

Šaržna biorazgradnja ksenobiotika

Vukorepa, Gracia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:715334>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Gracia Vukorepa

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2023.

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

Kandidatkinja **Gracia Vukorepa**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 24. siječnja 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Izv. prof. dr. sc. Davor Dolar, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

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

Diplomski ispit održat će se dana: 27. siječnja 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Gracia Vukorepa

ŠARŽNA BIORAZGRADNJA KSENOBIOTIKA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danijela Ašperger

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

izv. prof. dr. sc. Davor Dolar

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom prof. dr. sc. Danijele Ašperger akademske godine 2022./2023.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (AdWaTMiR, IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Danijela Ašperger na suradnji te stručnom vodstvu, pomoći i strpljenju koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala asistentici Bruni Babić, mag. ing. ecoing. na svojoj pomoći, razumijevanju, podršci i strpljenju tijekom cijelog procesa laboratorijskog rada.

Zahvaljujem tehničkim suradnicama na Zavodu za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći u laboratoriju i savjetima.

Najveće hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene u lijepim i onim manje lijepim trenucima i davala mi vjetar u leđa kada mi je najviše trebalo.

Hvala Roniju koji mi je uvijek bio najveća podrška i poticao me da idem naprijed.

Hvala mojim prijateljima i kolegama koji su moje studentske dane učinili nezaboravnima i uvijek bili spremni pomoći.

SAŽETAK

ŠARŽNA BIORAZGRADNJA KSENOBIOTIKA

U današnje vrijeme upotreba ksenobiotika sve je češća, a samim time se i sve veće količine nekontrolirano ispuštaju u okoliš. Pesticidi, antiparazitici te ostali ksenobiotici i njihovi metaboliti, razgradni i transformacijski produkti dospijevaju u tlo i vodu čineći štetu biljnom i životinjskom svijetu. Kako su ksenobiotici spojevi složene kemijske strukture, vrlo ih je teško u potpunosti ukloniti iz vode, a često je potrebno korištenje složenih i skupih metoda obrade otpadnih voda. Metode obrade aktivnim muljem najzastupljenije su metode u obradi otpadnih voda.

Cilj ovoga rada je ispitati mogućnosti uklanjanja ksenobiotika iz otpadnih voda biorazgradnjom pomoću aktivnog mulja. Određivana je mogućnost biorazgradnje antiparazitika febantela, albendazola i mebendazola te pesticida iz skupine insekticida tiakloprida, acetamiprida i klotianidina u vremenu od 48 sati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz praćenje pH-vrijednosti, temperature, gustoće, ukupne količine ugljika te utjecaja na mikroorganizme.

Proces biorazgradnje odvijao se u pet reaktora koji su bili zaštićeni aluminijskom folijom kako bi se spriječio utjecaj Sunčeve svjetlosti na razgradnju ksenobiotika. Uklanjanje ksenobiotika određivano je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda, a uzorci su se uzimali u točno određenim vremenskim intervalima. Uz to, uzorci su se analizirali i mjerenjem ukupne količine ugljika, a pratili smo i gustoću aktivnog mulja prije procesa biorazgradnje te gustoću nakon biorazgradnje i to za reaktor s muljem, mikroplastikom i ksenobiotikom te za reaktor s muljem i ksenobiotikom. Također je za svaki ksenobiotik provedena i mikrobiološka analiza kako bi se utvrdio utjecaj pojedinog ksenobiotika na mikroorganizme koji sudjeluju u procesu biorazgradnje.

Stopostotno uklanjanje postignuto je za sve antiparazitike, dok je kod pesticida uklanjanje bilo nešto lošije. Uz sam proces uklanjanja uzimala se u obzir i adsorpcija i desorpcija komponenata na površinu mikroplastike i pahuljice aktivnog mulja, a pomoću dobivenih kromatograma detektirali su se i razgradni/transformacijski produkti koji nastaju tijekom procesa biorazgradnje.

Ključne riječi:

aktivni mulj, biorazgradnja, ksenobiotici, farmaceutici, antiparazitici, albendazol, febantel, mebendazol, pesticidi, insekticidi, acetamiprid, klotianidin, tiaklopid, mikroplastika, kromatografija

ABSTRACT

BATCH BIODEGRADATION OF XENOBIOTICS

Nowadays, the use of xenobiotics is becoming more and more common, and thus increasing amounts are being released into the environment in an uncontrolled manner. Pesticides, antiparasitics and other xenobiotics and their metabolites, degradation and transformation products reach the soil and water causing damage to the plant and animal life. Since xenobiotics are compounds with a complex chemical structure, it is very difficult to completely remove them from water, and it is often necessary to use complex and expensive wastewater treatment methods. Activated sludge treatment methods are the most common methods in wastewater treatment.

The aim of this work is to examine the possibilities of removing xenobiotics from wastewater by biodegradation using activated sludge. The possibility of biodegradation of the antiparasitics febantel, albendazole and mebendazole and pesticides from the group of insecticides thiacloprid, acetamiprid and clothianidin was determined within 48 hours by high-performance liquid chromatography with monitoring of pH-value, temperature, density, total carbon and impact on microorganisms.

The biodegradation process took place in five reactors that were protected by aluminum foil to prevent the influence of sunlight on the degradation of xenobiotics. The removal of xenobiotics was determined by high-performance liquid chromatography with a diode array detector, and samples were taken at precisely determined time intervals. In addition, the samples were analyzed by measuring the total amount of carbon, and we monitored the density of activated sludge before the biodegradation process and the density after biodegradation for the reactor with sludge, microplastics and xenobiotics and for the reactor with sludge and xenobiotics. A microbiological analysis was also carried out for each xenobiotic in order to determine the influence of each xenobiotic on the microorganisms that participate in the biodegradation process.

One hundred percent removal was achieved for all antiparasitics, while the removal was slightly worse for pesticides. In addition to the removal process itself, the adsorption and desorption of components on the surface of microplastics and activated sludge flakes were also taken into account, and the resulting chromatograms were used to detect the degradation/transformation products that arise during the biodegradation process.

Keywords:

activated sludge, biodegradation, xenobiotics, pharmaceuticals, antiparasitics, albendazole, febantel, mebendazole, pesticides, insecticides, acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, microplastics, chromatography

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Ksenobiotici.....	3
2.2. Farmaceutici.....	3
2.2.1. Antiparazitici.....	4
2.2.1.1. Albendazol.....	4
2.2.1.2. Febantel.....	5
2.2.1.3. Mebendazol.....	5
2.3. Pesticidi.....	6
2.3.1. Insekticidi.....	6
2.3.1.1. Acetamiprid.....	7
2.3.1.2. Klotianidin.....	7
2.3.1.3. Tiaklopid.....	8
2.4. Mikroplastika.....	8
2.5. Obrada otpadne vode	9
2.5.1. Fizikalni procesi obrade otpadne vode.....	10
2.5.2. Kemijski procesi obrade otpadne vode.....	10
2.5.3. Biološki procesi obrade otpadne vode.....	11
2.5.4. Razgradnja ksenobiotika.....	11
2.5.5. Biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem.....	12
2.6. Analitičke metode praćenja ksenobiotika u okolišu	12
2.6.1. Spektrometrijske i mikroskopske metode.....	13
2.6.2. Kromatografske metode.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Ksenobiotici.....	16
3.1.2. Aktivni mulj.....	16
3.2. Instrumenti, uređaji i pribor.....	17
3.2.1. Analitička vaga	17
3.2.2. Sušionik.....	17
3.2.3. Eksikator.....	18
3.2.4. Ultrazvučna kupelj	18
3.2.5. pH-Metar.....	19
3.2.6. Aeracijske pumpe.....	20
3.2.7. TOC analizator.....	20
3.2.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	21
3.3. METODE RADA	22
3.3.1. Priprema temeljnih standardnih otopina ksenobiotika	22
3.3.2. Provedba procesa biorazgradnje aktivnim muljem	23
3.3.3. Određivanje gustoće mulja i ugušćivanje mulja.....	24

3.3.4. Uzorkovanje i praćenje temperature i pH-vrijednosti	25
3.3.5. Praćenje ukupne količine ugljika.....	26
3.3.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	26
3.3.7. Mikrobiologija.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Biorazgradnja albendazola.....	28
4.1.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	28
4.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	30
4.1.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	36
4.1.4. Gustoća.....	37
4.1.5. Mikrobiološka analiza.....	37
4.2. Biorazgradnja febantela.....	39
4.2.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	39
4.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	40
4.2.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	46
4.2.4. Gustoća.....	46
4.2.5. Mikrobiološka analiza.....	47
4.3. Biorazgradnja mebendazola.....	48
4.3.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	48
4.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	50
4.3.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	54
4.3.4. Gustoća.....	55
4.3.5. Mikrobiološka analiza.....	55
4.4. Biorazgradnja tiakloprida.....	57
4.4.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	57
4.4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	59
4.4.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	63
4.4.4. Gustoća.....	64
4.4.5. Mikrobiološka analiza.....	64
4.5. Biorazgradnja acetamiprida.....	66
4.5.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	66
4.5.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	68
4.5.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	72
4.5.4. Gustoća.....	73
4.5.5. Mikrobiološka analiza.....	73
4.6. Biorazgradnja klotianidina.....	75
4.6.1. Praćenje temperature i pH-vrijednosti.....	75
4.6.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	77
4.6.3. Određivanje ukupne količine ugljika.....	83
4.6.4. Gustoća.....	83

4.6.5. Mikrobiološka analiza.....	84
5. ZAKLJUČAK.....	86
6. LITERATURA.....	88

1. UVOD

Poznato je da je uporaba ksenobiotika, poput lijekova i pesticida, u svijetu svakim danom sve veća, a tijekom prethodna tri desetljeća porasla je za više od 2,5 puta. Neupitno je kako su navedeni ksenobiotici nužni u svakodnevnom životu u raznim područjima ljudskog djelovanja, ali su se s druge strane pokazali kao izvor velikog onečišćenja okoliša.¹

Ozbiljan globalni problem, koji vremenom postaje sve veći, je kontaminacija vodenog okoliša čak i farmaceuticima bez kojih je današnji život nezamisliv. Farmaceutske onečišćujuće tvari dospijevaju u okoliš iz farmi, bolnica, kućanstava te industrija, a vrlo mala učinkovitost uređaja za pročišćavanje otpadnih voda ne olakšava situaciju. Do 2019. godine u mnogim vodenim sustavima, čak i u pitkoj vodi, prijavljeno je više od 600 aktivni farmaceutskih tvari. Iako se one pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama koje se mjere u nanogramima i mikrogramima po litri, studije pokazuju da i tako male količine predstavljaju rizik za okoliš i štetno djeluju na biljni i životinjski svijet, ali i na ljude.²

Zbog svojih intrinzičnih svojstava, tj. često visoke polarnosti i postojanosti, mnogi će lijekovi dospjeti i vjerojatno se akumulirati u vodenom okolišu. Iako potencijalni štetni učinci na vodene ekosustave još nisu u potpunosti ispitani, zbog mjera predostrožnosti i novih znanstvenih dokaza zasigurno će doći do strožih zahtjeva za pročišćavanje otpadnih voda u budućnosti. Ovi novi pogledi na pročišćavanje otpadnih voda uključuju širok raspon mikro onečišćivača, koji su sofisticiranim modernim analitičkim tehnikama otkriveni u otpadnim vodama kao i u vodenom okolišu.³

Kada govorimo o negativnim utjecajima ksenobiotika, utvrđeno je da neki lijekovi izazivaju endokrine poremećaje, tj. radi se o kemikalijama koje ometaju normalno funkcioniranje hormonskog sustava. Mnoge sintetske kemikalije mogu djelovati kao endokrini disruptori, a posebice pesticidi i plastifikatori.³

Niske koncentracije u kojima se pojavljuju u komunalnim postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda čine njihovo učinkovito uklanjanje izazovom. Uklanjanje mikro onečišćujućih tvari tijekom pročišćavanja otpadnih voda događa se kroz različite mehanizme, uključujući biorazgradnju, abiotičke transformacije i sorpciju u biomasu ili suspendirane krutine. Općenito,

procesi sorpcije i biorazgradnja smatraju se najvažnijim mehanizmima uklanjanja mikroonečišćujućih tvari, iako oni ne slijede opće pravilo jer njihov relativni doprinos ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima onečišćujuće tvari, podrijetlu i sastavu otpadne vode i karakteristike uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Dok se mnogi mikro-onečišćivači relativno dobro uklanjaju sorpcijom u mulj zbog svoje nepolarne prirode, mnogi farmaceutski proizvodi ili farmaceutski aktivni spojevi su visoko polarni, bilo zato što su sintetizirani na ovaj način da jamče veliku mobilnost unutar organizma ili su formirani nakon biotransformacije kako bi se omogućilo njihovo konačno izlučivanje urinom. Stoga će za učinkovito uklanjanje farmaceutskih spojeva poticanje njihove biorazgradnje ili korištenje naprednih oksidacijskih procesa vjerojatno biti najučinkovitija strategija uklanjanja.³

2. OPĆI DIO

2.1. KSENOBIOTICI

Ksenobiotici su spojevi strani živim organizmima i nastaju antropogenim aktivnostima. Ovi spojevi i njihovi metaboliti nalaze svoj put u vodene ekosustave, čak i na Antarktiku, putem izravnog ispuštanja, površinskog otjecanja i ispiranja. Ksenobiotici imaju potencijalno toksične učinke na neciljane organizme, a njihovo dospijevanje u okoliš može uzrokovati promjene u mikrobnim zajednicama i remećenje sastava i funkcija zajednica u vodenim ekosustavima.⁴

Kada uđu u postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda, ksenobiotici obično nisu potpuno mineralizirani. Oni se ili djelomično zadržavaju u mulju, ili se metaboliziraju u hidrofilniji, ali ipak postojaniji oblik te stoga prolaze kroz uređaj za pročišćavanje otpadnih voda i završavaju u prihvatnim vodama. Njihovo uklanjanje u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda promjenjivo je i ovisi o svojstvima tvari i uvjetima procesa (npr. vrijeme zadržavanja mulja, hidrauličko vrijeme zadržavanja, temperatura).⁵

Ksenobiotik znači „strano životu“. To je izraz koji se odnosi na sintetske kemikalije koje se ne nalaze u prirodi. One će sadržavati strukturne elemente koji su nepoznati ili rijetki u prirodi i/ili su sastavljeni u strukturi koja nije prirodne pojave. Neki istraživači također koriste izraz „koncentracija ksenobiotika“, što znači koncentracija koja se ne nalazi u prirodi - tako da možemo imati prirodni spoj prisutan u koncentraciji ksenobiotika. Takva koncentracija može se pojaviti kao rezultat, na primjer, izlivanja nafte ili ispuštanja industrijskih otpadnih voda.⁶

2.2. FARMACEUTICI

Farmaceutici u većini slučajeva moraju biti biološki aktivne i hidrofilne tvari kako bi se lako apsorbirale u ljudskom tijelu. Također moraju biti i postojani kako ne bi došlo do razgradnje molekule prije nego što lijek u organizmu izazove željeni učinak. Ovisno o farmakologiji medicinske tvari, ona se može izlučiti iz organizma kao nepromijenjena tvar, kao mješavina metabolita ili konjugirana s inaktivirajućim spojem vezanim za molekulu.⁵

U postrojenjima za obradu otpadnih voda ksenobiotici se obično ne mineraliziraju u potpunosti već se ili djelomično zadržavaju u mulju ili prelaze u još hidrofilniji oblik koji je također postojan te tako prođu kroz postrojenje i ponovno završavaju u vodama.⁵

Istraživanja su pokazala kako je koncentracija farmaceutika na izvorima vode obično $> 0,1 \mu\text{g/L}$, dok je u pročišćenoj vodi $> 0,05 \mu\text{g/L}$. Procesi koji se koriste za uklanjanje farmaceutika iz otpadnih voda su oksidacija, degradacija UV-zračenjem, reverzna osmoza i nano-filtracija. Problemi koji se javljaju prilikom korištenja navedenih procesa ograničavaju ekonomsku održivost ovih sustava, a to su: stvaranje opasnog mulja, skupi operativni i kapitalni troškovi, nepotpuno uklanjanje te potreba za stručnim osobljem za rukovanje i održavanje sustava.

