxic action. Nevertheless, the risk assessment is still mainly based on results of single pollutant toxicity.

Six pharmaceuticals: azithromycin, erythromycin, carbamazepine, oxytetracycline, dexamethasone, and diclofenac, and four pesticides: alachlor, isoproturon, diuron, and chlorfenvinphos were selected for this research. Their individual toxicities were determined, as well as toxicities of their binary mixtures. Toxicity was measured toward *Vibrio fischeri* bacteria. Two mathematical models were applied to assess mixture effect: Concentration Addition model and Independent Action model.

Key words: toxicity, pharmaceuticals, pesticides, binary mixtures, concentration addition, independent action

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1 ZAŠTITA OKOLIŠA | 2 |
| 2.2 ONEČIŠĆIVALA | 4 |
| 2.2.1 Farmaceutici | 6 |
| 2.2.2 Pesticidi | 14 |
| 2.3 TOKSIČNOST ONEČIŠĆIVALA | 21 |
| 2.3.1 Određivanje toksičnosti prema <i>Vibrio fischeri</i> | 23 |
| 2.4 TOKSIČNOST VIŠEKOMPONENTNIH SUSTAVA | 24 |
| 2.5 MODELIRANJE TOKSIČNOSTI SMJESA | 25 |
| 2.5.1 Aditivni model | 25 |
| 2.5.2 Model neovisnog djelovanja | 27 |
| 2.5.3 Model kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti | 27 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 29 |
| 3.1 MATERIJALI | 29 |
| 3.1.1 Kemikalije..... | 29 |
| 3.1.2 Bakterija <i>Vibrio fischeri</i> | 29 |
| 3.1.3 Farmaceutici | 30 |
| 3.1.4 Pesticidi | 31 |
| 3.2 INSTRUMENTI | 32 |
| 3.2.1 Ultrazvučna kupelj..... | 32 |
| 3.2.2 Luminometar | 32 |
| 3.3 METODA ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI PREMA BAKTERIJI <i>VIBRIO FISCHERI</i> | 33 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 36 |
| 4.1 TOKSIČNOST JEDNOKOMPONENTNIH OTOPINA..... | 36 |
| 4.1.1 Toksičnost farmaceutika | 36 |
| 4.1.2 Toksičnost pesticida | 39 |
| 4.2 TOKSIČNOST BINARNIH SMJESA FARMACEUTIKA | 41 |
| 4.2.1 Primjena CA modela na smjese farmaceutika i analiza međudjelovanja | 43 |
| 4.2.2 Primjena IA modela na smjesama farmaceutika | 47 |
| 4.3 TOKSIČNOST BINARNIH SMJESA PESTICIDA | 51 |
| 4.3.1 Primjena CA modela na smjese pesticida i analiza međudjelovanja | 52 |
| 4.3.2 Primjena IA modela na smjesama pesticida | 54 |
| 5. ZAKLJUČAK | 57 |
| 6. LITERATURA..... | 58 |

1. UVOD

Razvojem industrije i tehnologije došlo je do povećanja potrebe za vodom, što kao posljedicu ima i porast količine otpadne i onečišćene vode raznim vrstama onečišćivala, organskog i anorganskog podrijetla. Velika količina otpadnih voda ne pročišćava se prije ispuštanja u prirodne vodotoke, što dovodi do onečišćenja zaliha vode i smanjenja količina pitke vode¹. Danas se sve više istraživanja posvećuje pesticidima i farmaceuticima koji u vode dospijevaju izravno ili u obliku razgrađenih produkata odnosno metabolita. Svjesni tog problema, Europska komisija u skladu s Okvirnom direktivom o vodama sastavila je listu prioriternih tvari koje su izdvojene sa sumnjom da izazivaju rizik za vodeni okoliš ili putem vodenog okoliša. Lista je sastavljena na temelju toksičnosti, stabilnosti, sposobnosti bioakumulacije i opasnosti za zdravlje ljudi i životinja. Također, sastavljena je i lista za praćenje tvari u području vodene politike Europske Unije (tzv. *EU Watch list*) na kojoj se nalaze potencijalni kandidati za listu prioriternih tvari. Listu čine farmaceutici i pesticidi te druge tvari koje se pronalaze u otpadnim vodama diljem svijeta.^{2,3}

U današnje se vrijeme sve više aktivnih farmaceutskih sastojaka pronalazi u vodenom okolišu. Kako bi farmaceutik uspješno odradio svoju zadaću, važno je da aktivna supstanca dođe nepromijenjena do mjesta na koje mora djelovati. Glavni je problem farmaceutika u okolišu njihova stabilnost. Posljedica toga je da aktivne komponente nisu potpuno metabolizirane te se izlučuju putem urina u okoliš. S druge strane zbog njihove stabilnosti nemoguće ih je ukloniti pomoću konvencionalnih postrojenja za obradu otpadnih voda.

Uporaba pesticida omogućila je razvoj poljoprivrednih djelatnosti. Međutim uz brojne prednosti njihove uporabe dolaze i brojni nedostaci. Pesticidi su potencijalno štetni za ljudsko zdravlje i okoliš. Mnogi od njih su stabilni, postojani spojevi koji podliježu bioakumulaciji, a u okolišu se mogu zadržati desetljećima. Veliki problem stvara pronalazak pesticida u hrani čime se direktno ugrožava ljudsko zdravlje⁴.

Nadalje, nekontrolirano ispuštanje toksičnih tvari iz industrije može imati nesagledive posljedice na stanje okoliša. Uklanjanje tih nusprodukata je skupo, ali onečišćenje okoliša ugrožava i ljudsko zdravlje i proizvodnju. Stoga se danas bilježi porast u ispitivanju ekotoksičnosti otpadnih voda kako bi se utvrdila njihova eventualna štetnost. Ekotoksičnost može biti uzrokovana kemijskim, fizikalnim, biološkim parametrima ili njihovom kombinacijom. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda, kao što su testovi na bakterijama, algama, biljkama, beskralješnjacima i ribama⁵.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Zaštita okoliša

Čovjek svojim aktivnostima utječe na stanje okoliša: na čistoću zraka, vode i zemlje, na koncentraciju stakleničkih plinova koji utječu na klimatske promjene te na količinu otpada koji stvara. Svaki novi proizvod, ne bi mogao nastati bez energije i materijala, a kad ga jednom potrošimo ili prestanemo koristiti, on postaje otpad koji se mora odvajati, reciklirati, koristiti za proizvodnju električne i toplinske energije, a tek zatim, ako ništa od navedenog nije moguće, odložiti na siguran način⁶.

Europska je unija postala jedan od glavnih aktera politike zaštite okoliša na svjetskoj razini, uvodeći visoke standarde radi očuvanja prirodnih resursa i smanjivanja negativnih posljedica ljudskog djelovanja na okoliš, te vodeći brigu o postizanju ekonomskog rasta koji je održiv i poštuje okoliš, o čemu je postignut konsenzus svih članica. Pojedine države članice propisima određuju čak i strože standarde u odnosu na one na razini Europske unije, na što imaju pravo, vodeći računa o svojim nacionalnim interesima⁷.

Politika zaštite okoliša Europske Unije obuhvaća približno 300 različitih pravnih propisa i normi koje se odnose na niz područja – gospodarenje otpadom, onečišćenje zraka, zaštitu i upravljanje vodama, zaštitu prirode i biološke raznolikosti, zaštitu tla, onečišćenje bukom, kemikalije i klimatske promjene. Očuvanje okoliša moguće je postići ako se odgovarajuće mjere integriraju u druge sektorske politike (poljoprivreda, promet, energetika, industrija, gospodarstvo, ribarstvo). Stoga područje očuvanja okoliša analizira i pitanja održivog razvitka, odnosno postizanja ravnoteže između socijalnih, ekonomskih i okolišnih interesa. Upravo zbog broja i složenosti propisa, kao i velikih izazova u njihovoj provedbi, ova se politika smatra jednom od najzahtjevnijih za članice Europske Unije. Osnovni ciljevi i načela provedbe politike zaštite okoliša jesu doprinijeti⁸:

- Očuvanju, zaštiti i poboljšanju kvalitete okoliša
- Zaštiti ljudskog zdravlja
- Razboritom i racionalnom korištenju prirodnih resursa
- Promicanju mjera na međunarodnoj razini kojima se rješavaju regionalni ili svjetski problemi okoliša, a posebno u borbi protiv klimatskih promjena.

Provedba politike zaštite okoliša temelji se na načelu opreza i načelu preventivnog djelovanja, odnosno na načelima da se šteta nanosena okolišu popravlja prvenstveno na samom izvoru i da je plaća onečišćivač.

U Republici Hrvatskoj, zakon o Zaštiti okoliša stupio je na snagu 3. listopada 2007. godine (NN 110/07). U zakonu je zaštita okoliša definirana kao skup odgovarajućih aktivnosti i mjera kojima je cilj sprječavanje opasnosti za okoliš, sprječavanje nastanka šteta i/ili onečišćivanja okoliša, smanjivanje i/ili otklanjanje šteta nanesenih okolišu te povrat okoliša u stanje prije nastanka štete. Također, definirani su i ciljevi zaštite okoliša, a to su⁹:

- zaštita života i zdravlja ljudi,
- zaštita biljnog i životinjskog svijeta, biološke i krajobrazne raznolikosti te očuvanje ekološke stabilnosti,
- zaštita i poboljšanje kakvoće pojedinih sastavnica okoliša,
- zaštita ozonskog omotača i ublažavanje klimatskih promjena,
- zaštita i obnavljanje kulturnih i estetskih vrijednosti krajobraza,
- sprječavanje velikih nesreća koje uključuju opasne tvari,
- sprječavanje i smanjenje onečišćenja okoliša,
- trajna uporaba prirodnih izvora,
- racionalno korištenje energije i poticanje uporabe obnovljivih izvora energije,
- uklanjanje posljedica onečišćenja okoliša,
- poboljšanje narušene prirodne ravnoteže i ponovno uspostavljanje njezinih regeneracijskih sposobnosti,
- ostvarenje održive proizvodnje i potrošnje,
- napuštanje i nadomještanje uporabe opasnih i štetnih tvari,
- održivo korištenje prirodnih dobara, bez većeg oštećivanja i ugrožavanja okoliša,
- unapređenje stanja okoliša i osiguravanje zdravog okoliša.

Zakonom se također uređuju: zaštita sastavnica okoliša i zaštita okoliša od utjecaja opterećenja, subjekti zaštite okoliša, dokumenti održivog razvitka i zaštite okoliša, instrumenti zaštite okoliša, praćenje stanja u okolišu, informacijski sustav, osiguranje pristupa informacijama o okolišu, sudjelovanje javnosti u pitanjima okoliša, osiguranje prava na pristup pravosuđu, odgovornost za štetu, financiranje i instrumenti opće politike zaštite okoliša, upravni i inspekcijski nadzor⁹.

2.2 Onečišćivala

Prema Direktivi 2000/60/EC Europskog parlamenta i vijeća od 23. listopada 2000. onečišćenjem se definira „izravno ili neizravno unošenje, izazvano ljudskom aktivnošću, tvari ili topline u zrak, vodu ili tlo, što može biti štetno za ljudsko zdravlje ili kvalitetu vodenih ekosustava ili kopnenih ekosustava izravno ovisnih o vodnim ekosustavima, koje dovodi do štete po materijalnu imovinu, šteti vrijednostima okoliša ili drugim legitimnim oblicima korištenja okoliša ili na njih utječe¹⁰.

Nova onečišćivala se definiraju kao sintetske ili prirodne kemijske tvari koje se obično ne pojavljuju u okolišu, ali imaju mogućnost ulaska u okoliš čime mogu, poznato ili nepoznato, utjecati na ekologiju i/ili ljudsko zdravlje. Trenutno postoji više od 700 novih onečišćivala, njihovih metabolita i razgradnih produkata prisutnih u europskom vodenom okolišu¹¹. Nova onečišćivala su prema svom podrijetlu kategorizirana u 20 razreda, a istaknuti su farmaceutici (uključujući steroide i hormone, veterinarske lijekove, parabene, repelente i mirise), sredstva za osobnu njegu, pesticidi, surfaktanti, perfluorirani spojevi, industrijski aditivi, omekšivala, aditivi za goriva, usporivači gorenja, nanomaterijali i nusprodukti dezinfekcije bazena¹¹. Europski parlament je u kolovozu 2013. usvojio *Direktivu 2013/39/EU* o izmjenama i dopunama *Direktive 2000/60/EC* i *2008/105/EC* o prioritetnim tvarima u području vodene politike³. Uz *Direktivu 2009/90/EC*, koja utvrđuje tehničke specifikacije za kemijske analize i praćenje stanja vode, tako su određeni osnovni zahtjevi o kvaliteti okoliša i voda na području Europske Unije¹². Na listi *Direktive* iz 2013. nalazi se 45 prioritetnih tvari, a njih 21 označeno je kao prioritetno opasna tvar (Tablica 1.) Cilj direktive je uspostaviti okvire za zaštitu kvalitete voda Europskih zemalja, a odnosi se na rijeke, jezera, mora i podzemne vode. Direktiva govori o specifičnim mjerama koje se trebaju provoditi na Europskoj razini, s ciljem smanjenja onečišćenja voda individualnim onečišćivanima ili skupinom onečišćivala, koji predstavljaju rizik za okoliš i vodu koja se koristi za piće. Cilj takvih mjera je progresivno smanjivanje razine onečišćenja za prioritetna onečišćivala, koja mogu naštetiti ljudskom zdravlju i ekosustavu, a što bi se postiglo smanjivanjem emisije prirodnih onečišćivala na prirodnu razinu te količine sintetskih onečišćivala blizu nule.³

Tablica 1. Popis prioritetnih tvari iz područja vodne politike Europske Unije³

| Broj | CAS broj | Naziv prioritetne tvari | Utvrđena kao prioritetno opasna tvar |
|------|-------------------|---|--------------------------------------|
| 1 | 15972-60-8 | alaklor | |
| 2 | 120-12-7 | antracen | DA |
| 3 | 1912-24-9 | atrazin | |
| 4 | 71-43-2 | benzen | |
| 5 | ne primjenjuje se | bromirani difenil-eteri | DA |
| 6 | 7440-43-9 | kadmij i njegovi spojevi | |
| 7 | 85535-84-8 | kloroalkani, C ₁₀ -C ₁₃ | DA |
| 8 | 470-90-6 | klorfenvinfos | |
| 9 | 2921-88-2 | klorpirifos | |
| 10 | 107-06-2 | 1,2-dikloroetan | |
| 11 | 75-09-2 | diklorometan | |
| 12 | 117-81-7 | di(2-etilheksil)ftalat | DA |
| 13 | 330-54-1 | diuron | |
| 14 | 115-29-7 | endosulfan | DA |
| 15 | 206-44-0 | fluoroanten | |
| 16 | 118-74-1 | heksaklorobenzen | DA |
| 17 | 87-68-3 | heksaklorobutadien | DA |
| 18 | 608-73-1 | heksaklorocikloheksan | DA |
| 19 | 34123-59-6 | izoproturon | |
| 20 | 7439-92-1 | olovo i njegovi spojevi | |
| 21 | 7439-97-6 | živa i njezini spojevi | DA |
| 22 | 91-20-3 | naftalen | |
| 23 | 7440-02-0 | nikal i njegovi spojevi | |
| 24 | ne primjenjuje se | nonilfenoli | DA |
| 25 | ne primjenjuje se | oktilfenoli | |
| 26 | 608-93-5 | pentaklorobenzen | DA |
| 27 | 87-86-5 | pentaklorofenol | |
| 28 | ne primjenjuje se | poliaromatski ugljikovodici | DA |
| 29 | 122-34-9 | simazin | |
| 30 | ne primjenjuje se | tributilkositreni spojevi | DA |
| 31 | 12002-48-1 | triklorobenzeni | |
| 32 | 67-66-3 | triklorometan | |
| 33 | 1582-09-8 | trifluralin | DA |
| 34 | 115-32-2 | dikofol | DA |
| 35 | 1763-23-1 | perfluorooktan sulfonička kiselina i njezini derivati | DA |
| 36 | 124495-18-7 | kinoksifen | DA |
| 37 | ne primjenjuje se | dioksini i spojevi poput dioksina | DA |
| 38 | 74070-46-5 | aklonifen | |
| 39 | 42576-02-3 | bifenoks | |
| 40 | 28159-98-0 | cibutrin | |
| 41 | 52315-07-8 | cipermetrin | |
| 42 | 62-73-7 | diklorvos | |
| 43 | ne primjenjuje se | heksabromociklododekan | DA |
| 44 | 76-44-8/1024-573 | heptaklor i heptaklor epoksid | DA |
| 45 | 886-50-0 | terbutrin | |

2.2.1 Farmaceutici

Lijekovi ili farmaceutici su tvari ili smjese različitih tvari koje u određenim količinama i pri određenim uvjetima služe za sprječavanje, ublažavanje, liječenje ili dijagnosticiranje bolesti u ljudskom i životinjskom organizmu¹³. Na tržište dolaze u obliku tableta ili tekućina pri čemu je bitno je napomenuti da se takav gotov proizvod sastoji od jedne ili više farmaceutski aktivnih tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API), pomoćnih sredstava i aditiva kao što su anorganske soli ili druge organske kemikalije poput šećera, mirisa, pigmenta i boja¹⁴. Prema podacima Europske unije, za primjenu u ljudskoj medicini koristi se preko 4000 farmaceutskih aktivnih spojeva koji na različite načine mogu dospjeti u okoliš. U novije vrijeme stvaraju se farmaceutici u obliku malih organskih spojeva koji su umjereno topljivi u vodi i liofilni, kako bi bili bioraspoloživi i biološki aktivni. Oni su također formirani na način da u malim koncentracijama postignu potrebne farmakološke i fiziološke učinke^{15,16}.

2.2.1.1 Farmaceutici u vodama

Zbog sve veće primjene u svakodnevnom životu, farmaceutici se kontinuirano unose u okoliš pa tako predstavljaju sve veću opasnost za prirodu i organizme u njoj¹⁷. Znatna količina upotrijebljenog farmaceutika može biti izlučena u nepromijenjenom obliku, tako da se od 30 do 90% upotrijebljene količine nerazgrađeno izluči putem urina ili izmeta, čovjeka ili životinje. Osim konzumiranih farmaceutika, česti je slučaj da se lijekovi kojima je istekao rok trajanja bacaju u otpad što se smatra najgorim oblikom onečišćenja¹⁸. Nadalje, prirodna gnojiva u sebi sadrže farmaceutike koje izlučuju životinje tretirane lijekovima, stoga postoji opasnost od onečišćenja prilikom rasipanja takvog gnojiva po zemlji. Kao posljedica toga, pronađeni su antibiotici u biljkama poput kukuruza, pšenice i krumpira uzgojenih na zemlji koja se gnojila stajskim gnojivom¹⁹.

Stoga, mogu se izdvojiti tri glavna načina na koji farmaceutici mogu dospjeti u okoliš, a samim time i vodu²⁰:

- neprimjereno odlaganje neželjenih ili starih lijekova,
- izlučivanje farmaceutika ili nekog njegovog metabolita putem urina i izmeta ili ispiranjem lijekova koji su se nanosili na kožu,

- otpadne vode iz proizvodnje farmaceutika i otpadne vode iz bolnica i kućanstava.

Farmaceutici koji završe u otpadnim vodama bilo putem izlučevina ili neodgovornog bacanja lijekova vrlo su teško uklonjivi standardnim postupcima za obradu otpadnih voda. Mogućnost uklanjanja farmaceutika uvelike ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima same tvari, njenoj stabilnosti i tipu otpadne vode u kojoj se nalazi²¹. Zapravo, vrlo se malo farmaceutika uklanja konvencionalnim postupcima obrade otpadnih voda te oni na kraju dopijevaju u površinske i podzemne vode te vodu za piće²². Koncentracije pojedinačnih farmaceutskih spojeva u ispuštima postrojenja za obradu otpadnih voda su uobičajeno niže od 1 µg/L, iako su više koncentracije u iznosu od nekoliko mg/L izmjerene u ispuštima postrojenja za obradu otpadnih voda farmaceutske industrije²³. Nakon što farmaceutici dopiju u vodeni okoliš, nekoliko procesa određuje njihovu sudbinu, a to su: razgradnja, transformacija, adsorpcija i protok prema podzemnim vodama. Svi ovi procesi ovise o fizikalno – kemijskim svojstvima farmaceutika kao što su: naboj molekule odnosno konstanta ionizacije, koeficijent raspodjele oktanol/voda te koeficijent sorpcije²⁴. Navedena fizikalno-kemijska svojstva određuju sorpciju farmaceutika na tlo i sediment kao i njihovu sklonost abiotičkim ili biotičkim procesima razgradnje. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu i fotolizu, dok biološka razgradnja podrazumijeva razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama¹³. S obzirom na količinu konzumacije, toksičnosti te prisutnosti u okolišu, antibiotici, hormoni i steroidi, beta blokatori, analgetici, regulatori masnoća, kemoterapeutici, antiepileptici i antidepresivi, jesu skupine farmaceutika koje se danas najviše proučavaju²⁵.

2.2.1.2 Utjecaj farmaceutika na okoliš

S obzirom na činjenicu da su farmaceutici biološki aktivni spojevi, koji su razvijeni s ciljem izazivanja bioloških učinaka pri vrlo niskim dozama, dovoljni su i tragovi farmaceutskih preparata kako bi uzrokovali djelovanje na ljude i vodene organizme. Problemi vezani uz prisutnost lijekova u okolišu uključuju poremećaje fizioloških procesa i reproduktivne funkcije organizma, razvoj rezistentnih bakterija te povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih supstanci²⁶.

