

# Ekotoksičnost komunalnih otpadnih voda prije obrade membranskim procesima

---

**Andrić, Darko**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:149:726254>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Darko Andrić**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, rujan 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Darko Andrić**

**EKOTOKSIČNOST KOMUNALNIH OTPADNIH VODA PRIJE OBRAD**  
**MEMBRANSKIM PROCESIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Doc. dr. sc. Davor Dolar

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Ovaj rad sufinanciran je od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 i od strane Vlade Republike Hrvatske projektom ReHOHMem, a izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2017./2018. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



Vlada  
Republike  
Hrvatske

**Izravna uporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje membranskim tehnologijama  
(ReHOHMem)**

*Projekt se financira u sklopu Programa Vlade Republike Hrvatske za poticanje istraživačkih i razvojnih aktivnosti u području klimatskih promjena za razdoblje od 2015. do 2016. godine*

*\*Sadržaj ove publikacije isključiva je odgovornost Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije*



REPUBLIKA HRVATSKA  
MINISTARSTVO ZAŠTITE  
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti  
obrazovanja i sporta



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA I  
ENERGETSKU UČINKOVITOST



**HRZZ**  
Hrvatska zaklada  
za znanost

## SAŽETAK

### EKOTOKSIČNOST KOMUNALNIH OTPADNIH VODA PRIJE OBRADE MEMBRANSKIM PROCESIMA

U novije vrijeme svjedočimo sve nezdravijem načinu života, što je dovelo do ekspanzije farmaceutske industrije. Osim toga, populacija ljudi na Zemlji je u procesu eksponencijalnog rasta te se susrećemo sa izazovom prehranjivanja velikog broja ljudi. Za to su neizbježni pesticidi, koji zajedno s farmaceuticima čine skupinu „novih zagađivala“, točnije toksičnih supstanci koje se nedvojbeno nalaze u vodenom okolišu. Njihovo uklanjanje je nužno iz više razloga, a konvencionalne metode su se pokazale neučinkovitima. Kako bismo bolje razumjeli problem i pronašli učinkovitu metodu eliminacije ovih spojeva u prirodi, prvi korak je upravo analiza otpadnih voda.

U ovom radu je mjerena toksičnost uzoraka otpadnih voda u Čakovcu pomoću luminiscirajućih bakterija *Vibrio fischeri* koje su osjetljive na organska onečišćenja. Rezultati su pokazali da većina uzoraka nije toksična. Cilj je, međutim, potpuno ukloniti bilo kakve toksine iz prirode.

#### **Ključne riječi:**

*Farmaceutici, pesticidi, voda, Vibrio fischeri, toksičnost, otpadne vode, Čakovec*

## **ABSTRACT**

### **ECOTOXICITY OF MUNICIPAL WASTEWATER BEFORE TREATMENT BY MEMBRANE PROCESSES**

In recent time we witness people leading very unhealthy lifestyles, which led to an expansion of pharmaceutical industry. Besides that, the world population faces an exponential growth and consequently we face the challenge of feeding a great number of people. Pesticides are unavoidable in the food industry and they are, along with pharmaceuticals, referred to as the „emerging contaminants“. To be more exact, they are toxins that are undoubtedly present in the aquatic environment. Their removal is necessary for several reasons, but conventional methods have proved to be ineffective. First step in understanding this problem and finding a solution in wastewater treatment is analysis of municipal wastewaters.

The aim of this paper was to measure and determine the toxicity of samples of municipal wastewaters in the city of Čakovec using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* that are sensitive to organic pollutants. The results have shown that most of the samples are not toxic. The goal is, however, to completely eliminate any toxins from the environment.

#### **Key words:**

*Pharmaceuticals, pesticides, water, Vibrio fischeri, toxicity, wastewaters, Čakovec*

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	OPĆI DIO .....	3
2.1.	MEĐIMURSKE VODE .....	3
2.1.1.	ČAKOVEČKE OTPADNE VODE.....	3
2.1.2.	KOMUNALNE VODE .....	3
2.2.	UZORKOVANJE VODA .....	4
2.3.	TOKSIČNOST .....	6
2.3.1.	ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI POMOĆU BAKTERIJA <i>Vibrio fischeri</i> .....	7
2.3.2.	BIOLUMINISCENTNA METODA – DIN 38412 – L34.....	8
2.3.3.	ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI.....	8
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1.	MATERIJALI .....	11
3.1.1.	KORIŠTENE KEMIKALIJE.....	11
3.2.	INSTRUMENT ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI.....	12
3.3.	POSTUPAK ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI.....	13
3.3.1.	PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE.....	13
3.3.2.	PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU .....	14
3.3.3.	PRIPREMA RADNE OTOPINE ZA RESUSPENZIJU I OTOPINE REFERENTNIH TVARI .....	15
3.3.4.	STERILNA TEHNIKA RADA .....	15
3.3.5.	AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA.....	16
3.3.6.	PRECJEPLJIVANJE BAKTERIJSKE KULTURE.....	17
3.3.7.	PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE .....	17
3.4.	MJERENJE TOKSIČNOSTI.....	18
3.4.1.	PRIPREMA MJERENJA .....	18

3.4.2. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA.....	19
3.4.3. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA .....	20
4. REZULTATI I OBRADA REZULTATA.....	21
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. LITERATURA.....	29
7. DODACI.....	31
7.1. POPIS SLIKA .....	31
7.2. POPIS TABLICA.....	32



## 1. UVOD

Usporedno s razvojem tehnologije od kraja sedamdesetih godina prošlog stoljeća, ubrzano se razvijala i kemijska industrija. U to doba, čini se da gotovo nitko još nije bio zabrinut za ekološke posljedice koje ubrzano razvijanje može donijeti. Danas, kada svi osjetimo posljedice kolektivnog nemara za zaštitu okoliša, nalazimo se na prekretnici ekološke svijesti. Razvijene zemlje već provode rigorozne zakone za zaštitu okoliša, a „zeleni“ poslovni planovi laganim korakom transformiraju industriju kakvu smo dosad poznavali. Štoviše, sve grane ekologije postaju unosne industrije same za sebe. [1]

Logično je da se ekolozi prvotno bave velikim problemima, poput emisije stakleničkih plinova i zbrinjavanja opasnog otpada. To, međutim, stavlja one „manje“ probleme u drugi plan. Sjedilački način života, stres i loša prehrana u novije vrijeme rezultiraju povećanim brojem oboljelih, a time i povećanom konzumacijom farmaceutika. Svakodnevna upotreba ovih supstanci nužnih za opstanak čovječanstva dovodi do povećane koncentracije istih u okolišu. Iako sve otpadne vode prolaze kroz pročišćivače s mehaničkim, kemijskim i biološkim komponentama, takvi sustavi još uvijek nisu dovoljno sofisticirani da bi eliminirali farmaceutike. Povrh toga, antibiotici dodatno inhibiraju biološku komponentu pročišćivača jer svojim antimikrobiološkim aktivnim djelovanjem ubijaju biomasu namijenjenu za razgradnju mrtve organske tvari. Sve to ukazuje na činjenicu da su farmaceutici sveprisutni u čistim vodama, uključujući onu u našim vodovodima koju koristimo za piće i kuhanje. [2-3]

Eksplozivnim rastom broja stanovnika na Zemlji, porasla je i potreba za proizvodnjom hrane. Moderna poljoprivreda je nezamisliva bez pesticida, koji također predstavljaju problem u okolišu. Vrlo lako dospijevaju u tlo te ih oborine ispiru, pa završavaju u podzemnim, odnosno ostalim okolišnim vodama. [1]

Ove dvije skupine spojeva (farmaceutici i pesticidi) su prozване „novim zagađivalima“, iako se već stotinu godina koriste za različite primjene u farmaceutskoj, veterinarskoj i poljoprivrednoj industriji. Antibiotici se slijevaju iz kućanstava i industrijskih pogona, dok pesticidi pronalaze svoj put s farmi, polja, šuma i golf terena. Potrebno je razumjeti da problem ne predstavljaju samo ovi nemetabolizirani spojevi, nego da njihovi metaboliti mogu biti još toksičniji od prvotne forme, ali s obzirom da je ovo tek novi (i rastući) problem, o tome još nemamo dovoljno informacija. [4-5]

S obzirom da je korištenje ovih supstanci neizbježno za ljudski opstanak, jedino što je preostalo jest učinkovito pročišćavanje otpadnih voda. Prvi korak u tome je analiza toksičnosti, zajedno

s kvantifikacijom najčešćih ksenobiotika. U ovom radu je određivana toksičnost uzoraka otpadne vode iz Čakovca. Uzorci su prikupljeni kroz period od 6 mjeseci što čini ovakvo istraživanje novitetom. [6]

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. MEĐIMURSKE VODE

#### 2.1.1. ČAKOVEČKE OTPADNE VODE

Sustav odvodnje i pročišćavanja otpadnih voda aglomeracije Čakovec je infrastrukturni projekt koji se sufinancira iz strukturnih fondova EU. Na pročišćivač otpadnih voda, osim grada Čakovca, spojena su i okolna mjesta: Nedelišće, Pušćine, Strahominec, Ivanovec, Gornji Hrašćan, Savska Ves, Mihovljan, Kuršanec, Novo Selo Rok, Mačkovec, Zasadbreg, Lopatinec, Brezje, Pleškovec, Žiškovec, Slemenice, Vučetinec i Štefanec. Procjenjuje se da 2/3 ovih komunalnih voda dolazi iz kućanstava, a 1/3 iz industrijskih slivova. [2]

#### 2.1.2. KOMUNALNE VODE

Voda se iz prirode za opskrbu stanovništva crpi vodoopskrbnim sustavima, odakle vodovodima dolazi u kućanstva i industrijske pogone, a nakon korištenja se kanalizacijskim sustavom odvodi na pročišćavanje te se na poslijetku vraća u prirodu, pa se time ciklus zatvara.