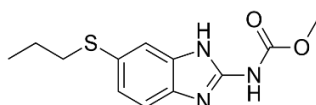
Kako je dosadašnji pristup ograničen malom mogućnošću ponovne uporabe, visokim troškovima i problemima zbrinjavanja, potrebne su naprednije tehnologije pročišćavanja kako bi se riješio problem prisutnosti farmaceutskih proizvoda u vodi.¹

2.2.1. ANTIPARAZITICI

Antiparazitici su jedna od skupina farmaceutika odnosno lijekova koja se najčešće upotrebljava u veterinarskoj medicini diljem svijeta, ali i u humanoj medicini. Antiparazitski lijekovi koriste se u prevenciji i liječenju parazitskih infekcija uključujući protozoe, ekoparazite i helminte. Ova skupina uključuje nekoliko klasa lijekova koji se koriste za liječenje širokog raspona bolesti uzrokovanih parazitima.⁷

2.2.1.1. ALBENDAZOL

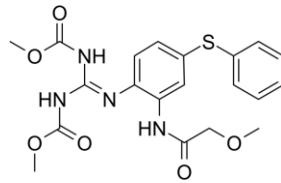
Albendazol (ABZ), čija struktura je prikazana na **Slici 1**, je učinkovit antihelmintik koji stvara aktivne i neaktivne metabolite kod ljudi i životinja. Ovaj lijek koristi se za liječenje određenih infekcija trakavicama (kao što su neurocisticerkoza i hidatidoza). Koristi se pretežito u tropskim i subtropskim regijama gdje je preporučeno periodično korištenje albendazola za liječenje infekcija helmintima.⁸



Slika 1. Albendazol⁹

2.2.1.2. FEBANTEL

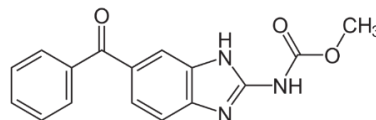
Febantel (FBT) je spoj strukturne formule prikazane na **Slici 2** koji se često koristi u veterinarskoj medicini. Koristi se za liječenje monogastričnih životinja i preživača zbog brze apsorpcije i metaboliziranja u životinja. Ima širok spektar antiparazitskog djelovanja stoga se koristi za liječenje gastrointestinalnog parazitizma kod ovaca, goveda i svinja, a ima i larvicidno i ovicidno djelovanje.¹⁰



Slika 2. Febantel¹¹

2.2.1.3. MEBENDAZOL

Mebendazol (MBZ) je anthelmintik strukturne formule prikazane na **Slici 3** koji se obično koristi za infekcije okruglim crvima, trihinelozom, kapilarijazom i toksokarijazom i drugim parazitskim infekcijama crvima. Kada se mebendazol daje tijekom duljeg razdoblja u visokim dozama, povezuje se s povišenjem razine enzima u serumu, a rijetki slučajevi akutnog, klinički vidljivog oštećenja jetre povezani su s njegovom primjenom. Mebendazol je sintetski derivat benzimidazola te ometa reprodukciju i preživljavanje helminta inhibiranjem stvaranja njihovih citoplazmatskih mikrotubula, čime selektivno i nepovratno blokira unos glukoze. To rezultira iscrpljivanjem zaliha glikogena i dovodi do smanjenog stvaranja ATP-a potrebnog za preživljavanje i reprodukciju helminta što na kraju uzrokuje smrt helminta.¹²



Slika 3. Mebendazol¹³

2.3. PESTICIDI

Pesticidi su skupina spojeva koja se intenzivno upotrebljava za suzbijanje insekata, gljivičnih infestacija, rasta korova i biljnih bolesti. S porastom svjetske populacije raste i uporaba pesticida zbog povećane potrebe za proizvodnjom hrane. Uporaba pesticida rezultira povećanjem količine hrane kao i poboljšanjem njene kvalitete te štiti od gubitaka usjeva. Međutim, pesticidi se svake godine sve više koriste diljem svijeta, sve je više raznih vrsta pesticida i dolazi do zlouporabe starijih, toksičnijih i ekološki postojećih pesticida.¹⁴

Njihova prisutnost u okolišu ima negativne učinke na ljudsko zdravlje, stoga se kod ljudi izloženih velikim dozama javlja čitav niz akutnih bolesti kao što su glavobolja, mučnina, grčevi, nelagode pri disanju i proljev, dok dugotrajni kontakt s manjim dozama može uzrokovati kronična oboljenja kao što su Parkinsonova bolest, reproduktivni poremećaji, rak, respiratorni poremećaji, dijabetes, kardiovaskularne bolesti itd.¹⁴

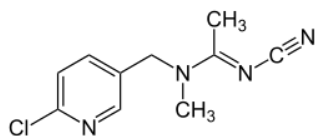
2.3.1. INSEKTICIDI

Insekticid je svaka otrovna tvar koja se koristi za ubijanje insekata. Takve se tvari prvenstveno koriste za suzbijanje štetnika koji napadaju kultivirane biljke ili za uklanjanje insekata koji prenose bolesti u određenim područjima.

Insekticidi se mogu klasificirati na nekoliko načina; na temelju njihovog kemijskog sastava, toksikološkog djelovanja ili načina ulaska u organizam. Prema načinu ulaska u organizam klasificirani su prema tome unose li se gutanjem (želučani otrovi), udisanjem (fumiganti) ili prodiranjem kroz tjelesni omotač (kontaktni otrovi). Međutim, većina sintetskih insekticida ulazi kroz sva tri navedena puta i stoga se bolje razlikuju jedni od drugih po svom osnovnom kemijskom sastavu. Osim sintetskih spojeva, neki organski spojevi koji se prirodno pojavljuju u biljkama korisni su insekticidi, kao i neki anorganski spojevi; neki od njih dopušteni su u organskim uzgojima. Većina insekticida se raspršuje po biljkama i drugim površinama kojima prolaze ili se njima hrane insekti.¹⁵

2.3.1.1. ACETAMIPRID

Acetamiprid je neonikotinoidni insekticid strukturne formule prikazane na **Slici 4** koji se koristi za suzbijanje insekata sisajućeg tipa na lisnatom povrću, plodovitom povrću, usjevima kupusa, citrusima, jabučicama, grožđu, pamuku i ukrasnom bilju i cvijeću.¹⁶

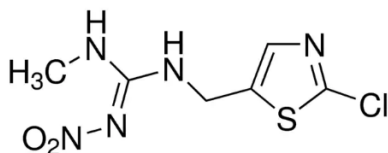


Slika 4. Acetamiprid¹⁷

Acetamiprid pokazuje vrlo kratko vrijeme poluraspada u tlu. Brzo se razgrađuje aerobnim metabolizmom. Acetamiprid je otporan na hidrolizu na temperaturama okoliša i sporo se fotorazgrađuje u vodi. Transformira se umjereno brzo u aerobnim vodenim okolišima, a sporo u anaerobnim vodenim sustavima. Čini se da ima minimalne učinke na pitku vodu i zbog brze razgradnje nije pokazao sposobnost bioakumulacije u prirodi. Zbog brze razgradnje acetamiprida ne očekuje se da će biti postojan u okolišu. Metaboliti acetamiprida predstavljat će veći rizik za okoliš, no potreban je dodatni rad kako bi se utvrdila sudbina i toksičnost metabolita acetamiprida.¹⁷

2.3.1.2. KLOTIANIDIN

Klotianidin, čija struktura je prikazana na **Slici 5**, pripada kemijskoj klasi insekticida poznatih kao neonikotinoidi ili kloronikotinili, koji ometaju nikotinske acetilkolinske receptore na postsinaptičkoj membrani. Spoj djeluje agonistično na nikotinske acetilkolinske receptore insekata koji se nalaze u središnjem živčanom sustavu. Klotianidin djeluje insekticidno kontaktom i gutanjem (sistemski insekticid).¹⁸

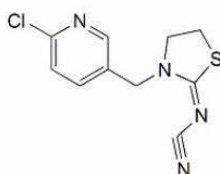


Slika 5. Klotianidin¹⁹

Klotianidin je kemijski pesticid koji može izazvati mnoge negativne učinke na ljude. Do trovanja može doći udisanjem, dermalnim kontaktom i gutanjem. Regulatorna tijela opisuju toksičnost klotianidina kao veliku, a mnoga su istraživanja pozvala vlasti da preispitaju upotrebu ove kemikalije.²⁰

2.3.1.3. TIAKLOPRID

Tiakloprid je kloronikotinilni insekticid koji se koristi protiv širokog spektra insekata čija je strukturna formula prikazana na **Slici 6**. Kao takav, njegov način djelovanja je ometanje prijenosa živcima i izazivanje nekontroliranog pucanja živaca, što dovodi do hiperekscitacije, konvulzija i smrti pogođenih insekata. Tiakloprid se često koristi kod insekata koji su postali otporni na inhibitore acetilkolinesteraze poput karbamata i organofosfatnih insekticida. Otrovanje tiaklopridom može uzrokovati razne zdravstvene probleme ovisno o težini trovanja. Blago do umjereno trovanje može dovesti do bolova u truhu, glavobolja, povraćanja, vrtoglavice, proljeva i blage sedacije. Ozbiljno trovanje izazvano konzumiranjem velikih količina tiakloprida može rezultirati hipotermijom, respiratornim zatajenjem, pneumonitisom, hipotenzijom, metaboličkom acidozom (neravnoteža kiseline u krvi) i ventrikularnim disritmijama (nepravilan rad srca). U nekim slučajevima teško trovanje tiaklopridom pokazalo se kobnim.²¹



Slika 6. Tiakloprid²²

2.4. MIKROPLASTIKA

Milijuni tona plastike proizvode se svake godine kako bi se zadovoljile potrebe suvremenog društva, od čega većina završava na odlagalištima ili u prirodi kao plastični otpad. Kao rezultat javlja se prisutnost plastike različitih veličina u raznim dijelovima svijeta i okoliša. Plastični ostaci mikro veličine od 1-5000 µm nazivaju se mikroplastikom i otkriveni su globalno u tlu,

zraku, otpadnim vodama, pitkoj i morskoj vodi te u jezerima i rijekama. Mikroplastika je postala novi zagađivač odnosno onečišćivač, a njena prisutnost u različitim ekološkim sustavima izaziva veliku zabrinutost zbog štetnih učinaka na ljudsko zdravlje i ekosustav. Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda privukla su u prošlom desetljeću veliku pozornost kao značajni izvor mikroplastike u vodenom okolišu. Mikroplastika od polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS) i polivinil klorida (PVC) otkrivena je u priljevima i otpadnim vodama postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda diljem svijeta u koncentracijama do 5,6 mg/L što jasno ukazuje da su upravo postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda put kojim mikroplastika dopire u vodeni okoliš. Slična opažanja zabilježena su i u postrojenjima za obradu vode za piće.²³

Kada govorimo o učincima mikroplastike na procese biološke obrade otpadnih voda, zabilježeno je da u kratkom vremenu (2 h) nema značajnog utjecaja mikroplastike na aktivnosti bakterija koje oksidiraju nitrite i amonij, denitrifikatore te organizme koji akumuliraju polifosfat. Zbog svega navedenog može se zaključiti kako mikroplastika ne utječe na učinkovitost biološke obrade otpadnih voda u smislu uklanjanja dušika i fosfora. Međutim, prilikom praćenja u duljem vremenu (264 dana), pokazali su se negativni utjecaji PVC mikroplastike na proces obrade anaerobnim granularnim muljem. Nadalje, pokazalo se da PE mikroplastika inhibira aerobnu i anaerobnu digestiju otpadnog aktivnog mulja zbog smanjenja ključnih bakterija putem oksidativnog stresa i otpuštanja toksičnih kemikalija, odnosno zbog indukcije reaktivnih kisikovih spojeva. Čestice mikroplastike također mogu adsorbirati, raspršivati ili blokirati UV-svjetlost čime utječu na učinkovitost UV-dezinfekcije. Kada su čestice mikroplastike suspendirane u otpadnoj vodi, one negativno utječu na UV-inaktivaciju mikroorganizama tako što povećavaju UV-apsorbanciju vode i štite mikroorganizme od UV-svjetlosti.²³

2.5. OBRADA OTPADNE VODE

Otpadne vode nastaju svakodnevno, a mogu biti poljoprivredne, industrijske ili otpadne vode iz kućanstva, stoga im je sastav raznolik. Efluenti iz različitih izvora sadrže organski ugljik i dušik, anorganske tvari, teške metale i suspendirane ili otopljene krute tvari. Prilikom procesa pročišćavanja otpadnih voda nastaju aerosoli koji mogu prenositi uzročnike infekcija kao što je to bio slučaj s infekcijom virusa SARS-CoV koji je zarazio velik broj ljudi u Kini upravo putem aerosoliziranih kapljica kontaminirane otpadne vode. Milijuni ljudi umiru svake godine od

posljedica bolesti koje se mogu prenositi otpadnom vodom kao što su kolera, tifus, dizenterija i druge bolesti uzrokovane lošim sanitarnim uvjetima. Iz svega navedenog može se zaključiti koliko je nekontrolirano ispuštanje nepročišćenih otpadnih voda opasno za ljude i okoliš. Zbog složenosti i heterogenosti onečišćujućih tvari potrebne su visoko učinkovite tehnologije obrade kako bi se zadovoljili potrebni standardi za kvalitetu vode, a pronaći one koji su ekonomski prihvatljivi u današnje vrijeme predstavlja veliki izazov.²⁴

2.5.1. FIZIKALNI PROCESI OBRADNE OTPADNIH VODA

Fizikalni procesi obrade otpadnih voda su oni kojima se uklanjanje tvari odvija korištenjem prirodnih sila kao što su gravitacija, električno privlačenje i Van der Waalove sile ili korištenjem fizičkih barijera. Fizikalni procesi ne izazivaju promjene u kemijskoj strukturi tvari dok se fizičko stanje može promijeniti kao što se događa kod isparavanja. Ove metode uključuju sedimentaciju, flotaciju i adsorpciju te korištenje barijera kao što su šipke, sita, duboki filtri i membrane.²⁵

2.5.2. KEMIJSKI PROCESI OBRADNE OTPADNIH VODA

Kemijski procesi obrade otpadnih voda koriste dvije vrste svojstava:

- Kemijske karakteristike onečišćujuće tvari s obzirom na njihovu sposobnost da reagiraju ili međusobno djeluju s kemikalijama za pročišćavanje.
- Kemijske karakteristike produkata reakcija onečišćujuće tvari i kemikalije za obradu s obzirom na njihovu topljivost, hlapljivost i druga svojstva.

Postoji šest kemijskih procesa koji se mogu koristiti za uklanjanje onečišćujućih tvari iz otpadnih voda:

- reakcije kojima se proizvode netopljive krutine,
- reakcije kojima se proizvode netopljivi plinovi,
- reduciranje naboja površine kako bi se potaknula koagulacija koloidne suspenzije,
- reakcije kojima se iz biološki nerazgradivih tvari proizvode biološki razgradive tvari,
- reakcije deaktiviranja kelirajućeg sredstva,
- oksidacija ili redukcija kojom se proizvodi tvar koja se može lakše ukloniti nekom od prethodnih metoda.²⁵

2.5.3. BIOLOŠKI PROCESI OBRADJE OTPADNIH VODA

Biološki procesi obrade otpadnih voda su oni kod kojih se koriste organske tvari kao hrana bakterijama i drugim mikroorganizmima. Gotovo se svaka organska tvar može koristiti kao hrana za jednu ili više vrsta bakterija, gljiva, cilijata i drugih mikroorganizama. Pri ovakvom korištenju, složene organske molekule se sustavno razgrađuju, a zatim se ponovno sastavljaju kao nova stanična protoplazma. Kisik, koji djeluje kao akceptor elektrona, je potreban u aerobnim ili anoksičnim sustavima u otopljenom molekularnom obliku ili u obliku aniona kao što su nitrati i sulfati. Na taj način dolazi do smanjenja količine organskih onečišćujućih tvari, dok se količina mikroorganizama, ugljičnog dioksida, vode i ostalih nusproizvoda mikrobnog organizma povećava.²⁵

2.5.4. BIORAZGRADNJA KSENOBIOTIKA

Biorazgradnja je proces razgradnje složenih organskih spojeva u jednostavne molekule kao što su voda i ugljikov dioksid pomoću mikroorganizama.²⁶

Pročišćavanje aktivnim muljem najčešći je postupak za pročišćavanje otpadnih voda, a dva su procesa eliminacije koji djeluju istovremeno: ili dolazi do sorpcije farmaceutika na čvrstu tvar ili do biorazgradnje uzrokovane mikroorganizmima. Do kojeg procesa eliminacije će doći ovisi o karakteristikama ksenobiotičkog spoja. Tako je za neke spojeve kao što su ibuprofen i mefenaminska kiselina, studija pokazala da sorpcija nije značajan faktor razgradnje već da je uklanjanje posljedica biorazgradnje, dok je za druge spojeve, primjerice ciprofloksacin koji je antibiotik, utvrđeno kako je glavni mehanizam uklanjanja upravo sorpcija. Općenito se može reći da je to veća vjerojatnost da će doći do biorazgradnje što je molekula jednostavnija.²⁷

Prilikom razgradnje ksenobiotički spojevi mogu se transformirati na tri načina: mineralizacijom, hidrofilnom ili hidrofobnom transformacijom. Ako se spoj transformira u ugljikov dioksid, govorimo o potpunoj mineralizaciji. Ako se farmaceutik transformira u hidrofobniji spoj povećava se razdioba u mulju, a ako postane hidrofilniji vjerojatno će ostati u vodi.²⁷

U prethodnim studijama biorazgradivost ksenobiotika ispitivana je jeftinom, ali učinkovitom i ponovljivom metodom mjerenja nastalog ugljikovog dioksida. Ispitivala se biorazgradivost osam ksenobiotika među kojima je bio i antiparazitik mebendazol koji je pokazao najviši stupanj biorazgradnje od $13,0 \pm 0,050$ %.²⁶

Kada govorimo o pesticidima, i njih je moguće učinkovito ukloniti iz okoliša biorazgradnjom pomoću različitih organizama (gljiva, bakterija, virusa, protozoa). Biorazgradnja je posebno

učinkovita kod uklanjanja organoklorina, organofosfata i karbamata koji se koriste u poljoprivredi. Najvažnija strategija za uklanjanje sintetičkih pesticida mikroorganizmima je enzimska razgradnja.²⁸

2.5.5. BIOLOŠKA OBRADA OTPADNE VODE AKTIVNIM MULJEM

Proces obrade otpadnih voda aktivnim muljem pruža mnoge značajne prednosti u odnosu na druge metode. Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda koja primarno koriste proces obrade aktivnim muljem omogućuju smanjenje količine neželjenog mulja, redukciju troškova, jednostavnije vođenje procesa, pouzdanost procesa itd.²⁹

Uklanjanje organskih onečišćivala u sustavima s aktivnim muljem uključuje biorazgradnju, hidrolizu, sorpciju, fotolizu i isparavanje, međutim mehanizmi uklanjanja također ovise i o spoju koji se uklanja.³⁰

Puno je čimbenika koji mogu utjecati na učinkovitost biorazgradnje aktivnim muljem kao što su mikrobne kulture (npr. koncentracija biomase i vrsta mulja), svojstva egzogenih onečišćujućih tvari (koncentracija, toksičnost i molekularna svojstva) i uvjeti okoliša (npr. temperatura, pH-vrijednost, otopljeni kisik, hidrauličko vrijeme zadržavanja i vrijeme zadržavanja mulja).³¹

2.6. ANALITIČKE METODE PRAĆENJA KSENOBIOTIKA U OKOLIŠU

Ksenobiotici se tradicionalno otkrivaju u okolišu analizom vode širokog spektra uzoraka. Za potrebe analize uzorkuju se površinske i podzemne vode koje se izravno ili neizravno koriste za proizvodnju pitke vode, kišnice, komunalne i industrijske otpadne vode i tehnološke vode.

Za pravilnu procjenu rizika i praćenje kakvoće površinske i pitke vode, potrebno je korištenje multirezidualnih metoda koje omogućuju mjerenje u tragovima i ultra-tragovima. Korištenjem jedne analitičke tehnike može se uštedjeti vrijeme, novac i resursi analizom više vrsta ksenobiotika koji pripadaju različitim klasama.