Pojava je farmaceutika u vodama u okolišu prvi put zabilježena u Velikoj Britaniji još 1984. godine. Tek od 1990. veća pažnja počinje se pridavati novim spojevima koji se ne određuju u redovnim programima praćenja. Glavni uzrok tome je pojava estrogena u otpadnim vodama što je rezultiralo feminizacijom riba. Osim estrogenih spojeva, u vodi su bili prisutni i ostali farmaceutici poput karbamazepina koji naglo smanjuje populaciju vodenih kukaca, fluoksetina koji nepovoljno utječe na mriještenje školjaka, diklofenaka itd²⁷. Svaka skupina lijekova koja nakon konzumacije završava u otpadnim vodama izaziva specifičan spektar poremećaja u prirodi. Tako je dokazano da mnogi antibiotici, poput tetraciklina i sulfonamida, narušavaju biološku ravnotežu vodenih ekosustava, antidepresivi usporavaju razvoj vodenih organizama ili izazivaju malformacije kod nekih riba, beta-blokatori, poput propranolola, mogu inhibirati fotosintezu kod algi i drugog vodenog bilja, dok protuupalni lijekovi mogu uzrokovati poremećeni rast i razvoj brojnih vodenih organizama²⁸.

Najpoznatiji primjer neželjenih i nepredvidljivih posljedica izazvanih prisutnošću lijekova u okolišu slučaj je protuupalnog lijeka diklofenaka. Neprikladna, pretjerana i nepotrebna uporaba diklofenaka izazvala je početkom ovog tisućljeća ekološku katastrofu na indijskom potkontinentu. Analgetik, poznatiji pod nazivom Voltaren masovno se rabio u veterinarske svrhe za tretiranje bolova, upala ili groznica kod stoke. Nakon ugibanja velik dio “medikaliziranih” lešina postao je redovita hrana pticama strvinarima, posebice indijskim i bengalskim supovima, koji su na ekološki efikasan način rješavali problem uginule stoke. Na taj je način Voltaren ušao u hranidbeni lanac i uzrokovao tragične posljedice²⁹. Nadalje, psihofarmaci mogu izazvati poremećaje kod vodenih organizama. Među antidepresivima posebno se ističe Prozac (djelatna tvar fluoksetin) koji je lociran u vodama cijelog razvijenog svijeta. U SAD-u se izdaje preko 250 milijuna recepata svake godine. Stoga je očekivano da su otpadne, podzemne i pitke vode onečišćene tragovima tog psihofarmaka. Iako niske (nekoliko ppb), te su koncentracije dovoljne da izazovu mjerljive poremećaje u okolišu. Najnoviji rezultati znanstvenih istraživanja pokazuju da vrlo niske koncentracije Prozaca i drugih antidepresiva (Tegretol, Effexor) utječu na funkcije mozga kod riba³⁰.

Osim izravnih učinaka “na terenu”, lijekovi se u okolišu često nakupljaju u onim biljkama i životinjama koje završavaju kao hrana na policama trgovina. Nađeno je da su mnogi morski specijaliteti, poput škampa, jegulja ili lososa, onečišćeni zabranjenim antibioticima, uglavnom nitrofuranim i kloramfenikolom. Tako je, na primjer, 30 posto uzoraka škampa iz kanadskih trgovina onečišćeno veterinarskim lijekovima. Više od polovice riba i morskih organizama u ribarnicama danas ne potječe iz ribarske mreže, već iz umjetnog

uzgoja. Takvu akvakulturu prati povećana učestalost bolesti ribljeg fonda, te potreba za brojnim veterinarskim intervencijama. Različitim cjepivima i lijekovima natapaju se morske farme, a ostatci tih kemikalija zaostaju u morskim organizmima i u okolišu³¹. Drugi je primjer nakupljanje lijekova u korjenastom povrću. Znanstvenici su uočili da korjenasto povrće ima poseban afinitet za apsorpciju antiepileptika karbamazepina (Tegretol) i lamotrigina (Lamictal), te alkaloidnog stimulansa kofeina. Svi ti lijekovi redovito se nalaze u otpadnim vodama i u tlu. U 100 grama mrkve može se nakupiti nekoliko stotina nanograma karbamazepina i njegovih metabolita. Otkriveno je da je nagomilavanje lijekova to veće što je tlo pjeskovitije³².

Prisutnost tragova lijekova u vodi, posebice antibiotika, izaziva niz ekoloških i medicinskih problema. Mnogo su puta željeni utjecaji na ciljane vrste štetni na one koje nisu ciljane. Ukoliko su bakterije kontinuirano izložene malim koncentracijama antibiotika, dolazi do pojave rezistentnosti, čime se izravno ugrožava zdravlje ljudi i životinja budući da se sve veći broj infekcija ne može liječiti postojećim antibioticima. Smatra se da je najviše rezistentnosti stvoreno prema penicilinu, posebice ampicilinu te tetraciklinima i makrolidima kao što je eritromicin³³.

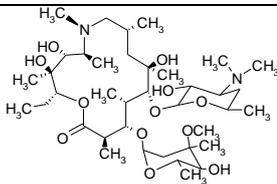
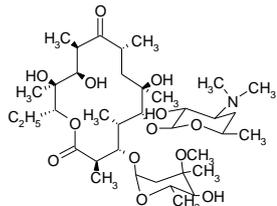
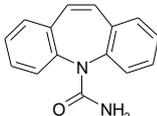
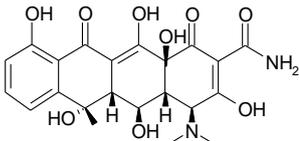
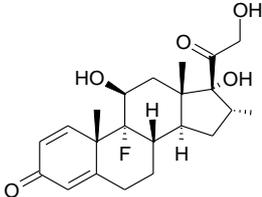
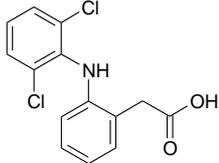
Poseban problem lijekova u okolišu predstavljaju reakcije pregrađivanja ili transformacija, čime se mijenja biološka i ekotoksikološka aktivnost lijekova. Mnogi se lijekovi takvim kemijskim promjenama u okolišu pretvaraju u nove, biološki aktivnije ili ekotoksičnije produkte. Također, problem koji može uzrokovati prisutnost antibiotika u vodi jesu kemijske reakcije antibiotika sa sredstvima za obradu voda, najčešće s klorom koji se dodaje otpadnoj ili pitkoj vodi kako bi se uklonile štetne tvari. Zbog reakcija s klorom, antibiotici se u vodi pregrađuju u spojeve koji mogu biti čak toksičniji od početnog farmaceutskog spoja³⁴.

2.2.1.3 Ispitivani farmaceutici

Za potrebe istraživanja odabrano je šest farmaceutika, a to su: azitromicin (AZM), eritromicin (ERM), karbamazepin (CBA), oksitetraciklin (OXY), deksametazon (DXM) i diklofenak (DCF) (prikazani u tablici 2). Azitromicin i eritromicin su makrolidni antibiotici koji se nalaze na listi za praćenje tvari u području vodene politike Europske Unije (*EU Watch list*). Karbamazepin je antiepileptik koji je bio kandidat za listu, ali nikad nije uključen na nju

zbog nedovoljno podataka. Oksitetraciklin kao antibiotik i deksametazon kao kortikosteroid su potencijalni kandidati za listu zbog svojih svojstava i sve veće upotrebe. Diklofenak je protuupalni lijek koji je bio na listi do 2018. godine kada je zbog dovoljno podataka uklonjen s nje.

Tablica 2. Ispitivani farmaceutici

| Farmaceutik | Formula | Struktura | Molarna masa / g mol ⁻¹ | Topljivost u vodi / mg L ⁻¹ pri 25 °C |
|-------------------------------|---|--|---------------------------------------|--|
| Azitromicin ³⁵ | C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂ |  | 748,9 | 2,37 |
| Eritromicin ³⁶ | C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ |  | 733,9 | 4,2 |
| Karbamazepin ³⁷ | C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O |  | 236,2 | 18 |
| Oksitetraciklin ³⁸ | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ |  | 460,4 | 313 |
| Deksametazon ³⁹ | C ₂₂ H ₂₉ FO ₅ |  | 392,4 | 89 |
| Diklofenak ⁴⁰ | C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ |  | 296,1 | 2,37 |

Azitromicin

Azitromicin je antibiotik široka spektra djelovanja, prvi predstavnik nove podskupine makrolidnih antibiotika nazvane azalidi, a djeluje tako da sprječava sintezu bakterijskih proteina i sposobnost bakterije da raste i da se razmnožava. Znatan učinak može imati i na ekspresiju faktora virulencije *P. aeruginosa* te na stvaranje biofilma, koji otežava eradikaciju ovog patogena u brojnim, osobito bolničkim infekcijama. Azitromicin se rabi za liječenje niza različitih infekcija kao što su: infekcije dišnih putova, infekcije kože, spolno prenosive bolesti te infekcije želuca⁴¹.

Koncentracija azitromicina koja je pronađena u površinskim vodama je oko 3 ng/L, dok se u otpadnim vodama njegova koncentracija penje do 69 ng/L. U podzemnim vodama pronađene su koncentracije azitromicina i do 257 ng/L. Ako aktivna komponenta koja se nalazi u antibiotiku nije u potpunosti metabolizirana u ljudskom ili životinjskom organizmu, dolazi do pojave tih tvari u okolišu, posebice u otpadnim vodama⁴².

Eritromicin

Eritromicin pripada makrolidnim antibioticima, podskupini inhibitora sinteze proteina. To je antibiotik širokog spektra djelovanja, a koristi se za liječenje bolesti izazvanih gram - pozitivnim i gram - negativnim bakterijama. Eritromicin se koristi za liječenje infekcija dišnih putova, kože i želuca. Štoviše, koristi se kao alternativa penicilinu za pacijente koji pokazuju alergiju na penicilin. Eritromicin se proizvodi aerobnim fermentacijskim postupkom iz *S. erythreus*. Tijekom procesa fermentacije stvara se eritromicin A (EA), koji ima najviše antimikrobnog učinka, zajedno s ostalim nusproduktima kao što su eritromicin B i C. Postoji strukturna sličnost s manjom razlikom između funkcionalne skupine (EA) i ostalih proizvoda. S druge strane, neki drugi makrolidni antibiotici, poput azitromicina i klaritromicina, nastaju iz eritromicina kao intermedijara⁴³.

Najviše pronađene koncentracije eritromicina iznose između 200 i 600 ng/L, a pronađene su u otpadnim vodama, dok se u površinskim vodama pronalaze koncentracije od 10 pa sve do 1700 ng/L. U podzemnim vodama koncentracije eritromicina nisu prelazile preko 50 ng/L⁴².

Karbamazepin

Karbamazepin pripada skupini antiepileptika, a jedan je od glavnih lijekova koji se koristi za liječenje epilepsije i neuropatske boli. Također, koristi se i za liječenje šizofrenije i bipolarnih poremećaja. Osnovni mu je mehanizam djelovanja blokada natrijskih kanala, a metabolizira se u jetri⁴⁴. Istraživanja pokazuju da je do danas konzumirano više od 1,000 tona karbamazepina. Oko 3% ukupne količine upotrijebljenog karbamazepina se izluči u nepromijenjenom obliku. Rasprostranjenost karbamazepina u okolišu može utjecati na embrionalne matične stanice na način da prekine njihovo razmnožavanje ili uzrokuje defekte. U nekim slučajevima vrlo niske koncentracije karbamazepina imaju jako toksični utjecaj na probavni sustav, reproduktivni sustav i centralni živčani sustav. Dugotrajno izlaganje karbamazepinu uzrokuje promjene na krvnim stanicama i lipidima, smanjuje broj bijelih krvnih zrnaca. Također, karbamazepin može inducirati oksidativni stres čime dolazi do staničnih oštećenja. Stoga štetni učinci karbamazepina mogu ugroziti život ljudi i drugih živih organizama⁴⁵.

Oksitetraciklin

Oksitetraciklin je antibiotik širokog spektra djelovanja, a spada u skupinu tetraciklina. Koristi se za liječenje infekcija izazvanih gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijama u ljudima i životinjama. Osim za liječenje infekcija, koristi se i za poticanje rasta kod svinja, goveda, peradi i riba⁴⁶. Zbog njegove široke upotrebe i nepotpune konverzije u organizmu došlo je do čestog pojavljivanja oksitetraciklina u površinskom vodama, otpadnim vodama, podzemnom vodama, pitkoj i morskoj vodi te u sedimentima diljem svijeta. Oko 0,34 µg/L oksitetraciklina je detektirano u površinskim vodama u SAD-u, dok su koncentracije i do 800 mg/L detektirane u otpadnim vodama pročištača voda u jednom od najvećih proizvođača oksitetraciklina u Kini. Pojava oksitetraciklina u prirodi može uzrokovati selekciju mikroorganizama što bi rezultiralo nastajanjem rezistentnih bakterija i patogena. Posljedica toga bi bio potencijalni rizik za zdravlje ljudi i životinja⁴⁷.

Deksametazon

Deksametazon je sintetski hormon kore nadbubrežne žlijezde (kortikosteroid) s glukokortikoidnim djelovanjem i blagim mineralokortikoidnim djelovanjem. Djeluje protuupalno i imunosupresivno, a djeluje i na energetski metabolizam i homeostazu glukoze te sprječava alergijske reakcije. Osigurava važne životne funkcije i opću fizičku dobrobit time što održava razinu šećera u krvi, krvni tlak i mišićnu snagu. Sudjeluje u nadzoru ravnoteže minerala i vode, te rasta. Razgrađuje se na mjestu djelovanja, u stanicama. Metabolizira se uglavnom u jetri, zatim u bubrezima i drugim tkivima. Izlučuje se uglavnom urinom⁴⁸.

Najveća upotreba deksametazona je zabilježena u Kini gdje su u rijekama u naseljenim mjestima pronađene koncentracije od 52 do 390 ng/L. U otpadnim vodama provedena su mjerenja te su pronađene koncentracije koje iznose i do 1050 ng/L. Dugotrajno izlaganje deksametazonu može utjecati na sintezu i tok glukoze te na spolnu diferencijaciju. Dugotrajno izlaganje deksametazona uvjetima u prirodi dovodi do njegove razgradnje te stvaranja još toksičnijih spojeva. Visoka uporaba deksametazona i kontinuirano odlaganje velike količine u okoliš dovelo je do njegove akumulacije u prirodi⁴⁹.

Diklofenak

Diklofenak je nesteroidni protuupalni lijek koji se koristi za ublažavanje upalnih procesa i uklanjanje boli, a kod oboljenja poput artritisa i akutnih ozljeda ima analgetsko djelovanje. Može se koristiti i za ublažavanje menstrualnih tegoba. Poslije oralne primjene se brzo uklanja iz organizma, a približno 65 % doze se izlučuje putem urina u okoliš⁵⁰.

Prosječna koncentracija diklofenaka od 4,7 µg/L se izmjeri na izlazu obrađivača otpadnih voda dok se u prosjeku 1,27 µg/L izmjeri u površinskim vodama, a u vodi za piće čak od 10 do 380 ng/L. Uz sve to, stvaranje štetnih dezinfekcijskih nusprodukata u postrojenjima za dobivanje pitke vode kao posljedica reakcije diklofenaka sa dezinfekcijskim sredstvima može biti ozbiljna prijetnja ljudskom zdravlju⁵¹.

2.2.2 Pesticidi

Pesticidi su proizvodi kemijskog ili biološkog podrijetla koji se koriste za zaštitu ekonomski značajnih biljaka i životinja od korova, bolesti, štetnih insekata, grinja i drugih štetnih organizama da bi se izbjeglo smanjenje prinosa i kvalitete proizvedene hrane. Također, pesticidi se koriste u javnom zdravstvu kako bi ubijali prijenosnike bolesti, poput komaraca, i u poljoprivredi, da uništavaju štetnike koji oštećuju usjeve. Prema djelovanju, pesticidi se dijele na⁵²:

- insekticide – za suzbijanje štetnih insekata
- fungicide – za suzbijanje gljiva
- herbicide – za suzbijanje korova
- limacide – za suzbijanje puževa
- nematocide – za suzbijanje štetnih nematoda
- rodenticidi – za suzbijanje štetnih glodavaca
- akaricidi – za suzbijanje grinja
- avicidi – za suzbijanje ptica
- baktericide – za suzbijanje bakterija
- algicide – za suzbijanje algi

Nadalje, pesticide možemo podijeliti i prema njihovom kemijskom sastavu⁵³, pa tako imamo:

- organofosfate
- karbamate
- organoklorine
- piretrine i piretroide
- benzoidne kiseline
- triazine
- derivate fenoksiacetata
- derivate dipiridina
- derivate glicina
- ditiokarbamate

Prilikom primjene u poljoprivredi, pesticidi završavaju u podzemnim i površinskim vodama. Kao posljedica iznimne stabilnosti pesticida u okolišu, oni se u njemu mogu akumulirati godinama pa i desetljećima. Onečišćenje voda pesticidima predstavlja jedan od najvećih problema današnjice, te predstavlja veliku opasnost za ljude i životinje⁵³. Pesticidi sličnih kemijskih struktura imaju slična toksična, fizikalna i kemijska svojstva te se na sličan način ponašaju u prirodi. Neki od pesticida koji se nalaze na listi *Direktive 2013/39/EU* jesu: alaklor, atrazin, klorfenvinfos, diuron, izoproturon, simazin, ciburtrin i drugi. *Direktivom 98/83* Europske komisije propisuje se maksimalna dozvoljena koncentracija pojedinog pesticida u vodenim uzorcima na 0,1 µg/L, a ukupna koncentracija svih pesticida na 0,5 µg/L⁵⁴.

2.2.2.1 Pesticidi u vodama

U zadnjih nekoliko godina posebna se pažnja posvećuje onečišćenju vode, posebno onečišćenju površinskih i podzemnih voda pesticidima i drugim kemijskim onečišćenjima. Pesticidi dospijevaju u okoliš uglavnom prilikom njihove pripreme za nanošenje te prilikom samog nanošenja. U okoliš mogu dospjeti na razne načine: ovisno o primjeni, agregatnom stanju i vremenu djelovanja. Uglavnom je riječ o špricanju većih površina ili lokaliziranom odlaganju krutih pesticida. Nakon nanošenja pesticide mogu konzumirati ciljani organizmi, mogu se razgraditi, transportirati u podzemne vode, otapati u površinskim vodama, hlapiti u zrak ili završiti u organizmima koji nisu bili objekt postupka tretiranja⁵⁵. Glavni putovi dospijeca pesticida u vode su difuzni i točkasti izvori. U difuzne izvore (poljoprivredne površine) kontaminacije voda pripadaju: hlapljenje, ispiranje (npr. erozija), ispiranje kroz profil tla, ispiranje kroz drenažne cijevi i zanošenje (drift). Kontaminacija iz točkastih izvora uglavnom se odnosi na mjesta punjenja i pranja strojeva za aplikaciju te ambalaži i ostacima pesticida⁵⁶. Ipak, difuzni izvori imaju znatno veći utjecaj na kakvoću voda.

U Republici Hrvatskoj, sukladno *Direktivi 91/676/EEZ* (DIREKTIVA VIJEĆA od 12. prosinca 1991. o zaštiti voda od onečišćenja koje uzrokuju nitrati poljoprivrednog podrijetla), i Pravilniku o uvjetima za utvrđivanje zona sanitarne zaštite izvorišta (NN 66/11, 47/13), definirane su četiri vodozaštitne zone. U prvoj vodozaštitnoj zoni (Zona strogog režima zaštite i nadzora) potpuno se zabranjuje primjena bilo kojeg sredstva za zaštitu bilja. U drugoj zaštitnoj zoni (Zona strogog ograničenja i nadzora) dopušta se primjena manje opasnih pripravaka. Zabranjuje se primjena bilo kojeg herbicida na određenim prostornim izolacijama

uz vodotoke, jezera, prirodne ili umjetne akumulacije, te na i u kanalima povremeno ili djelomično plavljenim vodom⁵⁷.

Zbog utjecaja na zdravlje ljudi i utjecaja na okoliš zakoni i propisi ograničavaju uporabu pesticida u mnogim zemljama, posebno u razvijenim zemljama gdje je zakon o kvaliteti vode dobro definiran. Zakonodavstvo Europske Unije koje definira najveću dopuštenu koncentraciju pesticida u pitkoj vodi najstrože je na svijetu. Unatoč strogim zakonima, mnogi su pesticidi otkriveni u europskim rijekama čime se dovodi u pitanje adekvatnost zakonodavstva⁵⁸. Tako su u Velikoj Britaniji rijeke uglavnom kontaminirane pesticidima u količinama većim od 0,1 µg/L. U podzemnim vodama najčešće su prisutni diuron, izoproturon, atrazin, simazin, mekoprop, MCPA, klortoluron i glifosat. Oko 30 % površinskih voda Francuske loše je ili vrlo loše kakvoće. Više od 20 % Francuza pije vode koje sadrže pesticide u količinama koje su iznad europskim propisima dopuštenih normi. U Sjedinjenim Američkim Državama detektirano je 16 pesticida u 39 važnih rijeka koje premašuju dozvoljene koncentracije. Zemlje u razvoju veliki su potrošači pesticida i predstavljaju veliki problem onečišćenja okoliša. Tako su Brazil i Kina trenutno vodeći potrošači pesticida u svijetu. Na ušću rijeke Yangtze u Kini pronađene su koncentracije pesticida 9 puta veće od dozvoljenih koncentracija propisanih zakonima Europske Unije⁵⁹.