Komunalne, odnosno otpadne vode nastaju uporabom vode za razne namjene, pri čemu dolazi do promjena fizikalnih, kemijskih i mikrobioloških karakteristika. Možemo ih podijeliti na:

- kućanske otpadne vode – nastale uporabom sanitarnih čvorova u kućama, uredima i hotelima ili za potrebe kuhanja i čišćenja; ovdje pripadaju i vode iz industrijskih pogona koji također imaju sanitarna trošila,
- industrijske otpadne vode – vode korištene u procesu proizvodnje i rada u industrijskim pogonima; ovdje pripadaju i toplinski onečišćene vode za potrebe rashladnih sustava,
- oborinske otpadne vode – iako inicijalno čiste, oborinske vode se onečišćuju kiselim plinovima iz atmosfere te ispiranjem tala, odnosno površina poput krovova i cesta.

Osim navedenih, treba spomenuti i procjedne vode s odlagališta neopasnog otpada. [7]

## 2.2. UZORKOVANJE VODA

Uzorkovanje vode iz okoliša je postupak koji treba isplanirati i provesti sukladno spoznajama o razlogu uzorkovanja, svojstvima i koncentraciji zagađivala te mogućnostima laboratorija u kojem će se provesti pripadajuća analiza. Strategija uzorkovanja površinskih voda ovisi o sastavu biosfere, hidrogeološkim uvjetima, dnevnim i godišnjim promjenama protoka vode, o predviđenoj koncentraciji zagađivala, brzini protoka na mjestu uzorkovanja te o udaljenosti od mjesta uzorkovanja do ispusta vode u okoliš.

Prilikom uzorkovanja dobro je uzeti što veći volumen, posebice kada se određuju zagađivala za koje se pretpostavlja da su prisutna u vrlo malim koncentracijama, (nižim od granica detekcije i kvantifikacije) kako bi ih bilo moguće koncentrirati i odrediti. Velik volumen je bitan i ako se predviđa veći broj analiza istog uzorka.

Uzorkovanje se može provoditi ručno ili automatskim uređajem, uzorkivačem. Automatsko uzorkovanje je prikladno za motrenje tekućica i ispusta otpadnih voda, a najveća prednost mu je namještanje učestalosti uzorkovanja i količine uzorka. Za potrebe ovog rada korišten je automatski uzorkivač. U novije vrijeme se koriste i uzorkivači upravljani računalom koje i pohranjuje podatke. Na **Slici 1** prikazan je pročišćivač vode za aglomeraciju Čakovec, a crveno je zaokruženo mjesto automatskog uzorkivača.



**Slika 1.** Sustav odvodnje i pročišćavanja otpadnih voda aglomeracije Čakovec [8]

Zbog kontinuiranog kruženja vode u prirodi, valja uzeti u obzir i vrijeme uzorkovanja vode. Komunalne vode mijenjaju sastav ovisno o ritmu ljudskog života. Očito je da je ujutro (prije radnog vremena) i u večernjim satima dotok vode iz kućanstava veći, dok iz industrijskih pogona tada dotoka skoro pa nema i obrnuto. Uzorkovanje gradskih ispusta zahtijeva poznavanje sustava, poznavanje dnevnih i godišnjih promjena protoka i koncentracija zagađivala. Bitno je da se uzorkovanje provodi kompozitno, odnosno da se prikupi više uzoraka svakih sat vremena, razmjerno protoku.

Kao u svim analitičkim ispitivanjima, vrlo je važna i čistoća posuđa za skladištenje uzoraka. Za vodu se uglavnom koriste dobro oprane (bez detergenta) staklene boce. Plastične se izbjegavaju jer polimerne mase lako mogu adsorbirati različite organske tvari. Također, treba obratiti pozornost na mjesto skladištenja uzoraka prije analize, a način konzerviranja ovisi o analitu i matici. [5, 9]

### 2.3. TOKSIČNOST

Toksikologija je definirana kao znanost koja se bavi proučavanjem otrova (toksina) i njihovih učinaka na živa bića. Poznato je da je mnogo spojeva otrovno za život ljudi, biljaka, životinja i mikrobiološkog sustava, pa je tako toksikologija široko područje koje uključuje elemente biokemije, histologije, farmakologije, patologije i drugih srodnih područja. Toksini reagiraju sa staničnim komponentama i poremećuju metabolizam te tako oštećuju ili ubijaju žive organizme. S obzirom da su većinom vrlo reaktivni, štetni su čak i u najmanjim koncentracijama (ppb i ppt). Ekotoksikologija je grana toksikologije koja se bavi interakcijama, transformacijama i učincima prirodnih i sintetskih kemijskih spojeva u biosferi. [1]

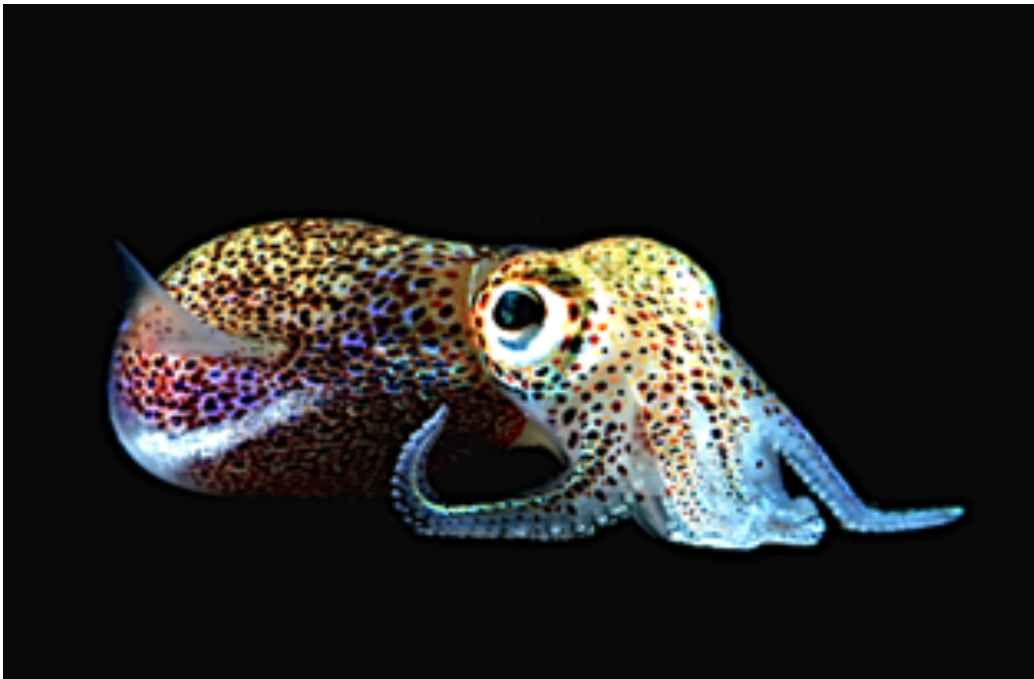
Farmaceutici i pesticidi su poznati toksini, a njihova stabilnost ih čini vrlo podložnima sorbiranju na krute matice i akumulaciji u sedimentima i tlima. Nekontrolirano ispuštanje farmaceutika i pesticida može imati vrlo negativne posljedice na biosustav, kao npr. poremećaj hranidbenog lanca, izumiranje određenih vrsta, rezistentnost bakterija na antibiotike itd. Cilj zdravstvene ekologije je svesti koncentracije takvih zagađivala na prihvatljive razine, iako još uvijek nisu određene maksimalno dopuštene koncentracije mnogih ksenobiotika. [5]

Fizikalne i kemijske analize nisu dovoljni pokazatelji štetnih učinaka zagađivala jer nam daju informacije o prirodi ispitivanih tvari. Kako bismo bili upoznati s biološkim utjecajem ovih spojeva, potrebno je provesti testove toksičnosti. S obzirom na aktualnost problema, razvijeno je mnogo metoda određivanja toksičnosti kao što su testovi na biljkama, algama, pa čak i ribama, ali najšire korišteni oblik jesu testovi na bakterijama. [10]

Razlikujemo akutnu i kroničnu toksičnost određenog kemijskog spoja. Akutna izloženost je jednokratni unos otrova u organizam, a kroničnim izlaganjem se smatra svako izlaganje otrovu kroz duži period (više od 3 mjeseca). Najčešći oblik ispitivanja toksičnosti je mortalitet, a razlikujemo akutne i kronične testove toksičnosti. Akutnim testom se ispituje preživljavanje odabranih organizama u vremenskom periodu od 24 do 96 sati. Kronični test toksičnosti odvija se u trajanju od minimalno tjedan dana, a tim testom, osim samog preživljavanja organizma zagađenog ispitivanim uzorkom vode, ispituje se i utjecaj koji taj uzorak ima na organizme. Ti utjecaji najčešće se očituju kao poremećaji razmnožavanja i rasta. U ovom radu je ispitivana akutna toksičnost otpadnih voda. [11]

### 2.3.1. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI POMOĆU BAKTERIJA *VIBRIO FISCHERI*

*Vibrio fischeri* je štapićasta, gram-negativna bakterija koja obitava u svim morima, a ponajviše u morima umjerene i suptropske klime. Posjeduje svojstvo bioluminiscencije i živi uglavnom u simbiozi s drugim, većim morskim organizmima poput lignja i riba (**Slika 2.**), koje koriste to svojstvo za svoje noćne aktivnosti. Ove bakterije svijetle ekspresijom *lux operona*, odnosno skupinom gena koja se može pronaći u više bakterija iz skupine *Vibrionaceae*. Pet gena (*luxCDABEG*) je zaslužno za emisiju vidljive svjetlosti, a dva gena (*luxR* i *luxI*) reguliraju operon.