Metode koje se temelje na pripremi uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi (**eng.** *solid-phase extraction*, SPE) u kombinaciji sa tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom

(**eng.** *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC/MS), najčešće su korištene metode za probir i kvalifikaciju ksenobiotika u okolišu i otpadnim vodama. U novije vrijeme su se kvaliteta i mogućnosti masenih spektrometara poboljšali stoga dobivamo sve opsežnije i kvalitetnije informacije u području analize ksenobiotika. Kao rezultat toga zadnjih godina su razvijene i primijenjene najsuvremenije analitičke metode u analizi ksenobiotika i produkata njihove transformacije u uzorcima okoliša i otpadnim vodama korištenjem naprednih kromatografskih tehnika (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (**eng.** *high performance liquid chromatography*, HPLC) i tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (**eng.** *ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC)). Kromatografske tehnike koriste se u kombinaciji sa spektrometrom masa detekcijskim sustavom niske ili visoke razlučivosti kao što su hibridni kvadripol s mjerenjem vremena proleta (**eng.** *quadrupole time-of-flight*, Q-TOF-MS), kvadripolna linearna ionska klopka (**eng.** *quadrupole linear ion trap*, Q-LIT-MS), *Fourierova transformacija* masene spektrometrije *ionske ciklotron-rezonancije* (**eng.** *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, FT-ICR-MS) i orbitalna klopka (**eng.** *Orbitrap*).³²

2.6.1. SPEKTROMETRIJSKE I MIKROSKOPSKE METODE

Spektrometrijske metode se češće koriste za analizu pesticida u formulacijama. Međutim, također su zabilježene neke spektrometrijske metode pregleda za okolišne i biološke uzorke. Snažne spektrometrijske tehnike strukturalnog razjašnjenja (kao što je spektrometrija nuklearne magnetske rezonancije – NMR) također su se intenzivno koristile za istraživanje obrazaca razgradnje matičnih pesticida, uglavnom u biološkim sustavima. Derivatizacija je često potrebna za uvođenje kromofora, fluorofora ili luminofera u ciljne molekule.³³

Masena spektrometrija je analitički alat koristan za mjerenje omjera mase i naboja (m/z) jedne ili više molekula prisutnih u uzorku. Ta se mjerenja često mogu koristiti i za izračunavanje točne molekularne težine komponenata uzorka. Obično se maseni spektrometri mogu koristiti za identifikaciju nepoznatih spojeva određivanjem molekularne težine, za kvantificiranje poznatih spojeva i za određivanje strukture i kemijskih svojstava molekula.³⁴

Kako bi se izmjerile karakteristike pojedinačnih molekula, maseni spektrometar ih pretvara u ione tako da se mogu pomicati i manipulirati vanjskim električnim i magnetskim poljima. Tri osnovne funkcije masenog spektrometra i povezanih komponenti su:

1. Izvor iona - mali uzorak je ioniziran, obično u katione gubitkom elektrona.
2. Analizator mase - ioni se sortiraju i odvajaju prema njihovoj masi i naboju.
3. Detektor - odvojeni ioni se zatim detektiraju, a rezultati prikazuju na dijagramu.³⁵

Napredni spektrometri masa visoke razlučivosti imaju brojne prednosti, a neke od najvažnijih su izvanredna točnost mase, visoka razlučivost, izvrsna točnost izotopa i iznimno visoka osjetljivost.³²

Svjetlosna mikroskopija je opći izraz koji se koristi za bilo koju vrstu mikroskopije gdje se svjetlost prenosi iz izvora koji se nalazi na suprotnoj strani uzorka, do leće objektiva. Općenito, svjetlost prolazi kroz kondenzator kako bi se fokusirala na uzorak kako bi se postigla maksimalna svjetlina. Nakon što svjetlost prođe kroz uzorak, prolazi kroz leću objektiva kako bi povećala sliku uzorka i zatim do okulara, gdje se vidi uvećana slika.

Tehnike svjetlosnog mikroskopa značajno su se razvile u proteklih 20 godina i sada pružaju nezamjenjiv alat za proučavanje molekularnih događaja na substancičnoj razini kako bi se dobile vremenske i prostorne informacije visoke rezolucije. Kako bi se postigli optimalni rezultati, bitno je pažljivo planirati i provesti pokuse temeljene na mikroskopiji, što zahtijeva razumijevanje barem osnova stanične biologije, pripreme uzorka i fluorescentne svjetlosne mikroskopije.

Mikroskopijom se istražuju odnosi između struktura i svojstava za vrlo širok raspon materijala, od mekih do vrlo tvrdih, od neživih materijala do živih organizama, kako bi se bolje razumjelo njihovo ponašanje.³⁶

2.6.2. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografija je skupni naziv za laboratorijske tehnike koje se koriste za razdvajanje smjese. Ona uključuje dvije faze, pokretnu (mobilnu) i nepokretnu (stacionarnu). U pokretnoj fazi je otopljena ispitivana smjesa koja se kreće kroz nepokretnu fazu čime se dijelovi smjese razdvajaju te ih se može analizirati i kvantitativno odrediti. Postoji više vrsta kromatografija, npr. tekućinska kromatografija, plinska kromatografija, kromatografija ionske izmjene, afinitetna kromatografija, ali sve one koriste iste osnovne principe.

Za analizu pesticida u hrani, okolišu i kliničkim uzorcima, glavna primarna metoda je plinska kromatografija. Odvajanje komponenti se postiže na nepokretnim fazama koje imaju različite

polarne karakteristike zbog širokog raspona polariteta analita. Međutim, termalna labilnost, niska hlapljivost i visoka polarnost nekih ciljnih analita glavni su razlozi neuspjeha plinske kromatografije u analizi pesticida. Broj klasa pesticida koji nisu prikladni za plinsku kromatografiju je relativno malen, a neki od njih su: fenilurea, karbamati, dinitrofenoli, benzimidazoli, azoli, benzoiluree, neki organofosforni, piretroidni i kvaterni amonijevi derivati stoga oni zahtijevaju upotrebu tekućinske kromatografije.

Mehanizam odvajanja pesticida koji je najpopularniji u tekućinskoj kromatografiji je kromatografija reverzne faze, a koriste se još i mehanizmi ionske izmjene i ionskih parova.³³

Kada govorimo o kromatografskoj analizi farmaceutskih aktivnih spojeva u uzorcima vode, cilj je usvajanje brzih metoda tekućinske kromatografije s kratkim, uskim stupcima koji omogućuju ultravisoke tlakove i visoke brzine protoka pokretne faze. Produljena trajanja analize nisu prihvatljiva za visokoučinkovitu analizu, stoga je postizanje najveće kromatografske razlučivosti u najkraćem mogućem vremenu ključno za laboratorije koji provode studije praćenja. Na primjer, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti koja koristi kolone napunjene česticama ispod 2 μm , omogućuje eluiranje komponenata uzorka u puno uže i fokusiranije zone ili krivulje što rezultira većom kromatografskom rezolucijom i povećanim vršnim kapacitetom. Upravo zato UHPLC postaje sve popularniji za analizu farmaceutika, ali i ksenobiotika općenito, u vodi s izvješćima o povećanoj osjetljivosti i brzini u usporedbi s tipičnim HPLC kolonama sa 5 ili 3 μm zrnima sorbensa. Također se pojavila i hidrofilna interakcijska kromatografija (**eng.** *hydrophilic interaction chromatography*, HILIC) kao koristan analitički alat za odvajanje polarnih farmaceutskih aktivnih spojeva. U usporedbi sa konvencionalnom tekućinskom kromatografijom reverzne faze (**eng.** *reversed-phase liquid chromatography*, RPLC), HILIC povećava osjetljivost u detekciji masenom spektrometrijom, međutim primjene HILIC-a u okolišu su rijetke.³²

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. KSENOBIOTICI

U **Tablici 1** navedeni su ksenobiotici korišteni u radu.

Tablica 1. Korišteni ksenobiotici tijekom eksperimentalnog rada

Farmaceutik	Molekulska formula	Mw, g/mol	CAS broj	Naziv po IUPAC-u	Topljivost (voda, 25 °C, g/L)
Febantel	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	446,48	58306-30-2	metil <i>N</i> -[<i>N'</i> -[2-[(2-metoksiacetil)amino]-4-fenilsulfanilfenil]- <i>N</i> -metoksikarbonilkarbamimidol]karbamat	33,9
Mebendazol	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	295,29	31431-39-7	metil <i>N</i> -(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il)karbamat	71,3
Albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	265,33	54965-21-8	metil <i>N</i> -(6-propilsulfanil-1H-benzimidazol-2-il)karbamat	22,8
Tiaklopid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252,72	111988-49-9	[3-[(6-kloropiridin-3-il)metil]-1,3-tiazolidin-2-iliden]cijanamid	0,18
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222,67	135410-20-7	<i>N</i> -[(6-klor-3-piridil)metil]- <i>N'</i> -cijano- <i>N</i> -metil-acetamidin	4,25
Klotianidin	C ₆ N ₅ H ₈ SO ₂ Cl	249,68	210880-92-5	1-[(2-kloro-1,3-tiazol-5-il)metil]-3-metil-2-nitrovanidin	0,33

3.1.2. AKTIVNI MULJ

Aktivni mulj korišten za biorazgradnju ksenobiotika uzorkovao se za svaki ispitivani ksenobiotik posebno. Prije korištenja u reaktorima, mulj se prelio u čaše i ostavio neko vrijeme kako bi se ugustio, nakon čega se odijeljena tekućina dekantirala. U svaki reaktor (osim slijepe probe) stavljeno je 300 mL mulja.

3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR

3.2.1. ANALITIČKA VAGA

U radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, XA105, Švicarska, prikazana na **Slici 7**.



Slika 7. Analitička vaga Mettler Toledo, XA105, Švicarska

3.2.2. SUŠIONIK

Sušionik je uređaj koji se koristi za uklanjanje viška vlage iz uzorka mulja s ciljem određivanja gustoće. U radu je korišten sušionik Memmert UNB 100, Schwabach, Njemačka prikazan na **Slici 8**.



Slika 8. Sušionik Memmert UNB 100, Schwabach, Njemačka

3.2.3. ESIKATOR

Eksikator je staklena posuda sa suhom atmosferom koja nastaje zbog prisutnosti sredstva koje upija vlagu. Upotrebljava se za čuvanje uzoraka, reagensa ili taloga od vlage iz zraka. Kao sredstvo za sušenje obično se koristi bezvodni kalcijev klorid (CaCl_2).³⁷

Na **Slici 9** prikazan je eksikator korišten u ovom radu.



Slika 9. Eksikator

3.2.4. ULTRAZVUČNA KUPELJ

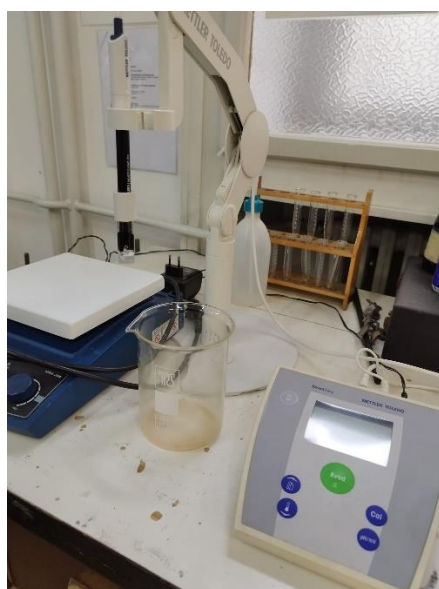
Ultrazvučna kupelj je uređaj koji koristi ultrazvučne valove koji se prenose kroz kapljevinu za ubrzanje emulgiranja, otapanja uz miješanje, ekstrakciju itd. U ovom radu kupelj se koristila za pripremu temeljnih standardnih otopina kako bi se postiglo bolje otapanje farmaceutika u vodi i metanolu. Na ultrazvučnoj kupelji moguće je podešavanje temperature kupelji i snage ultrazvuka. Uz to postoji mogućnost pohranjivanja i do 10 programa s različitim postavkama eksperimentalnih uvjeta. Maksimalna temperatura kupelji iznosi 80 °C, vrijeme od 1 do 99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W. Ultrazvučna kupelj korištena u ovom radu je Sonorex digital 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka prikazana na **Slici 10**.



Slika 10. Ultrazvučna kupelj Sonorex digital 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka

3.2.5. pH-METAR

Mjerenje pH-vrijednosti vrši se kombiniranom staklenom elektrodom koja se sastoji od mjernog i referentnog sustava uklopljenih u zajedničko kućište. pH-elektroda koristila se za mjerenje pH-vrijednosti u svih pet reaktora u određenim vremenskim intervalima. Nakon svakog korištenja elektroda se ispirala deioniziranom vodom, a u vrijeme kada se ne koristi čuva se uronjena u otopinu kalijevog klorida. U radu je korišten pH-metar Mettler Toledo S20 SevenEasy, Švicarska i prikazan je na **Slici 11**.



Slika 11. pH-metar Mettler Toledo S20 SevenEasy, Švicarska

3.2.6. AERACIJSKE PUMPE

Aeracijske pumpe su uređaji koji se koriste za dovod kisika. Prilikom rada sa aktivnim muljem cilj je da mikroorganizmi imaju dovoljno kisika koji im je potreban za život. Prilikom provođenja procesa biorazgradnje, reaktori su morali biti zatvoreni kako čestice i mikroorganizmi iz okoline ne bi dospjeli u njih, stoga su se aeracijske pumpe koristile kako bi osigurale povoljne uvjete za mikroorganizme unutar reaktora. Aeracijska pumpa također osigurava i miješanje smjese u reaktoru. Na **Slici 12** prikazane su aeracijske pumpe Eheim air400, Njemačka, korištene u ovom radu.



Slika 12. Aeracijske pumpe Eheim air400, Njemačka

3.2.7. TOC ANALIZATOR

Praćenje ukupnog ugljika (**eng.** *total carbon*, TC) jedan je od najvažnijih parametara koji se koristi u postrojenjima za analizu pitke vode i otpadne vode. Mjerenje TC-a (mg C/L) može biti ključno za optimizaciju procesa pročišćavanja otpadnih voda. TC je koristan u otkrivanju prisutnosti mnogih organskih kontaminanata uključujući naftne proizvode, organske kiseline poput huminskih i fulvo kiselina, pesticida, patogena itd. To je nespecifičan, ali uključiv parametar za praćenje organskih tvari. Poznavanje i razumijevanje razina ugljika koje dolaze u postrojenje, prolaze kroz njega i napuštaju ga, može se koristiti kao mjera učinkovitosti tretmana i kao pokazatelj kontaminacije.³⁸

Metoda mjerenja na TOC-Vws zasniva se na kombiniranoj oksidaciji uzorka pri povišenoj temperaturi od 80 °C pomoću persulfata i UV zračenja. Persulfat se koristi jer je fotosenzibilan

i jer zakiseljava uzorak na pH = 2. Ugljik u vodenim uzorcima oksidira u CO₂ koji se detektira pomoću neraspršujućeg infracrvenog detektora.

U ovom radu korišten je TOC-Vws analizator proizvođača Shimadzu, Kyoto, Japan, prikazan na **Slici 13**.



Slika 13. TOC-Vws analizator Shimadzu, Kyoto, Japan

3.2.8. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

U prethodnom poglavlju govorili smo o kromatografiji i koliko veliku ulogu ima u analizi otpadnih voda. Upravo zato je korištena i u ovom radu za analizu uzoraka uzetih iz svih pet reaktora u točno određenim intervalima. Uzorci su analizirani tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti (HPLC) Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države, koji je prikazan na **Slici 14**. Instrument se sastoji od ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatoranog držača kolone, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala s programom STAR 5.2. preko kojeg se upravlja HPLC-om, prikupljaju i obrađuju podaci. Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u ACN-u), a sastav pokretne faze mijenja se s vremenom prema gradijentu separacije prikazanim u **Tablici 2**. Volumen injektiranja uzorka je 30 µL, temperatura 20-25 °C. Kolona se prala 65 %-tnim acetonitrilom (ACN) jedan sat protokom od 0,5 mL/min prije i nakon analize uzoraka. Volumen injektiranog ACN-a je 10 µL.

Tablica 2. Gradijent separacije pokretne faze tijekom snimanja kromatograma

t_R , min	Protok, mL/min	A, %	B, %
0,00	0,5	100	0
2,30	0,5	92	8
6,00	0,5	90	10
11,00	0,5	70	30
15,00	0,5	40	60
18,00	0,5	5	95
28,00	0,5	5	95
28,06	0,5	100	0
30,00	0,5	100	0



Slika 14. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države

3.3. METODE RADA

3.3.1. PRIPREMA TEMELJNIH STANDARDNIH OTOPINA KSENOBIOTIKA

Temeljna standardna otopina (TSO) antiparazitika koncentracije 1000 mg/L pripravljena je u tikvicama od 200 mL. Najprije se izvagalo 200 mg svakog pojedinog antiparazitika na

analitičkoj vagi koja je potom dodana u tikvicu koja se dopunila metanolom do oznake. Nakon toga tikvica je uronjena u ultrazvučnu kupelj radi poboljšanja procesa otapanja antiparazitika. Na ovaj način pripremljene su otopine febantela, mebendazola i albendazola. Koncentracija radnih otopina (RO) bila je 10 mg/L, a pripremljene su tako da se 10 mL TSO otpipetiralo u 1000 mL destilirane vode u reaktoru. Radna otopina pripremana je tako da udio metanola ne prelazi 1 % zbog toksičnog utjecaja na mikroorganizme.

Kako su pesticidi topljivi u vodi, nije bilo potrebe za metanolom, ali se zbog visoke cijene i velikih volumena, odmah pripremla radna otopina koncentracije 10 mg/L na način da se odvagalo 10 mg pesticida u tikvicu volumena 1 L te se dodavala MiliQ voda do oznake. Tako pripremljena otopina dodavala se direktno u reaktore.

3.3.2. PROVEDBA PROCESA BIORAZGRADNJE AKTIVNIM MULJEM

Procesi biorazgradnje ksenobiotika provodili su se u staklenim reaktorima koji su prikazani na **Slici 15**. Svaki reaktor poklopljen je plastičnim poklopcem koji na sebi ima dva otvora. Kroz jedan otvor uveden je termometar kojim se pratila temperatura reakcijske smjese, a kroz drugi gumena cijev aeracijske pumpe koja je spojena na staklenu cijev sa filterom za zrak uronjenim u reaktor.