2.2.2.2 Utjecaj pesticida na okoliš

Tijekom primjene sredstava za zaštitu bilja na otvorenim prostorima organizmi koji nisu ciljani mogu biti izloženi sredstvu uslijed unosa kontaminirane hrane, vode ili zbog izravne izloženosti prilikom primjene. Tako se ptice i sisavci izlažu sredstvu za zaštitu bilja prilikom konzumacije kukaca, riba, gujavica i biljnih dijelova koji sadrže ostatke tih sredstava, dok najveći problem predstavljaju sredstva u obliku granula, peleta i mamaca te tretirano sjeme. Vodeni organizmi su isto tako vrlo izloženi sredstvima za zaštitu bilja. Najčešći način unošenja pesticida u vodotoke je zanošenje što se može smanjiti primjenom pravilnih sapnica. Isto tako pesticidi u vodotoke mogu doći prilikom velikih kiša ili infiltracijom. Veliki problem predstavlja utjecaj pesticida, posebno sredstva za zaštitu bilja, na pčele i ostale oprašivače. Kad se sredstvo za zaštitu bilja primjenjuje, ono predstavlja opasnost za pčele i „neciljane“ člankonošce te je potrebno primijeniti mjere za smanjenje rizika. Zbog toga je zabranjena primjena sredstava za zaštitu bilja za vrijeme aktivnosti pčela i

ostalih oprašivača posebno ako je kultura na koju se primjenjuje u cvatnji. Ako su sredstva za zaštitu bilja koja se primjenjuju jako kontaktno toksična propisuju se mjere zatvaranja košnica na određeno razdoblje ovisno o trajanju toksičnosti sredstva za zaštitu bilja. Organizmi u tlu mogu biti izloženi ostacima sredstava i njegovim metabolitima koji dopiru na tlo prilikom primjene⁶⁰. Kada pesticidi dopiru do organizama kojima nisu namijenjeni, dolazi do njihove biotransformacije putem reakcija poput hidrolize, oksidacije i redukcije. Biotransformacija je pokušaj organizma da razgradi i uništi ksenobiotike, ali produkti tih procesa ponekad mogu biti toksičniji od samog spoja. Ta pojava naziva se bioaktivacijom. Istraživanja su dokazala da dugotrajno izlaganje pesticidima povećava rizik od mnogih bolesti poput astme, gubitka pamćenja i depresije, a najpogubniji je karcinom⁶¹.

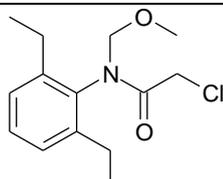
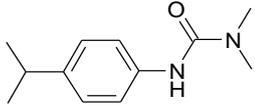
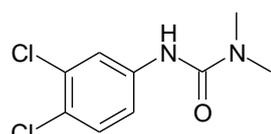
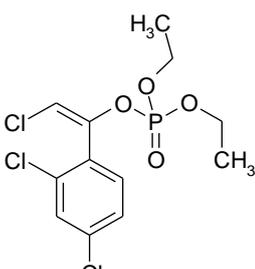
S obzirom na položaj tla između litosfere i atmosfere, tlo je prijemnik niza različitih tvari koje u njega dopijevaju iz atmosfere ili ih čovjek nekontrolirano unosi pri uporabi tla u izgradnji i korištenju infrastrukture ili korištenjem tla u poljoprivredne svrhe. Ponašanje pesticida u tlu najviše ovisi o tipu tla, svojstvu pesticida, mikrobiološkoj aktivnosti tla i klimatskim uvjetima. Onog trenutka kada aktivna tvar dopiše u dodir s komponentama tla, slijedi čitav niz različitih fizikalno-kemijskih i bioloških procesa koji izravno utječu na njegovu učinkovitost i ponašanje u okolišu. Svaki pesticid u tlu podliježe procesima koji utječu na njegovo zaostajanje u tlu (adsorpcija, ispiranje, isparavanje, apsorpcija koju uzrokuju živi organizmi i biljke) i procesima koji utječu na njegovu razgradnju (fotokemijski, kemijski i mikrobiološki procesi). Da bi se smanjio rizik a onečišćenje svelo unutar propisanih granica, potrebno je detaljno poznavati dinamiku pesticida u tlu. Procesu kao što u adsorpcija, desorpcija, difuzija i degradacija utječu na stabilnost pesticida, a samim time i na njegovo ispiranje iz tla. Isto tako nisu svi pesticidi jednaki onečišćivači voda. Tako se isto sredstvo potpuno drugačije ponaša u različitim tipovima tala. Neka područja (npr. krška polja) zbog nedovoljnog sadržaja glinenih minerala, organskih koloida (humusa), kao i zbog propusnog matičnog supstrata, spadaju u skupinu visoko rizičnih zona, te u tom slučaju primjenu pojedinih ispiranju sklonih herbicida, treba potpuno isključiti. Svaki od navedenih procesa izravno utječe na perzistentnost pojedinog pesticida i na razdoblje kroz koje ostaje u tlu u aktivnom obliku te kao takvo predstavlja moguću opasnost za okoliš. Važno je istaknuti da manje perzistentna tvar predstavlja manju opasnost za okoliš. Uz postojanost, važnu ulogu ima i stupanj adsorpcije pesticida na čestice tla. Što je pesticid skloniji adsorpciji, to je manje podložan ispiranju u podzemne vode⁶⁰. Istraživanjima štetnih utjecaja na tlo, za razliku od vode i zraka, pristupa se mnogo kasnije, odnosno tek kada su se u većoj mjeri počeli

pojavljivati problemi vezani uz oštećenje i onečišćenje produktivnih tala kao posljedica ljudske aktivnosti. Posljedice prisutnosti ostataka pesticida su te da hrana postaje neupotrebljiva zbog mutagenih, kancerogenih ili teratogenih učinaka, a ugroženi su i drugi ekosustavi⁶².

2.2.2.3 Ispitivani pesticidi

Za potrebe istraživanja odabrana su četiri pesticida: alaklor (ALC), izoproturon (IPT), diuron (DIU) i klorfenvinfos (CFP) (prikazani u tablici 3). Alaklor, izoproturon i diuron spadaju u skupinu herbicida, dok je klorfenvinfos insekticid. Sva četiri pesticida nalaze se na listi prioriternih tvari *Direktive 2013/39/EU*.

Tablica 3. Ispitivani pesticidi

| Pesticid | Formula | Struktura | Molarna masa / g mol ⁻¹ | Topljivost u vodi / mg L ⁻¹ pri 25°C |
|-----------------------------|--|---|---------------------------------------|---|
| Alaklor ⁶³ | C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂ |  | 269,7 | 242 |
| Izoproturon ⁶⁴ | C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O |  | 201,6 | 5 |
| Diuron ⁶⁵ | C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O |  | 233,09 | 42 |
| Klorfenvinfos ⁶⁶ | C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P |  | 359,5 | 145 |

Alaklor

Alaklor je registriran 1969. kao herbicid i jedan je od najčešće korištenih herbicida diljem svijeta koji se primjenjuje prije izbijanja mnogih širokolisnih korova u usjevima, najčešće kukuruzu i soji. Komercijalno je dostupan u obliku emulzije, granula, peleta i otopine. Alaklor ima vrijeme poluraspada u tlu 7-38 dana, a može vrlo jednostavno iz zemlje dospjeti do podzemnih voda, pa i u vodu za piće, stoga se alaklor vrlo učestalo detektira u površinskim vodama. Nalazi se na listi prioriternih onečišćivala u Okvirnoj direktivi o vodama. Također, problem predstavljaju razgradni produkti alaklora koji pokazuju toksična svojstva⁶⁷. Alaklor je klasificiran kao kancerogen, a poznat je i kao visoko toksična tvar koja djeluje na endokrine žlijezde. Osim toga, može uzrokovati oštećenje jetra, a pripisuju mu se mutagenost i teratogenost. Kratkotrajno izlaganje alakloru izaziva iritaciju očiju i kože⁶⁸.

Izoproturon

Izoproturon je herbicid koji se koristi za kontrolu rasta sezonskih trava i širokolisnih korova na žitaricama. Njegovo je vrijeme poluraspada oko 15 dana u tropskim klimama i oko 40 dana u umjerenim klimama. Jedan je od najčešće upotrebljivanih herbicida u Europi, a 1997. u Velikoj Britaniji je potrošeno 3300 tona izoproturona. Zbog svoje široke uporabe, izoproturon se može naći u rijekama, potocima, podzemnim vodama te morima. Također se nalazi kao prioriterno onečišćivalo u sklopu Okvirne direktive o vodama⁶⁹.

Izoproturon se smatra genotoksičnim i klasificiran je kao kancerogeni spoj. Topljiv je u vodi i blago hidrofoban, dok se slabo adsorbira u tlo, a biljke ga vrlo lagano apsorbiraju. Ekotoksikološki nalazi upućuju na to da su izoproturon i njegovi metaboliti štetni za morske organizme, alge i mikroorganizme. Metaboliti izoproturona poput azobenzena i azoksibenzena pokazuju kancerogena djelovanja, stoga je potrebno razviti svijest o štetnosti izoproturona⁷⁰.

Diuron

Diuron je 1967. registriran kao herbicid, a koristi se za kontrolu jednogodišnjih i višegodišnjih širokolisnih i travnatih korova na poljoprivrednim prehrabnim i neprehrabnim usjevima. Komercijalno je dostupan u obliku pudera, emulzije, granula, peleta i otopine. Sporo se otapa u vodi, te uz kiše prolazi kroz zemlju sve do podzemnih voda, tako da se lako pronalazi u površinskim i u podzemnim vodama. Zbog njegovog dugog vremena poluraspada od 370 dana, onečišćenje okoliša diuronom vrlo je ozbiljan problem. Naveden je kao prioritetno onečišćivalo u sklopu Okvirne direktive o vodama⁷¹.

Diuron je toksičan za sisavce, ptice i vodene beskralježnjake dok njegovi metaboliti pokazuju izrazito visoku toksičnost. Istraživanja su također dokazala da je diuron genotoksičan i kancerogen te da uzrokuje poremećaje endokrinog sustava i narušava ravnotežu hormona. Zbog niske topljivosti i kemijske stabilnosti, prodiranja u dublje slojeve zemlje čime zagađuje podzemne izvore pitke vode te negativnog utjecaja na okoliš i zdravlje ljudi, intenzivno se radi na razvijanju metoda za njegovo uklanjanje iz voda⁷².

Klorfenvinfos

Klorfenvinfos je 1963. registriran kao insekticid i akaricid. Djeluje tako da inhibira kolinesterazu, pa je onemogućen prijenos novih impulsa sa živca na mišić; djeluje na centralni i periferni živčani sustav. Učestalo se koristi za kontrolu kućnih štetočina kao što su muhe, buhe i miševi. Većina komercijalno dostupnog klorfenvinfososa je u tekućem obliku. Korištenje klorfenvinfososa zabranjeno je u Europskoj Uniji i SAD-u. Klorfenvinfos ulazi u okoliš otjecanjem s mjesta odlaganja otpada ili ispiranjem pomoću oborina. Nakon toga, ostaje postojan u tlu i podzemnoj vodi, a može biti prisutan i u površinskim vodama. Iz tla može ispariti, biti adsorbiran putem biljaka ili biorazgrađen. Naveden je kao prioritetno onečišćivalo u okviru Okvirne direktive o vodama⁷³.

Klorfenvinfos u ljudsko tijelo dolazi prilikom njegove pripreme za korištenje ili prilikom same aplikacije ali i konzumiranjem hrane i vode koja je bila tretirana tim spojem. Posljedice trovanja su štetni utjecaji na rad srca, gušenje, znojenje, mučnina i povraćanje. Također prisutnost klorfenvinfososa u tijelu može utjecati na centralni živčani sustav te

uzrokovati napetost, anksioznost, depresiju, oslabljeni rad respiratornog sustava i u konačnici komu. Kancerogenost klorfenvinfosu nije dokazana⁷⁴.

2.3 Toksičnost onečišćivala

Ekotoksikologija je grana toksikologije usredotočena na istraživanje toksičnih učinaka nastalih kao posljedica prisutnosti prirodnih ili umjetno stvorenih štetnih tvari (onečišćivala) na ljude, životinje, biljke, mikroorganizme i sve ostale sastavne dijelove ekosustava. Ona je sinergijska znanost koja u sebi obuhvaća i dijelove drugih znanstvenih disciplina kao što su ekologija, toksikologija, fiziologija, molekularna biologija, analitička kemija. Konačni cilj sveobuhvatnih ekotoksikoloških istraživanja jest omogućiti znanstvenicima da sa što većom točnošću predviđaju raznolike utjecaje štetnih tvari na ekosustav. Štetna tvar je tvar štetna za ljudsko zdravlje ili okoliš, s dokazanim akutnim i kroničnim toksičnim učincima, vrlo nadražujuća, kancerogena, mutagena, nagrizajuća, zapaljiva i eksplozivna tvar, ili tvar koja u određenoj dozi i/ili koncentraciji ima takva svojstva⁷⁵.

Ispitivanje toksičnosti otpadnih voda ili ekotoksičnost se provodi kako bi se utvrdila eventualna štetnost dotoka otpadnih industrijskih voda u prirodne vodotokove. Može biti uzrokovana kemijskim, fizikalnim, biološkim parametrima ili njihovom kombinacijom. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda, kao što su testovi toksičnosti koji se provode na bakterijama, algama, biljkama, beskralješnjacima i ribama⁷⁶.

Jedan od alata koji se koriste u ekotoksikološkim istraživanjima, posebice u okviru monitoringa, tj. biomonitoringa različitih ekosustava (površinskih i otpadnih voda, te morskih i kopnenih ekosustava) jesu biotestovi. Pojam biotest ili laboratorijski test toksičnosti u užem smislu riječi, označava istraživanje djelovanja okolišnih uzoraka (vode, sedimenta, tla...) ili određene kemikalije na organizme/stanice u kontroliranim uvjetima, tj. u laboratoriju. Biotestovima se u širem smislu riječi smatraju eksperimentalne metode za određivanje granične vrijednosti tolerancije pri izlaganju odabranih bioloških modela – test organizama – utjecaju različitih toksičnih tvari⁷⁷. Test organizmi su biološki modeli (bioindikator) na kojima se provodi praćenje djelovanja različitih toksičnih tvari, a najčešći oblik ispitivanja je mortalitet. Izbor bioindikatora ovisi o svrsi testa, specifičnostima ekosustava,

karakteristikama otpadne vode i recipijenta, ali i mogućnostima laboratorija. U tablici 4. dan je pregled različitih vrsta bioindikatora⁷⁸.

Tablica 4. Vrste bioindikatora⁷⁸

| NAZIV TESTA | TEST ORGANIZAM | PRINCIP TESTA |
|---|--|---|
| Test akutne toksičnosti – <i>Daphnia</i> test, te izvedenice tog testa s drugim testnim organizmima | <i>Daphnia magna</i> ; <i>Srtaus</i> (<i>Crustacea</i>); <i>D. pulex</i> ; <i>Ceriodaphnia dubia</i> ; <i>Artemia salina</i> | Slatkovodni račić / inhibicija pokretljivosti – optičko opažanje mortaliteta gravidnih jedinki |
| Microtox TM ; BIOTOX TM ; ToxAlert; LUMISTox | <i>Photobacterium phosphoreum</i> (dr. Lange LUMISTox luminous bacteria, LCK 480); <i>Vibrio fischeri</i> | Luminiscentna bakterija / inhibicija emitiranja svjetlosti |
| Testovi toksičnosti na morskim algama | <i>Ceramium strictum</i> ; <i>C. tenuicorne</i> ; <i>Phaedactylum tricornutum</i> | Morske alge / inhibicija rasta |
| Testovi toksičnosti na slatkovodnim algama | <i>Senedesmus subspicatus</i> ; <i>Selenastrum capricornutum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> | Planktonske slatkovodne alge / inhibicija rasta |
| Yeast Toxicity Test YTT (Dvoraček, Stilinović, 1997) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Kvaščeve gljivice / inhibicija fermentacije i smanjenje količine nastalog CO ₂ |
| AMES test – test za detekciju genotoksičnosti | <i>Salmonella typhimurium</i> | Sojevi bakterija his ⁻ / broje se kolonije revertanata izrasle na podlozi s manjkom histidina |
| Test inhibicije rasta zelene alge | <i>Raphidocelis subcapitata</i> ; <i>Scenedesmus subspicatus</i> | Zelene alge / procjena biomase – optička gustoća, klorofil; fiziološki procesi – fotosinteza, disanje,... |
| US EPA test; OECD test; <i>Lemna</i> test | <i>Lemna minor</i> ; <i>L. gibba</i> ; <i>L. Trisulca</i> ; <i>Eloidea canadensis</i> ; <i>Spirodela ptyrrhiza</i> ; <i>Wolfia arrhiza</i> | Viša biljka / izgled, prirast, konc. fotosintetskih pigmenta, pojava stresnih proteina,... |
| Allium test – procjena učinka kemikalija na genom viših biljaka | <i>Allium cep</i> ; <i>A. sativum</i> ; <i>A. fistulosum</i> ; <i>Vicia faba</i> | Viša biljka / analiza kromosomskih i mitotskih aberacija |

Postoji mnoštvo parametara koji mogu utjecati na varijabilnost testova toksičnosti⁷⁶:

- priroda ispitivanog uzorka
- fizikalni i kemijski uvjeti ispitivanja (salinitet, pH vrijednost, provodnost, ...)
- procedura provođenja (protokol i uvježbanost)
- fizičko stanje organizma (dob, spol, uhranjenost)

Postoje dvije vrste testova toksičnosti⁷⁷: kronični i akutni. Akutnim testom se određuje preživljavanje testiranih organizama unutar 24 do 96 sati dok se kroničnim testom određuje preživljavanje organizma koji je kontaminiran ispitivanim uzorkom, ali i utjecaj tog uzorka kao npr. smetnje rasta, ponašanja, reprodukcije i sl. Traje minimalno 7 dana⁷⁷.

2.3.1 Određivanje toksičnosti prema *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri su Gram negativne štapičaste bakterije koje su isključivo prisutne u morskom ekosustavu. Imaju bioluminiscentna svojstva, heterotrofne su i pokreću se uz pomoć bičeva. Slobodno su živuće jedinice koje žive kao saprofiti razlažući organsku tvar. Pretežno se nalaze u simbiozi s raznim ribama i glavonošcima. Zanimljiv primjer njihove simbioze pronalazimo u Tihom oceanu gdje bakterije žive unutar dvije različite životinje: noćnoj lignji vrste *Euprymna scolopes* i ribi vrste *Monocentris japonica* koja nastanjuje grebenska staništa⁷⁹.

Određivanje akutne toksičnosti prema *Vibrio fischeri* temelji se na bioluminiscenciji koja nastaje oksidacijom molekule luciferina (flavin mononukleotid). Mehanizam se temelji na redukciji FMN u FMNH₂ u prisutnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) i enzima flavin reduktaze⁷⁹.



Reducirani FMNH₂ se potom oksidira u FMN u prisutnosti molekularnog kisika i enzima luciferaze pri čemu se emitira plavo – zelena svjetlost valne duljine od 490 nm.



Pomoću *Vibrio fischeri* može se odrediti toksičnost⁸⁰:

- antibiotika i antibakterijskih sredstava
- atmosferskih onečišćivala
- pesticida
- teških metala i nanočestica
- otpadnih voda
- mikotoksina
- fenola i njegovih derivata

Bakterije *Vibrio fischeri* koriste se za određivanje akutne toksičnosti. Jedan od najčešće korištenih testova je kratkoročni test inhibicije bioluminiscencije u trajanju od 15 ili 30 minuta. Prednosti ovog testa jesu: jednostavnost i brzina uporabe te relativno niski troškovi ispitivanja. Takvi kratkotrajni testovi su standardizirani i normirani. Nadalje, osim kratkoročnog testa, postoji i test toksičnosti gdje je vrijeme inkubacije testnog organizma 24 sata. Međutim, za takav je test malo dostupnih podataka o toksičnosti stoga je teško prosuditi kvalitetu dobivenih rezultata⁸¹.

2.4 Toksičnost višekomponentnih sustava

U posljednjih je nekoliko desetljeća komercijalno proizvedeno više od 100,000 kemijskih proizvoda. Povećanjem broja takvih proizvoda, rastu i razine kontrole te propisi s ciljem zaštite okoliša i ljudskog zdravlja. Također, brz rast svjetske populacije rezultirao je povećanjem globalne svijesti o važnosti resursa pitke vode te intenzivnijim monitoringom okoliša⁸².

Farmaceutici i pesticidi su tvari čija prisutnost u vodenom okolišu predstavlja potencijalnu prijetnju organizmima. Iako su u okolišu prisutni u koncentracijama koje se ne smatraju štetnim za ljudsko zdravlje, mnogi od njih kumulativno mogu uzrokovati štetne učinke odnosno stvarni rizik se krije u dugoročnoj izloženosti. Ljudi i drugi živi organizmi obično su izloženi višekomponentnim kemijskim smjesama koje su prisutne u okolišu, hrani i proizvodima široke potražnje. Međutim, trenutna se procjena rizika u mnogim zemljama, uključujući i Europsku Uniju temelji na analizi utjecaja čistih tvari. Takav pristup je opravdan

jedino ako izloženost smjesama ne predstavlja rizik od povećane toksičnosti. To bi bio slučaj ukoliko je jedna kemikalija smjese toksična dok je druga biološki inertna. Međutim, pojedine se tvari u okolišu pojavljuju u koncentracijama u kojima ne pokazuju toksično djelovanje, no u prisutnosti druge kemikalije mogu pokazivati visoku toksičnost odnosno toksičnost smjese je veća od toksičnosti pojedinih komponenata (sinergizam). Stoga se u novijim istraživanjima sve više ispituje toksičnost višekomponentnih smjesa⁸³.