**Slika 2.** Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijama *Vibrio fischeri* [12]

Za razliku od ostalih bakterija skupine *Vibrionaceae*, *Vibrio fischeri* se proučava već dugi niz godina na fiziološkoj i genetskoj razini, te su ove bakterije česti alat za kvantifikaciju pri analitičkim ispitivanjima u ekotoksikologiji. Određivanje biološke toksičnosti pomoću svjetlećih bakterija opisano je u DIN-ovim standardima. [13-15]

### 2.3.2. BIOLUMINISCENTNA METODA – DIN 38412 – L34

Bioluminescencija je pojava do koje dolazi kada živi organizam ima sposobnost emisije valnih duljina koje su u vidljivom dijelu spektra. Nastaje kao rezultat kemijske reakcije u kojoj dolazi do oksidacije molekule luciferina u oksiluciferin. Brzinu takve reakcije određuje koncentracija enzima luciferaze.

Određivanje biološke toksičnosti pomoću svjetlećih bakterija je opisano u DIN-ovim standardima i temelji se na pronalaženju učinaka niza razrijeđenja uzorka otpadne vode na emitiranje svjetlosti od fluorescentnih bakterija. Za određivanje toksičnosti uzoraka otpadnih voda u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda po DIN-u (DIN 38 412-L34). To je praktična bioluminiscentna metoda koja spada u testove kratkog trajanja jer traje svega 30 minuta. Kao test bakterije korištene su fluorescirajuće bakterije *Vibrio fischeri*. One emitiraju svjetlost ujednačenog intenziteta. Mjerenjem intenziteta moguće je primijetiti svako oštećenje bakterijskog metabolizma kao posljedicu djelovanja toksične tvari. [13]

### 2.3.3. ISKAZIVANJE TOKSIČNOSTI

Prije iskazivanja same toksičnosti, potrebno je upoznati se s određenim kraticama koncentracija koje uzrokuju inhibiciju određenog postotka populacije. Najčešće spominjana je  $LD_{50}$  (**eng.** *lethal dose*), odnosno doza otrova koja izaziva smrt 50 % populacije nakon jednokratnog unosa. Mjerna jedinica u kojoj se  $LD_{50}$  izražava je najčešće mg/kg tjelesne težine. Osim ove, postoje i druge važne kratice za koncentracije koje štetno djeluju na populaciju.  $EC_{50}$  (**eng.** *effect concentration*) je efektivna koncentracija uzorka koja ima štetan učinak za 50 % populacije.  $LOEC$  (**eng.** *lowest observable effect concentration*) je najniža koncentracija koja izaziva vidljivi štetni učinak, a  $LOED$  je kratica s istim značenjem kao i  $LOEC$ , ali se odnosi na vrijednost doze.  $NOEC$  (**eng.** *no observable effect concentration*) je vrijednost koncentracije tvari koja ne izaziva vidljivi štetni učinak.  $NOED$  se isto tako odnosi na vrijednost doze. [10]

Broj u indeksu navedenih kratica je varijabilan i ovisi o potrebama istraživanja, a za potrebe ovog rada su određivane vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  ukoliko su uzorci bili toliko toksični da su uopće uzrokovali 20 %, odnosno 50 % inhibiciju.

Za potrebe ovog rada nužno je izmjeriti početne luminiscencije bakterijske suspenzije, u te otopine pipetirati realni uzorak otpadne vode i mjeriti luminiscenciju nakon određenog vremena inkubacije, u ovom slučaju 30 minuta.



Nakon toga se uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane kulture nakon određenog vremena. Iz grafa se kasnije očitaju vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  (ukoliko postoje) koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije bakterijske kulture što nam omogućava lakšu interpretaciju rezultata i definiranje utjecaja uzorka na ispitivanu bakterijsku kulturu. [10, 13, 15]

Iz očitane  $EC_{50}$  vrijednosti izračuna se  $TU$  prema formuli (1):

$$TU = 100 \times (EC_{50})^{-1} \quad (1)$$

Prikaz određivanih fizikalno-kemijskih veličina:

$l_0$  – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija),

$l_t$  – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu  $t$  (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka),

$l_{0K}$ ;  $l_{tK}$  – početna i konačna luminiscencija kontrolne otopine (2 % NaCl),

$fK$  – faktor korekcije,

$$fK = l_{tK}/l_{0K}$$

$l_c$  – ispravljeni  $fK$ ,

$$l_c = fK \times l_0$$

$I$  – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu  $t$ ,

$$I = (l_c - l_t) \times 100/l_c$$

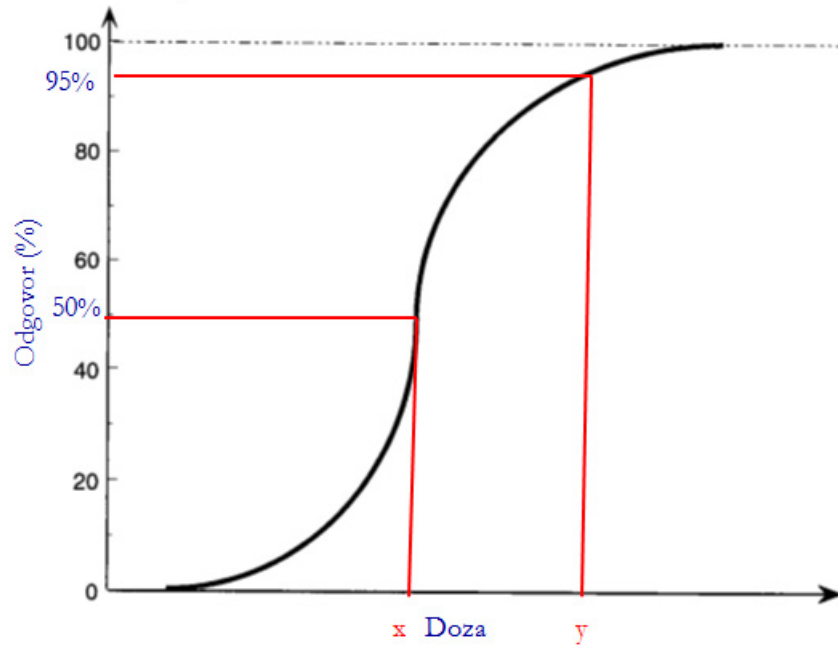
$TU$  – jedinice toksičnosti (**eng.** *toxicity units*),

$LOEC$  – najniža koncentracija koja izaziva vidljivi štetni učinak,

$EC_{20}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije,

$EC_{50}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije.

**Slika 3** prikazuje uobičajenu krivulju toksičnosti. Ona prikazuje odnos doze i odgovora, a kod normalne razdiobe ima oblik „S – krivulje“. Kod doze  $X$ , odgovor se javlja kod 50 % populacije, a kod doze  $y$ , odgovor se javlja kod 95 % populacije. U ovom radu dobiveni su odnosi doza i odgovora za realne uzorke otpadnih voda i računalno su nacrtane krivulje toksičnosti.



**Slika 3.** Krivulja toksičnosti [13]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. KORIŠTENE KEMIKALIJE

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

NAZIV	KEMIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVODAČ
<b>natrijev klorid</b>	NaCl	p.a.	Lach-Ner, Češka
<b>kalcijev klorid</b>	CaCl <sub>2</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
<b>kalcijev karbonat</b>	CaCO <sub>3</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
<b>kalijev dihidrogen fosfat</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
<b>magnezijev sulfat</b>	MgSO <sub>4</sub>	p.a.	T.T.T., Hrvatska
<b>cinkov sulfat heptahidrat</b>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	p.a.	Lach-Ner, Češka
<b>agar</b>	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	p.a.	Liofilchem, Italija
<b>kvašičev ekstrakt</b>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	p.a.	Biolife, Italija
<b>pepton</b>	-	p.a.	Biolife, Italija
<b>D-glukoza</b>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	p.a.	Lach-Ner, Češka
<b>D-rafinoza pentahidrat</b>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	99 %	Lach-Ner, Češka
<b>glicerol</b>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p.a.	Lach-Ner, Češka
<b>metanol</b>	CH <sub>3</sub> OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
<b>etanol</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	HPLC čistoća	J.T. Baker, Nizozemska
<b>deionizirana voda</b>	H <sub>2</sub> O	p.a.	Mili Q

### 3.2. INSTRUMENT ZA ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI

Za potrebe mjerenja u ovom radu je korišten mjerni instrument LUMIStox 300 (**Slika 4.**). To je instrument koji je razvijen za mjerenje jačine svjetlosti luminiscentnih bakterija. Zajedno s termostatskim blokom za inkubaciju naziva LUMIStherm, ovaj sustav odgovara tehničkim zahtjevima DIN 38412 L34 i L341 te međunarodnom standardu ISO DIS 11348. LUMIStox 300 je spoj mjernog instrumenta (luminometra) i računala koje, kao i svako drugo, zahtijeva svoj operativni sustav koji se nalazi na disketi. S obzirom da tehnologija konstantno napreduje, tako dolaze i ažuriranja i programska proširenja koja se lako učitaju umetanjem nove diskete u uređaj. LUMIStox 300 ima ugrađenu funkciju fotometra i automatsko mjerenje. Te značajke omogućuju prepoznavanje efekata boja pri ispitivanju luminiscentnih bakterija, pa uređaj može uzeti u obzir korekciju u slučaju obojene otopine. Osim toga, moguće je unaprijed procijeniti učinkovitost određenih boja na mjerenje te se može koristiti za određivanje optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene inhibicije rasta u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost LUMIS-24-tox (LCK486). LUMIStox 300 ima i automatski referentni upravljački sustav kojim se provjerava funkcioniranje cijelog mjerenja prije svake serije luminiscentnih bakterija. [16]