Slika 15. Reaktori za provedbu postupka biorazgradnje

Radni volumen u reaktorima iznosio je 1 L. Kako bi se isključio utjecaj Sunčevog zračenja na razgradnju farmaceutika, reaktori su se omotali aluminijskom folijom.

Osim aktivnog mulja, destilirane vode i otopine ksenobiotika, u reaktore se dodavala i mikroplastika. Cilj je bio analizirati utjecaj mikroplastike na biorazgradnju pojedinog ksenobiotika. U **Tablici 3** upisan je sadržaj svakog pojedinog reaktora.

Tablica 3. Sadržaji reaktora tijekom biorazgradnje

REAKTOR	SADRŽAJ
Reaktor 1	300 mL ugušćenog mulja + destilirana voda
Reaktor 2	Otopina ksenobiotika koncentracije 10 mg/L
Reaktor 3	300 mL aktivnog mulja + otopina ksenobiotika koncentracije 10 mg/L
Reaktor 4	300 mL aktivnog mulja + otopina ksenobiotika koncentracije 10 mg/L + mikroplastika
Reaktor 5	300 mL aktivnog mulja + mikroplastika + destilirana voda

3.3.3. ODREĐIVANJE GUSTOĆE MULJA I UGUŠĆIVANJE MULJA

Gustoća mulja određivala se za čisti mulj koji je korišten u reaktorima prije početka procesa biorazgradnje, te nakon završetka biorazgradnje za mulj s ksenobiotikom i mulj s ksenobiotikom i mikroplastikom.

S ciljem pripreme aktivnog mulja za proces biorazgradnje, dobiveni mulj je potrebno prvo ugustiti tako da se izlije u veće posude te se pričekava dok se mulj na istaloži na dno kao što je prikazano na **Slici 16**. Nakon taloženja, potrebno je izliti (dekantirati) tekućinu iznad mulja.



Slika 16. Ugušćivanje mulja

Tako ugušćeni mulj se zatim izlije u reaktore.

Za određivanje gustoće najprije je potrebno filter papir staviti u eksikator na 1 h. Nakon toga papir se važe i postavlja u lijevak spojen na posudu za odsisavanje koja je gumenom cijevi spojena na izvor vakuuma. Pusti se voda iz slavine kako bi se u posudi stvorio vakuum, a potom se dodaje 10 mL prethodno homogeniziranog mulja. Nakon završetka filtracije, filter papir se suši u sušioniku sat vremena na 105 °C, a potom drži u eksikatoru 1 h. Nakon toga se važe, a gustoća se računa prema izrazima (1) i (2):

$$m_{\text{mulja}} = m_{\text{ukupna}} - m_{\text{papira}} \quad (1)$$

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2)$$

3.3.4. UZORKOVANJE I PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

Za vrijeme vođenja pokusa bilo je potrebno pratiti niz parametara: pH-vrijednost otopine, temperaturu sadržaja u reaktoru, temperaturu okoline, TC i gustoću mulja. Temperatura i pH-vrijednost pratila se na početku reakcije te u 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 24 h i 48 h. Uzorci za kromatografsku analizu uzimani su u istim vremenskim intervalima, dok su se uzorci za TC uzimali na kraju procesa biorazgradnje. Uzorkovanje se vršilo pomoću plastičnih šprica te su uzorci profiltrirani kroz filter za injekcije FilterBio, Labex Ltd., Kina veličine pora 0,45 μm prikazan na **Slici 17**.



Slika 17. Filtar za injekcije FilterBio, Labex Ltd., Kina

3.3.5. PRAĆENJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

Ukupna količina ugljika određivala se za sve uzorke nakon provedenog procesa biorazgradnje. Uzorci su uzimani iz reaktora te su profiltrirani kroz filtar za injekcije veličine pora 0,22 μm . Prije početka mjerenja potrebno je u programu odabrati umjernu krivulju. Kada se program pokrene, uzorak se injektira u uređaj te se nakon 7-10 minuta dobiva rezultat iskazan u mg/L. Nakon uporabe uređaja potrebno je pokrenuti ispiranje koje se vrši MiliQ vodom.

3.3.6. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

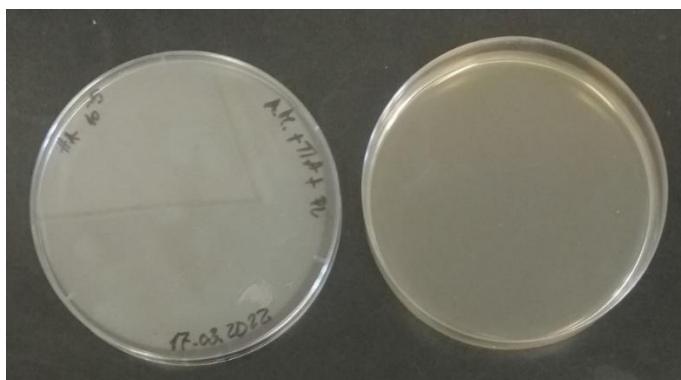
Za analizu uzoraka na kromatografu potrebno je vijale postaviti na označena mjesta te u program upisati koje uzorke analiziramo te na kojim se mjestima nalaze. Cilj kromatografske analize bilo je praćenje uklanjanja ksenobiotika tijekom vremena i to u smjesi s muljem i s muljem i mikroplastikom. Za svaki uzorak pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i apsorbancija (A), a rezultat kromatografske analize je kromatogram. Na kromatogramu su vidljive kromatografske krivulje svih spojeva koji se nalaze u smjesi te se usporedbom kromatograma dobivenih u različitim vremenima može zaključiti da li je došlo do razgradnje promatranog spoja.

3.3.7. MIKROBIOLOGIJA

Mikrobiološka analiza provodila se za čisti mulj prije početka biorazgradnje, čisti mulj nakon biorazgradnje, za mulj + ksenobiotik te za mulj + ksenobiotik + mikroplastiku. Pratio se broj nastalih kolonija (**eng.** *colony-forming unit*, CFU) gljiva i bakterija. Za bakterije je bilo potrebno pripremiti razrjeđenja 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} , a za gljive 10^{-2} i 10^{-3} . Razrjeđenja se pripremaju tako da se otpipetira 1 mL uzorka u 9 mL fiziološke otopine u epruveti – tako se dobije

razrjeđenje 10^{-1} . Sadržaj epruvete se homogenizira te se uzima 1 mL razrijeđene otopine i otpipetira u novih 9 mL fiziološke otopine. Postupak se ponavlja za svako sljedeće razrjeđenje. Nakon pripreme razrjeđenja po 1 mL uzorka se prenosi u Petrijeve zdjelice koje su označene kako je prikazano na **Slici 18**. Svaka Petrijeva zdjelica zalije se hranjivom podlogom i to sladnim agarom za gljive i hranjivim agarom za bakterije. Odmah nakon izlijevanja podloge potrebno je homogenizirati sadržaj i to pokretima u obliku broja osam desetak puta. Tijekom cijelog postupka potrebno je raditi u sterilnim uvjetima. Potrebno je Petrijeve zdjelice ostaviti nekoliko minuta kako bi se podloga stvrdnula te se nakon toga prebacuju na termostatiranje. Bakterije se termostatiraju na 37 °C 24-48 sati, a gljive na 28 °C 3-5 dana. Nakon proteka vremena broje se izrasle kolonije te se CFU računa prema sljedećem izrazu (3):

$$\text{CFU} = (\text{broj kolonija} * (1/\text{faktor razrjeđenja})) * \text{količina uzorka} \quad (3)$$



Slika 18. Označena Petrijeva zdjelica za mikrobiološku analizu

4. REZULTATI I RASPRAVA

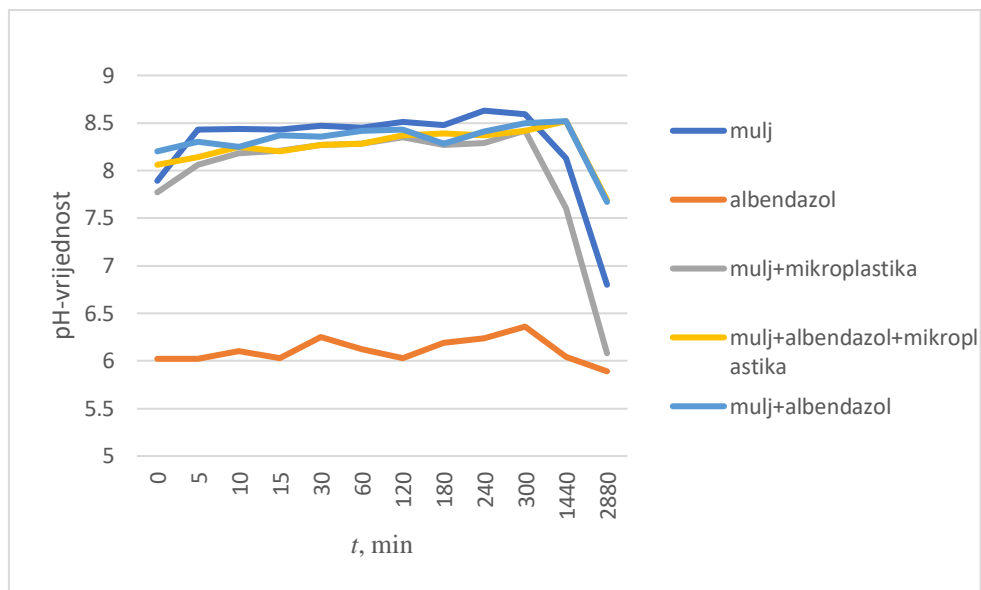
4.1. BIORAZGRADNJA ALBENDAZOLA

4.1.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

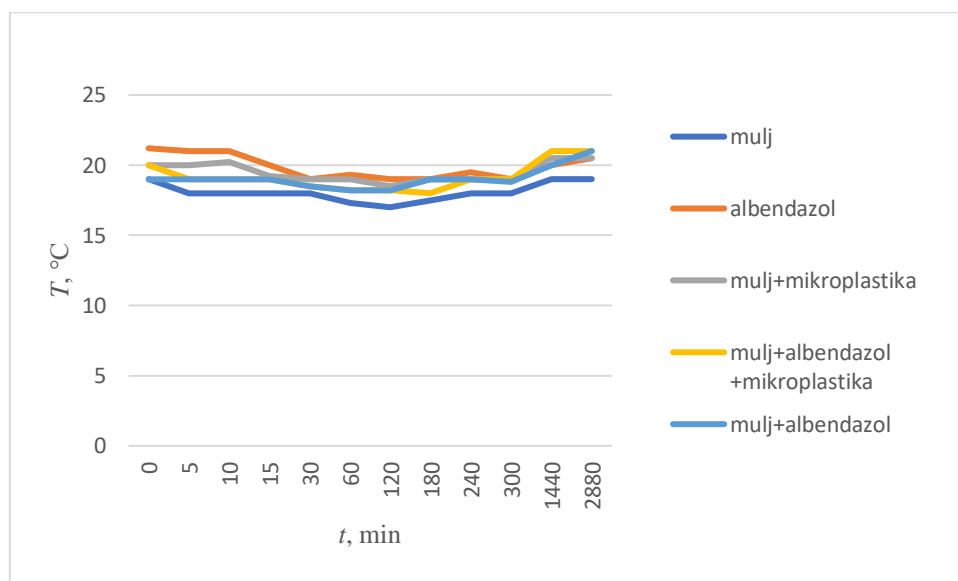
U **Tablici 4** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s albendazolom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički na **Slikama 19** i **20**.

Tablica 4. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s albendazolom tijekom biorazgradnje

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	7,89	8,43	8,44	8,43	8,47	8,45	8,51	8,48	8,63	8,59	8,13	6,80
	$T/^\circ\text{C}$	19	18	18	18	18	17,3	17	17,5	18	18	19	19
albendazol	pH	6,02	6,02	6,10	6,03	6,25	6,12	6,03	6,19	6,24	6,36	6,04	5,89
	$T/^\circ\text{C}$	21,2	21	21	20	19	19,3	19	19	19,5	19	20	20,5
mulj+mikroplastika	pH	7,77	8,06	8,18	8,21	8,27	8,28	8,35	8,27	8,29	8,42	7,60	6,08
	$T/^\circ\text{C}$	20	20	20,2	19,2	19	19	18,5	19	19	19	20,5	20,5
mulj+albendazol+mikroplastika	pH	8,06	8,14	8,25	8,20	8,27	8,28	8,37	8,39	8,37	8,42	8,52	7,69
	$T/^\circ\text{C}$	20	19	19	19	18,5	18,2	18,2	18	19	19	21	21
mulj+albendazol	pH	8,20	8,30	8,25	8,37	8,36	8,42	8,43	8,28	8,41	8,5	8,52	7,67
	$T/^\circ\text{C}$	19	19	19	19	18,5	18,2	18,2	19	19	18,8	20	21



Slika 19. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednosti o vremenu tijekom biorazgradnje albendazola

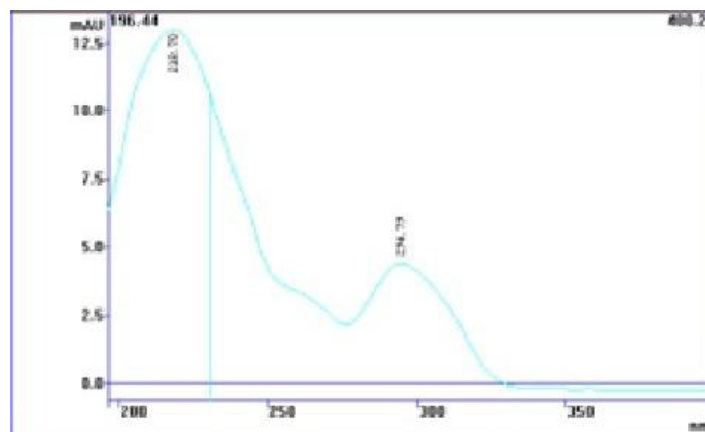


Slika 20. Grafički prikaz ovisnosti temperature u ovisnosti o vremenu tijekom biorazgradnje albendazola

Kao što je vidljivo iz grafičkih prikaza na **Slikama 19** i **20**, vrijednosti temperature su u svim reaktorima bez velikih oscilacija, dok kod pH-vrijednosti mogu se primijetiti manje promijene tijekom 24 sata, a u 48-om satu dolazi do naglog pada u svim reaktorima.

4.1.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Kromatografska analiza provodi se kako bi se ustanovilo koliko se albendazola uklanja biorazgradnjom. Za početak je potrebno znati valnu duljinu maksimuma apsorpcije pojedinog spoja. U slučaju albendazola to je valna duljina od 210 nm, a apsorpcijski spektar albendazola na prikazan je na **Slici 21**.



Slika 21. Apsorpcijski spektar albendazola

Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje albendazola računalo se je u postotcima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 5** i **Tablici 6**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 22**.

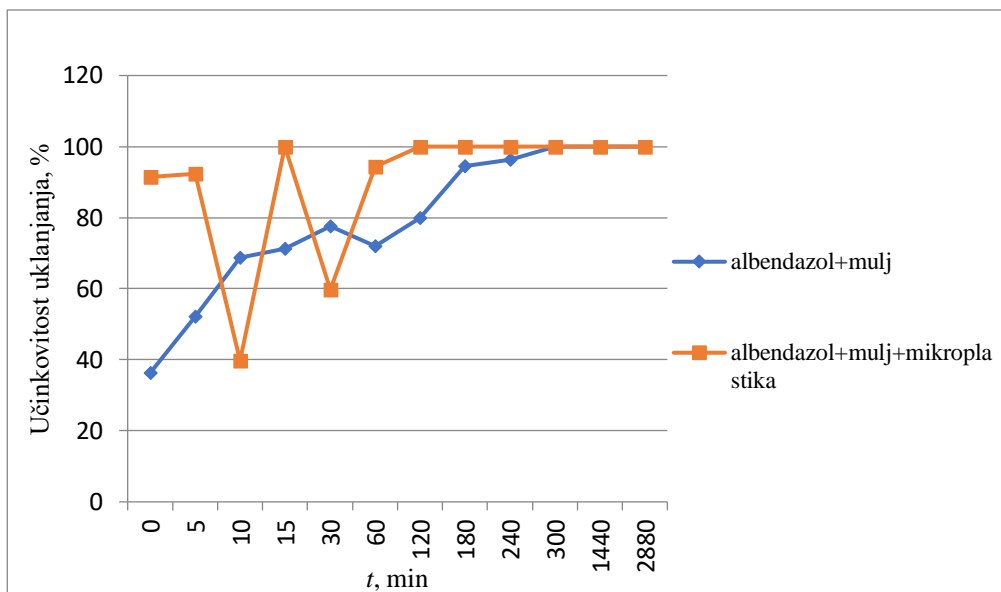
$$((A_{max}-A)/A_{max}) \cdot 100 \quad (4)$$

Tablica 5. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu albendazola i mulja

Uzorak	t_R , min	A, mAUs	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
albendazol + mulj (0 min)	23,107	98,1	0	36,30
albendazol + mulj (5 min)	23,107	73,8	5	52,08
albendazol + mulj (10 min)	23,107	48,1	10	68,77
albendazol + mulj (15 min)	23,107	44,3	15	71,23
albendazol + mulj (30 min)	23,08	34,5	30	77,60
albendazol + mulj (1 h)	23,107	43,2	60	71,95
albendazol + mulj (2 h)	23,08	30,9	120	79,94
albendazol + mulj (3 h)	23,08	8,52	180	94,47
albendazol + mulj (4 h)	23,053	5,63	240	96,34
albendazol + mulj (5 h)	0	0	300	100
albendazol + mulj (24 h)	0	0	1440	100
albendazol + mulj (48 h)	0	0	2880	100

Tablica 6. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu albendazola, mulja i mikroplastike