2.5 Modeliranje toksičnosti smjesa

Kemijska smjesa definirana je kao kombinacija dvije ili više tvari među kojima nema kemijske veze. U praksi nije moguće ispitati toksičnost svih mogućih kombinacija tvari u smjesi. Za to postoji nekoliko jasnih razloga. Prvo, broj kombinacija tvari koje se nalaze u okolišu ili se koriste u proizvodima je beskonačna. Nadalje, stanje i uvjeti kemijskih smjesa u okolišu mogu se vrlo brzo promijeniti. Također, testovi toksičnosti na životinjama su skupi, dugotrajni i složeni, stoga se za potrebe predviđanja toksičnosti smjesa koriste različiti matematički modeli. Najčešće korišteni matematički modeli jesu⁸²:

- Aditivni model (engl. *Concentration Addition model, CA*)
- Model neovisnog djelovanja (engl. *Independent Action model, IA*)
- Model kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR*)

2.5.1 Aditivni model

Aditivni model najčešće je korišteni model za predviđanje toksičnosti smjesa. Model se temelji na pretpostavci da sve komponente smjese imaju sličan mehanizam djelovanja. Ukoliko jedna komponenta smjese djeluje kao sredstvo za razrjeđenje druge komponente, isti se učinak može postići djelomičnom ili potpunom zamjenom jedne komponente smjese sa ekvivalentnom količinom neke druge komponente⁸⁴. Aditivni model opisan je jednadžbom 3.⁸⁵:

$$\sum \frac{c_i}{EC_{p,i}} = 1 \quad (3)$$

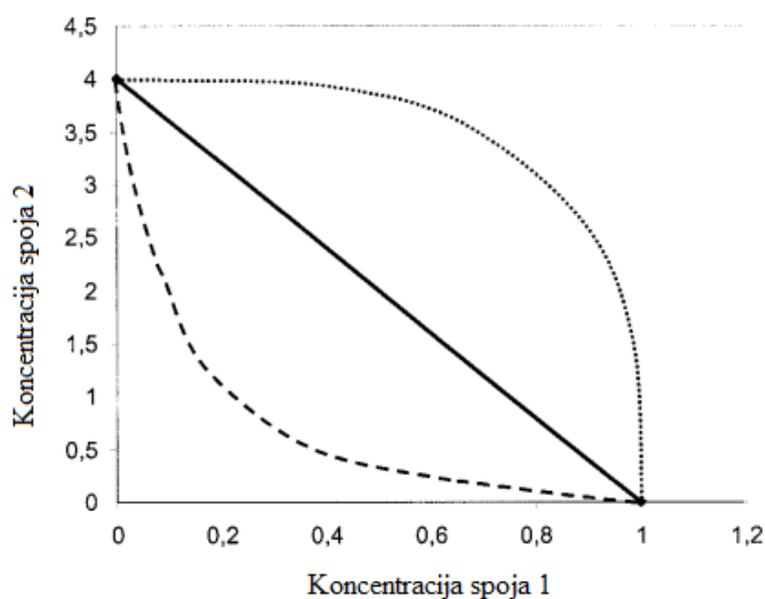
gdje je: c_i koncentracija komponente i u smjesi, $EC_{p,i}$ vrijednost EC_p pojedinačne komponente, a p odabrani postotak inhibicije.

Za potrebu analize rezultata, može se koristiti jedinica toksičnosti (engl. *toxicity unit*, TU) koja predstavlja omjer molarne koncentracije pojedine komponente i njene EC_p vrijednosti, a model je opisan jednadžbom 4⁸⁵:

$$\sum TU_i = \sum \frac{c_i}{EC_{p,i}} \quad (4)$$

Ako je zbroj manji od 0,8 ili veći od 1,2, očekuje se da smjesa pokaže manje ili veće učinke od pojedinačnih komponenti odnosno potencijalni antagonizam ili sinergizam⁸⁵.

Rezultati toksičnosti dobiveni ovim modelom prikazuju se izobologramom prikazanim na slici 1. To je dvodimenzionalni prikaz s krivuljom koja povezuje sve točke različitih omjera smjese istog učinka. Karakteristična izobola za ovaj model je pravac koji povezuje iste efektivne koncentracije pojedinačnih komponenti. Tumačenje se temelji na odstupanju od izobole, a ograničen je na binarne smjese⁸⁶.



Slika 1. Izobologram

Točkasta konkavna izobola (prema gore) ilustrira smjese kojima je za postizanje učinka potrebna veća koncentracija (antagonizam); konveksna krivulja (prema dolje) predstavlja smjese s nižim koncentracijama koje su potrebne za izazivanje kombiniranog učinka (sinergizam).

2.5.2 Model neovisnog djelovanja

Za razliku od aditivnog modela, osnovna pretpostavka modela neovisnog djelovanja je da svaka komponenta smjese ima različite mehanizme djelovanja te da svaka od njih neovisno djeluje na ispitivane organizme. Model je opisan jednadžbom 5.⁸⁴:

$$E(c_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (5)$$

gdje je c_i koncentracija pojedine komponente u smjesi, $E(c_i)$ učinak komponente i ako se primjenjuje samo u koncentraciji prisutnoj u smjesi, a $E(c_{\text{mix}})$ ukupni učinak smjese (vrijednosti od 0 – 1) pri koncentraciji jednakoj zbroju koncentracija pojedinih komponenata

U modelu neovisnog djelovanja, kada su komponente prisutne u koncentracijama koje nemaju pojedinačni toksični učinak, one neće doprinosti ukupnom učinku smjese. Stoga, smjese opisane po ovom modelu neće pokazivati toksičnost, dokle god sve komponente ne premaše odgovarajuće koncentracijske razine.

2.5.3 Model kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti

U modelu kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti se matematičkim jednadžbama može predvidjeti i izračunati biološka aktivnost pojedine komponente ili smjese na temelju njihove kemijske odnosno molekulske strukture. Molekulske strukture karakteriziraju se veličinama koje se nazivaju molekulski deskriptori⁸⁷.

$$\text{svojstvo} = F(\text{molekulski deskriptori}) \quad (6)$$

gdje je F matematički model koji povezuje eksperimentalna svojstva s matematičkim odnosno molekulskim strukturama⁸⁸.

Kako se QSAR model zasniva na molekulskim deskriptorima, često zahtijeva složene izračune i velik broj eksperimentalnih podataka, stoga se on rijetko koristi za određivanje toksičnosti smjesa⁸⁸.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

U tablici 5. Prikazane su kemikalije korištene prilikom provođenja analize toksičnosti binarnih smjesa farmaceutika i pesticida.

Tablica 5. Kemikalije korištene pri određivanju toksičnosti

| Kemikalija | Formula | Čistoća | Proizvođač |
|--------------------|--------------------------------|---------|------------|
| Sumporna kiselina | H ₂ SO ₄ | p.a. | Kemika |
| Natrijev hidroksid | NaOH | p.a. | Kemika |
| Natrijev klorid | NaCl | p.a, | Kemika |

Otopine sumporne kiseline i natrijeva hidroksida korištene su za podešavanje pH vrijednosti uzorka. Otopina natrijeva klorida koristila se kao medij koji simulira prirodno stanište bakterija *Vibrio fischeri*.

3.1.2 Bakterija *Vibrio fischeri*

Za analizu toksičnosti korištene su komercijalno dostupne smrznute luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* (Macherey-Nagel GmbH–Co., Düren, Germany) koje se čuvaju u zamrzivaču na temperaturi od – 18 °C do – 20 °C. Suspenzija bakterija se priprema na način da se u ampulu sa zamrznutim bakterijama doda 1 mL otopine *BioFix Lumi Reconstitution* (Macherey-Nagel GmbH–Co., Düren, Germany) te se dobro homogenizira. Dodatkom otopine bakterije odmah oživljavaju i spremne su za testiranje. U čašu od 100 ml ulije se 50 mL otopine *BioFix Lumi Medium* (Macherey-Nagel GmbH–Co., Düren, Germany) te se doda homogenizirana smjesa bakterija. Tako pripremljena smjesa bakterija razrijedi se s dodatnih 50 ml otopine *BioFix Lumi Medium*.

3.1.3 Farmaceutici

U tablici 6. prikazani su osnovni podaci ispitivanih farmaceutika.

Tablica 6. Osnovni podaci farmaceutika:

| Naziv | Molarna masa / g mol ⁻¹ | Čistoća / % | Proizvođač | Masa / mg (u 1 L) |
|-----------------------|------------------------------------|-------------|-----------------|-------------------|
| Azitromicin (AZM) | 749,00 | 99,1 | Sigma - Aldrich | 74,9 |
| Eritromicin (ERM) | 733,94 | 99,8 | Sigma - Aldrich | 73,4 |
| Karbamazepin (CBA) | 236,27 | 99,6 | Sigma - Aldrich | 11,8 |
| Oksitetraciklin (OTC) | 460,44 | 99,8 | Sigma - Aldrich | 46,0 |
| Deksametazon (DXM) | 392,47 | 99,8 | Sigma - Aldrich | 39,2 |
| Diklofenak (DCF) | 318,13 | 99,6 | Sigma - Aldrich | 31,8 |

Temeljne standardne otopine pojedinih farmaceutika pripremaju se otapanjem točne odvage svakog farmaceutika dane u tablici 6. u ultračistoj vodi u odmjernim tikvicama od 1 L. Molarna koncentracija tako pripremljenih otopina iznosi 0,1 mM. Topljivost se poboljšala djelovanjem ultrazvuka na pripremljenu otopinu. Otopine su uvijek svježe pripremljene prije mjerenja.

Potom su pripremljene binarne otopine ispitivanih farmaceutika volumena 30 mL. Molarni omjeri farmaceutika u pripremljenim smjesama jesu: 25:75, 50:50 i 75:25. Pripremljeno je i analizirano 45 binarnih smjesa farmaceutika.

3.1.4 Pesticidi

U tablici 7. prikazani su osnovni podaci ispitivanih pesticida.

Tablica 7. Osnovni podaci pesticida:

| Naziv | Molarna masa / g mol ⁻¹ | Čistoća / % | Proizvođač | Masa / mg (u 1L) |
|---------------------|---------------------------------------|----------------|-----------------|------------------|
| Alaklor (ALC) | 269,77 | 99,8 | Sigma - Aldrich | 26,9 |
| Izoproturon (IPT) | 206,29 | 99,8 | Sigma - Aldrich | 20,6 |
| Diuron (DIU) | 233,09 | 99,6 | Sigma - Aldrich | 23,3 |
| Klorfenvinfos (CFP) | 359,56 | 97,1 | Sigma - Aldrich | 35,9 |

Temeljne standardne otopine pojedinih pesticida pripremaju se otapanjem točne odvage svakog pesticida dane u tablici 7. u ultračistoj vodi u odmjernim tikvicama od 1 L. Molarna koncentracija tako pripremljenih otopina iznosi 0,1 mM. Kako bi se topljivost poboljšala, otopine su postavljene u ultrazvučnu kupelj. Tako pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Njihove koncentracije kontrolirane su prije svakog mjerenja.

Potom su pripremljene binarne otopine ispitivanih farmaceutika volumena 30 mL. Molarni omjeri pesticida u pripremljenim smjesama jesu: 25:75, 50:50 i 75:25. Tako pripremljene otopine čuvane su u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Pripremljeno je i analizirano 18 binarnih smjesa pesticida.

3.2 Instrumenti

3.2.1 Ultrazvučna kupelj

Prilikom pripreme otopina neki od spojeva pokazali su slabiju topljivost. Kako bi se pospješila topljivost, primijenjena je ultrazvučna kupelj. Korištena ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL DT 514 BH, Bandelin, Berlin, Njemačka prikazana je na slici 2. Kupelj je ispunjena vodom do 2/3 svog volumena. Ona je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji, vremena trajanja i snage ultrazvuka. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1 – 30 minuta, a maksimalna snaga iznosi 860 W⁸⁹.



Slika 2. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL DT 514 BH⁸⁹

3.2.2 Luminometar

Toksičnost je određivana luminometrom BioFix Lumi-10 Toxicity Analyzer (Macherey – Nagel GmbH – Co. Düren, Germany) prikazanim na slici 3.



Slika 3. Luminometar BioFix Lumi-10 Toxicity Analyzer⁹⁰

Ovaj se luminometar koristi za mjerenje bioluminiscencije ili kemijske luminiscencije. Ima širok raspon primjene kao što su:

- analiza okoliša,
- toksikološka ispitivanja – akutni i kronični testovi toksičnosti, testovi mutagenosti i genotoksičnosti,
- medicinska dijagnostika – analiza ATP-a,
- molekularna biokemijska ispitivanja – analiza NADPH, DNA ispitivanja, bioluminiscentna imunološka ispitivanja.

Luminometar ima kapacitet pohrane za 2000 rezultata, dok mu je radna temperatura između 15 °C – 30 °C⁹⁰.

3.3 Metoda određivanja toksičnosti prema bakteriji *Vibrio fischeri*

Mjerenje toksičnosti izvedeno je prema standardnoj metodi ISO 11348-3:1998. Metoda se temelji na mjerenju inhibicije luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri* u serijskim ispitivanjima. To se postiže miješanjem uzorka i suspenzije bakterija u kivetama. Mjerenje se provodi nakon što su uzorak i bakterije u kontaktu 15 ili 30 minuta. Iz vrijednosti inhibicije luminiscencije bakterija mogu se izračunati vrijednosti EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} , itd.

Prethodno pripremljenim uzorcima pesticida i farmaceutika potrebno je izmjeriti i podesiti pH. Vrijednost pH svakog uzorka mora biti između 6,8 i 7,2. Za podešavanje pH

vrijednosti koriste se otopine sumporne kiseline ($c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,04 \text{ M}$) i natrijeva hidroksida ($c(\text{NaOH}) = 0,02 \text{ M}$). Nakon podešavanja pH u svaki uzorak se dodaje 0,6 g NaCl kako bi uzorci bili 2%-tna otopina natrijeva klorida.

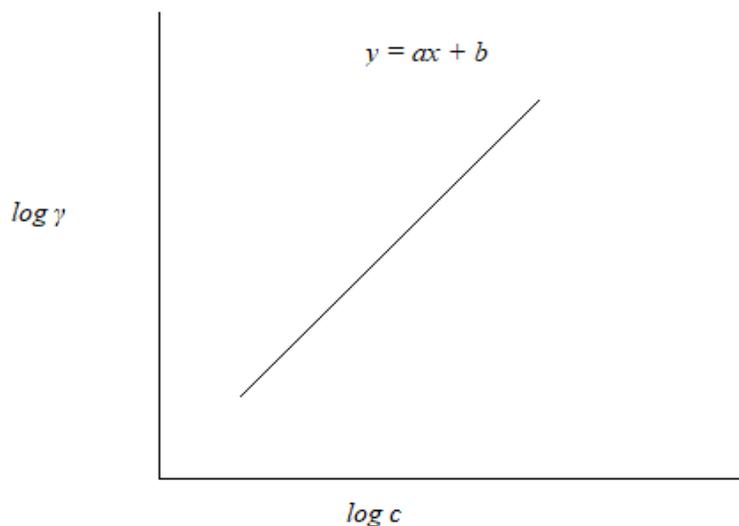
Potom se pripremi 100 mL otopine natrijevog klorida masenog udjela 2% otapanjem 2 g NaCl u 100 mL vode. Pripremi se potreban broj kiveta (7 za jedan uzorak) u stalak za kivete te se pripremi jedna referentna test kiveta u koju će ići 500 μL vode i 500 μL bakterijske suspenzije. U kivete se zatim pipetiraju određeni volumeni uzorka i otopine NaCl dani u Tablici 8, kako bi se zadovoljile koncentracije uzorka prikazane u tablici 8.

Tablica 8. Pipetirani volumeni uzorka, NaCl i suspenzije bakterija kako bi se postigle željene koncentracije

| Broj kivete | Volumen otopine NaCl / μL | Volumen uzorka / μL | Volumen bakterija / μL | Koncentracija uzorka / mM |
|-------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| 1 | 0 | 500 | 500 | 0,05 |
| 2 | 100 | 400 | 500 | 0,04 |
| 3 | 200 | 300 | 500 | 0,03 |
| 4 | 300 | 200 | 500 | 0,02 |
| 5 | 400 | 100 | 500 | 0,01 |
| 6 | 450 | 50 | 500 | 0,005 |
| 7 | 475 | 25 | 500 | 0,0025 |

Nakon pipetiranja pokreće se mjerenje te se započinje s dodavanjem suspenzije bakterija. Počevši od referentne, u svaku se kivetu dodaje 500 μL suspenzije bakterija. Razmak između pipetiranja mora biti 15 sekundi kako bi svaki uzorak bio točno 15 min u kontaktu s bakterijama. Mjerenje inhibicije luminiscencije provodi se nakon 15 min. Mjerenje se provodi u prostoriji koja mora biti ohlađena na 15 °C.

Nakon obavljenih mjerenja izrađuje se krivulja toksičnosti koja daje međuovisnost koncentracije onečišćivala i odziva. Krivulja je izvorno S oblika, no zbog lakšeg izračuna, vrijednosti na osima su logaritmirane te se dobiva linearni odziv prikazan na slici 4.



Slika 4. Krivulja toksičnosti

Na slici 4 $\log c$ predstavlja logaritamski oblik koncentracije spoja, a $\log \gamma$ – logaritamsku vrijednost odgovora dobivenog iz jednadžbe 7.

$$\gamma = \frac{\%INH}{100 - \%INH} \quad (7)$$

$\%INH$ je vrijednost inhibicije luminiscencije dobivena mjerenjem.

Iz jednadžbi 8. i 9. računa se vrijednosti EC_{50} koja predstavlja efektivnu koncentraciju koja uzrokuje učinak kod 50% ispitivanih jedinki.

$$EC_{50} / \text{mM} = 10^{\frac{b}{a}} \quad (8)$$

Oznaka a predstavlja nagib pravca, dok je b odsječak na osi y .

$$EC_{50} / \text{mg L}^{-1} = EC_{50} / \text{mM} \cdot M (\text{spoja}) / \text{mg mmol}^{-1} \quad (9)$$

Prema dobivenim vrijednostima EC_{50} tvari možemo karakterizirati kao⁹¹:

- jako toksične, $EC_{50} < 1 \text{ mg/L}$
- srednje toksične, $1 \text{ mg/L} < EC_{50} < 100 \text{ mg/L}$
- slabo toksične, $EC_{50} > 100 \text{ mg/L}$

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Toksičnost jednokomponentnih otopina

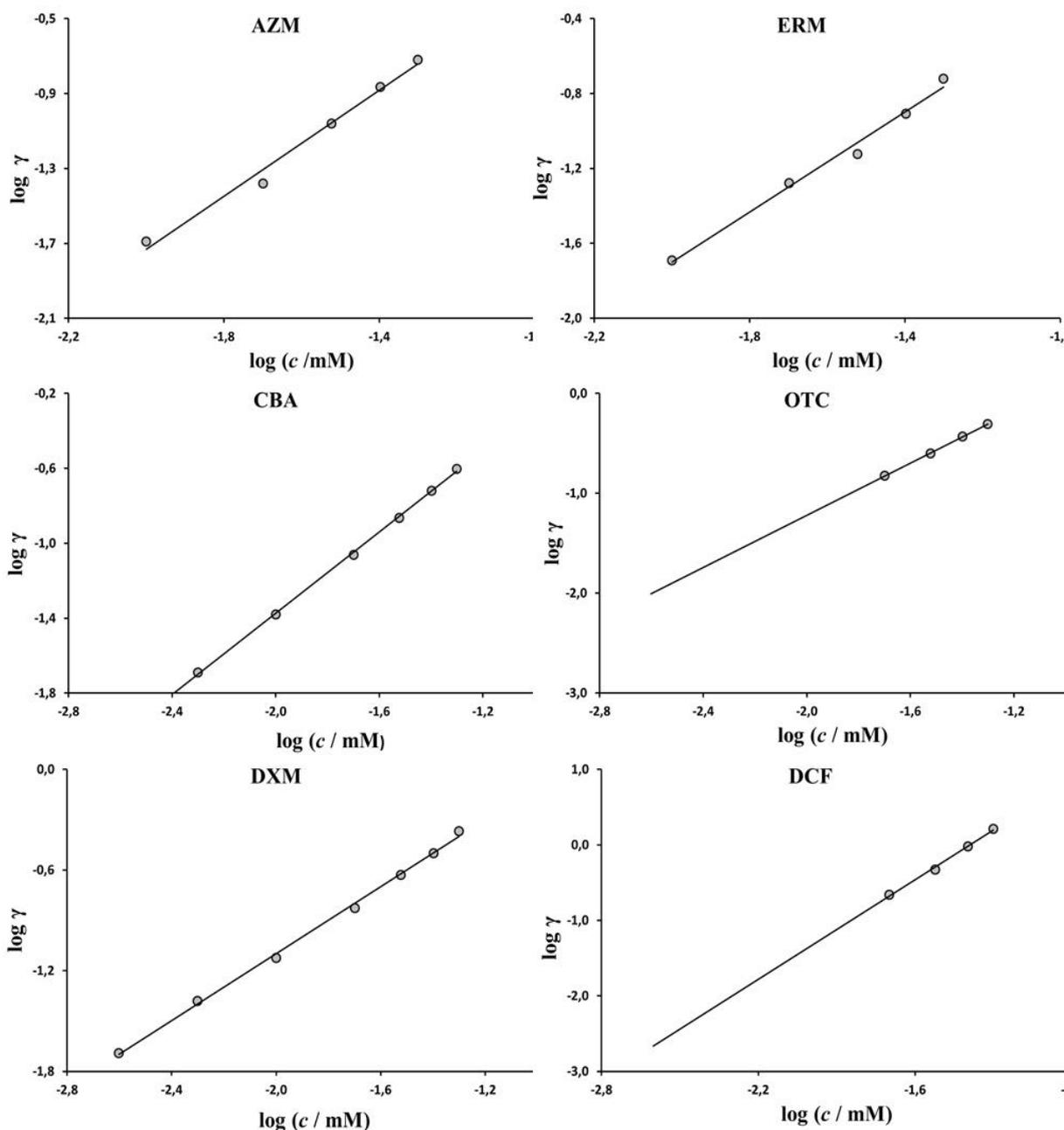
Početni korak ovog istraživanja uključivao je ispitivanje toksičnosti jednokomponentnih otopina farmaceutika i pesticida prema bakterijama *Vibrio fischeri*.