**Slika 4.** Instrument za provedbu toksičnosti LUMIStox 300 s termostatskim blokom LUMIStherm

### 3.3. POSTUPAK ODREĐIVANJA TOKSIČNOSTI

#### 3.3.1. PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE

Hranjiva podloga je umjetni medij za uzgoj bakterija *in vitro* i održavanje čiste kulture. Priprema se otapanjem sastojaka iz **Tablice 2** u redeioniziranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja. S obzirom da neotopljeni kalcijev karbonat ima tendenciju da zagori, zagrijavanje se provodi u vodenoj kupelji. Čim dođe do pojave prvih jačih mjehurića, odnosno vrenja, tikvicu treba maknuti s izvora topline kako hranjiva podloga ne bi iskipjela. Smjesa se zatim sterilizira 15 minuta u autoklavu na temperaturi od 121 °C te se po završetku ostavi hladiti na sobnoj temperaturi dok se temperatura smjese ne spusti na 45 °C. Sterilizirana podloga se tada izlijeva u prethodno sterilizirane petrijeve zdjelice tako da sloj bude maksimalne debljine 0,5 cm. Petrijeve zdjelice se čuvaju u hladnjaku na 4 °C te se po potrebi vade i koriste bez potrebe temperiranja. Ohlađena, čvrsta hranjiva podloga je hladinaste konzistencije jer sadrži polisaharide koji kuhanjem hidratiziraju i nabubre, a nakon hlađenja očvrstnu i poprime oblik posude. [17]

**Tablica 2.** Sastav hranjive podloge

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	30 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
agar	15 g
pepton	5 g
kvašćev ekstrakt	5 g
glicerol	10 g

### 3.3.2. PRIPREMA OTOPINE ZA RESUSPENZIJU

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U redeioniziranoj vodi se otope svi sastojci iz **Tablice 3** osim šećera. Otopina se prokuha, ohladi na sobnoj temperaturi i po potrebi profiltrira, a na posljetku sterilizira. Sterilizacija se također provodi 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Tako priređena otopina može se čuvati u hladnjaku na 4 °C neograničeno dugo, međutim ukoliko su u njoj otopljeni i šećeri (glukoza i rafinoza), nakon već 2 tjedna može doći do pojave zamućenja. Šećeri se zato uglavnom dodaju naknadno. Također, otopina se može čuvati zamrznuta u malim plastičnim bočicama te prije korištenja jednostavno odmrznuti na sobnoj temperaturi. pH otopine za resuspenziju se namješta netom prije korištenja otopine, a vrijednost mu mora biti između 6,8 i 7,2 jer su to optimalni uvjeti za život bakterija *Vibrio fischeri*.

**Tablica 3.** Sastav otopine za resuspenziju

Sastojci	u 1000 mL
NaCl	36 g
CaCl <sub>2</sub>	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
glicerol	0,5 mL
rafinoza	10 g
glukoza	10 g

### 3.3.3. PRIPREMA RADNE OTOPINE ZA RESUSPENZIJU I OTOPINE REFERENTNIH TVARI

Radna otopina je 2 % NaCl, a koristi se za pripremu niza razrjeđenja. Priprema se otapanjem 20 g NaCl u 1 L redeionizirane vode. Ova otopina se također sterilizira 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Otopina referentnih tvari je otopina  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  u redeioniziranoj vodi, masene koncentracije 25 mg/L. Ova otopina se koristi za provjeru valjanosti bakterijske kulture. Naime, kako su *Vibrio fischeri* bakterije koje obitavaju u moru, dodavanjem NaCl imitiramo njihovo prirodno stanište, dok je sol poput cinkovog sulfata otrov za ovu vrstu.

Kivete za provjeru toksičnosti moraju biti u termostatskom bloku za inkubaciju na temperaturi od 15 °C barem 15 minuta prije početka mjerenja.

### 3.3.4. STERILNA TEHNIKA RADA

S obzirom da se za potrebe ovih mjerenja radi s mikroorganizmima nužna je sterilna tehnika rada. Ovakva tehnika se mora primijeniti kako bi se ispitivani uzorci i pribor zaštitili od kontaminacije iz zraka, a bitna je i zaštita analitičara i radne okoline. Provodi se tako da se upali plamenik na oksidirajućem plamenu te se šire područje radnog stola pošprica etanolom (izosanom, anisolom, drugim antiseptikom). To su uglavnom hlapljive tvari koje uspješno steriliziraju područje oko plamenika. Nužno je da se sav daljnji rad oprezno obavlja u neposrednoj blizini otvorenog plamena. Eza koja se koristi prvo se pali u unutrašnjem plamenu, a zatim žari cijelom dužinom u vanjskom dijelu plamena.

### 3.3.5. AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA

Kiveta s liofiliziranim zamrznutim bakterijama se izvadi iz zamrzivača i u nju se odmah (bez prethodnog temperiranja) ulije 1 mL sterilizirane otopine 2 % NaCl ili gotove otopine za reaktivaciju od proizvođača. Obavezna je sterilna tehnika rada. Priređena suspenzija se zatim termostatira 15 minuta na 15 °C. Nakon termostatiranja provjerava se aktivnost kulture mjerenjem relativne luminiscencije opcijom LU na instrumentu LUMISTox 300. Ukoliko je vrijednost veća od 1000, suspenzija je dobra i spremna za daljnje korištenje. Idući korak je izlivanje suspenzije na hranjivu podlogu te razvlačenje sterilnom ezom po podlozi. Kultura se ostavi u mračnom prostoru na sobnoj temperaturi. Optimalna vrijednost temperature je 18 °C, tako da se u hladnim zimskim i vrućim ljetnim danima preporuča čuvanje u inkubatoru. Ukoliko je aktivacija prošla kako treba, nakon 24 sata bakterije intenzivno svijetle u mraku i to je znak da su uredno oživljene i spremne za mjerenje toksičnosti. Oživljena kultura (**Slika 5.**) je valjana za rad najmanje 2, a najviše 9 dana od oživljavanja, odnosno precjepljivanja. Međutim, već nakon 4 dana primjećuje se puno slabija luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije.



**Slika 5.** Hranjiva podloga s oživljenom kulturom bakterija *Vibrio fischeri*



### 3.3.6. PRECJEPLJIVANJE BAKTERIJSKE KULTURE

Nakon što se jednom aktiviraju liofilizirane bakterije, nije ih potrebno aktivirati ponovno prije svakog mjerenja. Jeftiniji i jednostavniji način jest da se kultura precijepi iz jedne Petrijeve zdjelice u kojoj je oživljena kultura u drugu, sterilnu zdjelicu. I za ovaj postupak je svakako nužna sterilna tehnika rada. Na čistu hranjivu podlogu nakapa se nekoliko kapi bakterijske suspenzije (bakterije otopljene u otopini za resuspenziju). Zatim se sterilnom ušicom eze zahvati grudica čiste kulture te se razvuče po natopljenoj podlozi. Postupak nije preporučljivo ponoviti više od 2 puta pri jednom precjepljivanju.

### 3.3.7. PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE

Epruveta se napuni otopinom za resuspenziju do otprilike  $\frac{3}{4}$  punog volumena. Zatim se ušicom eze zahvati grudica bakterijske kulture te se otapa u napunjenoj epruveti. Grudice je potrebno usitniti i opreznim miješanjem postići što veći stupanj homogenosti otopine. Ukoliko opcija LU na LUMISTox 300 instrumentu pokaže slabu relativnu luminiscenciju, postupak se može ponoviti u istoj epruveti. Očigledno je i ovdje sterilna tehnika rada neizostavna. Bakterijska suspenzija se prije korištenja mora termostatirati 15 minuta na 15 °C (adaptacija kulture).

### 3.4. MJERENJE TOKSIČNOSTI

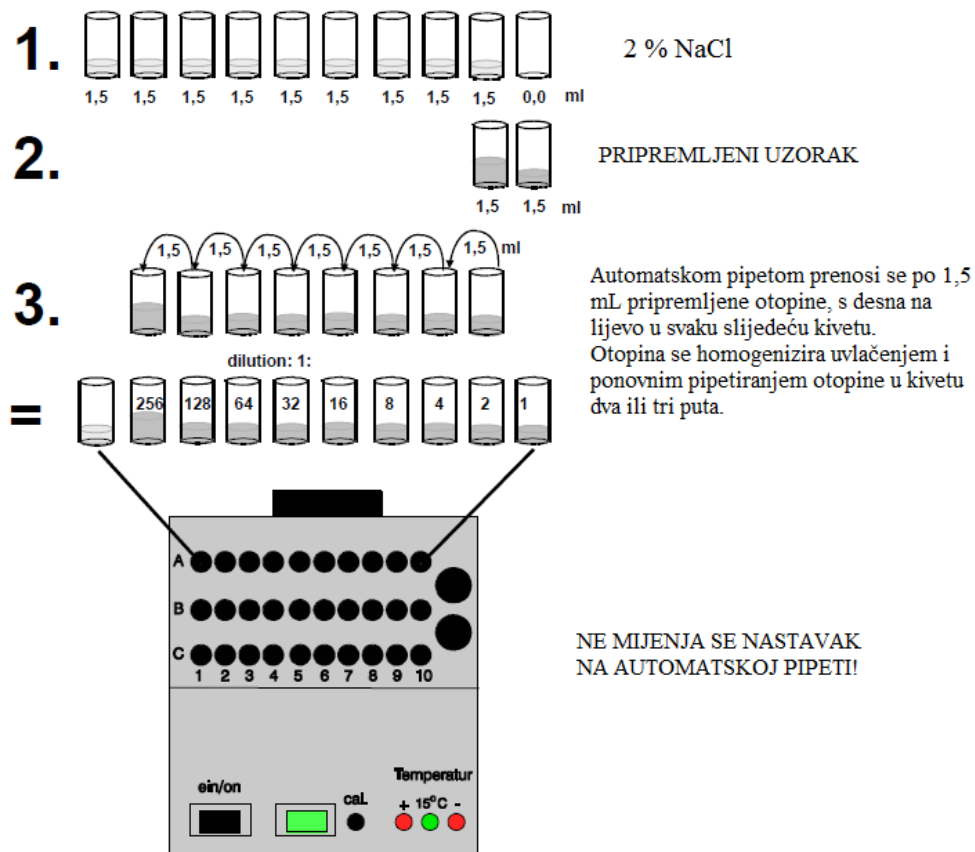
#### 3.4.1. PRIPREMA MJERENJA

Prije samog mjerenja poželjno je napraviti već spomenuto mjerenje relativne luminiscencije bakterijske suspenzije kako bi se provjerila aktivnost bakterijske kulture. Na glavnom izborniku LUMISTox 300 instrumenta se odabere opcija LU te se nakon referentne provjere umetne kiveta. Ukoliko je vrijednost luminiscencije ispod 1000, ne može se započeti mjerenje, nego treba povisiti koncentraciju bakterija. Također, luminiscencija ne smije biti niti preko 10 000, ali to gotovo nikada nije slučaj.