Uzorak	t_R , min	A, mAU	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
albendazol + mulj + mikroplastika (0 min)	23,08	13,1	0	91,49
albendazol + mulj + mikroplastika (5 min)	23,08	11,8	5	92,34
albendazol + mulj + mikroplastika (10 min)	23,107	92,8	10	39,74
albendazol + mulj + mikroplastika (15 min)	0	0	15	100
albendazol + mulj + mikroplastika (30 min)	23,107	61,9	30	59,80
albendazol + mulj + mikroplastika (1 h)	23,08	8,75	60	94,32
albendazol + mulj + mikroplastika (2 h)	0	0	120	100
albendazol + mulj + mikroplastika (3 h)	0	0	180	100
albendazol + mulj + mikroplastika (4 h)	0	0	240	100
albendazol + mulj + mikroplastika (5 h)	0	0	300	100
albendazol + mulj + mikroplastika (24 h)	0	0	1440	100
albendazol + mulj + mikroplastika (48 h)	0	0	2880	100

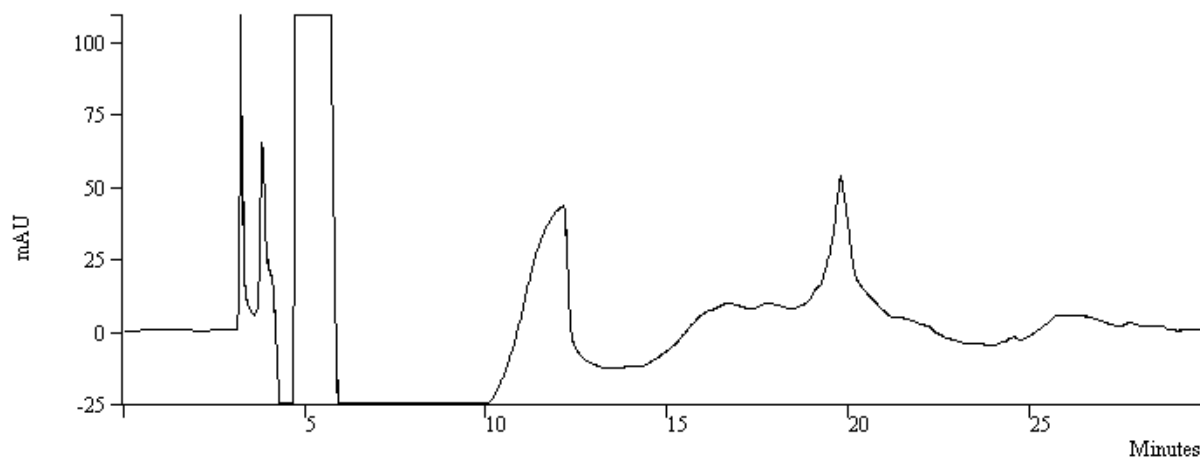


Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti uklanjanja albendazola o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

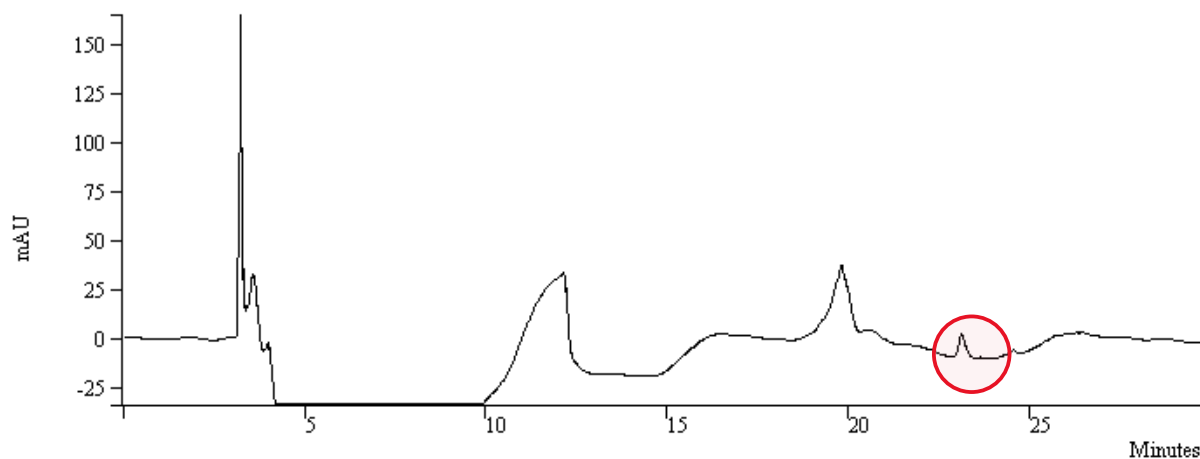
Na grafičkom prikazu na **Slici 22** vidljivo je da je postotak uklanjanja albendazola u reaktoru s muljem sve veći s vremenom uz manje oscilacije te da dolazi do 100 % uklanjanja albendazola. Kada se promatra reaktor uz dodatak mikroplastike uočavaju se oscilacije u učinkovitosti uklanjanja albendazola biorazgradnjom. Stoga se može pretpostaviti da do tih oscilacija dolazi zbog fenomena adsorpcije i desorpcije albendazola na površinu mikroplastike, međutim i u ovom reaktoru albendazol se uklanja u potpunosti i stoga se može zaključiti da je biorazgradnja učinkovita unatoč prisutnosti mikroplastike.

Na **Slici 23** prikazan je kromatogram čistog mulja, a na **Slici 24** kromatogram radne otopine albendazola. Usporedbom ova dva kromatograma može se primijetiti kromatografska krivulja oko 23 minute koja ukazuje na prisutnost albendazola. Na **Slici 25** prikazan je kromatogram za uzorak albendazola i mulja u $t = 0$ min, te na **Slici 26** u $t = 48$ h. Usporedbom ova dva kromatograma vidljivo je uklanjanje albendazola uz nastanak novih kromatografskih krivulja što ukazuje na nastajanje razgradnih ili transformacijskih produkata tijekom procesa biorazgradnje. Nadalje, usporedbom kromatograma uzorka koji se sastoji od albendazola, mulja i mikroplastike i to u vremenu $t = 0$ min na **Slici 27** s kromatogramom uzorka istog sastava, ali u vremenu $t = 48$ h prikazanog na **Slici 28** može se uočiti prisutnost albendazola na početku, no nakon 48 sati krivulja albendazola nestaje što opet ukazuje na 100 % učinkovitost uklanjanja albendazola. Međutim, i u ovom slučaju nastaju razgradni ili transformacijski produkti, no u manjem broju nego kod reakcije albendazola i mulja. Stoga se može pretpostaviti da je to zbog

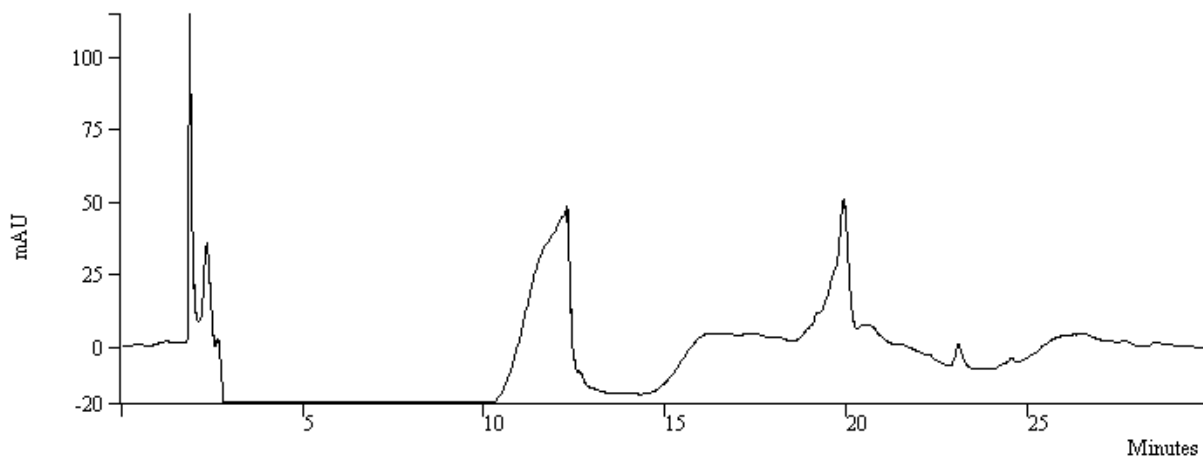
adsorpcije većeg dijela albendazola na mikroplastiku na što upućuje i kromatografska krivulja u vremenu $t = 0$.



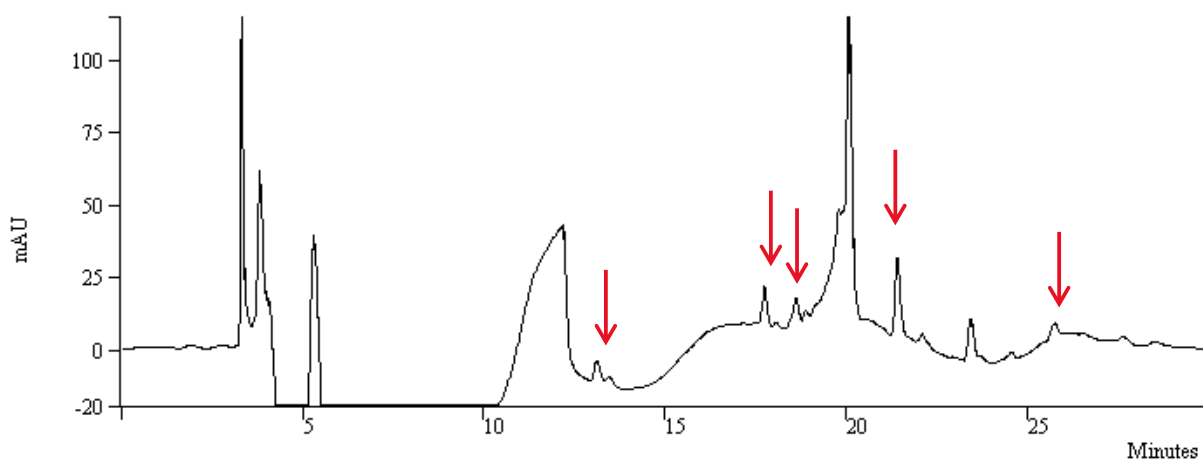
Slika 23. Kromatogram za čisti mulj



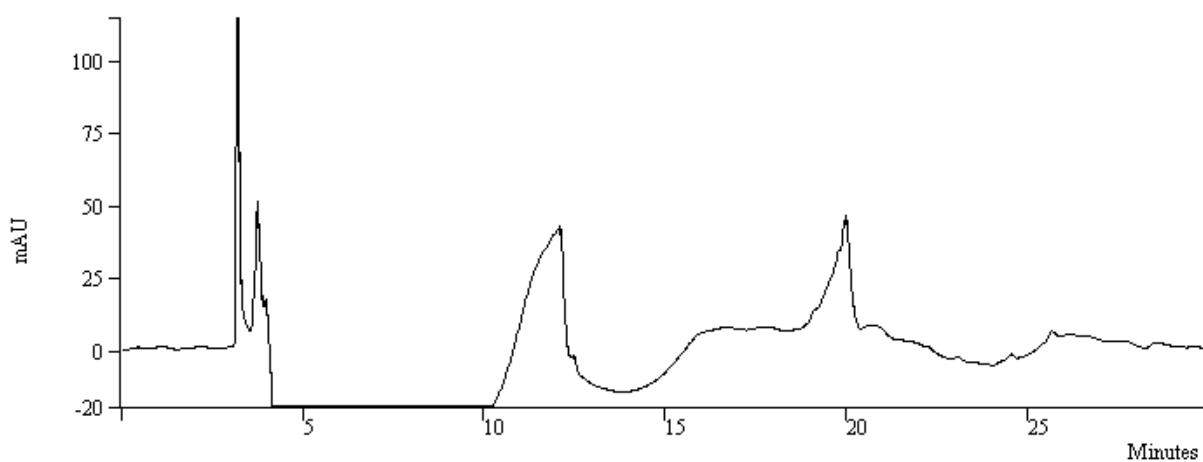
Slika 24. Kromatogram za radnu otopinu albendazola



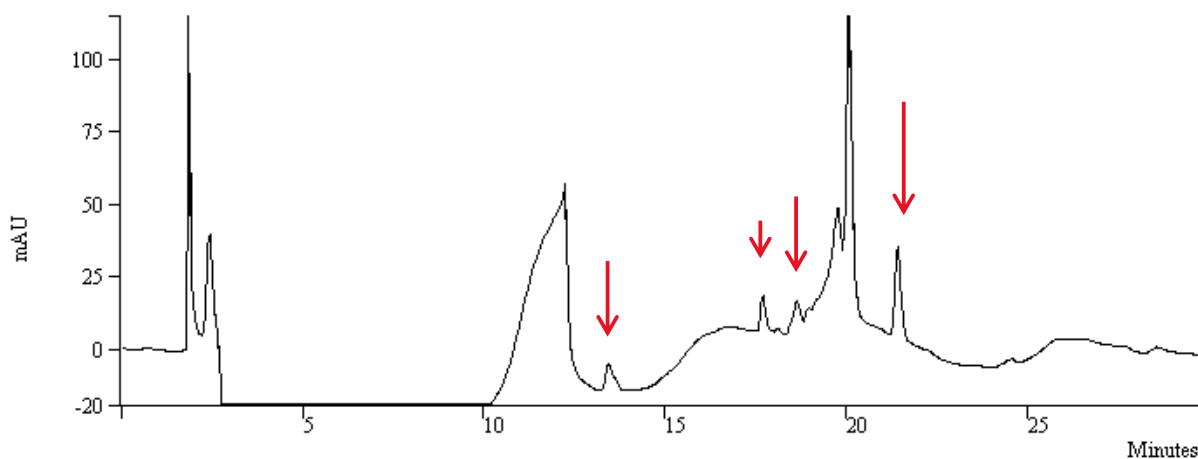
Slika 25. Kromatogram za uzorak albendazola i aktivnog mulja u $t = 0$ h



Slika 26. Kromatogram za uzorak albendazola i aktivnog mulja u $t = 48$ h



Slika 27. Kromatogram za uzorak albendazola, aktivnog mulja i mikroplastike u $t = 0$ h



Slika 28. Kromatogram za uzorak albendazola, aktivnog mulja i mikroplastike u $t = 48$ h

4.1.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 7** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je uklanjanje albendazola gotovo jednako uspješno u reaktorima sa i bez mikroplastike, iako se nešto bolji rezultat dobio u prisutnosti mikroplastike što se može objasniti adsorpcijom albendazola na površinu mikroplastike. Iako su vrijednosti TC nešto veće u reaktorima s albendazolom nego što su u onima u kojima nije bio prisutan, može se zaključiti da je uklanjanje uspješno jer se razina ugljika višestruko smanjila biorazgradnjom.

Tablica 7. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
albendazol	1685,5
mulj	10,42
mulj + albendazol	70,52
mulj + mikroplastika	12,93
mulj + albendazol + mikroplastika	66,12

4.1.4. GUSTOĆA

U **Tablici 8** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i albendazol te mulj, mikroplastiku i albendazol nakon razgradnje.

Tablica 8. Gustoća čistog mulja prije razgradnje, mulja i albendazola te mulja, mikroplastike i albendazola nakon razgradnje

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj $t = 0$ h	3,66
mulj + albendazol $t = 48$ h	4,23
mulj + albendazol + mikroplastika $t = 48$ h	4,71

Podaci iz tablice ukazuju na povećanje gustoće tijekom biorazgradnje. Iz toga se može zaključiti da se mikroorganizmi iz mulja hrane albendazolom te se njihov broj povećava.

4.1.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 9** prikazani su rezultati mikrobiološke analize za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za uzorke nakon provedenog procesa biorazgradnje. Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako dolazi do vrlo malog smanjenja broja bakterija i gljiva u reaktorima s albendazolom u usporedbi sa čistim muljem. Može se zaključiti da albendazol u ovim količinama nema značajan štetni utjecaj na mikroorganizme iz aktivnog mulja.

Tablica 9. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	$1,9 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^4$
-4	$4 \cdot 10^4$	-
-5	$8 \cdot 10^3$	-
MULJ + ALBENDAZOL ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$2,7 \cdot 10^4$
-3	$9 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^3$
-4	$1 \cdot 10^4$	-
-5	$3 \cdot 10^3$	-
MULJ + ALBENDAZOL + MIKROPLASTIKA ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	$7,5 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3$
-4	$8 \cdot 10^3$	-
-5	$4 \cdot 10^3$	-

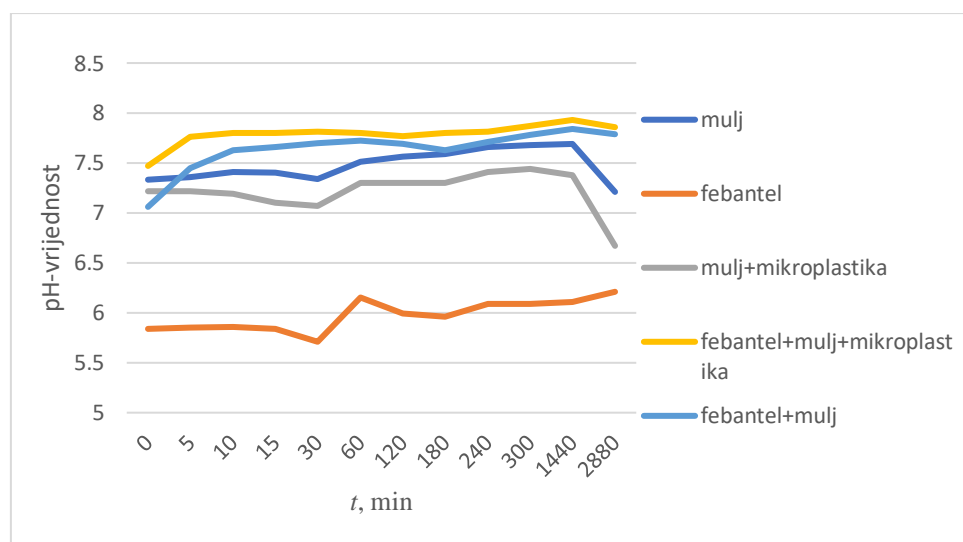
4.2. BIORAZGRADNJA FEBANTELA

4.2.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

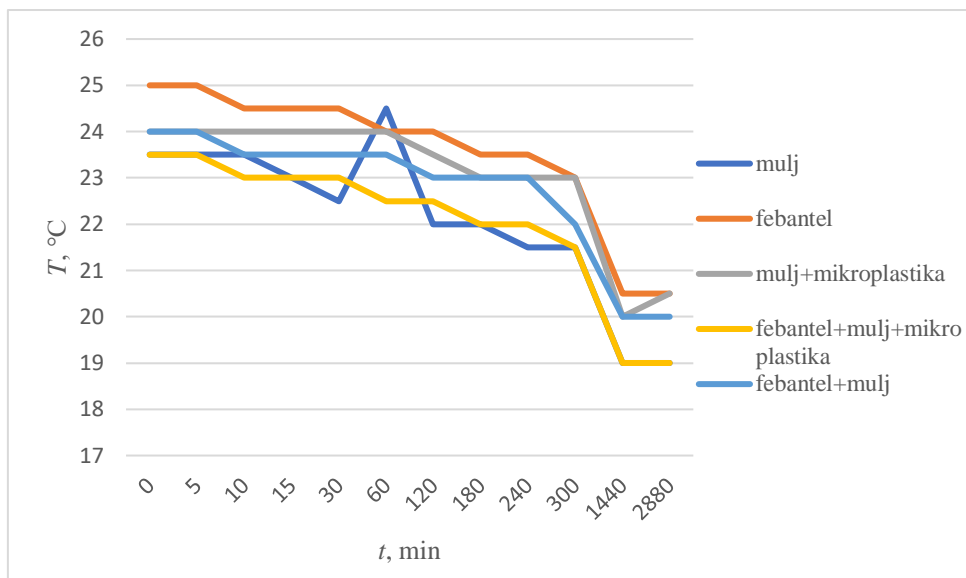
U **Tablici 10** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s febantelom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički **Slikama 24** i **25**.