4.1.1 Toksičnost farmaceutika

Rezultati mjerenja toksičnosti jednokomponentnih otopina farmaceutika prikazani su u tablici 9. Akutna toksičnost izražena je kao vrijednost EC_{50} u mg/L i mM. Na slici 5. prikazane su krivulje toksičnosti otopina farmaceutika. Svaka je krivulja linearizirana kako bi se lakše odredila EC_{50} vrijednost. Parametri a i b , predstavljaju nagib pravca i odsječak na osi y , a koeficijent determinacije (R^2) daje informaciju o slaganju eksperimentalnih podataka s odabranim modelom za određivanje toksičnosti..

Tablica 9. Rezultati mjerenja toksičnosti za jednokomponentne otopine farmaceutika

| Farmaceutik | a | b | R^2 | EC_{50} / mM | $EC_{50} / \text{mg L}^{-1}$ |
|-------------|--------|--------|--------|-----------------------|------------------------------|
| AZM | 1,4153 | 1,0988 | 0,9871 | 0,1673 | 125,30 |
| ERM | 1,3384 | 0,9762 | 0,9884 | 0,1865 | 136,86 |
| CBA | 1,0844 | 0,7944 | 0,9993 | 0,1851 | 43,73 |
| OTC | 1,3061 | 1,3915 | 0,9998 | 0,0860 | 39,60 |
| DXM | 0,9970 | 0,8954 | 0,9979 | 0,1264 | 49,63 |
| DCF | 2,1988 | 3,0569 | 0,9945 | 0,0407 | 12,95 |



Slika 5. Krivulje toksičnosti ispitivanih farmaceutika

Iz dobivenih vrijednosti EC_{50} prikazanih u tablici 9. Toksičnost ispitivanih farmaceutika raste u nizu: $ERM < CBA < AZM < DXM < OTC < DCF$. Toksičnost farmaceutika može se dovesti u korelaciju s molarnom masom spojeva te supstituentima koji su vezani na njihove prstenaste strukture. Tako je uočeno da spojevi niže molarne mase imaju veću aktivnost te lakše prolaze kroz staničnu membranu, a samim time lakše ulaze u stanice⁹². Što se tiče supstituenata vezanih na strukture spojeva, uočeno je da keto, hidroksilna i metilna

skupina nemaju direktan utjecaj na toksičnost pojedinog spoja, dok amino skupine i halogeni elementi pridonose toksičnosti spojeva prema bakterijama *Vibrio fischeri*⁹³.

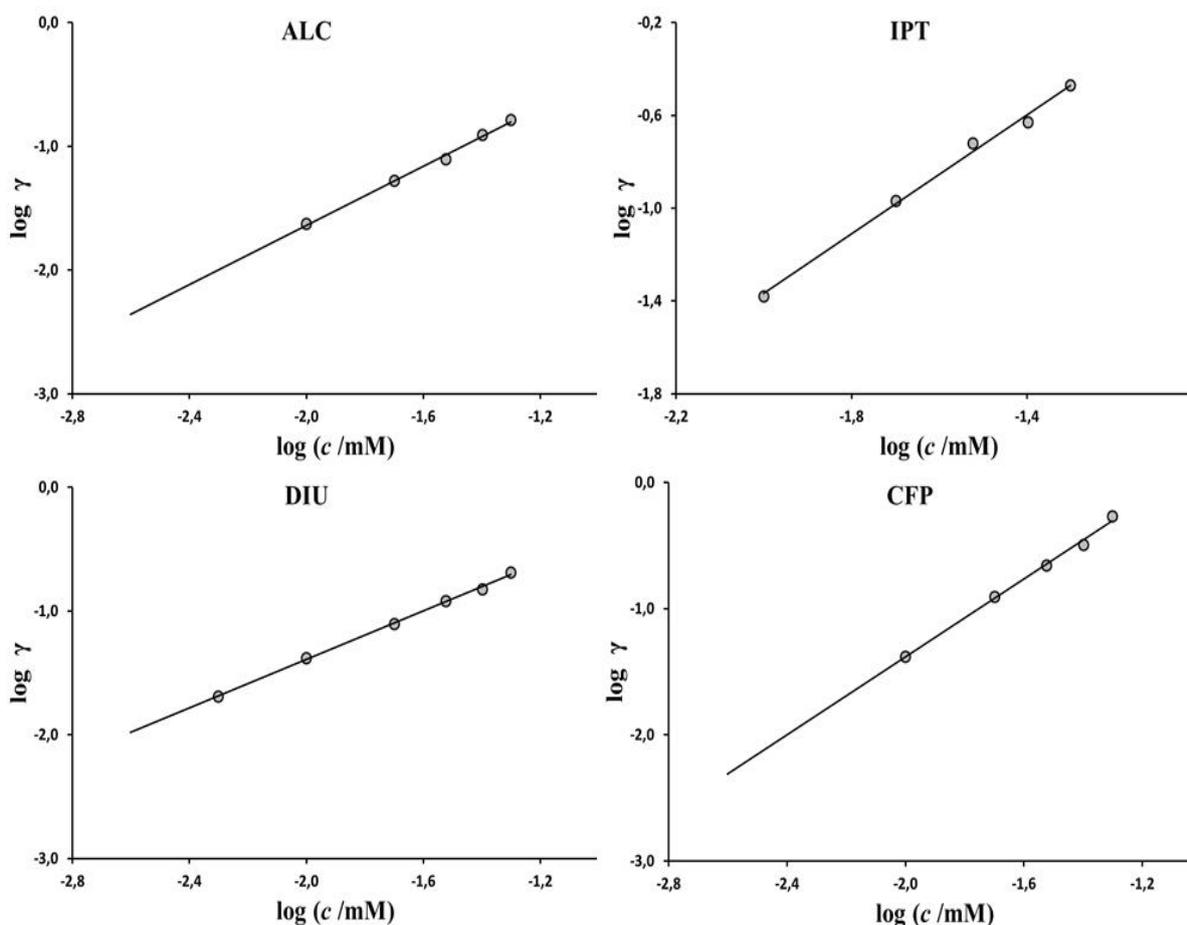
Ekotoksičnost eritromicina kreće se u rasponu od srednje toksičnog za alge do slabo toksičnog za vodene organizme⁹⁴. U ovom se radu prema vrijednosti EC_{50} eritromicin klasificira kao slabo toksičan spoj. Nadalje, i drugi ispitivani makrolidni antibiotik, azitromicin, u radu je klasificiran kao slabo toksičan. Nisku toksičnost ovih spojeva možemo povezati s funkcionalnim skupinama odnosno supstituentima koji su vezani na makrolidni prsten kod ova dva antibiotika. Supstituenti koji prevladavaju kod ovih antibiotika jesu metilna i hidroksilna skupina koje ne doprinose toksičnosti prema ispitivanim bakterijama. Također, zbog svoje velike molarne mase vrijeme inkubacije od 15 min provedeno u ovom ispitivanju možda nije dovoljno dugo kako bi se utvrdila toksičnost. Iako su spojevi slične strukture, azitromicin je pokazao nešto veću toksičnost od eritromicina. Prema mikrobiološkim studijama, azitromicin se pokazao kao učinkovitiji lijek za gram-negativne bakterije, a samim time je i njegova toksičnost veća⁹⁵. Karbamazepin je klasificiran kao srednje toksičan spoj za bakterije i rakove⁹⁶. Provedenom analizom, karbamazepin prema EC_{50} vrijednosti pripada u srednje toksične spojeve. Karbamazepin na svom prstenu ima vezana dva supstituenta, keto i amino skupinu. Iako keto skupina ne pridonosi toksičnosti, zbog amino skupine, karbamazepin ima nešto veću toksičnost od deksametazona. Deksametazon se klasificira kao srednje toksičan spoj za rakove i alge⁹⁷. U ovom se istraživanju s obzirom na dobivenu EC_{50} vrijednost deksametazon također klasificira kao srednje toksičan spoj. Kao i kod ERM i AZM, u svojoj strukturi deksametazon ima vezane hidroksilne skupine koje ne doprinose toksičnosti, stoga toksičnost deksametazona nije visoka. Međutim zbog niže molarne mase, DXM pokazuje veću toksičnost u usporedbi s ERM i AZM. Oksitetraciklin je također srednje toksičan spoj za rakove i bakterije, što je i potvrđeno⁹⁸. Na oksitetraciklinu vezane su hidroksilne i keto skupine koje ne doprinose toksičnosti spoja te amino skupine koje povećavaju toksičnost spoja prema *Vibrio fischeri*. Kao najtoksičniji spoj u ovom radu pokazao se diklofenak. Diklofenak je klasificiran kao srednje do jako toksičan spoj za vodene organizme⁹⁹. Prema dobivenoj vrijednosti EC_{50} , u ovom se slučaju diklofenak klasificira kao srednje toksičan spoj, s najnižom EC_{50} vrijednosti u skupini ispitivanih spojeva. Razlog izrazito visoke toksičnosti diklofenaka može se pronaći u kloridnim supstituentima koji uvelike povećavaju toksičnost spoja prema *Vibrio fischeri*.

4.1.2 Toksičnost pesticida

Rezultati mjerenja toksičnosti jednokomponentnih otopina pesticida prikazani su u tablici 10. Akutna toksičnost izražena je kao vrijednost EC_{50} u mg/L i mM. Na slici 6. prikazane su krivulje toksičnosti otopina pesticida. Svaka je krivulja linearizirana kako bi se lakše odredila EC_{50} vrijednost. Parametri a i b , predstavljaju nagib pravca i odsječak na osi y, a koeficijent determinacije (R^2) daje informaciju o ponašanju sustava u ispitivanom koncentracijskom rasponu.

Tablica 10. Rezultati mjerenja toksičnosti jednokomponentnih otopina pesticida

| Pesticid | a | b | R^2 | EC_{50} / mM | $EC_{50} / \text{mg L}^{-1}$ |
|----------|--------|--------|--------|-----------------------|------------------------------|
| ALC | 1,1943 | 0,7506 | 0,9961 | 0,2352 | 63,46 |
| IPT | 1,2821 | 1,1972 | 0,9945 | 0,1164 | 24,03 |
| DIU | 0,9788 | 0,5658 | 0,9984 | 0,2642 | 61,58 |
| CFP | 1,5419 | 1,7008 | 0,9958 | 0,0780 | 28,36 |



Slika 6. Krivulje toksičnosti ispitivanih pesticida

Iz dobivenih EC_{50} vrijednosti prikazanih u tablici 10. Toksičnost ispitivanih pesticida raste u nizu $DIU < ALC < IPT < CFP$. Kao i u slučaju farmaceutika, toksičnost pesticida možemo povezati s molarnom masom te supstituentima koji su vezani na centralne prstenaste strukture pesticida.

Alaklor je klasificiran kao srednje do slabo toksičan spoj za vodene organizme¹⁰⁰. Prema ovom istraživanju alaklor pripada srednje toksičnim spojevima za ispitivane bakterije. Alaklor u strukturi sadrži atom klora koji može doprinijeti porastu toksičnosti. Diuron je klasificiran kao srednje toksičan spoj za vodene organizme¹⁰¹ što je i potvrđeno eksperimentalno. Kao i kod alaklora, struktura diurona sadrži atom klora koji značajno povećava toksičnost spojeva prema *Vibrio fischeri*⁹². Izoproturon je klasificiran kao srednje

toksičan spoj za vodene organizme što je i potvrđeno ovim istraživanjem¹⁰². Razlog se povišene toksičnosti izoproturona može pronaći u činjenici da spoj ima najmanju molarnu masu između ispitivanih pesticida. Kao što je već rečeno, spojevi manje molarne mase jesu aktivniji te lakše ulaze u stanicu prolaskom kroz staničnu membranu⁹². Također, u strukturi IPT nalaze se amino skupine koje povećavaju toksični efekt spoja prema ispitivanim bakterijama. Klorfenvinfos je srednje do jako toksičan spoj za vodene organizme¹⁰³. Prema određenoj se EC_{50} vrijednosti klorfenvinfos može smatrati srednje toksičnim spojem prema bakterijama *Vibrio fischeri*. Nadalje, pokazao se kao najtoksičniji spoj od svih ispitivanih pesticida. Iako ima znatno veću molarnu masu od ostalih ispitivanih pesticida, klorfenvinfos u svojoj strukturi sadrži tri atoma klora te fosfatnu skupinu, koje uvelike pridonose toksičnosti spojeva prema ispitivanim bakterijama.

4.2 Toksičnost binarnih smjesa farmaceutika

Kao što je već rečeno, ovo je istraživanje bilo usmjereno na određivanje toksičnosti smjesa, te analizi mogućih međudjelovanja. Ukupno je analizirano 45 binarnih smjesa farmaceutika, a rezultati su prikazani u tablici 10. Toksičnost smjesa izražena je kao EC_{50} vrijednost u mM, dok vrijednost R^2 daje informaciju o ponašanju sustava u ispitivanom koncentracijskom rasponu. Promatrajući vrijednosti toksičnosti binarnih smjesa, može se uočiti da smjese u kojima se nalazi diklofenak imaju višu toksičnost od ostalih smjesa. Isto tako, porastom se množinskog udjela diklofenaka povećava i toksičnost smjese. S druge strane, binarne smjese koje sačinjavaju slabije toksični spojevi, kao što su ERM i AZM u konačnici rezultiraju slabo toksičnim binarnim smjesama. Kako bi se ispitali toksični efekti binarnih smjesa, nije dovoljno samo usporediti EC_{50} vrijednosti, već je dobro primijeniti neke od teorijskih modela, što je i učinjeno u slijedećim poglavljima.

Tablica 10. Rezultati toksičnosti binarnih smjesa farmaceutika

| Broj | Smjesa | Omjer | R^2 | EC_{50} / mM |
|------|---------|-------------|--------|----------------|
| 1 | | 0,75 : 0,25 | 0,9559 | 0,0283 |
| 2 | DCF-OTC | 0,50 : 0,50 | 0,9982 | 0,0359 |
| 3 | | 0,25 : 0,75 | 0,9959 | 0,0479 |

| | | | | |
|----|---------|-------------|--------|--------|
| 4 | | 0,75 : 0,25 | 0,9942 | 0,0319 |
| 5 | DCF-CBA | 0,50 : 0,50 | 0,9841 | 0,0422 |
| 6 | | 0,25 : 0,75 | 0,9948 | 0,0705 |
| 7 | | 0,75 : 0,25 | 0,9857 | 0,0393 |
| 8 | DCF-DXM | 0,50 : 0,50 | 0,9906 | 0,0571 |
| 9 | | 0,25 : 0,75 | 0,9923 | 0,0800 |
| 10 | | 0,75 : 0,25 | 0,9966 | 0,0428 |
| 11 | DCF-AZM | 0,50 : 0,50 | 0,9901 | 0,0683 |
| 12 | | 0,25 : 0,75 | 0,9904 | 0,1228 |
| 13 | | 0,75 : 0,25 | 0,9955 | 0,0467 |
| 14 | DCF-ERM | 0,50 : 0,50 | 0,9762 | 0,0745 |
| 15 | | 0,25 : 0,75 | 0,9796 | 0,1254 |
| 16 | | 0,75 : 0,25 | 0,9939 | 0,1403 |
| 17 | OTC-CBA | 0,50 : 0,50 | 0,9868 | 0,1504 |
| 18 | | 0,25 : 0,75 | 0,9909 | 0,1402 |
| 19 | | 0,75 : 0,25 | 0,9957 | 0,1623 |
| 20 | OTC-DXM | 0,50 : 0,50 | 0,9841 | 0,1424 |
| 21 | | 0,25 : 0,75 | 0,9985 | 0,1410 |
| 22 | | 0,75 : 0,25 | 0,9884 | 0,1962 |
| 23 | OTC-AZM | 0,50 : 0,50 | 0,9787 | 0,2694 |
| 24 | | 0,25 : 0,75 | 0,9751 | 0,2872 |
| 25 | | 0,75 : 0,25 | 0,9910 | 0,2297 |
| 26 | OTC-ERM | 0,50 : 0,50 | 0,9738 | 0,2577 |
| 27 | | 0,25 : 0,75 | 0,9938 | 0,3283 |
| 28 | | 0,75 : 0,25 | 0,9922 | 0,1966 |
| 29 | CBA-DXM | 0,50 : 0,50 | 0,9895 | 0,1594 |
| 30 | | 0,25 : 0,75 | 0,9903 | 0,1374 |
| 31 | | 0,75 : 0,25 | 0,9836 | 0,2499 |
| 32 | CBA-AZM | 0,50 : 0,50 | 0,9837 | 0,2384 |
| 33 | | 0,25 : 0,75 | 0,9695 | 0,2520 |
| 34 | | 0,75 : 0,25 | 0,9933 | 0,2332 |
| 35 | CBA-ERM | 0,50 : 0,50 | 0,9780 | 0,2831 |
| 36 | | 0,25 : 0,75 | 0,9585 | 0,2784 |

| | | | | |
|----|---------|-------------|--------|--------|
| 37 | | 0,75 : 0,25 | 0,9864 | 0,1519 |
| 38 | DXM–AZM | 0,50 : 0,50 | 0,9746 | 0,1587 |
| 39 | | 0,25 : 0,75 | 0,9934 | 0,2179 |
| 40 | | 0,75 : 0,25 | 0,9881 | 0,1487 |
| 41 | DXM–ERM | 0,50 : 0,50 | 0,9896 | 0,1985 |
| 42 | | 0,25 : 0,75 | 0,9867 | 0,2301 |
| 43 | | 0,75 : 0,25 | 0,9909 | 0,3368 |
| 44 | AZM–ERM | 0,50 : 0,50 | 0,9918 | 0,2926 |
| 45 | | 0,25 : 0,75 | 0,9608 | 0,3382 |

4.2.1 Primjena CA modela na smjese farmaceutika i analiza međudjelovanja

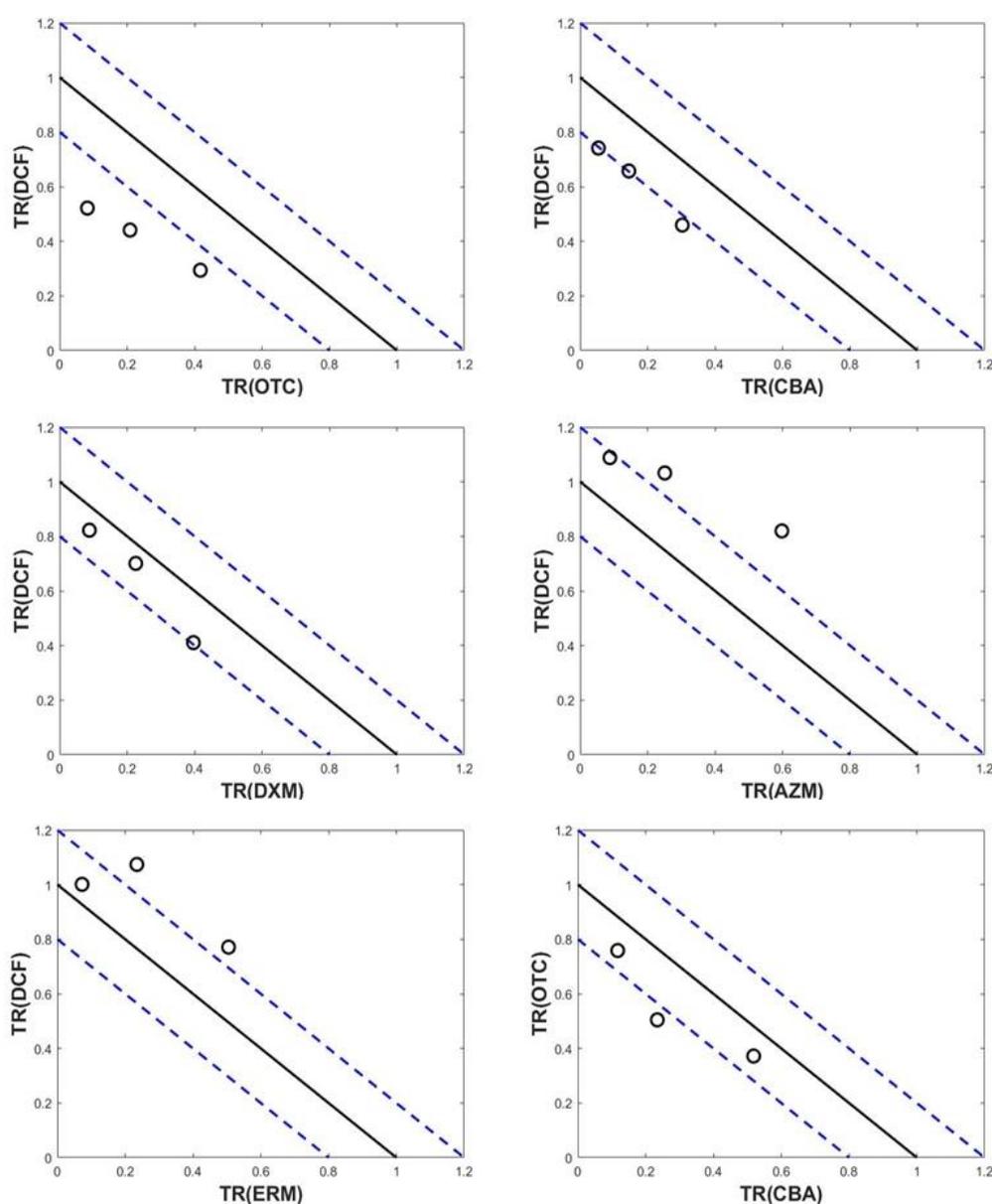
Aditivni model temelji se na pretpostavci da sve komponente smjese imaju sličan mehanizam djelovanja. Ukoliko jedna komponenta smjese djeluje kao sredstvo za razrjeđenje druge komponente, isti se učinak može postići djelomičnom ili potpunom zamjenom jedne komponente smjese sa ekvivalentnom količinom neke druge komponente. Krivulje toksičnosti, odnosno ovisnost koncentracije i odziva prikazane su u dvodimenzionalnom obliku. Krivulje sadrže točke iste efektivne koncentracije pojedinačnih komponenti koje se mogu povezati krivuljom koja se naziva izobola. Aditivni model opisan je jednadžbom 10 kako bi se dobio uvid u prikladnost modela za analizirane smjese.