Test valjanosti ili tzv. „screen test“ je nužno obaviti prije početka svakog mjerenja. Izvodi se tako da se u jednu kivetu (referentnu) stavi 0,5 mL otopine 2 % NaCl i 0,5 mL bakterijske suspenzije. U drugu (test) kivetu se stavi 0,5 mL otopine  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  i također 0,5 mL bakterijske suspenzije. Obje kivete se termostatiraju 15 minuta na 15 °C. Nakon toga se u glavnom izborniku LUMISTox 300 uređaja odabere opcija SCRN, umetne se referentna, a zatim test kiveta i očita se vrijednost. Poželjan rezultat je između 20 % i 80 % luminiscencije. Pri nižim i višim vrijednostima od navedenih, potrebno je prirediti novu bakterijsku suspenziju i ponoviti test valjanosti.

### 3.4.2. PRIPREMA GEOMETRIJSKOG NIZA

Termoblok ima A, B i C red, svaki s 10 mjesta za 10 kiveta. U A redu se priprema red razrjeđenja, dok se u B i C redove pipetira po 0,5 mL bakterijske suspenzije u svakoj kiveti (**Slika 6.**). U A redu se u prvu (lijevu) kivetu u termobloku pipetira 2/3 volumena 2 % NaCl, a u zadnju (desnu) 2/3 uzorka realne vode, odnosno analita čiju toksičnost mjerimo. U preostale kivete A reda se pipetira po 1,5 mL 2 % NaCl. S obzirom da geometrijski red implicira da se u svakoj narednoj kiveti koncentracija duplo smanjuje u odnosu na prethodnu, razrjeđenje lako izvodimo pipetirajući jednake volumene automatskom pipetom iz desne u lijevu. Dakle bitno je namjestiti pipetu na jednaki volumen onome koji je već pripremljen u preostalim kivetama, i bitno je pripaziti na homogenizaciju svake kivete.

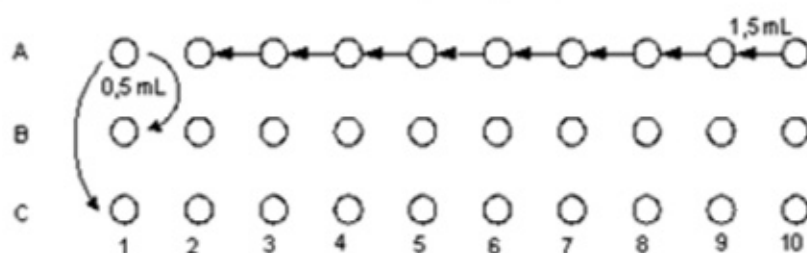


**Radna otopina za resuspenziju, 2 % NaCl uvijek se nalazi u A1. Uzorak najviše koncentracije, u ovom slučaju nerazrijeđene otopine, nalazi se krajnje desno, A10.**

**Slika 6.** Priprema geometrijskog niza razrjeđenja [13]

### 3.4.3. MJERENJE I OČITAVANJE REZULTATA

Na korisničkom sučelju uređaja LUMIStox 300 odabere se program EC i unesu se željene karakteristike mjerenja. Uvjeti za potrebe mjerenja u ovom radu su prikazani u **Tablici 4**. Kreće se umetanjem kivete na mjestu B1. Nakon očitavanja njene luminiscencije, umeće se C1 kiveta, a iz kivete A1 se pipetira 0,5 mL uzorka u B1. Nakon očitavanja C1, umeće se B2, a u C1 se pipetira 0,5 mL uzorka iz A1. Postupak se ponavlja dok se ne očitaju vrijednosti svih kiveta iz B i C reda, odnosno dok se u svaku od njih ne doda po 0,5 mL uzorka iz A reda. Po završetku prvog mjerenja, uređaj odbrojava vrijeme (30 minuta) do idućeg mjerenja svih kiveta B i C reda s dodanim uzorcima. Tek nakon drugog mjerenja svake kivete je postupak gotov, a kao i uvijek u analitičkim ispitivanjima, isti uzorak realne vode je potrebno još jednom provesti kroz ovaj postupak kako bi se utvrdila ponovljivost mjerenja. Na **Slici 7** je shematski prikazan postupak za vrijeme mjerenja.



**Slika 7.** Princip pipetiranja pri mjerenju toksičnosti uz već pripremljen geometrijski niz razrjeđenja

**Tablica 4.** Postavljeni uvjeti za potrebe EC programa

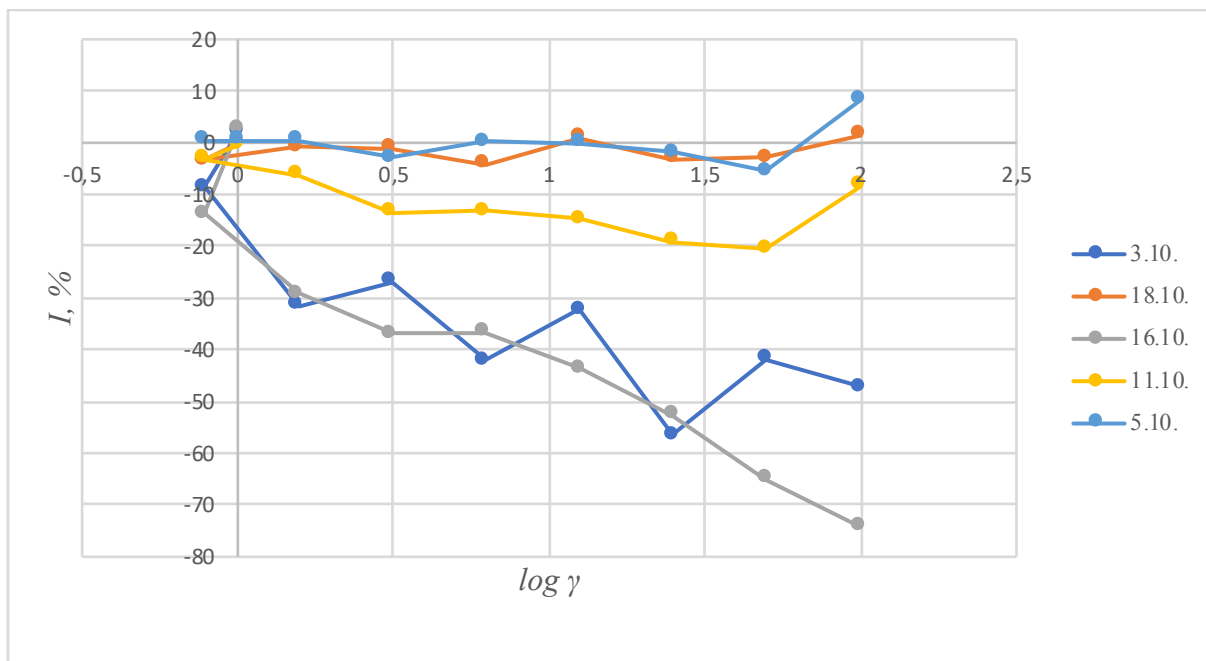
Eksperimentalni uvjeti EC programa na uređaju LUMIStox 300	
dilution steps	8
type of dilution	2
unit	%
inic. conc.	100%
time of inc.	1. 30 min
	2. 0 min

#### 4. REZULTATI I OBRADA REZULTATA

Za potrebe ovog rada ispitivana je isključivo toksičnost realnih uzoraka otpadne vode. Uzorci su prikupljeni automatskim uzorkivačem unutar 24 sata kroz različite datume u razdoblju od listopada 2017. do ožujka 2018. godine. Svi uzorci su analizirani dva puta, a prikazani rezultati su aritmetička sredina dobivenih vrijednosti. Međutim, za potrebe rada [18] rađena je kvantifikacija toksičnih supstanci, odnosno ksenobiotika (farmaceutici i pesticidi) od kojih su se svi pokazali toksičnima. Analizirane supstance su propisane Listom za praćenje određene Direktivom 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća. Većina ksenobiotika pokazala je toksičnost tek pri nešto nižim razrjeđenjima (višim koncentracijama), dok je pesticid metiokarb pokazao inhibiciju bakterijske kulture čak i pri razrjeđenju od 128 puta. [13] U prikazu rezultata usporedit će se toksičnost uzoraka s koncentracijama kvantificiranih supstanci za potrebe rada [18].