Tablica 10. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s febantelom tijekom biorazgradnje

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	7,33	7,36	7,41	7,40	7,34	7,51	7,56	7,59	7,66	7,68	7,69	7,21
	$T/^\circ\text{C}$	23,5	23,5	23,5	23	22,5	24,5	22	22	21,5	21,5	19	19
febantel	pH	5,84	5,85	5,86	5,84	5,71	6,15	5,99	5,96	6,09	6,09	6,11	6,21
	$T/^\circ\text{C}$	25	25	24,5	24,5	24,5	24	24	23,5	23,5	23	20,5	20,5
mulj+ mikroplastika	pH	7,22	7,22	7,19	7,10	7,07	7,30	7,30	7,30	7,41	7,44	7,38	6,67
	$T/^\circ\text{C}$	24	24	24	24	24	24	23,5	23	23	23	20	20,5
mulj+febantel +mikroplastika	pH	7,47	7,76	7,80	7,80	7,81	7,80	7,77	7,80	7,81	7,87	7,93	7,86
	$T/^\circ\text{C}$	23,5	23,5	23	23	23	22,5	22,5	22	22	21,5	19	19
mulj+febantel	pH	7,33	7,36	7,41	7,40	7,34	7,51	7,56	7,59	7,66	7,68	7,69	7,21
	$T/^\circ\text{C}$	23,5	23,5	23,5	23	22,5	24,5	22	22	21,5	21,5	19	19



Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednost o vremenu tijekom biorazgradnje febantela

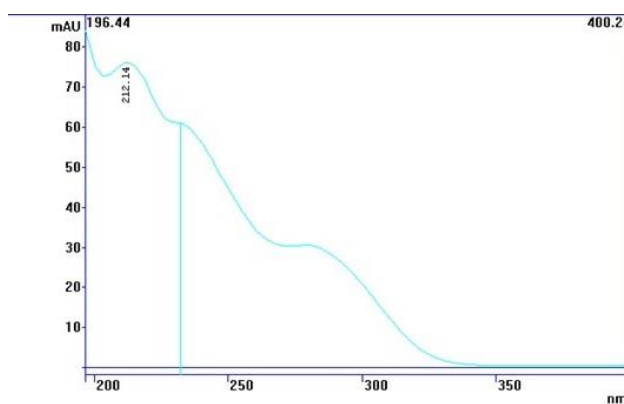


Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti temperature o vremenu tijekom biorazgradnje febantela

Kao što je vidljivo iz grafičkih prikaza na **Slikama 24 i 25**, dolazi do snižavanja temperature s vremenom i to u svim reaktorima, dok za pH-vrijednosti može se primijetiti da dolazi do blagog porasta u svim reaktorima, a u 48-om satu dolazi do pada u reaktoru s muljem te muljem i mikroplastikom.

4.2.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma za febantel iznosi 210 nm, a apsorpcijski spektar febantela pri 210 nm vidljiv je na **Slici 26**.



Slika 26. Apsorpcijski spektar febantela

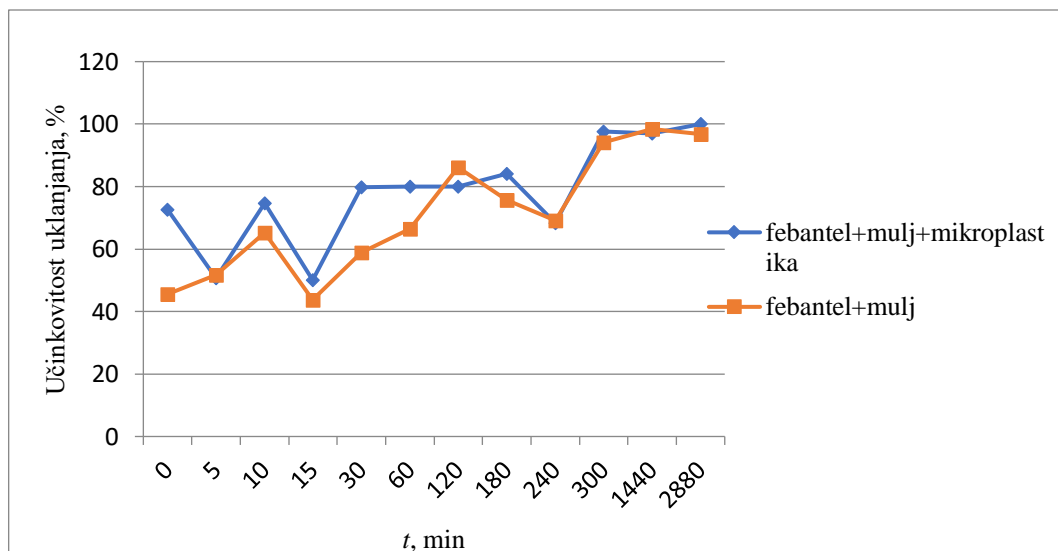
Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje se računalo u postotcima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 11** i **Tablici 12**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 27**.

Tablica 11. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu febantela i mulja

Uzorak	t_R , min	A , mAUs	T , min	učinkovitost uklanjanja, %
febantel + mulj (0 min)	25,64	498	0	72,70
febantel + mulj (5 min)	25,64	898	5	50,77
febantel + mulj (10 min)	25,64	463	10	74,62
febantel + mulj (15 min)	25,43	911	15	50,05
febantel + mulj (30 min)	25,64	369	30	79,77
febantel + mulj (1 h)	25,64	363	60	80,10
febantel + mulj (2 h)	25,64	366	120	79,93
febantel + mulj (3 h)	25,64	290	180	84,10
febantel + mulj (4 h)	25,613	577	240	68,37
febantel + mulj (5 h)	25,747	43,2	300	97,63
febantel + mulj (24 h)	25,747	55	1440	96,98
febantel + mulj (48 h)	-	0	2880	100

Tablica 12. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu febantela, mulja i mikroplastike

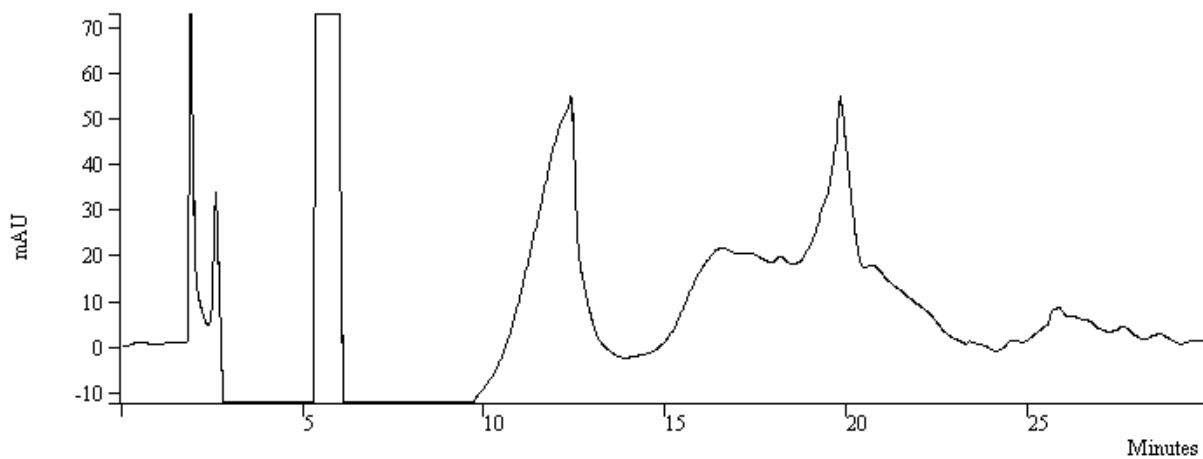
Uzorak	t_R , min	A, mAUs	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
febantel + mulj + mikroplastika (0 min)	25,613	993	0	45,56
febantel + mulj + mikroplastika (5 min)	25,613	880	5	51,75
febantel + mulj + mikroplastika (10 min)	25,613	633	10	65,30
febantel + mulj + mikroplastika (15 min)	25,64	1026	15	43,75
febantel + mulj + mikroplastika (30 min)	25,64	751	30	58,83
febantel + mulj + mikroplastika (1 h)	25,64	612	60	66,45
febantel + mulj + mikroplastika (2 h)	25,667	253	120	86,13
febantel + mulj + mikroplastika (3 h)	25,613	445	180	75,60
febantel + mulj + mikroplastika (4 h)	25,613	563	240	69,13
febantel + mulj + mikroplastika (5 h)	25,64	108	300	94,08
febantel + mulj + mikroplastika (24 h)	25,773	29	1440	98,41
febantel + mulj + mikroplastika (48 h)	25,773	57,8	2880	96,83



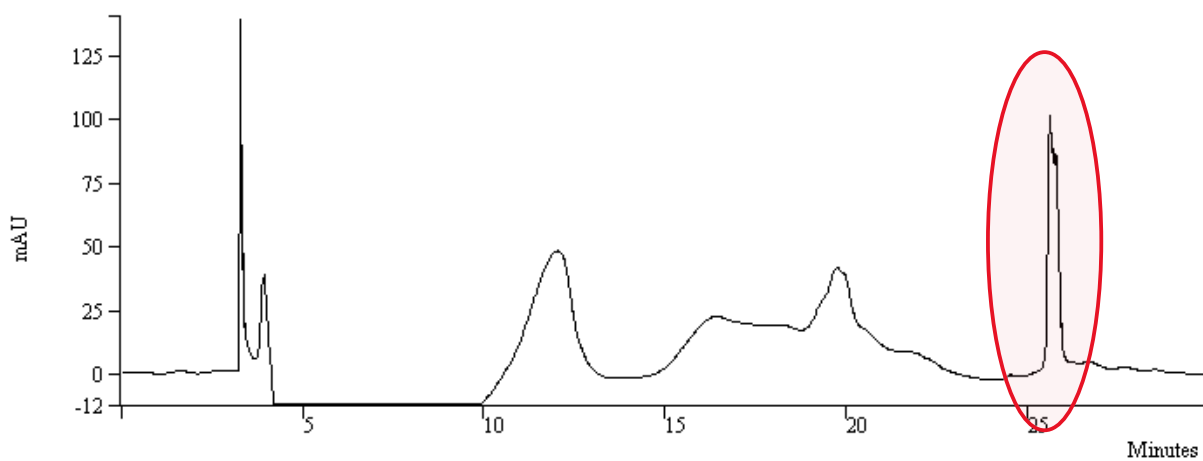
Slika 27. Grafički prikaz ovisnosti uklanjanja albendazola o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

Na grafičkom prikazu na **Slici 27** vidljive su oscilacije u oba reaktora te se obje krivulje slično ponašaju. Razlika se vidi u početku kada je uklanjanje znatno veće za reaktor s mikroplastikom. Također je i u cijelom procesu uklanjanje nešto bolje kada je prisutna mikroplastika. Najvažnije je napomenuti kako je uklanjanje u reaktoru sa febantelom, muljem i mikroplastikom potpuno, dok u reaktoru bez mikroplastike dolazi do 96,8 % u 48-om satu.

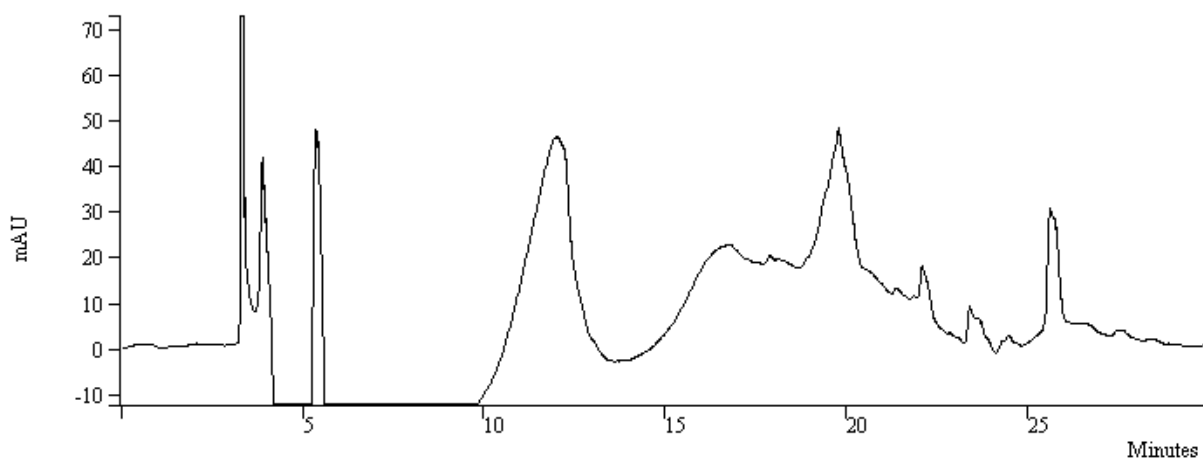
Na **Slici 28** prikazan je kromatogram čistog mulja, a na **Slici 29** kromatogram radne otopine febantela. Usporedbom kromatograma čistog mulja i radne otopine febantela vidljiva je kromatografska krivulja oko 26.-ste minute koja ukazuje na febantel. Na **Slici 30** prikazan je kromatogram za uzorak febantela i mulja u $t = 0$ min, te na **Slici 31** u $t = 48$ h. Usporedbom ova dva kromatograma vidljivo je kako uklanjanje febantela nije potpuno jer se i nakon 48 sati uočava kromatografska krivulja u 26-oj minuti. Nadalje je vidljiv kromatogram uzorka febantela, mulja i plastike u $t = 0$ min na **Slici 32**, te u $t = 48$ h na **Slici 33**. Nakon 48 sati kromatografska krivulja je u potpunosti nestala što ukazuje na potpuno uklanjanje febantela. Uklanjanju pridonosi mikroplastika koja omogućuje adsorpciju farmaceutika na svoju površinu.



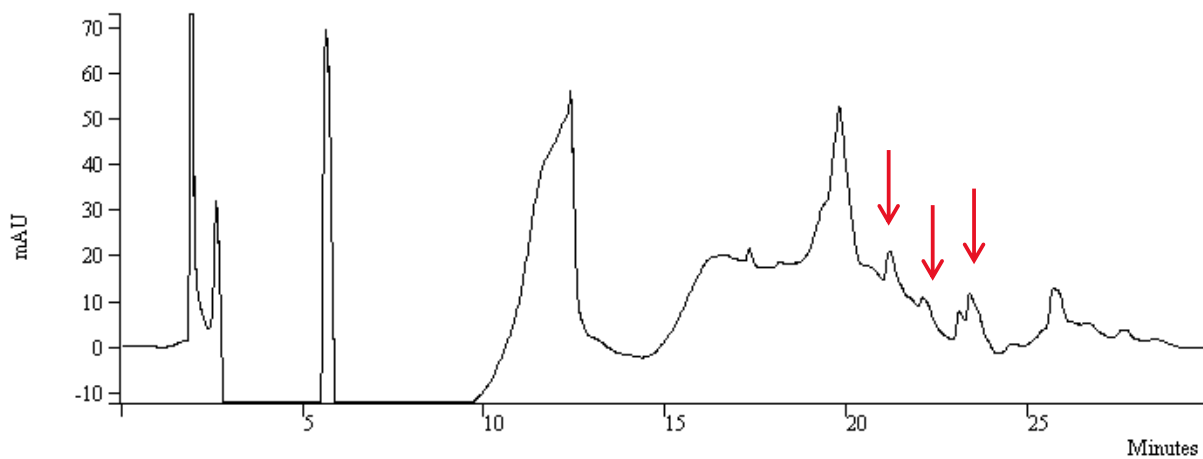
Slika 28. Kromatogram čistog mulja



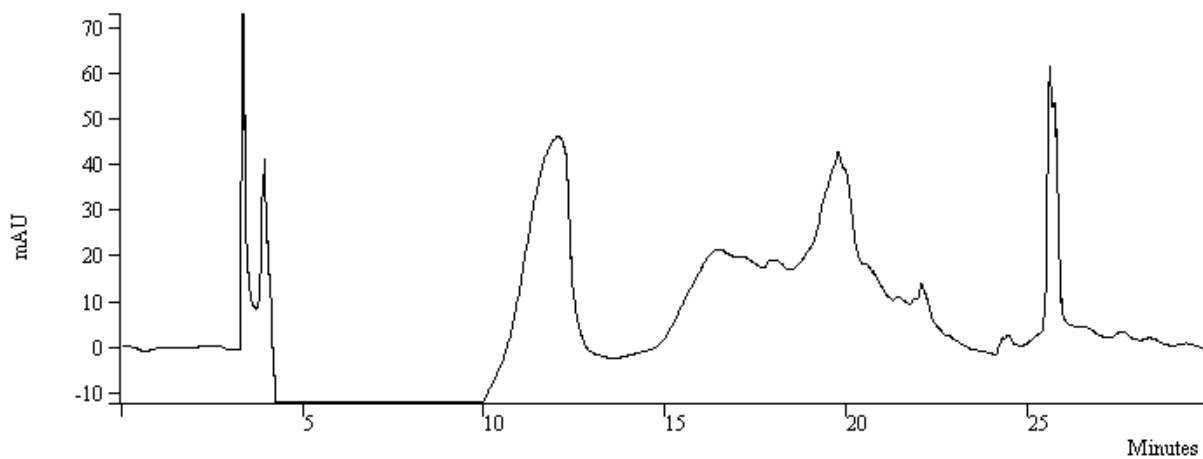
Slika 29. Kromatogram radne otopine febantela