$$\sum_i \frac{x_i \cdot EC_{50,MIX}}{EC_{50,i}} = 1 \quad (10)$$

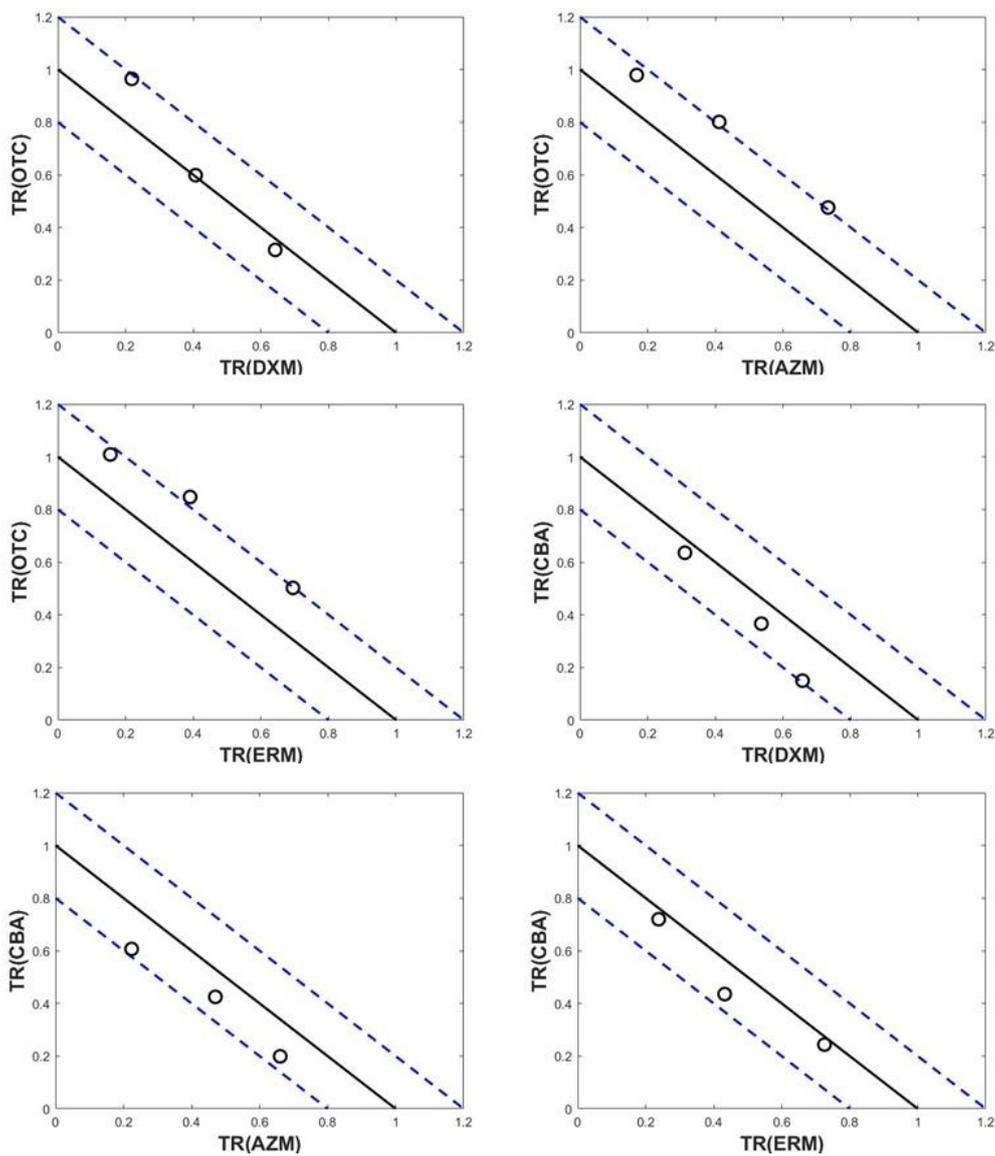
Funkcija opisana jednadžbom 10 naziva se CA izobola. U idealnom slučaju, suma doprinosa pojedinih komponenti u smjesi treba biti jednaka 1. U realnom slučaju, gdje imamo više onečišćivala, može doći do odstupanja od izobole. Ta odstupanja služe za karakterizaciju različitih učinaka u smjesama. Izobologrami za ispitivane binarne smjese farmaceutika prikazani su na slikama 7 – 9. Puna crta predstavlja odgovarajuću CA izobolu, dok dvije isprekidane crte predstavljaju granice predviđanja odnosno odstupanja od aditivnog modela (0,8 i 1,2). Svaka binarna smjesa prikazana je u obliku jedinice toksičnosti (*TU*) izračunate prema jednadžbi 11.

$$TU_{eff,i} = \frac{x_i \cdot EC_{50.MIX}}{EC_{50,i}} \quad (11)$$

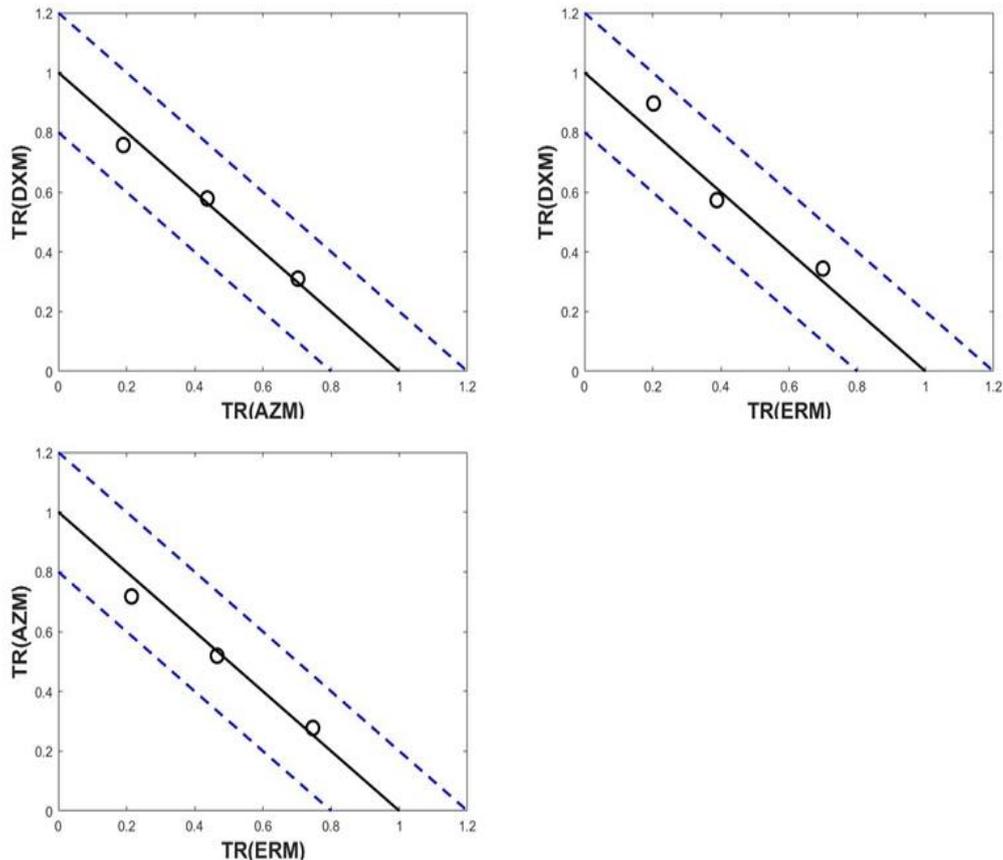
Ukoliko se suma vrijednosti TU nađe izvan granica predviđanja, smjesa pokazuje sinergizam ($< 0,8$) odnosno antagonizam ($> 1,2$). Sinergističko ili antagonističko ponašanje smjese potvrđuje se ukoliko se točke na izobologramu nalaze izvan definiranih ograničenja. Ukoliko se točke na izobologramu nalaze na CA izoboli, može se potvrditi prikladnost aditivnog modela za opis toksičnog djelovanja pri toj kombinaciji onečišćivala u ispitivanom rasponu koncentracija.



Slika 7. Izoblografski prikaz toksičnosti smjese DCF-OTC, DCF-CBA, DCF-DXM, DCF-AZM, DCF-ERM i OTC-CBA



Slika 8. Izobolografski prikaz toksičnosti smjesa OTC-DXM, OTC-AZM, CBA-DMX, OTC-ERM, CBA-AZM i CBA-ERM



Slika 9. Izobolografski prikaz toksičnosti smjesa DXM-AZM, DXM-ERM i AZM-ERM

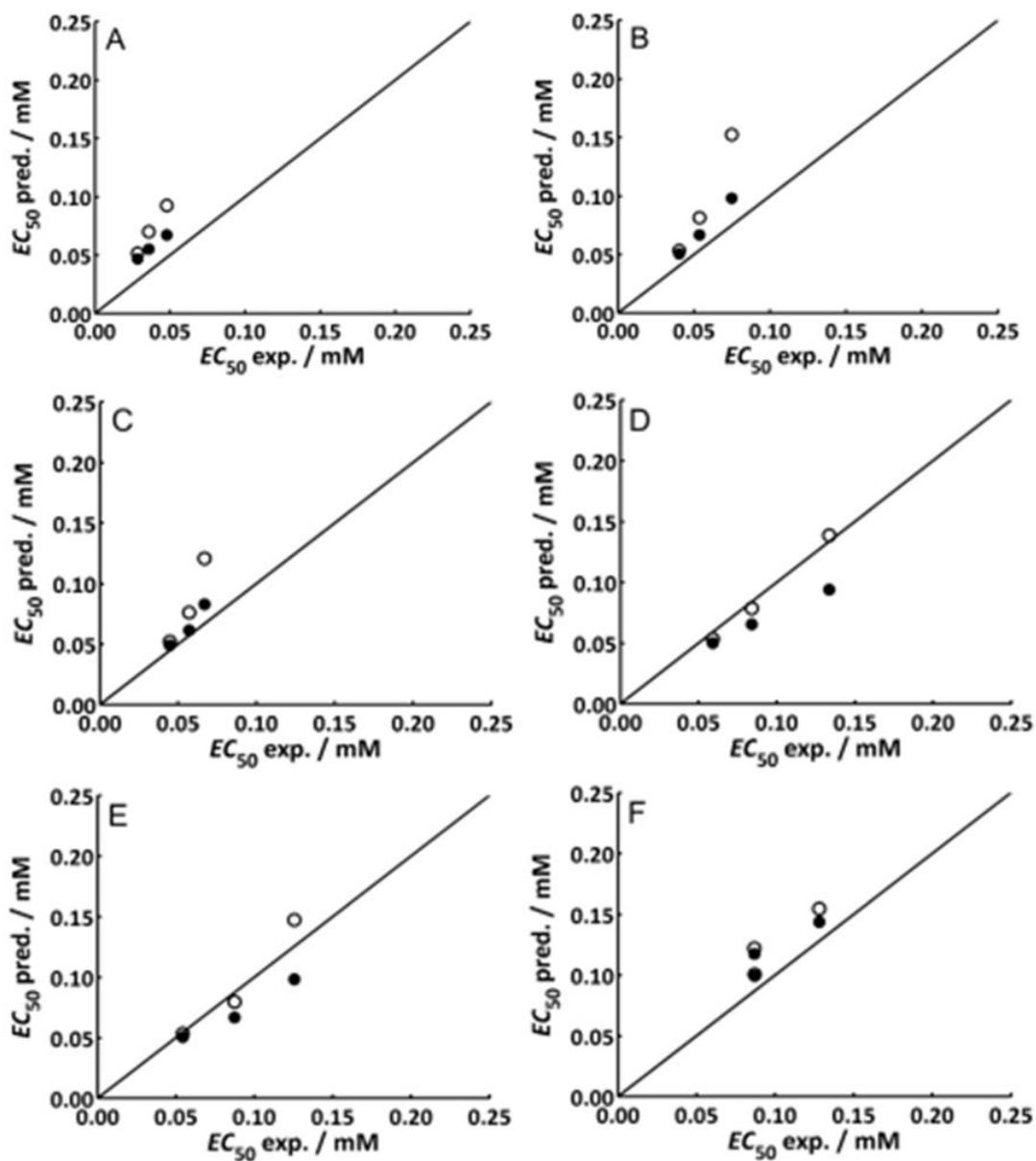
Gledajući dobivene izobolograme, vidljivo je da smjesa DCF-OTC pokazuje sinergizam, odnosno vrijednosti toksičnih jedinica za sva tri koncentracijska omjera nalaze se ispod crtkane izobole s vrijednostima 0,8. Kod smjese DCF-CBA sve točke nalaze se točno na granici od 0,8 pa možemo reći kako smjesa pokazuje potencijalno sinergističko djelovanje. Slično ponašanje vidljivo je i kod smjese DCF-DXM. Nadalje, promatrajući izobolograme za smjese DCF-AZM i DCF-ERM vidljivo je da su točke smještene s druge strane CA izobole, odnosno pojavljuje se potencijalno antagonističko djelovanje. Uočeno je da se antagonizam javlja povećanjem molarnog udjela AZM-a i ERM-a u binarnim smjesama. Antagonističko ponašanje u smjesama DCF-AZM i DCF-ERM prisutno je zbog utjecaja vrlo toksičnog DCF-a, koji možda suzbija utjecaj makrolidnih antibiotika na toksičnost. Nadalje, smjesa OTC-CBA, slično kao u slučaju DCF-CBA pokazuje potencijalno sinergističko djelovanje. Kod smjese OTC-DXM uočeno je aditivno ponašanje jer su sve točke unutar granica aditivnosti modela. Izobole OTC-AZM i OTC-ERM pokazuju potencijalno antagonističko djelovanje. Naime, utvrđeno je da oksitetraciklin potiče ugrađivanje luciferaze u katalitički aktivna mjesta

tako što stvara vodikove veze s triptofanom i serinom te na taj način utječe na kinetiku bioluminiscencije kod *Vibrio fischeri*. Također, može stvarati vodikovu vezu s glutaminskom kiselinom koja služi kao vezivno mjesto za fosfat u FMNH₂. S druge strane, AZM ne može poticati ugradnju luciferaze u aktivno mjesto zbog veličine molekulske strukture.¹⁰⁴ Situacija je slična i u kombinaciji s eritromicinom, koji je vrlo sličan eritromicinu po veličini i obliku molekule.

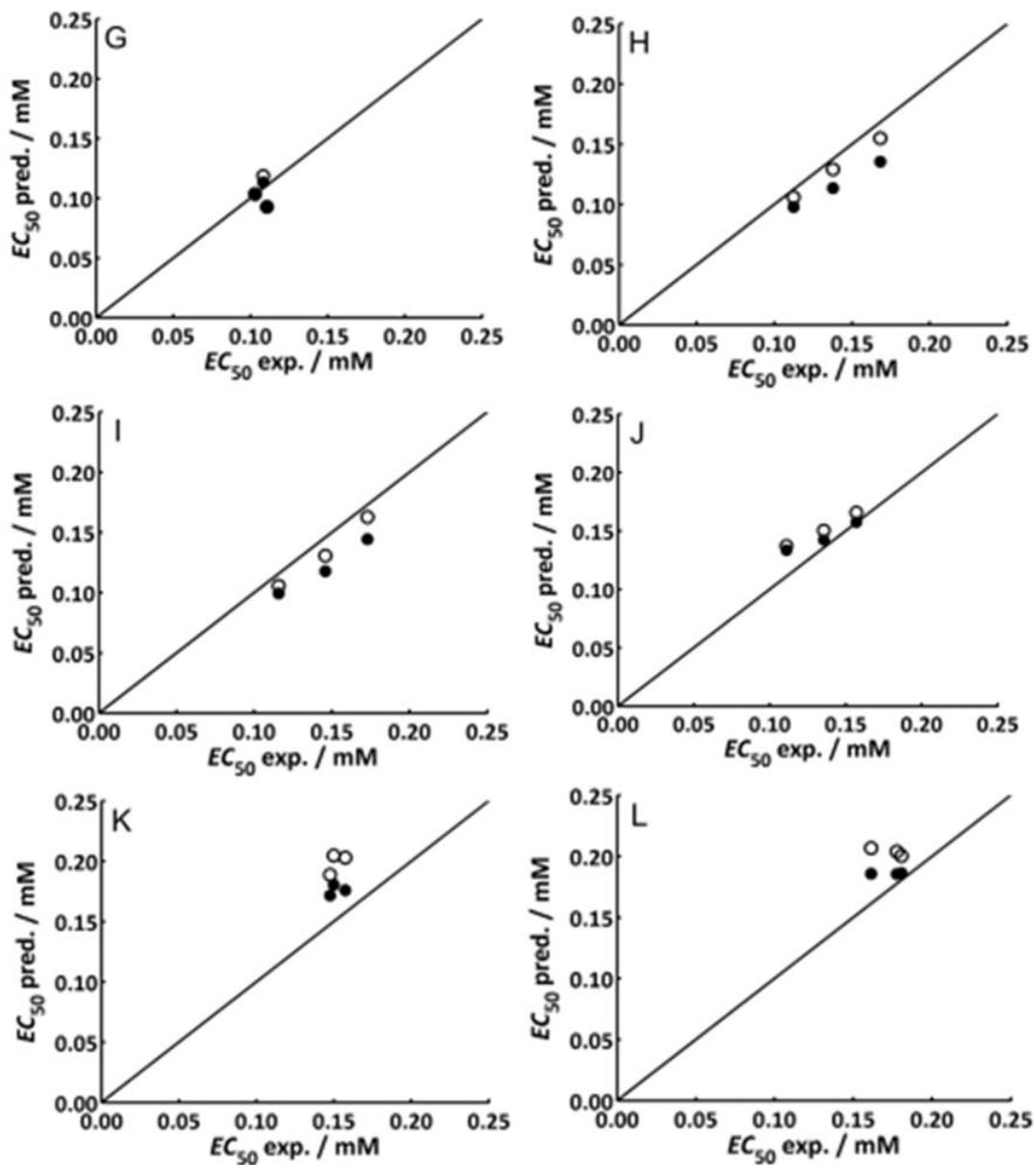
Kod ostalih binarnih smjesa nije uočeno sinergističko ili antagonističko ponašanje. Sve se točke nalaze unutar granica procjene, odnosno može se potvrditi aditivnost takvih smjesa. Analizirajući sve binarne smjese, uočeno je slično toksično djelovanje AZM i ERM, vjerojatno zbog njihove strukturne sličnosti. Također, uočeno je i slično toksično djelovanje DCF-a i OTC-a u binarnim smjesama.