**Slika 8** prikazuje graf toksičnosti uzoraka iz listopada 2017. godine. Uzorci su razvrstani po datumima uzorkovanja. Na osi apscise se nalazi logaritam koncentracije uzorka, a na ordinati je prikazana inhibicija kulture u postocima. Lako je uočljivo da inhibicije kulture gotovo pa uopće nema. Tek pri najvišoj koncentraciji uzorka uzorkovanog 5.10.2017. može se primijetiti blaga inhibicija bakterijske kulture. To se može pripisati povećanoj koncentraciji toksičnog makrolidnog antibiotika azitromicina koja je kvantificirana za potrebe rada [18] te iznosi  $307 \mu\text{g L}^{-1}$ . Osim azitromicina, kvantificiran je i njemu srodni eritromicin s koncentracijom od  $87 \mu\text{g L}^{-1}$  te klaritromicin s koncentracijom od  $152 \mu\text{g L}^{-1}$ . Pesticidi su također pokazali povišene koncentracije u ovom uzorku. Tako su kvantificirani diklofenak ( $224 \mu\text{g L}^{-1}$ ), acetamiprid ( $165 \mu\text{g L}^{-1}$ ) i klotianidin ( $164 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Ostali analizirani pesticidi nisu pronađeni u značajnijim koncentracijama. Međutim, insekticid metiokarb je kvantificiran s koncentracijom  $75 \mu\text{g L}^{-1}$ , što se ne čini kao nužno relevantan broj, ali valja uzeti u obzir da je to supstanca koja već u najmanjim koncentracijama pokazuje svojstva izrazite toksičnosti te sigurno doprinosi blagoj toksičnosti ovog uzorka otpadne vode. [13]

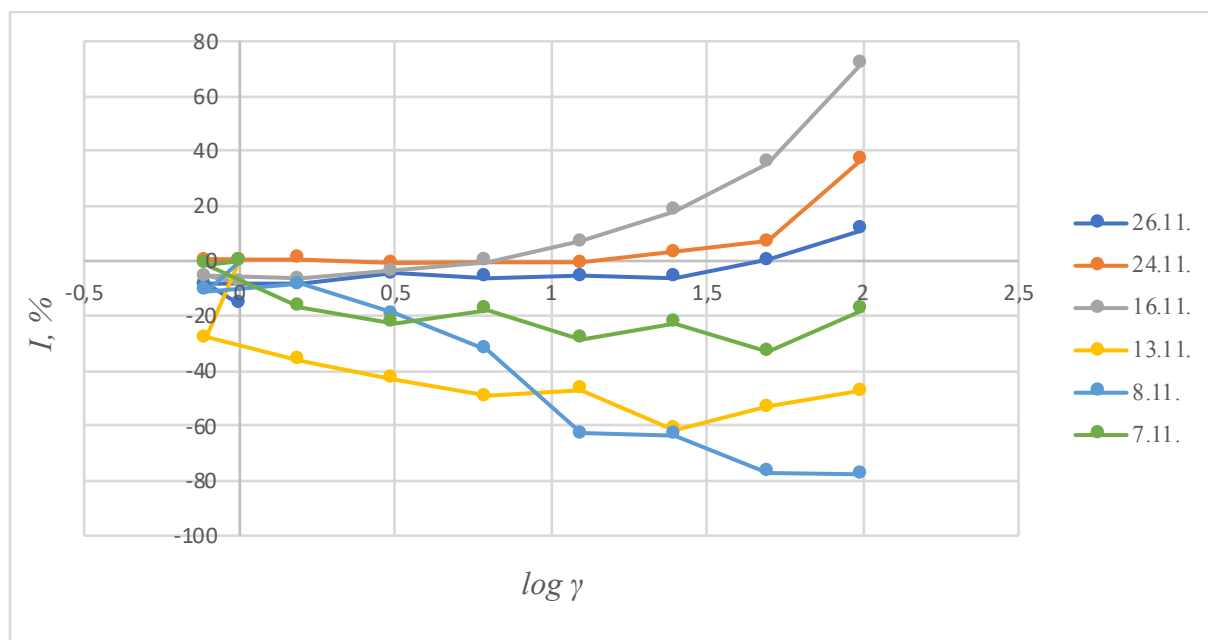
Preostali uzorci iz listopada nisu uzrokovali inhibiciju kulture, što se podudara s rezultatima iz rada [18]. Dakle, analizirane supstance su kvantificirane u minimalnim koncentracijama ili uopće nisu pronađene.



**Slika 8.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u listopadu 2017.

Na **Slici 8** također je vidljivo da krivulje nemaju nužno kontinuitet rasta ili padanja, odnosno primjećuju se oscilacije. To nije slučaj pri npr. analizi toksičnosti farmaceutika koji su čisti spojevi točno određenog sastava. Ovdje su analizirani realni uzorci otpadnih voda, te se kod takvih ne mogu očekivati kontinuirani rezultati zbog raznih interferencija u matici.

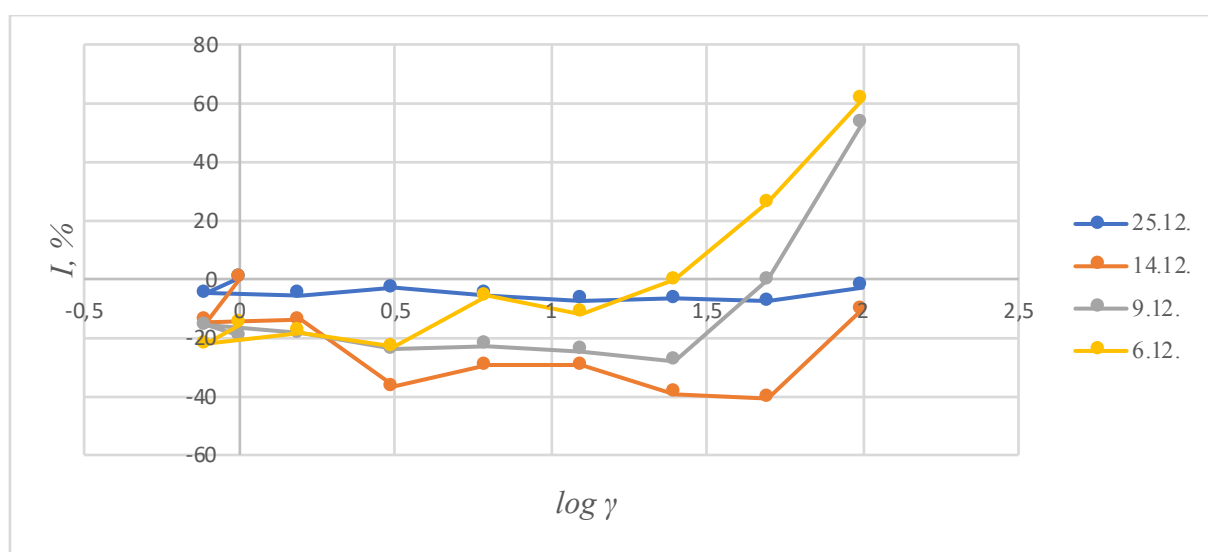
Od analiziranih uzoraka iz studenog 2017. treba izdvojiti onaj uzorkovan 16.11.2017. Prema **Slici 9** vidljivo je da je došlo do inhibicije kulture već pri razrjeđenju od 8 puta te očekivano inhibicija raste sa smanjenjem razrjeđenja. Najvjerojatniji razlog tome je izrazito povišena koncentracija nesteroidnog antireumatika diklofenaka s iznosom od  $230 \mu\text{g L}^{-1}$ . 24. i 26. studenog su koncentracije diklofenaka upola manje (oko  $120 \mu\text{g L}^{-1}$ ), što odgovara pripadajućim krivuljama toksičnosti. Preostali uzorci ne pokazuju inhibiciju, što je očekivano jer u radu [18] nije pronađen niti jedan farmaceutik, a kvantificirana su tek 2 pesticida koji vjerojatno nisu toksični za bakterije zbog interferencija s maticom ili eventualnog raspada na netoksične metabolite.



**Slika 9.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u studenom 2017.

Za toksične uzorke izračunate su i  $EC$  vrijednosti. Za uzorak uzorkovan 24.11.  $EC_{20}$  iznosi  $65,89 \text{ mg/L}$ . Za uzorak 16.11.  $EC_{20}$  iznosi  $28,18 \text{ mg/L}$ , a  $EC_{50}$  iznosi  $66,83 \text{ mg/L}$ . S obzirom da je za ovaj uzorak poznata  $EC_{50}$  vrijednost, izračunata je i sama toksičnost  $TU$  koja iznosi 1,5.

U prosincu 2017. godine, uzorci vode uzorkovani 6. i 9. prosinca pokazuju relativno sličnu inhibiciju kulture (**Slika 10.**). Prema radu [18], 9.12. su određene najveće koncentracije svih antibiotika:  $543 \mu\text{g L}^{-1}$  azitromicina,  $245 \mu\text{g L}^{-1}$  eritromicina i  $360 \mu\text{g L}^{-1}$  klaritromicina. Osim njih, već prije spomenuti insekticid metiokarb je također ovog datuma pokazao najveću koncentraciju, i to  $356 \mu\text{g L}^{-1}$ . Međutim, voda uzorkovana 6.12. pokazuje veću inhibiciju kulture nego uzorak od 9.12., a usporedbom s podacima iz rada [18], tog datuma nije kvantificirana gotovo niti jedna toksična supstanca. Uzrok toksičnosti bi stoga mogla biti neka tvar koja nije određivana jer nije propisana EU Direktivom. Treba uvijek uzeti u obzir i moguću grešku analitičara, ali s obzirom da su sva mjerenja ponavljana dva puta, te da su odbačena mjerenja koja nisu pokazala ponovljivost, u ovom slučaju je prvi navedeni razlog vjerojatniji.