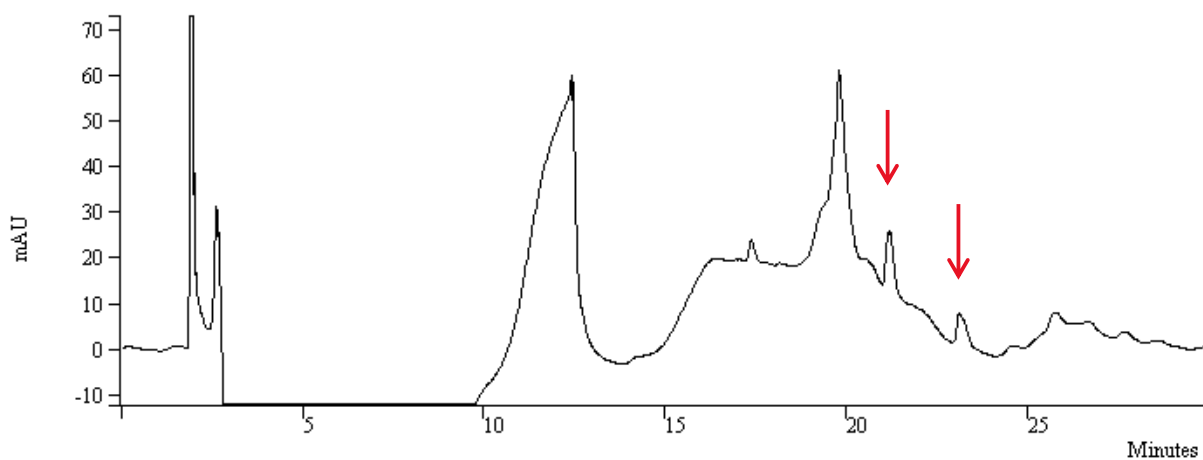
Slika 30. Kromatogram za uzorak febantela i aktivnog mulja u $t = 0$ h



Slika 31. Kromatogram za uzorak febantela i aktivnog mulja u $t = 48$ h



Slika 32. Kromatogram za uzorak febantela, aktivnog mulja i plastike u $t = 0$ h



Slika 33. Kromatogram za uzorak febantela, aktivnog mulja i plastike za $t = 48$ h

4.2.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 13** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. Vidljivo je da je u reaktoru sa febantelom i muljem količina ugljika na visokoj razini, kao i u reaktoru s mikroplastikom, međutim u reaktoru s mikroplastikom ipak nalazimo puno manje ugljika. Ovakve rezultate možemo pripisati adsorpciji i desorpciji febantela na aktivni mulj i mikroplastiku, ali i pripremi temeljnih standardnih otopina metanolom.

Tablica 13. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
febantel	1210,5
mulj	18,14
mulj + febantel	1031,5
mulj + mikroplastika	21,46
mulj + febantel + mikroplastika	665

4.2.4. GUSTOĆA

U **Tablici 14** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i albendazol te mulj, plastiku i abendazol nakon razgradnje.

Tablica 14. Gustoća čistog mulja prije razgradnje, mulja i febantela te mulja, mikroplastike i abendazola nakon razgradnje.

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj $t = 0$ h	2,33
mulj + febantel $t = 48$ h	2,45
mulj + febantel + mikroplastika $t = 48$ h	2,5

Podaci iz tablice ukazuju na povećanje gustoće tijekom biorazgradnje. Iz toga možemo zaključiti da se mikroorganizmi iz mulja hrane febantelom te se njihov broj povećava.

4.2.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 15** prikazani su rezultati mikrobiološke analize čistog mulja prije provedenog procesa biorazgradnje te uzoraka nakon provedenog procesa biorazgradnje. Kada se usporede rezultati dobiveni iz čistog mulja prije razgradnje i oni dobiveni nakon 48 sati u prisutnosti febantela, vidljivo je da dolazi do povećanja broja mikroorganizama. Dakle mikroorganizmi se hrane febantelom te se njihov broj u mulju povećava. Također je važno da febantel nije toksičan za mikroorganizme u ovoj koncentraciji stoga je biorazgradnja moguća.

Tablica 15. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje i ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$5 \cdot 10^4$
-3	$1,5 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^3$
-4	$1,1 \cdot 10^4$	-
-5	$5 \cdot 10^3$	-
MULJ + FEBANTEL ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	NB	$3 \cdot 10^4$
-4	$1,6 \cdot 10^4$	-
-5	$6 \cdot 10^3$	-
MULJ + FEBANTEL + PLASTIKA ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	NB	$1,5 \cdot 10^4$
-4	$1,5 \cdot 10^5$	-
-5	$8 \cdot 10^3$	-

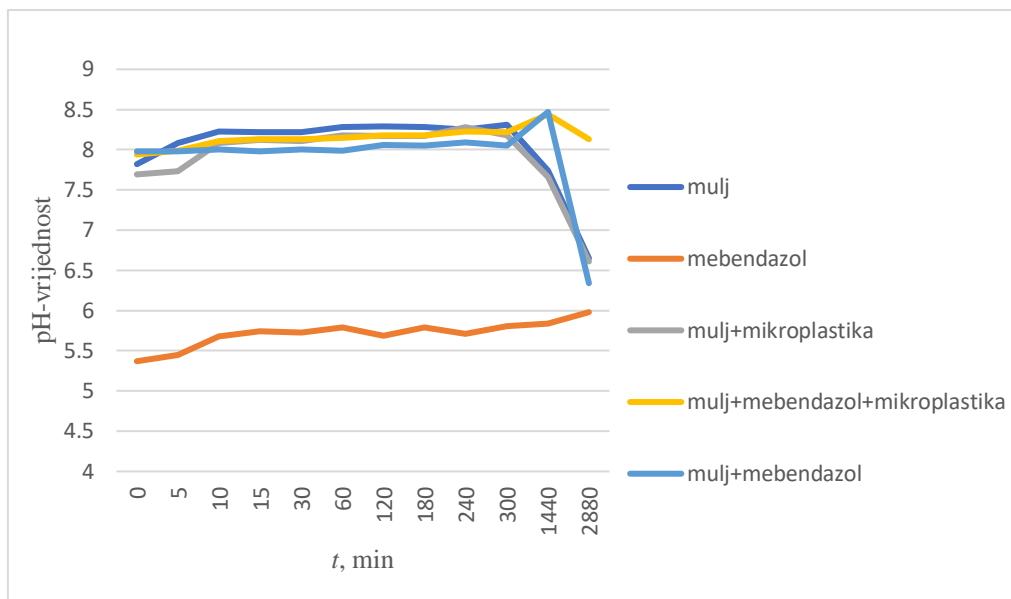
4.3. BIORAZGRADNJA MEBENDAZOLA

4.3.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I PH-VRIJEDNOSTI

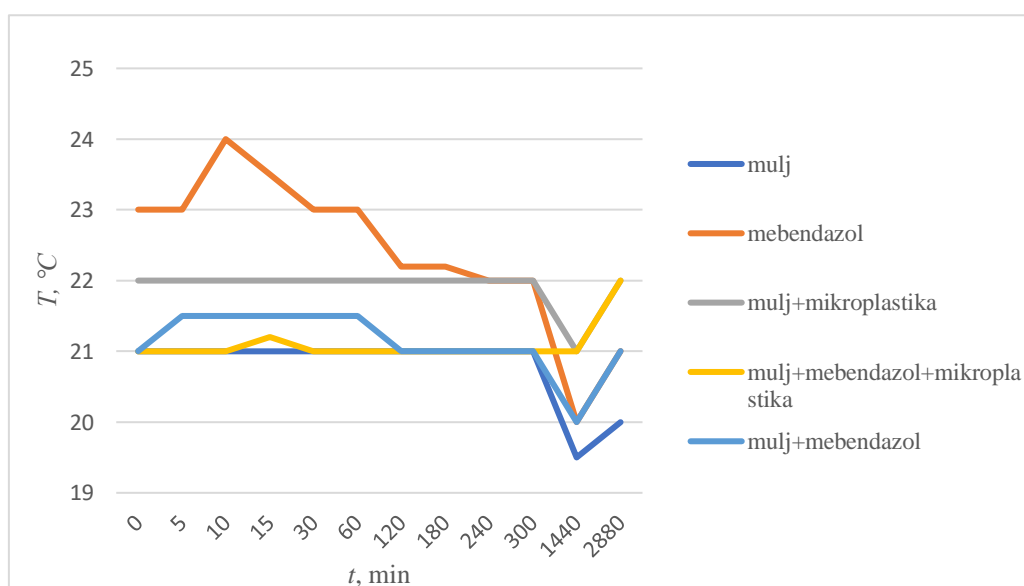
U **Tablici 16** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s mebendazolom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički na **Slikama 34** i **35**.

Tablica 16. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s mebendazolom tijekom biorazgradnje

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	7,82	8,08	8,23	8,22	8,22	8,28	8,29	8,28	8,25	8,31	7,74	6,65
	T/°C	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	19,5	20
mebendazol	pH	5,37	5,45	5,68	5,74	5,73	5,79	5,69	5,79	5,71	5,81	5,84	5,98
	T/°C	23	23	24	23,5	23	23	22,2	22,2	22	22	20	21
mulj+plastika	pH	7,69	7,73	8,08	8,12	8,11	8,18	8,17	8,17	8,28	8,18	7,66	6,61
	T/°C	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	21	22
mulj+mebendazol+plastika	pH	7,94	7,99	8,11	8,13	8,13	8,15	8,18	8,18	8,23	8,22	8,44	8,13
	T/°C	21	21	21	21,2	21	21	21	21	21	21	21	22
mulj+mebendazol	pH	7,98	7,98	8	7,98	8	7,99	8,06	8,05	8,09	8,05	8,47	6,34
	T/°C	21	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21	21	21	21	20	21



Slika 34. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednosti o vremenu tijekom biorazgradnje mebendazola

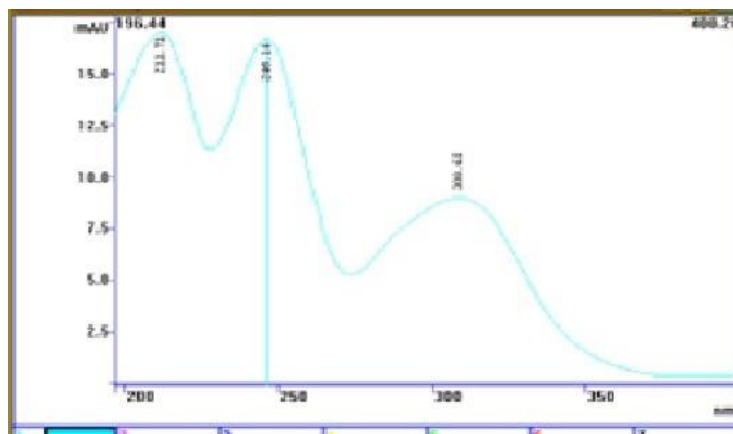


Slika 35. Grafički prikaz ovisnosti temperature o vremenu tijekom biorazgradnje mebendazola

Promatrajući biorazgradnju mebendazola vidljivo je kako nema velikih oscilacija u temperaturi koja lagano pada ili je konstantna sve do 5-og sata kada pada te se u 24-tom satu ponovno podiže. pH-Vrijednost bilježi beznačajan rast u standardnoj otopini mebendazola, dok u ostalim reaktorima raste te u 5-om satu počinje padati.

4.3.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma za mebendazol iznosi 254 nm, a apsorpcijski spektar mebendazola prikazan je na **Slici 36**.



Slika 36. Apсорpcijski spektar mebendazola

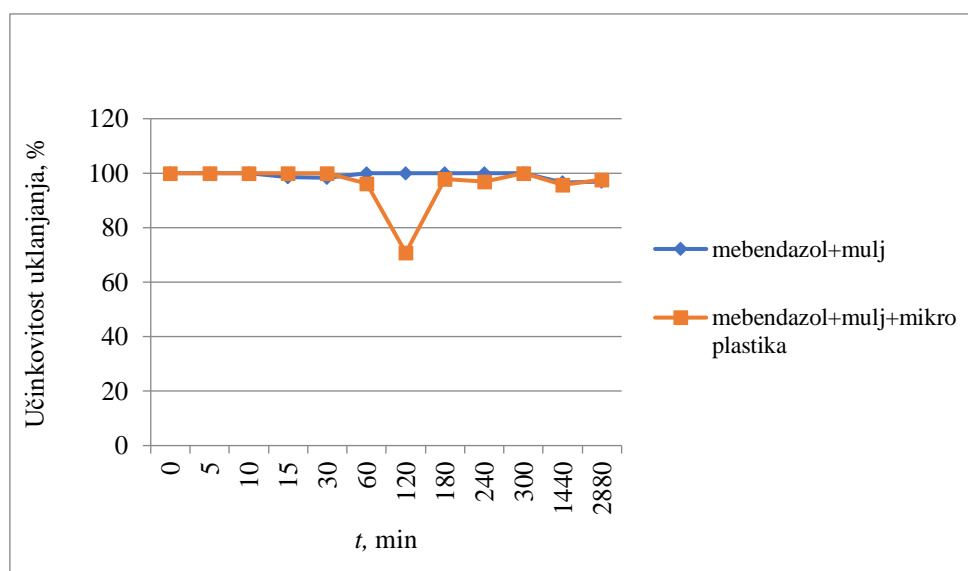
Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje se računalo u postotcima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 17** i **Tablici 18**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 37**.

Tablica 17. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu mebendazola i mulja

Uzorak	t_R , min	A , mAU	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
mebendazol + mulj (0 min)	0	0	0	100
mebendazol + mulj (5 min)	0	0	5	100
mebendazol + mulj (10 min)	0	0	10	100
mebendazol + mulj (15 min)	22,92	2,8	15	98,48
mebendazol + mulj (30 min)	22,95	3,11	30	98,31
mebendazol + mulj (1 h)	0	0	60	100
mebendazol + mulj (2 h)	0	0	120	100
mebendazol + mulj (3 h)	0	0	180	100
mebendazol + mulj (4 h)	0	0	240	100
mebendazol + mulj (5 h)	0	0	300	100
mebendazol + mulj (24 h)	23,08	6,3	1440	96,58
mebendazol + mulj (48 h)	22,95	5,71	2880	96,90

Tablica 18. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu mebendazola, mulja i mikroplastike

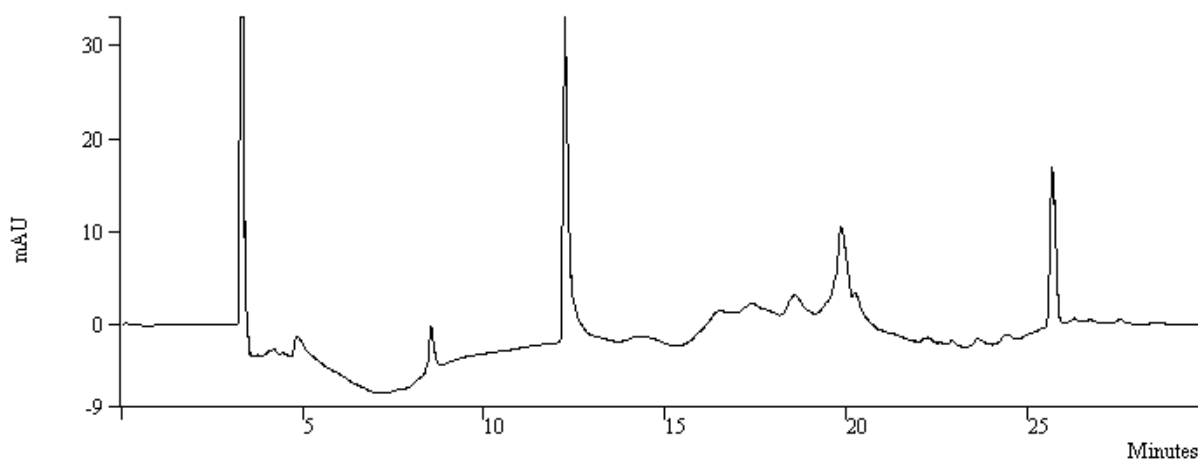
Uzorak	t_R , min	A, mAUs	t, min	učinkovitost uklanjanja, %
mebendazol + mulj + mikroplastika (0 min)	0	0	0	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (5 min)	0	0	5	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (10 min)	0	0	10	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (15 min)	0	0	15	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (30 min)	0	0	30	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (1 h)	22,60	6,84	60	96,28
mebendazol + mulj + mikroplastika (2 h)	22,84	53,7	120	70,82
mebendazol + mulj + mikroplastika (3 h)	22,61	3,77	180	97,95
mebendazol + mulj + mikroplastika (4 h)	22,61	5,67	240	96,92
mebendazol + mulj + mikroplastika (5 h)	0	0	300	100
mebendazol + mulj + mikroplastika (24 h)	22,63	8,01	1440	95,65
mebendazol + mulj + mikroplastika (48 h)	22,95	4,33	2880	97,65



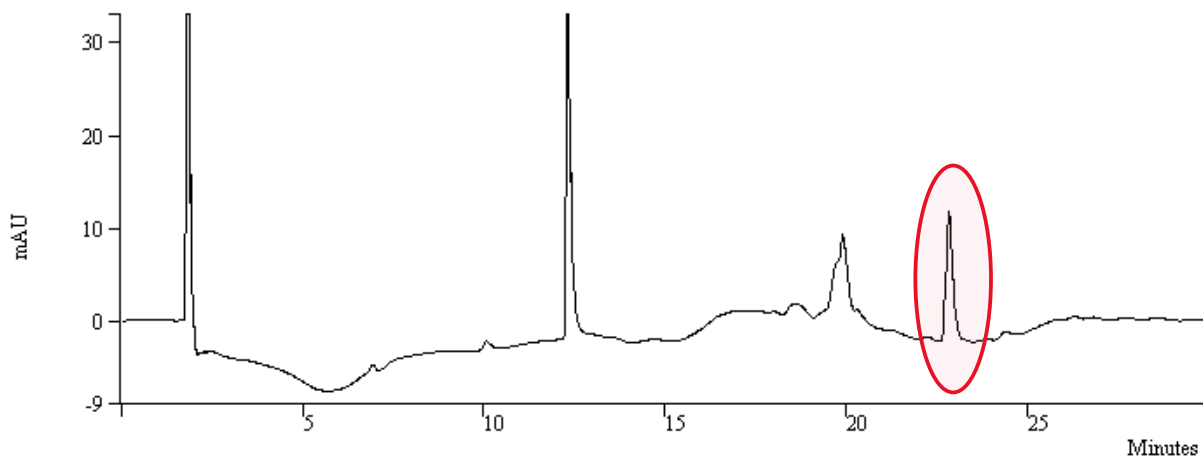
Slika 37. Grafićki prikaz ovisnosti uklanjanja mebendazola o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

Promatrajući rezultate dobivene kromatografskom analizom može se zaključiti kako je mebendazol sklon vrlo brznoj adsorpciji jer se već pri samom dodavanju u reaktor ne detektira, dok vrijednosti u 24-tom i 48-om satu ukazuju na to da mebendazol nije u potpunosti razgrađen. Rezultati su vrlo slični rezultatima dobivenima u reaktoru s mikroplastikom i u reaktoru bez nje što ukazuje na to da mikroplastika ne ometa proces biorazgradnje.