4.2.2 Primjena IA modela na smjesama farmaceutika

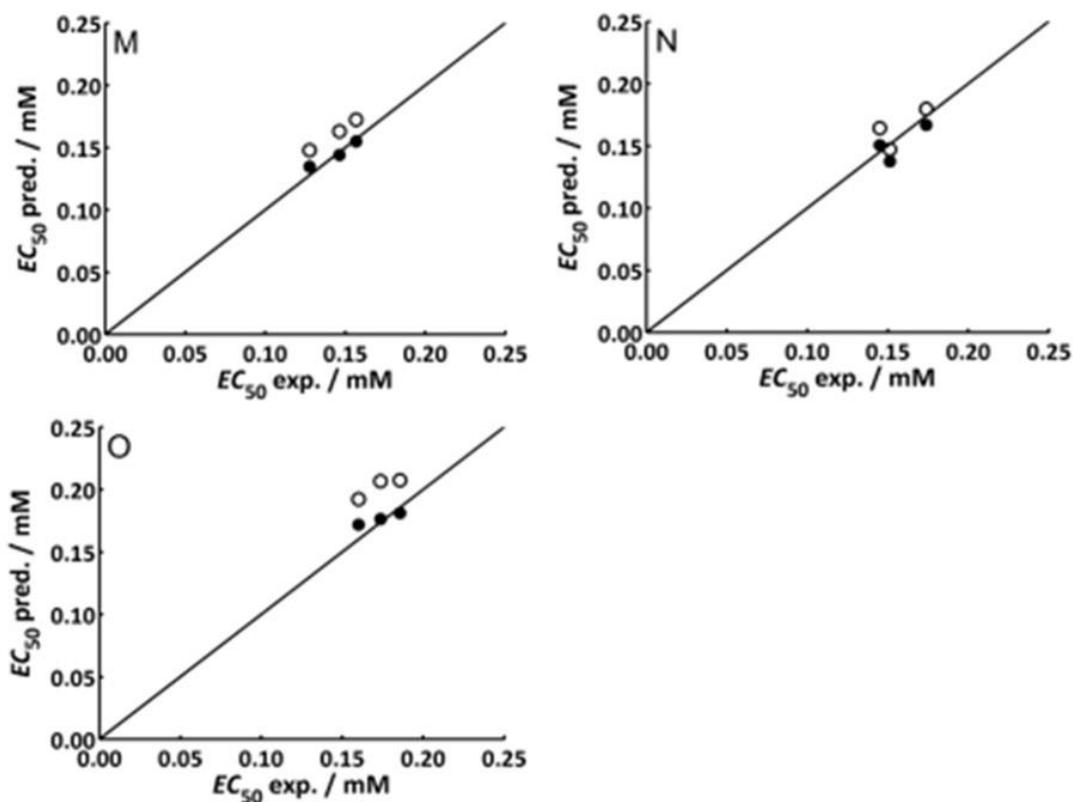
Model neovisnog djelovanja zasniva se na pretpostavci da svaka komponenta smjese ima različite mehanizme djelovanja te da svaka od njih neovisno djeluje na ispitivane organizme. Model neovisnog djelovanja razvijen je pri konstantnim molarnim omjerima onečišćivala u smjesama. Omjeri onečišćivala u smjesama jesu 25:75, 50:50 te 75:25. Uvrštavanjem vrijednosti inhibicije jednokomponentnih otopina farmaceutika u jednadžbu 5, dobivamo međuovisnost koncentracije onečišćivala odnosno smjese i odziva, koja nam daje traženu EC_{50} vrijednost. Rezultati primjene modela neovisnog djelovanja dani su slikama 10 - 12, gdje je prikaz ovisnosti EC_{50} vrijednosti predviđenih CA i IA modelima o EC_{50} vrijednosti određenih eksperimentalno. Pravac predstavlja slučaj kad su vrijednosti dobivene primjenom određenog modela jednake eksperimentalnim vrijednostima. Ispunjeni krugovi predstavljaju CA, a prazni IA model.



Slika 10. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalno dobivenih toksičnosti testiranih binarnih smjesa: A) DCF-OTC, B) DCF-CBA, C) DCF-DXM, D) DCF-AZM, E) DCF-ERM, F) OTC-CBA



Slika 11. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalno dobivenih toksičnosti testiranih binarnih smjesa: G) OTC–DXM, H) OTC–AZM, I) OTC–ERM, J) CBA–DXM, K) CBA–AZM, L) CBA–ERM



Slika 12. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalno dobivenih toksičnosti testiranih binarnih smjesa: M) DXM–AZM, N) DXM–ERM i O) AZM–ERM

Promatrajući dobivene grafove, vidljivo je kako se IA model pokazao boljim za smjese DCF-AZM, DCF-ERM, OTC-AZM i OTC-ERM, čime dokazuje neovisnost djelovanja pojedinih komponenata u smjesama za razliku od potencijalnog antagonizma kod CA modela. Nadalje, dobro predviđanje IA modela uočeno je i za smjesu oksitetraciklina i deksametazona. To dovodi do zaključka da oba modela mogu jednako dobro opisati toksično djelovanje ove smjese. Nadalje, za očekivati je da će oba modela dati slična predviđanja za smjese čije komponente imaju slične vrijednosti toksičnosti. Za smjese DXM-AZM i DXM-ERM razlike predviđanja CA i IA modela su relativno male. Toksični DXM u kombinaciji sa nisko toksičnim AZM i ERM rezultira suzbijanjem doprinosa ERM i AZM ukupnoj toksičnosti smjese što dovodi do prevladavanja djelovanja DXM na toksičnost u smjesi. Što se tiče smjese AZM-ERM, imamo kombinaciju dvaju slabo toksičnih spojeva, vrlo slične strukture. Za ostale se binarne smjese aditivni model pokazao znatno boljim u usporedbi s modelom neovisnog djelovanja.

4.3 Toksičnost binarnih smjesa pesticida

Osim na binarne smjese farmaceutika, fokus ovog istraživanja bio je i u ispitivanju toksičnosti binarnih smjesa pesticida. Tako je analizirano 18 binarnih smjesa pesticida, a rezultati modela te vrijednosti toksičnosti prikazani su u tablici 11. Toksičnost binarnih smjesa izražena je kao EC_{50} vrijednost u mM, dok R^2 daje informaciju o slaganju eksperimentalnih podataka s odabranim modelom određivanja toksičnosti. Uspoređujući vrijednosti toksičnosti binarnih smjesa, vidljivo je da smjese u kojima se nalazi klorfenvinfos imaju veću toksičnost. Također, uočeno je da porastom udjela klorfenvinfososa u smjesi, toksičnost takve smjese raste. Binarne smjese u kojima se nalazi slabo toksični alaklor, pokazale su najniže toksičnosti. Kako bi se ispitali toksični efekti binarnih smjesa, nije dovoljno samo usporediti EC_{50} vrijednosti, već je dobro primijeniti neke od teorijskih modela, što je i učinjeno u slijedećim poglavljima.

Tablica 11. Rezultati toksičnosti binarnih smjesa pesticida

| Broj | Smjesa | Omjer | R^2 | EC_{50} / mM |
|------|---------|-------------|--------|----------------|
| 1 | | 0,75 : 0,25 | 0,9935 | 0,124 |
| 2 | IPT-ALC | 0,50 : 0,50 | 0,9991 | 0,130 |
| 3 | | 0,25 : 0,75 | 0,9932 | 0,181 |
| 4 | | 0,75 : 0,25 | 0,9994 | 0,137 |
| 5 | IPT-DIU | 0,50 : 0,50 | 0,9992 | 0,157 |
| 6 | | 0,25 : 0,75 | 0,9911 | 0,226 |
| 7 | | 0,75 : 0,25 | 0,9992 | 0,119 |
| 8 | IPT-CFP | 0,50 : 0,50 | 0,9999 | 0,104 |
| 9 | | 0,25 : 0,75 | 0,9975 | 0,100 |
| 10 | | 0,75 : 0,25 | 0,9998 | 0,202 |
| 11 | ALC-DIU | 0,50 : 0,50 | 0,9912 | 0,243 |
| 12 | | 0,25 : 0,75 | 0,9957 | 0,229 |
| 13 | | 0,75 : 0,25 | 0,9905 | 0,173 |
| 14 | ALC-CFP | 0,50 : 0,50 | 0,9948 | 0,129 |
| 15 | | 0,25 : 0,75 | 0,9926 | 0,093 |
| 16 | | 0,75 : 0,25 | 0,9968 | 0,182 |

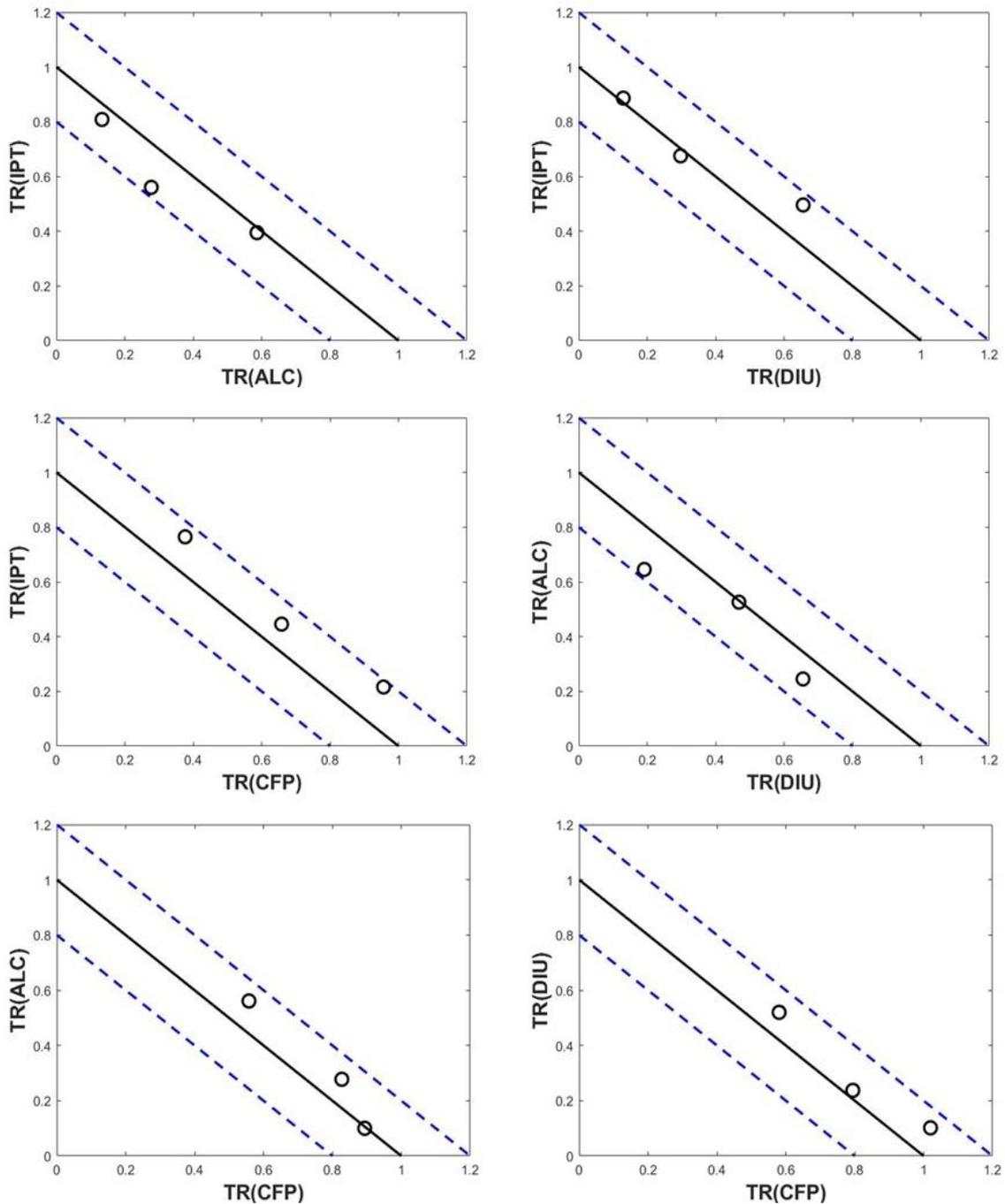
| | | | | |
|----|---------|-------------|--------|-------|
| 17 | DIU-CFP | 0,50 : 0,50 | 0,9935 | 0,124 |
| 18 | | 0,25 : 0,75 | 0,9973 | 0,107 |

4.3.1 Primjena CA modela na smjese pesticida i analiza međudjelovanja

Kao i kod farmaceutika, i kod pesticida su krivulje toksičnosti, odnosno međuovisnost koncentracije i odziva prikazane u dvodimenzionalnom obliku. Aditivni model opisan je jednadžbom 10 kako bi se dobio uvid u prikladnost modela za analizirane smjese. U idealnom je slučaju suma doprinosa pojedinih komponenti u smjesi jednaka jedan. U realnom slučaju, gdje imamo više onečišćivala, može doći do odstupanja od izobole. Ta odstupanja služe za karakterizaciju različitih učinaka u smjesama.

Izobologrami za ispitivane binarne smjese pesticida prikazane su na slici 13. Puna linija predstavlja odgovarajuću CA izobolu, dok dvije isprekidane linije predstavljaju granice predviđanja odnosno odstupanja od aditivnog modela (0,8 i 1,2). Svaka binarna smjesa prikazana je jedinicama toksičnosti (*TU*) koje se računaju prema jednadžbi 11.

Ukoliko se suma vrijednosti *TU* nađe izvan granica predviđanja, smjesa pokazuje sinergizam ($< 0,8$) odnosno antagonizam ($> 1,2$). Sinergističko ili antagonističko ponašanje smjese potvrđuje se ukoliko se točke na izobologramu nalaze izvan definiranih ograničenja. Ukoliko se točke na izobologramu nalaze na CA izoboli, može se potvrditi prikladnost aditivnog modela za opis toksičnog djelovanja pri toj kombinaciji onečišćivala u ispitivanom rasponu koncentracija.



Slika 13. Izobolografski prikaz toksičnosti smjese IPT-ALC, IPT-DIU, IPT-CFP, ALC-DIU, ALC-CFP, DIU-CFP

Promatrajući dobivene izobolograme, vidljivo je aditivno ponašanje u smjesi IPT-ALC jer se sve vrijednosti nalaze unutar granica aditivnosti. Međutim, analizirane se vrijednosti nalaze ispod CA izobole, što nam ukazuje na potencijalno sinergističko ponašanje ove smjese. Slično ponašanje može se uočiti kod smjese ALC-DIU, koja također pokazuje potencijalno

sinergističko djelovanje, iako su sve vrijednosti unutar granica predviđanja. Izraženo aditivno djelovanje uočeno je kod IPT-DIU smjese gdje se gotovo sve izmjerene vrijednosti nalaze na CA izoboli. Naime, sva tri analizirana pesticida: IPT, ALC i DIU jesu herbicidi koji djeluju na način da ometaju fotosintetske procese. Kako *Vibrio fischeri* nisu fotosintetski organizmi, ovaj mehanizam ne može imati utjecaj na toksičnost ovih smjesa. Na potencijalni sinergizam ovih binarnih smjesa, utjecaj ima neki drugi mehanizam, koji je sličan za sva tri ispitivana herbicida¹⁰⁵.

Kod IPT-CFP, ALC-CFP te DIU-CFP smjesa, uočeno je aditivno ponašanje. Međutim, kod sve tri smjese vidljivo je da se izmjerene vrijednosti nalaze iznad aditivne izobole što nas upućuje na potencijalno antagonističko djelovanje ovih smjesa. Potencijalni antagonizam u slučaju IPT-CFP može biti uzrokovan ponašanjem izoproturona u kombinaciji s ispitivanim insekticidom. Naime, izoproturon može uzrokovati endokrine poremećaje. Točnije, utječe na aktivaciju staničnog receptora Pregnana X čija je funkcija prepoznavanje stranih toksina u tijelu i regulacija proteina uključenih u detoksikaciju i čišćenje takvih supstanca iz stanice. Međutim, u kombinaciji s insekticidima, u ovom slučaju s klorfenvinfosom, izoproturon može utjecati na mehanizam djelovanja CFP-a tako da smanjuje njegovu aktivnost, a samim time dolazi do smanjenja toksičnosti ovakve smjese¹⁰⁵. Antagonizam uočen kod smjese DIU-CFP, može se pripisati strukturnoj sličnosti diurona s izoproturonom. Antagonizam smjese ALC-CFP javlja se zbog strukturne razlike ova dva pesticida te alaklora koji blokira mehanizam djelovanja CFP-a¹⁰⁶.

4.3.2 Primjena IA modela na smjesama pesticida

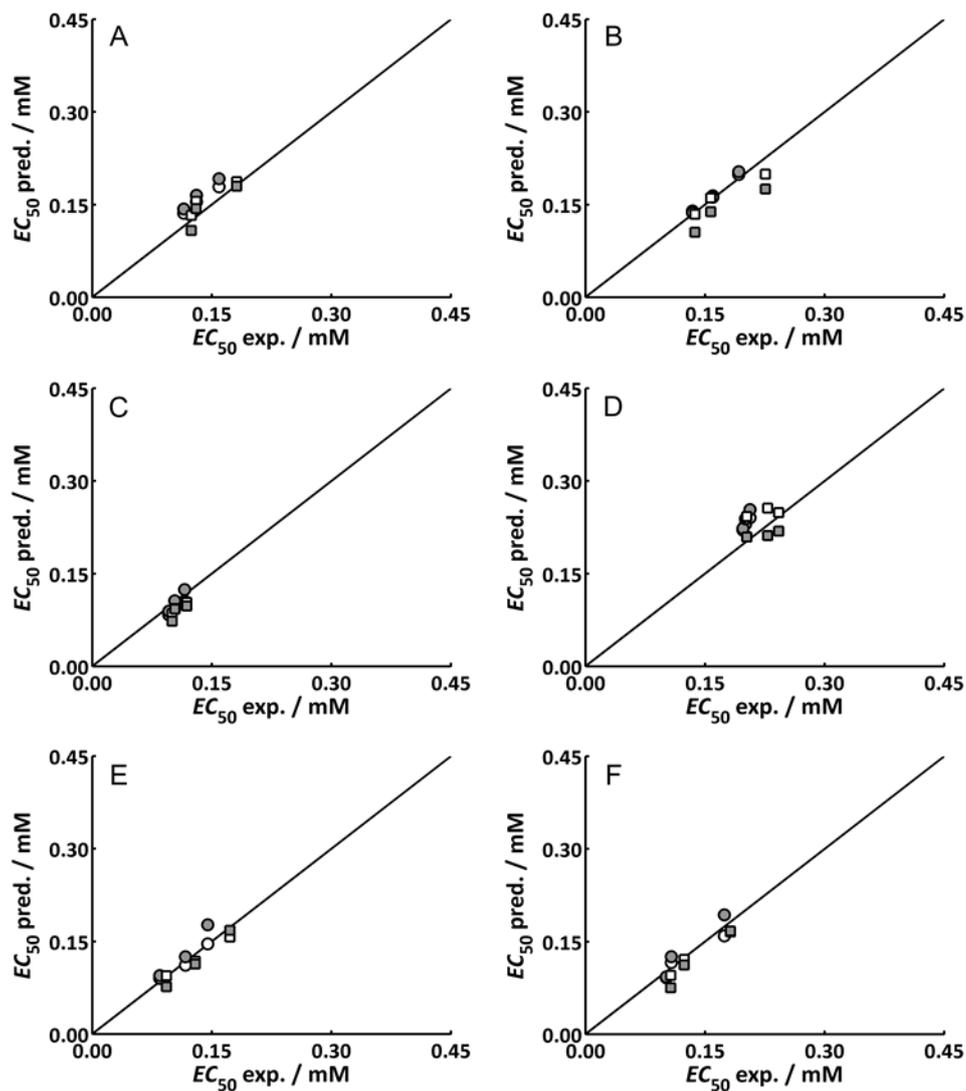
Osim aditivnog modela, za potrebe određivanja toksičnosti smjesa pesticida razvijen je i model neovisnog djelovanja. Omjeri onečišćivala u smjesama jesu 25:75, 50:50 te 75:25. Za potrebe modela korištena je jednadžba 4. Uvrštavanjem vrijednosti inhibicije za jednokomponentne otopine pesticida u jednadžbu 4. dobivena je vrijednost toksičnosti za binarnu smjesu. Rezultati primjene modela neovisnog djelovanja dani su slikom 14, gdje je prikaz ovisnosti EC_{50} vrijednosti predviđenih CA i IA modelima o EC_{50} vrijednosti određenih eksperimentalno. Pravac predstavlja slučaj kad su vrijednosti dobivene primjenom određenog modela jednake eksperimentalnim vrijednostima.

Gledajući grafove dobivene IA modelom, uočavamo da se razlike vrijednosti predviđene linearnim i logaritamskim modelom pojavljuju u svim slučajevima, bez obzira na inhibicijsku vrijednost. Razlike nisu prevelike, no njihovo postojanje ukazuje na činjenicu da

bi odabir krivog modela mogao utjecati na konačne zaključke. Također, vidljivo je kako linearni model u nekim slučajevima pokazuje niže toksičnosti od logističkog što ukazuje na nedostatke prilikom ekstrapolacije podataka.

Nadalje, kod smjesa IPT-ALC, ALC-CFP, DIU-CFP pokazalo se da aditivni model bolje opisuje toksičnost tih smjesa od IA modela. Kod smjese IPT-ALC vidimo bolje predviđanje linearnim modelom, dok se kod smjesa ALC-CFP i DIU-CFP bolja procjena postiže logaritamskim modelom.

Kod smjesa IPT-DIU, IPT-CFP i ALC-DIU uočeno je podudaranje IA i CA modela, odnosno oba modela jednako dobro procjenjuju toksičnost ovih smjesa. Za smjese IPT-DIU i IPT-CFP bolja procjena toksičnosti dobivena je logaritamskim modelom, dok se kod smjese ALC-DIU kao bolji model pokazao linearni.



Slika 14. Grafički prikaz predviđenih i eksperimentalno dobivenih toksičnosti testiranih binarnih smjesa: A) IPT-ALC, B) IPT-DIU, C) IPT-CFP, D) ALC-DIU, E) ALC-CFP, F) DIU-CFP. Krugovi odgovaraju podacima dobivenim koristeći logistički model, dok kvadrati odgovaraju linearnom modelu. Ispunjeni krugovi i kvadrati predstavljaju IA, dok prazni predstavljaju CA model.

5. ZAKLJUČAK

Svjesni problema koji oni predstavljaju, sve više istraživanja, pa tako i ovo, posvećeno je pesticidima i farmaceuticima koji u vode dospijevaju izravno ili u obliku razgrađenih produkata odnosno metabolita. Međutim, pesticidi i farmaceutici u okolišu postoje u obliku smjesa. Svjesni opasnosti djelovanja takvih smjesa, ovo je istraživanje usmjereno ka ispitivanju ekotoksičnosti višekomponentnih sustava.