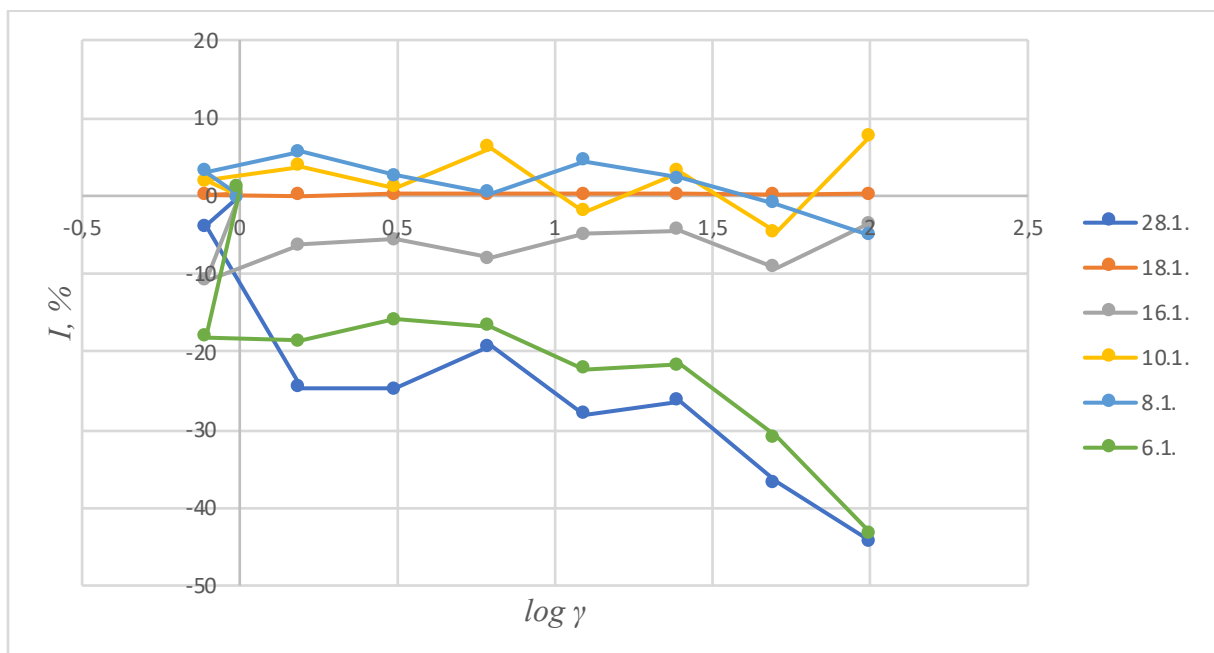
**Slika 10.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u prosincu 2017.

Za uzorak uzorkovan 6.12. određene su  $EC_{20}$  vrijednost u iznosu od  $42,45 \text{ mg/L}$  i  $EC_{50}$  u iznosu od  $80,46$ . Izračunata je i toksičnost  $TU$  koja iznosi  $1,24$ .

Za uzorak 9.12.  $EC_{20}$  iznosi  $67,23$ , a  $EC_{50}$  iznosi  $96,29$ . Dakle,  $TU$  vrijednost iznosi  $1,04$ .

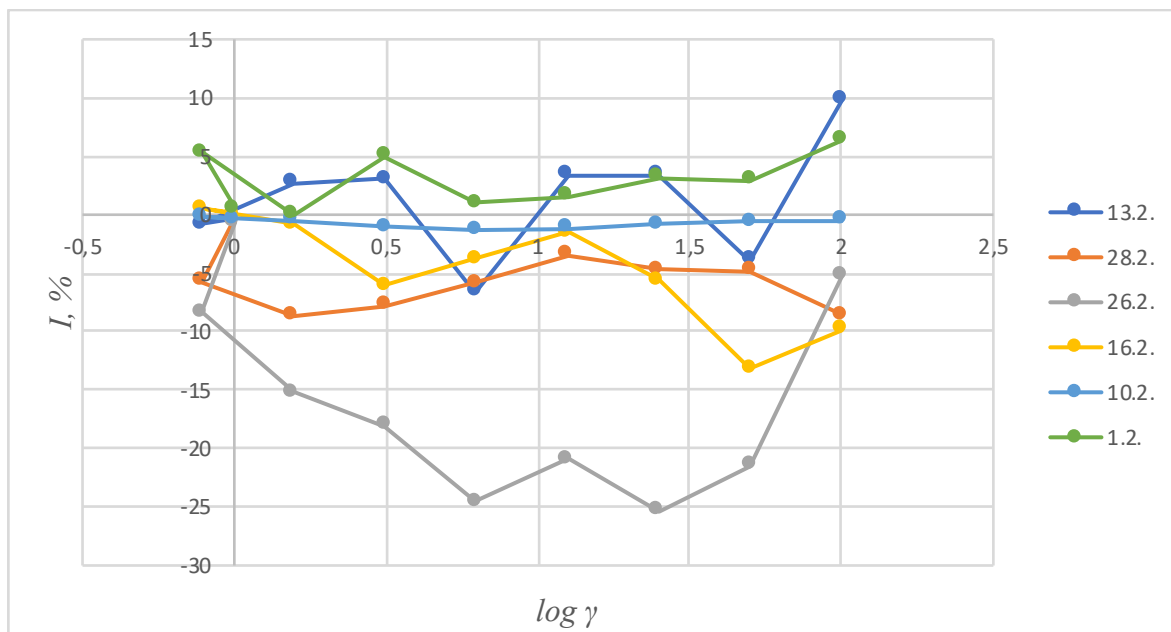


Na **Slici 11** su prikazane krivulje toksičnosti uzoraka prikupljenih u siječnju 2018. godine. Usporedbom s rezultatima iz rada [18] još jednom nailazimo na logičnu sukladnost podataka. Naime, u siječnju 2018. gotovo nijedan ksenobiotik nije kvantificiran. Kroz siječanj je pronađen samo pesticid diklofenak, ali u zanemarivim koncentracijama (ispod  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Na grafičkom prikazu toksičnosti, očekivano, gotovo niti jedna krivulja nema pozitivnu inhibiciju. Za uzorak uzorkovan 10.1. prisutne su male oscilacije u pozitivnom dijelu ordinate, međutim to treba pripisati grešci analitičara ili slučajnim interferencijama u matici.



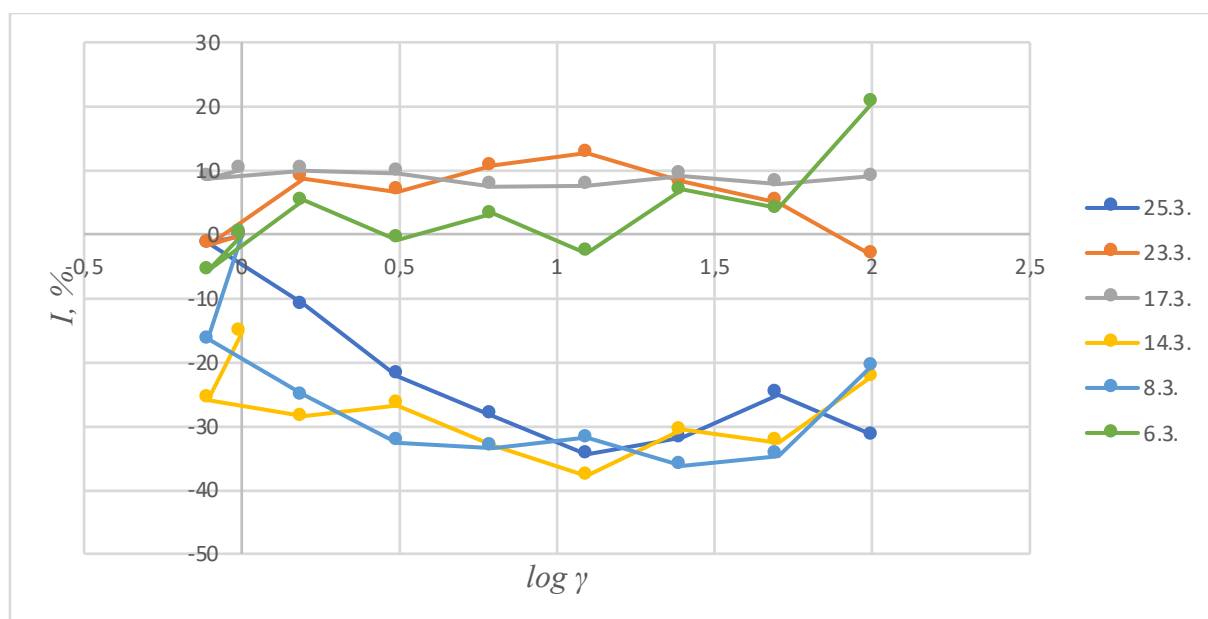
**Slika 11.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u siječnju 2018.

Sličan slučaj je i s uzorcima prikupljenim u veljači 2018. Na **Slici 12** su prikazani grafovi toksičnosti uzoraka. Prema rezultatima iz rada [18], u veljači također nije kvantificiran niti jedan ksenobiotik u relevantnoj koncentraciji. Prisutni su samo antibiotik azitromicin i pesticid diklofenak s koncentracijama manjim od  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Pozitivnu inhibiciju kod uzorka prikupljenog 13.2. treba također pripisati analitičkoj pogrešci ili interferencijama, odnosno eventualnoj prisutnosti toksične supstance koja nije određivana za potrebe rada [18].