Tako je odabrano šest farmaceutika: azitromicin, eritromicin, karbamazepin, oksitetraciklin, deksametazon i diklofenak, te četiri pesticida: alaklor, izoproturon, diuron i klorfenvinfos u svrhu određivanja toksičnosti na luminiscentnim bakterijama *Vibrio fischeri*. Proveden je standardizirani test toksičnosti u trajanju od 15 minuta, a analizirane su jednokomponentne otopine farmaceutika i pesticida te njihove binarne smjese. Za predviđanje toksičnosti binarnih smjesa farmaceutika i pesticida primijenjena su dva najistaknutija modela: aditivni model (CA) i model neovisnog djelovanja (IA).

Prema dobivenoj EC_{50} vrijednosti izraženoj u mM toksičnost čistih farmaceutika raste u nizu: ERM < CBA < AZM < DXM < OXT < DCF, dok kod pesticida raste u nizu: DIU < ALC < IPT < CFP. Ispitivanjem binarnih smjesa farmaceutika, uočeno je sinergističko ponašanje kod smjesa DCF-OTC, DCF-CBA te OTC-CBA. Antagonizam je uočen u smjesama eritromicina i azitromicina s DCF-om i OXT-om. Kod ostalih binarnih smjesa farmaceutika uočeno je aditivno ponašanje. Što se tiče binarnih smjesa pesticida, uočen je sinergizam kod smjesa IPT-ALC i ALC-DIU. Sve smjese u kojima se nalazi klorfenvinfos pokazale su potencijalno antagonističko ponašanje.

Iz provedenih analiza, dobivene su vrijedne informacije o toksičnosti i interakcijama koje se mogu koristiti pri procjeni opasnosti pojave binarnih smjesa u okolišu. Također, analizirana onečišćivala mogu se grupirati u skupine prema načinu djelovanja, što može biti korisno u predviđanju toksičnosti višekomponentnih sustava. Nadalje, na temelju provedene analize, može se zaključiti kako je toksičnost nekih sustava veća od toksičnosti zasebnih komponenata koje čine takav sustav. Uzimajući u obzir dobivene rezultate i činjenicu da se onečišćivala u okolišu ne nalaze zasebno, već dolaze u obliku raznih smjesa, važno je fokus i daljnja istraživanja usmjeriti prema višekomponentnim sustavima.

6. LITERATURA

1. The United Nations World Water Development Report 2014, Water And Energy, Vol 1, 2014., UNESCO CLD, Paris, 2014., 22–28.
2. V. Geissena, H. Molb, E. Klumppc, G. Umlaufd, M. Nadale, M. van der Ploega, S. van de Zeea, C. J. Ritsemaa, Emerging Pollutants In The Environment: A Challenge For Water Resource Management, *International Soil and Water Conservation Research*, 3 (2015) 57–65.
3. European Union, Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, *Official Journal*, 226 (2013) 1–17.
4. M. K. Hill, Understanding Environmental Pollution, Cambridge University Press, New York, 2010, 457–458.
5. R. R. Zepon Tarpani, C. Alfonsin, A. Hospido, A. Azapagic, Life cycle environmental impacts of sewage sludge treatment methods for resource recovery considering ecotoxicity of heavy metals and pharmaceutical and personal care products, *Journal od Environmental Managment*, 260 (2020)
6. http://www.fzoeu.hr/hr/zastita_okolisa/ (pristupio 12. 10. 2019.)
7. <https://www.europarl.europa.eu/factsheets/hr/sheet/71/politika-zastite-okolisa-opca-nacela-i-osnovni-okvir> (pristupio 12. 10. 2019.)
8. https://ec.europa.eu/environment/international_issues/index_en.htm (pristupio 12. 10. 2019.)
9. Hrvatski sabor, Zakon o zaštiti okoliša NN 110/07 (2007)
10. European Commision, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, *Official Journal of European Commision*, 327 (2000) 1–72.
11. M. la Farre, S. Perez, L. Kantiani, D. Barcelo, Fate And Toxicity Of Emerging Pollutants, Their Metabolites And Transformation Products In The Aquatic Environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2013) 991–1007.
12. European Commision, Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status, *Official Journal of European Commision*, 201 (2009) 64–66.
13. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji*, 65 (2016) 471–482.

14. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the Environment, *The Annual Review of Environment and Resources*, 35 (2010) 57–75.
15. G. Rimkus, Polycyclic musk fragrances in the aquatic environmental, *Toxicological Letters*, 111 (1999) 37–56.
16. N. Le – Minh, S. J. Khan, R. M. Stuetz, Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes, *Water research*, 44 (2010) 4295–4323.
17. A. Y. C. Lin, T. H. Yu, C. F. Lin, Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams, Risk to aqueous environments in Taiwan. *Chemosphere*, 74 (2008) 131–141.
18. J. P. Bound, N. Voulvoulis, Household Disposal of Pharmaceuticals as a Pathway for Aquatic Contamination in the United Kingdom, *Environ Health Perspect*, 113 (2005) 1705–1711.
19. M. Stumpf, T. A. Ternes, K. Haberer, P. Seel, W. Baumann, Determination of pharmaceuticals in sewage plants and river water, *Vom Wasser*, 86 (1996) 291–303.
20. J. Brausch, K. Connors, B. Brooks, G. Rand, Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Review of Recent Toxicological Studies and Considerations for Toxicity Testing, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 218 (2012) 93–99.
21. A. M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (2013) 649–666.
22. M. Wu, D. Atchley, L. Greer, S. Janssen, D. Rosenberg, J. Sass, Dosed without prescription: preventing pharmaceutical contamination of our nation’s drinking water, NRDC white paper, 2010. 12–14.
23. J. Akhtar, N. A. S. Amin, K. Shahzad, A review on removal of pharmaceuticals from water by adsorption, *Desalination and Water Treatment*, 57 (2015) 1–19.
24. O. Miarov, A. Tal, D. Avisar, A critical evaluation of comparative regulatory strategies for monitoring pharmaceuticals in recycled wastewater, *Journal of Environmental Management* 254 (2020), 109794.
25. A. Jelić, M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barcelo, Emerging and Priority Pollutants in Rivers. Springer, *Occurrence and Elimination of Pharmaceuticals during Conventional Wastewater Treatment* (2012) 1–23.
26. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, 24 (2016) 119–136.

27. M. Oetken, G. Nentwig, D. Löffler, T. Ternes, J. Oehlmann, Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49 (2005) 353–361.
28. M. J. Benotti, R. A. Trenholm, B. J. Vanderford, J. C. Holady, B. D. Stanford, S. A. Snyder, Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 597–603.
29. J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Me-teyer, B. A. Rideout, H. L. Shivaprasada, S. Ahmed, M. J. I. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A. A. Khan, Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan, *Nature*, 427 (2004) 630–633.
30. T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, J. Klaminder, Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations, *Science*, 339 (2013) 814–815.
31. D. C. Love, S. Rodman, R. A. Neff, K. E. Nachman, Veterinary Drug Residues in Seafood Inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 7232–7240.
32. T. Malchi, Y. Maor, G. Tadmor, M. Shenker, B. Chefetz, Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks, *Environmental Science & Technology*, 48 (2014) 9325–9333.
33. A. M. Deegan, M. Shaik, K. Nolan, U. K. Urell, J. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (2011) 649–666.
34. M. Bedner, W. A. MacCrehan, Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzo-quinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine, *Environmental Science & Technology*, 40 (2006) 516–522.
35. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azithromycin> (pristupio 25. 10. 2019.)
36. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythromycin> (pristupio 25. 10. 2019.)
37. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbamazepine> (pristupio 25. 10. 2019.)
38. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxytetracycline> (pristupio 25. 10. 2019.)
39. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone> (pristupio 25. 10. 2019.)
40. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (pristupio 25. 10. 2019.)
41. W. Schonfeld, S. Mutak, Azithromycin and novel azalides, *Macrolide Antibiotic*, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland (2004) 73–94.

42. M. Voigt, M. Jaeger, On the photodegradation of azithromycin, erythromycin and tylosin and their transformation products - A kinetic study, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5 (2017) 131–140.
43. B. A. Shoushtari, G. Pazuki, J. R. Shahrouzi, S. Shahriari, N. Hadidi, Separation of erythromycin using aqueous two-phase system based on acetonitrile and carbohydrates, *Fluid Phase Equilibria*, 505 (2020) 112360.
44. G. J. Akorede, S. F. Ambali, M. G. Hudu, A. O. Olatunji, M. Shittu, A. Aremu, A. Basiru, K. T. Biobaku, A. O. Ahmed, S. A. Ameen, Protective effect of vitamin C on chronic carbamazepine-induced reproductive toxicity in male wistar rats, *Toxicology Reports*, 7 (2020) 269–276.
45. H. Chen, X. Wang, W. Bi, Y. Wu, W. Dong, Photodegradation of carbamazepine with BiOCl/Fe₃O₄ catalyst under simulated solar light irradiation, *Journal of Colloid and Interface Science*, 502 (2017) 89–99.
46. S. N. Gharajalar, P. Shahbazi, Distribution of oxytetracycline resistance genes in *E. coli* isolated from pigeon faecal samples, *Journal of Exotic Pet Medicine*, 33 (2020) 14–17.
47. Y. Liu, X. He, Y. Fu, D.D. Dionysiou, Degradation Kinetics and Mechanism of Oxytetracycline by Hydroxyl Radical-based Advanced Oxidation Processes, *Chemical Engineering Journal*, 284 (2016) 1317–1327.
48. Halmed, Sažetak opisa svojstava lijeka: Dexamethason Krka 4 mg/ml otopina za injekciju ili infuziju, 2013
49. Z. Guo, A. Guo, Q. Guo, M. Rui, Y. Zhao, H. Zhang, S. Zhu, Decomposition of Dexamethasone by gamma irradiation: Kinetics, degradation mechanisms and impact on algae growth, *Chemical Engineering Journal*, 307 (2017) 722–728.
50. Y. Zhanh, S. U. Geissen, C. Gal, Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, *Chemosphere*, 73 (2008), 1151-1161
51. X. Lua, Y. Shaoa, N. Gaoa, J. Chenc, Y. Zhanga, H. Xianga, Y. Guoa, Degradation of diclofenac by UV-activated persulfate process: Kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141 (2017) 139–147.
52. <https://www.agroklub.com/zastitna-sredstva/> (pristupio 5. 11. 2019.)
53. W.-X. Liu, Y. Wang, W. He, N. Qin, X. Z. Kong, Q. S. He, B. Yang, C. Yang, Y. J. Jiang, S. E. Jorgensen, F. L. Xu, Aquatic biota as potential biological indicators of the contamination, bioaccumulation and health risks caused by organochlorine pesticides in

- a large, shallow Chinese lake (Lake Chaohu), *Ecological Indicators*, 60 (2016) 335–345.
54. European Commission, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Official Journal of European Commission*, 330 (1998) 32–54.
 55. C. Lourencetti, M. R. R. Marchi, M. L. Ribeiro, Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV, *Talanta*, 77 (2008) 701–709.
 56. https://www.voda.hr/sites/default/files/dokumenti/utjecaj_poljoprivrede_na_oneciscenje_povrsinskih_i_podzemnih_voda_u_republici_hrvatskoj.pdf (pristupio 6. 11. 2019.)
 57. Z. Ostojić, Sredstva za zaštitu bilja i vode, *Glasilno biljne zaštite* 1 (2013) 9–11.
 58. R. M. de Souza, D. Seibert, H. B. Quesada, F. de Jesus Bassetti, M. R. Fagundes – Klen, R. Bergamasco, Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water, *Process Safety and Environmental Protection*, 135 (2020) 22–37.
 59. R. Hoff, A. D. Echeverria, G. D. Hoff, R. C. Kneip, L. Jank, J. Arsand, F. F. Gonçalves, Efficiency of a low-cost pyramid-shaped solar still for pesticide removal from highly contaminated water, *Chemosphere*, 234 (2019) 427–437.
 60. A. Bokulić, Ž. Budinščak, R. Turk, M. Ševar i dr.: Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja, 2015.
 61. K. L. Bassil, C. Vakil, M. Sanborn, D. C. Cole, J. S. Kaur, K. J. Kerr Cancer health effects of pesticides: *Systematic review Can Fam Physician*, 53 (2007) 1704–1711.
 62. T. Sofilić, Onečišćenje i zaštita tla, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak, 2014.
 63. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alachlor> (pristupio 8. 11. 2019.)
 64. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoproturon> (pristupio 8. 11. 2019.)
 65. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diuron> (pristupio 8. 11. 2019.)
 66. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorfenvinphos> (pristupio 8. 11. 2019.)
 67. World Health Organization, Alachlor In Drinking-Water, Guidelines For Drinking-Water Quality, Health Criteria And Other Supporting Information, Geneva, 2 (1996) 297–298.
 68. A. R. F. Pipi, A. R. De Andrade, E. Brillas, I. Sirés, Total removal of alachlor from water by electrochemical processes, *Separation and Purification Technology*, 132 (2014) 674–683.

69. S. Zeng, X. Qin, L. Xia, Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems, *Biochemical Engineering Journal*, 119 (2017) 92–100.
70. Y. Si, M. Wang, C. Tian, J. Zhou, D. Zhou, Effect of charcoal amendment on adsorption, leaching and degradation of isoproturon in soils, *Journal of Contaminant Hydrology*, 123 (2011) 75–81.
71. M. Zbair, A. El Hadrami, A. Bellarbi, M. Monkade, A. Zradba, R. Brahmi, Herbicide diuron removal from aqueous solution by bottom ash: Kinetics, isotherm, and thermodynamic adsorption studies, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8 (2020) 103667
72. W. Khongthong, G. Jovanovic, A. Yokochi, P. Sangvanich, V. Pavarajarn, Degradation of diuron via an electrochemical advanced oxidation process in microscale-based reactor, *Chemical Engineering Journal*, 292 (2016) 298–307.
73. R. M. Fernández Domene, G. Roselló-Márquez, R. Sánchez-Tovar, B. Lucas-Granados, J. García-Antón, Photoelectrochemical removal of chlorfenvinphos by using WO₃ nanorods: Influence of annealing temperature and operation pH, *Separation and Purification Technology*, 212 (2019) 458–464.
74. B. Szatkowska, M. Kwiatkowska, J. Michałowicz, P. Sicinska, B. Huras, B. Bukowska, Impact of chlorfenvinphos, an organophosphate insecticide on human blood mononuclear cells (in vitro), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102 (2012) 175–181.
75. D. Đikić, H. Glavač, V. Glavač, V. Hršak, V. Jelavić, D. Njegač, V. Simončić, O. P. Springer, I. Tomašković, V. Vojvodić, *Ekološki leksikon. BARBAT*, Zagreb, 2001.
76. S. Korunić-Košćina, M. Mioč, V. Bobić, Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, *Goriva i maziva*, 42 (2003) 153–176.
77. P. Pessala, E. Schultz, T. Nakari, A. Joutti, S. Herveb, Evaluation of wastewater effluents by small-scale biotests and a fractionation procedure, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59 (2004) 263–272.
78. Working Group of the Federal States on Water Problems, Recommendation on the Deployment of Continuous Biomonitoring for the Monitoring of Surface Waters, Berlin, 1998, 6–17.
79. S. Parvez, C. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* 32 (2006) 265–268.

80. M. Abbas, M. Adil, S. Ehtisham-ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, M. Iqbal, *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, *Science of The Total Environment* 626 (2018) 1295–1309.
81. T. Backhaus, K. Froehner, R. Altenburger, L. H. Grimme, Toxicity testing with *Vibrio Fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay, *Chemosphere*, 35 (1997) 2925–2938.
82. J. Kim, S. Kim, G. E. Schaumann, Reliable predictive computational toxicology methods for mixture toxicity: toward the development of innovative integrated models for environmental risk assessment: A review, *Environmental Science and Bio/Technology*, 12 (2013) 235–256.
83. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf (pristupio 28. 3. 2020.)
84. R. Altenburger, T. Backhaus, W. Boedeker, M. Faust, M. Scholze, L. Horst Grimme, Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals, *Environmental Toxicology and Chememisty*, 19 (2000) 2341–2347.
85. A. Puckowski, S. Stolte, M. Wagil, M. Markiewicz, P. Łukaszewicz, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220 (2017) 575–582.
86. R. Altenburger, M. Nendza, G. Schüürmann, Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships, *Environmental Toxicology and Chememisty*. 22 (2003) 1900–1915.
87. M. Mwense, X. Z. Wang, F. V. Buontempo, N. Horan, A. Young, D. Osborn, QSAR approach for mixture toxicity prediction using independent latent descriptors and fuzzy membership functions, *SAR and QSAR in Environmental Research*, 17 (2006) 53–73.
88. A. R. Katritzky, M. Kuanar, S. Slavov, C. D. Hall, M. Karelson, I. Kahn, D. A. Dobchev, Quantitative Correlation of Physical and Chemical Properties with Chemical Structure: Utility for Prediction, *Chemical Reviews*, 110 (2010) 5714–5789.
89. https://bandelin.com/datenblaetter/DT/DT_514_BH_BANDELIN.pdf (Pristupio 2. 4. 2020.)
90. <https://www.mn-net.com/media/pdf/e4/0d/ea/Instruction-940008-Luminometer-BioFix-Lumi-10-for-luminous-bacteria-toxicity-tests-EN.pdf> (Pristupio 2. 4. 2020.)
91. <https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/naled/appendix-i.pdf> (Pristupio 2. 4. 2020.)

92. C. A. Staples, W. J. Adams, T. F. Parkerton, J. W. Gorsuch, G. R. Biddinger, K. H. Reinert, Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (1997) 875–891.
93. Y. Dong, Z. Fang, Y. Xu, Q. Wang, X. Zou, The toxic effects of three active pharmaceutical ingredients (APIs) with different efficacy to *Vibrio fischeri*, *Emerging Contaminants*, 5 (2019) 297–302.
94. S. O. de Garcia, P. A. Garcia – Encina, G. P. Pinto, R. Irusta, Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants, *Ecotoxicology*, 23 (2014) 1517–1533.
95. G. W. Amsden, Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: are the differences real? *Clinical Therapeutics*, 18 (1996) 56–72.
96. Y. Kim, K. Choi, J. Jung, S. Park, P. G. Kim, J. Park, Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environment International*, 33 (2007) 370–375.
97. M. Della Greca, A. Fiorentino, M. Isidori, M. Lavorgna, L. Previtiera, M. Rubino, F. Temussi, Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms, *Chemosphere*, 54 (2004) 629–637.
98. C. E. Taveira Parente, J. Sierra, E. Martí, Ecotoxicity and biodegradability of oxytetracycline and ciprofloxacin on terrestrial and aquatic media. *Orbital – Electronic Journal of Chemistry*, 10 (2018) 262–271.
99. X. H. Wang, L. Y. Fan, S. Wang, Y. Wang, L. C. Yan, S. S. Zheng, C. J. Martyniuk, Y. H. Zhao, Relationship between acute and chronic toxicity for prevalent organic pollutants in *Vibrio fischeri* based upon chemical mode of action. *Journal of Hazardous Materials*, 338 (2017) 458–465.
100. L. Guzzella, S. Galassi, Chemical and toxicological characterization of river water extracts with the *Vibrio fischeri* photobacterium. *Science of Total Environment*, 134 (1997) 1217–1226.
101. S. Villa, S. Migliorati, G. S. Monti, M. Vighi, Toxicity on the luminesce bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86 (2012) 93–100.
102. C. Tixier, L. Meunier, F. Bonnemoy, P. Boule, Phototransformation of three herbicides: chlorbufam, isoproturon, and chlorotoluron, Influence of irradiation on toxicity, *International Journal of Photoenergy*, 2 (2000) 1–8.

103. A. M. Polo, M. Tobajas, S. Sanchis, A. F. Mohedano, J. J. Rodriguez, Comparison of experimental methods for determination of toxicity and biodegradability of xenobiotic compounds, *Biodegradation*, 22 (2011) 751–761.
104. M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli, L. Pascarella, A. Parrella, Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Science of the Total Environment*, 346 (2005) 87–98.
105. A. F. Hernandez, T. Parron, A. M. Tsatsakis, M. Requena, R. Alarcon, O. Lopez-Guarnido, Toxic effects of pesticides mixtures at a molecular level: Their relevance to human health, *Toxicology*, 307 (2013) 136–145.
106. C. V. Rider, G. A. LeBlanc, An integrated addition and interaction model for assessing toxicity of chemical mixtures, *Toxicological Sciences*, 87 (2005) 520–528.

ŽIVOTOPIS

Edi Radin ██████████ Osnovnu školu pohađao je u Fažani, a 2011. godine upisuje Opću gimnaziju u Puli. Maturirao je 2015. godine te odlazi u Zagreb gdje upisuje studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Za vrijeme preddiplomskog studija odradio je stručnu praksu u Tvornici duhana Rovinj d.o.o. Završni rad na temu „Oksidacija prioriternih onečišćivala feratom(VI)“ izradio je pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Šime Ukića te ga uspješno obranio 2018. godine čime je stekao zvanje prvostupnika primijenjene kemije. Iste godine, upisuje diplomski studij Primijenjene kemije, modul Kemija okoliša.

Tijekom studiranja, aktivno je pomagao u izvođenju nastave pa je tako obavljao dužnost demonstratora na laboratorijskim vježbama koje su se odvijale na Zavodu za analitičku kemiju i Zavodu za opću i anorgansku kemiju.