**Slika 12.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u veljači 2018.

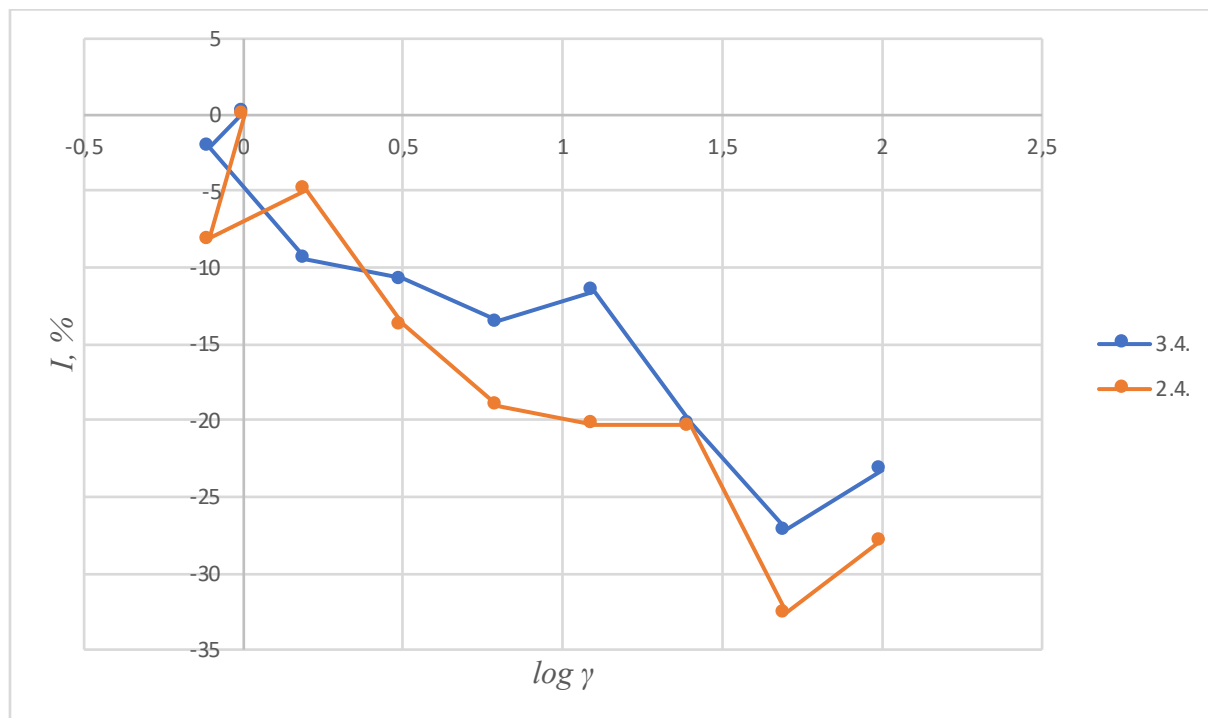
Na **Slici 13** prikazani su grafovi toksičnosti uzoraka iz ožujka 2018. godine. S obzirom da su za potrebe rada [18] kvantificirani uzorci zaključno s veljačom, ovi rezultati se ne mogu usporediti kao dosadašnji. Može se primijetiti da uzorak prikupljen 6.3. uzrokuje čak 20 % inhibicije kulture pri najmanjem razrjeđenju, što implicira da su neki toksični spojevi svakako bili prisutni tog datuma.



**Slika 13.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u ožujku 2018.

Za uzorak uzorkovan 6.3. pronađena je i  $EC_{20}$  vrijednost u iznosu 96,82 mg/L.

U travnju 2018. su uzorkovana i analizirana samo dva uzorka. Niti jedan se nije pokazao toksičnim, što je vidljivo na **Slici 14**.



**Slika 14.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u travnju 2018.

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je određivanje toksičnosti realnih uzoraka otpadnih voda. Uzorci otpadne vode uzorkovani su u Aglomeraciji Čakovec, dijelu Međimurskih voda, iz postrojenja za obradu otpadnih voda grada Čakovca i okolice. Prikupljeni su kompozitnim uzorkivačem i prikupljeno je 35 uzoraka u razdoblju od listopada 2017. do travnja 2018. godine. Uzorci sadržavaju najveći postotak kućanske otpadne vode. Voda je uzorkovana nakon grube fizikalne obrade, no na njoj nije provedena kemijska obrada.

Za mjerenje toksičnosti navedenih uzoraka koristile su se bakterije *Vibrio fischeri* koje prirodno luminisciraju te se mjerila inhibicija luminiscencije uzrokovana dodavanjem uzoraka otpadnih voda.

Primijećeno je da većina uzoraka nije pokazala inhibiciju luminiscencije, odnosno da nisu toksični. Uzorci koji su se pokazali toksičnima su uspoređeni s rezultatima rada pod nazivom „*Praćenje farmaceutika i pesticida s liste praćenja EU u čakovečkim otpadnim vodama*“, koji se također izradio na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Rezultati se podudaraju u 93 % slučajeva, odnosno 2 od 28 uzoraka ispitanih u navedenom radu nisu pokazala podudaranje rezultata toksičnosti i kvantifikacije ksenobiotika. Konačni rezultati toksičnosti pojedinih realnih uzoraka i njihovih parametara toksičnosti prikazani su u **Tablici 5**.

**Tablica 5.** Rezultati i parametri toksičnih uzoraka

Realni uzorak	$EC_{20}$	$EC_{50}$	TU
16. listopada 2017.	28,18 mg/L	66,83 mg/L	1,5
24. listopada 2017.	65,89 mg/L	-	-
6. prosinca 2017.	42,45 mg/L	80,46 mg/L	1,24
9. prosinca 2017.	67,23 mg/L	96,29 mg/L	1,04
6. ožujka 2018.	96,82 mg/L	-	-

## 6. LITERATURA

- [1] **W. P. Cunningham, M. A. Cunningham**, Environmental Science: A Global Concern, Tenth Edition, McGraw-Hill Higher Education, New York, 2008. Preface xiv-xv, str 208-215; 162-166
- [2] **Otpadne vode Čakovec**, [http://www.medjimurskevode.hr/Projekti/mura\\_wwtp/brosura\\_MURA\\_WWTP.pdf](http://www.medjimurskevode.hr/Projekti/mura_wwtp/brosura_MURA_WWTP.pdf) (pristup ožujak 2018.)
- [3] **P. Landova, M. Vavrova**, A new method for macrolide antibiotics determination in wastewater from three different wastewater treatment plants, *Acta Chimica Slovaca*, **10 (1)** (2017) 47-53.
- [4] **D. Ašperger**, Razvoj kromatografskih metoda za određivanje veterinarskih antibiotika u okolišu, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2007.
- [5] **M. Kaštelan–Macan, M. Petrović**, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013. str. 75, 130-133
- [6] **D. Mansuy**, Metabolism of xenobiotics: Beneficial and adverse effects, *Biologie Aujourd'Hui* **207 (1)** (2013) 33–37
- [7] **B. Tušar**, Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, Croatia knjiga, Zagreb, 2004., str. 13-27; 38-40; 41-47.
- [8] **Aglomeracija Čakovec**, <http://medjimurske-vode.hr/aglomeracije-cakovec/> (pristup travanj 2018.)
- [9] **Hrvatske vode**, <http://www.voda.hr/hr/odgovori-na-najcesca-pitanja> (pristup travanj 2018.)
- [10] **L. Foglar**, Ekotoksikologija, Skripta za studente, [https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/Ekotoksikologija\\_SKRIPTA\\_LF%5B1%5D.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Ekotoksikologija_SKRIPTA_LF%5B1%5D.pdf)
- [11] **S. Parvez, S. Venkataraman, S. Mukherji**, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-268.
- [12] ***Vibrio fischeri***, <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2013/07/let-there-be-light.html> (pristup kolovoz 2018.)
- [13] **T. Borojević**, Određivanje toksičnosti farmaceutika u vodi, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb 2017.
- [14] **T. Miyashiro, E. G. Ruby**, Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*, *Molecular Microbiology*, **84(5)**, 795-806 (2012)

- [15] **M. Farré, D. Ašperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrović, D. Barceló**, Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, *Anal Bioanal Chem* (2008) 390:1999–20073
- [16] **Dr. Bruno Lange GmbH**, Hach-Lange LUMISTOX 300 LPV321 User Manual
- [17] **Hranjiva podloga**, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=26314> (pristup kolovoz 2018.)
- [18] **D. Andrić, T. Borojević, I. Mađor-Božinović**, Praćenje farmaceutika i pesticida s liste praćenja EU u čakovečkim otpadnim vodama, Rad za Dekanovu nagradu, Zagreb, 2018.

## 7. DODACI

### 7.1. POPIS SLIKA

**Slika 1.** Sustav odvodnje i pročišćavanja otpadnih voda aglomeracije Čakovec [8]

**Slika 2.** Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijama *Vibrio fisheri* [12]

**Slika 3.** Krivulja toksičnosti [13]

**Slika 4.** Instrument za provedbu toksičnosti LUMIStox 300 s termostatskim blokom LUMIStherm

**Slika 5.** Hranjiva podloga s oživljenom kulturom bakterija *Vibrio fischeri*

**Slika 6.** Priprema geometrijskog niza razrjeđenja [13]

**Slika 7.** Princip pipetiranja pri mjerenju toksičnosti uz već pripremljen geometrijski niz razrjeđenja

**Slika 8.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u listopadu 2017.

**Slika 9.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u studenom 2017.

**Slika 10.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u prosincu 2017.

**Slika 11.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u siječnju 2018.

**Slika 12.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u veljači 2018.

**Slika 13.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u ožujku 2018.

**Slika 14.** Graf toksičnosti uzoraka prikupljenih u travnju 2018.

## 7.2. POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Popis korištenih kemikalija

**Tablica 2.** Sastav hranjive podloge

**Tablica 3.** Sastav otopine za resuspenziju

**Tablica 4.** Postavljeni uvjeti za potrebe EC programa

**Tablica 5.** Rezultati i parametri toksičnih uzoraka



## ŽIVOTOPIS

**Darko Andrić** [REDACTED] Odrastao je u Zagrebu gdje završava Osnovnu školu Vukomerec te Gornjogradsku gimnaziju s odličnim uspjehom. 2014. upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije kao redovni student sveučilišnog preddiplomskog studija Primijenjena kemija. Stručnu praksu odrađuje u Vitalab Nova tvrtki za prodaju i distribuciju kromatografskih kolona, kemijske instrumentacije i ostalog pribora. Redovni je član studentske udruge BEST (*Board of European Students of Technology*) gdje mu je glavna funkcija prikupljanje sredstava za inženjerske projekte i seminare. U sklopu udruge pohađa ljetne seminare vezane za kemiju diljem Europe. Osim toga, radio je kao savjetnik za zapošljavanje u Manpower agenciji za zapošljavanje. Tečno govori engleski i dobro se služi njemačkim jezikom. Posjeduje vozačku B kategorije, a u slobodno vrijeme se bavi sportom.