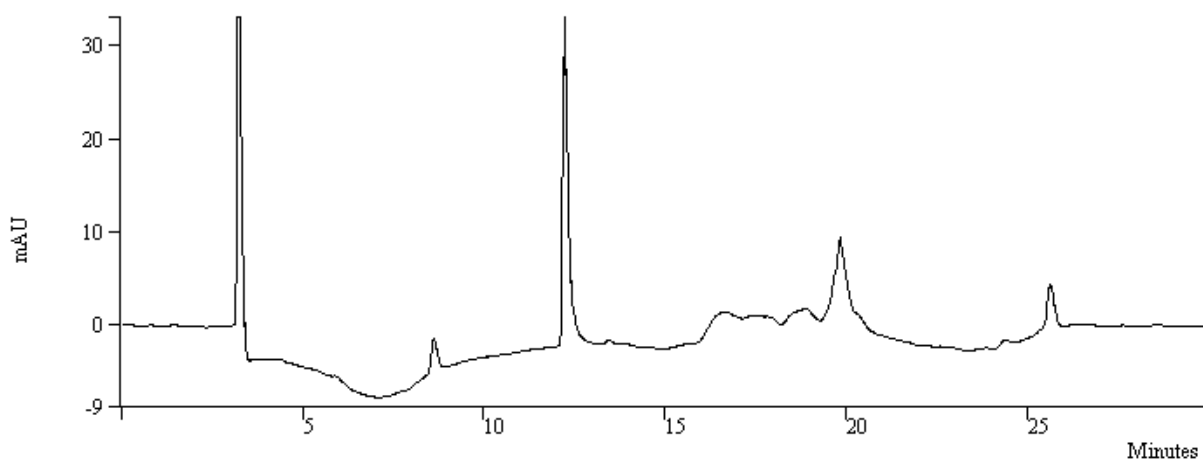
Na **Slici 38** prikazan je kromatogram čistog mulja, a na **Slici 39** kromatogram radne otopine mebendazola. Usporedbom kromatograma čistog mulja i radne otopine vidljiva je kromatografska krivulja oko 23.-će minute koji ukazuje na mebendazol. Na **Slici 40** prikazan je kromatogram za uzorak mebendazola i mulja u $t = 0$ min, te na **Slici 41** u $t = 48$ h. Usporedbom ova dva kromatograma vidljivo je kako se mebendazol ne detektira već u nultoj minuti. Ipak, nakon 48 sati dolazi do pojave kromatografske krivulje koja ukazuje na mebendazol. Može se zaključiti kako dolazi do adsorpcije mebendazola na mulj te kasnije i do desorpcije što objašnjava pojavu kromatografske krivulje nakon 48 sati. Kromatogram uzorka mebendazola, mulja i mikroplastike u $t = 0$ min prikazan je na **Slici 42**, te u $t = 48$ h na **Slici 43**. I ovdje se dobivaju slični rezultati onima u reaktoru bez mikroplastike gdje je uklanjanje odmah na početku 100 %, a na kraju eksperimenta dolazi do pojave kromatografske krivulje mebendazola.



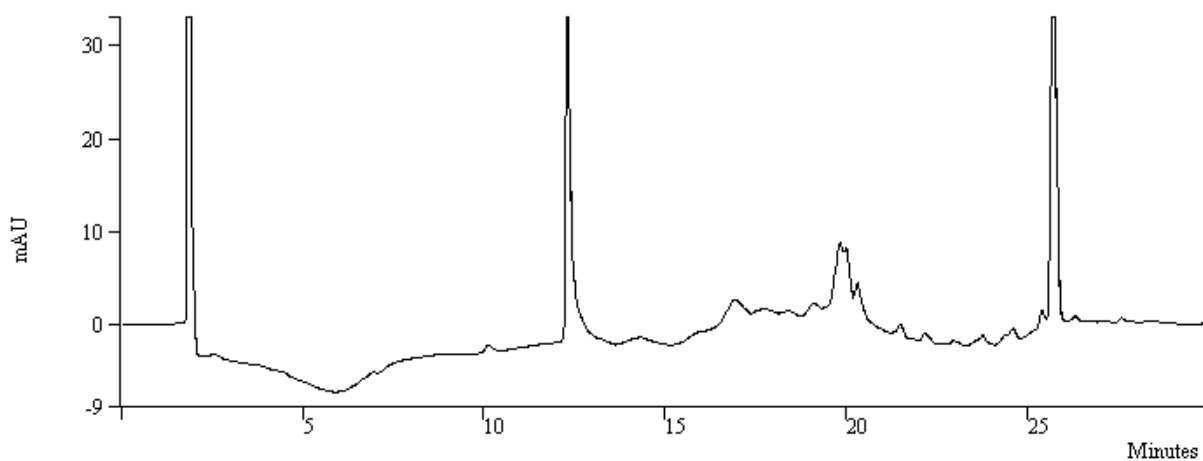
Slika 38. Kromatogram čistog mulja



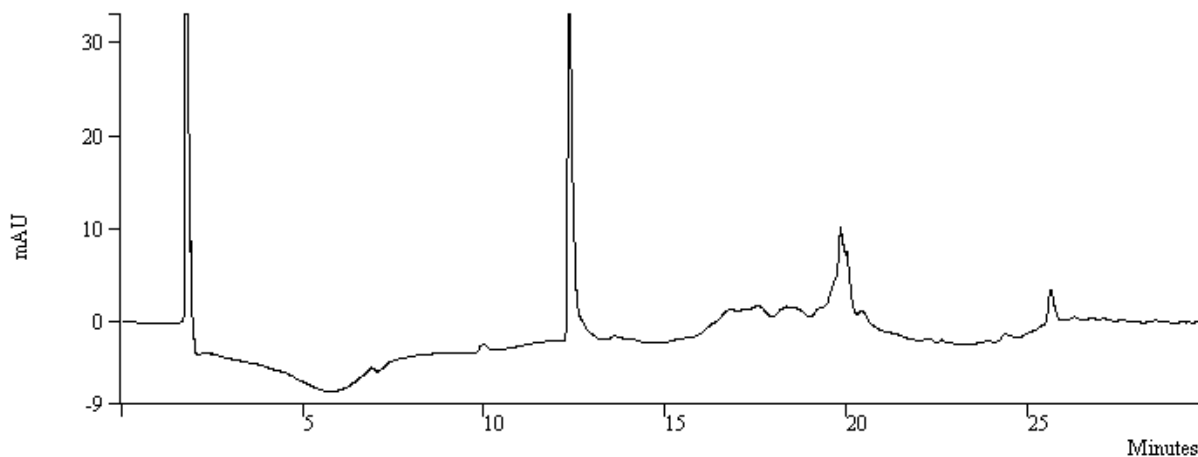
Slika 39. Kromatogram radne otopine mebendazola



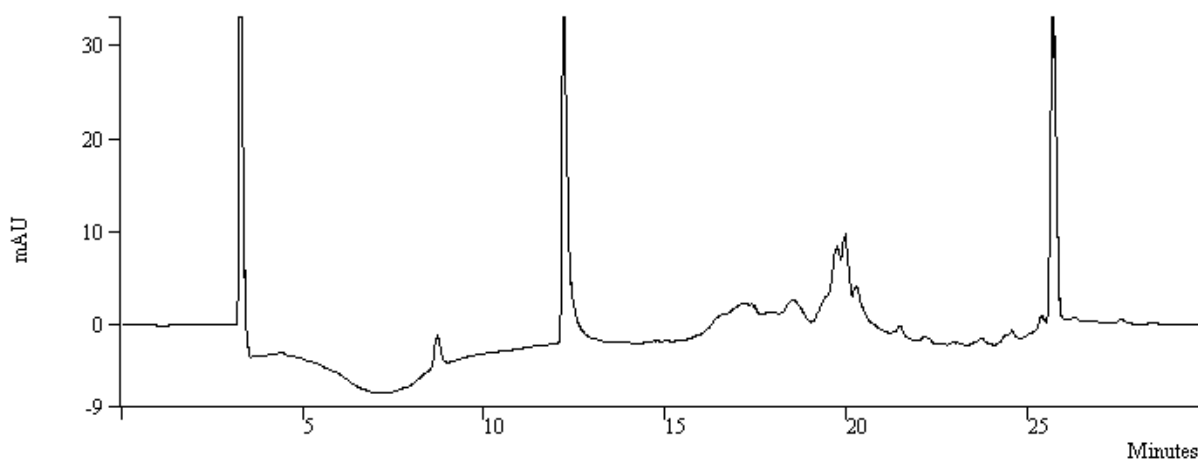
Slika 40. Kromatogram za uzorak mebendazola i aktivnog mulja u $t = 0$ h



Slika 41. Kromatogram za uzorak mebendazola i aktivnog mulja za $t = 48$ h



Slika 42. Kromatogram za uzorak mebendazola, aktivnog mulja i mikroplastike za $t = 0$ h



Slika 43. Kromatogram za uzorak mebendazola, aktivnog mulja i plastike za $t = 48$ h

4.3.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 19** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. Kada se uspoređuju rezultate TC analize s onima kromatografske analize može se zaključiti da je biorazgradnja mebendazola zadovoljavajuća. Također je vidljivo i da mikroplastika ne utječe na biorazgradnju, međutim kako je količina ugljika izrazito niska u reaktoru s muljem, mebendazolom i mikroplastikom, može se pretpostaviti da je došlo do adsorpcije mebendazola na površinu mikroplastike.

Tablica 19. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
mebendazol	1183
mulj	17,22
mulj + mebendazol	45,64
mulj + mikroplastika	18
mulj + mebendazol + mikroplastika	13,59

4.3.4. GUSTOĆA

U **Tablici 20** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i mebendazol te mulj, mikroplastiku i mebendazol nakon razgradnje.

Tablica 20. Gustoća čisti mulj prije razgradnje, mulj i mebendazol te mulj, mikroplastiku i mebendazol nakon razgradnje.

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj	2,89
mulj + mebendazol	6,85
mulj + mebendazol + mikroplastika	6,9

Podaci iz tablice ukazuju na povećanje gustoće tijekom biorazgradnje. Iz toga se može zaključiti da dolazi do povećanja biomase unutar reaktora, dok je gustoća u reaktoru s mikroplastikom najveća.

4.3.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 21** prikazani su rezultati mikrobiološke analize za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za uzorke nakon provedenog procesa biorazgradnje. Kada se usporede rezultati dobiveni iz čistog mulja i oni dobiveni nakon 48 sati u prisutnosti mebendazola, može se vidjeti da dolazi do blagog smanjenja broja mikroorganizama. Međutim, smanjenje nije toliko

značajno da bi se mogao donijeti zaključak kako mebendazol štetno djeluje na mikroorganizme iz mulja.

Tablica 21. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	$1,92 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$
-4	$5 \cdot 10^4$	-
-5	$7 \cdot 10^3$	-
MULJ + MEBENDAZOL ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$1,66 \cdot 10^5$
-3	$2,09 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$
-4	$4,7 \cdot 10^4$	-
-5	$2 \cdot 10^3$	-
MULJ + MEBENDAZOL + MIKROPLASTIKA ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$9,6 \cdot 10^4$
-3	$1,32 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^3$
-4	$1,1 \cdot 10^4$	-
-5	0	-

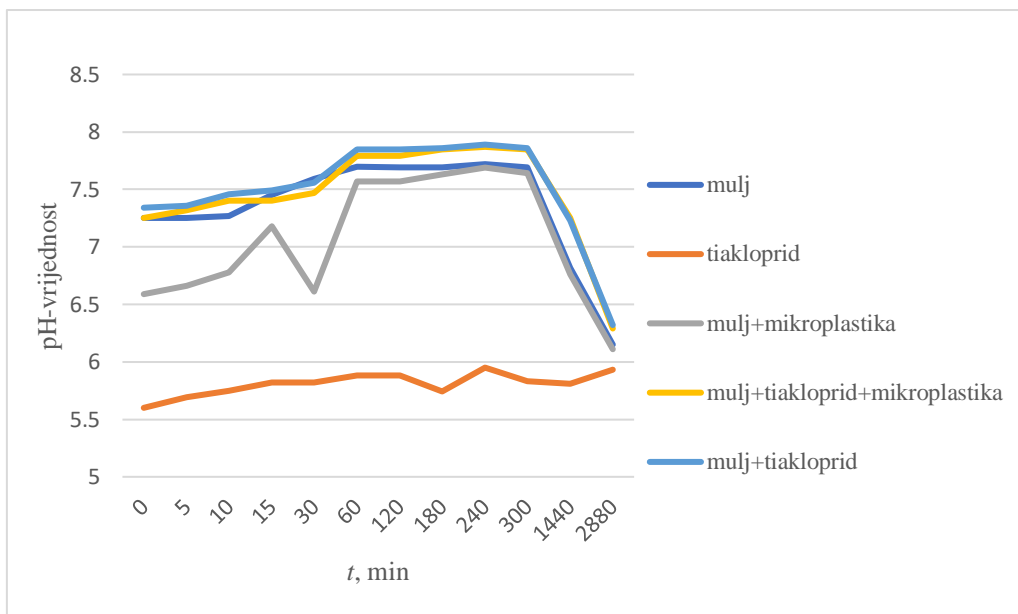
4.4. BIORAZGRADNJA TIAKLOPRIDA

4.4.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

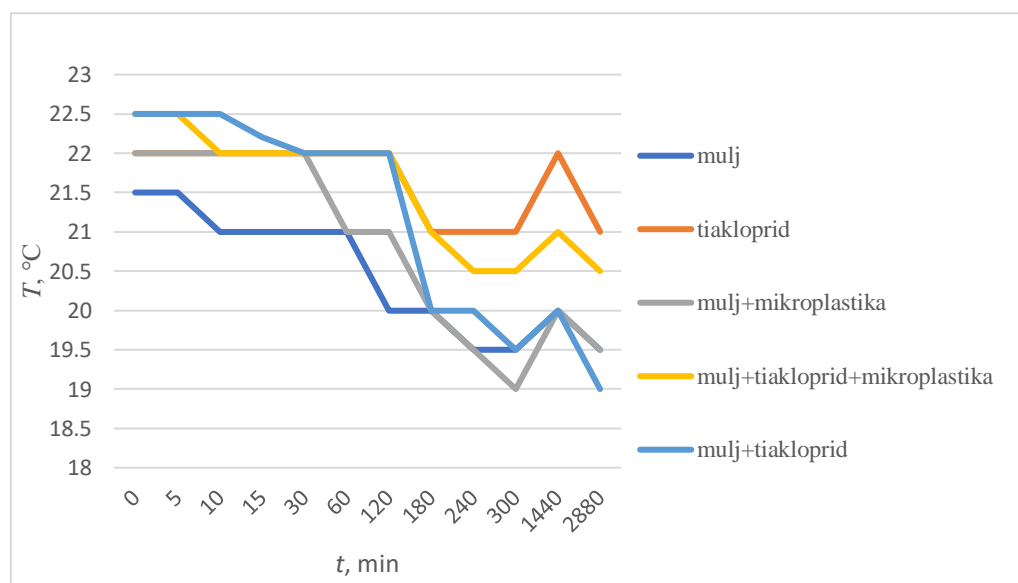
U **Tablici 22** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s tiaklopridom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički na **Slikama 44 i 45**.

Tablica 22. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s tiaklopridom

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	7,25	7,25	7,27	7,45	7,59	7,70	7,69	7,69	7,72	7,69	6,82	6,15
	T/°C	21,5	21,5	21	21	21	21	20	20	19,5	19,5	20	19,5
tiakloprid	pH	5,60	5,69	5,75	5,82	5,82	5,88	5,88	5,74	5,95	5,83	5,81	5,93
	T/°C	22	22	22	22	22	22	22	21	21	21	22	21
mulj+mikroplastika	pH	6,59	6,66	6,78	7,18	6,61	7,57	7,57	7,63	7,69	7,64	6,76	6,11
	T/°C	22	22	22	22	22	21	21	20	19,5	19	20	19,5
mulj+tiakloprid+mikroplastika	pH	7,25	7,32	7,40	7,40	7,47	7,79	7,79	7,85	7,87	7,85	7,25	6,29
	T/°C	22,5	22,5	22	22	22	22	22	21	20,5	20,5	21	20,5
mulj+tiakloprid	pH	7,34	7,36	7,46	7,49	7,56	7,85	7,85	7,86	7,89	7,86	7,23	6,32
	T/°C	22,5	22,5	22,5	22,2	22	22	22	20	20	19,5	20	19



Slika 44. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednosti o vremenu tijekom biorazgradnje tiakloprida

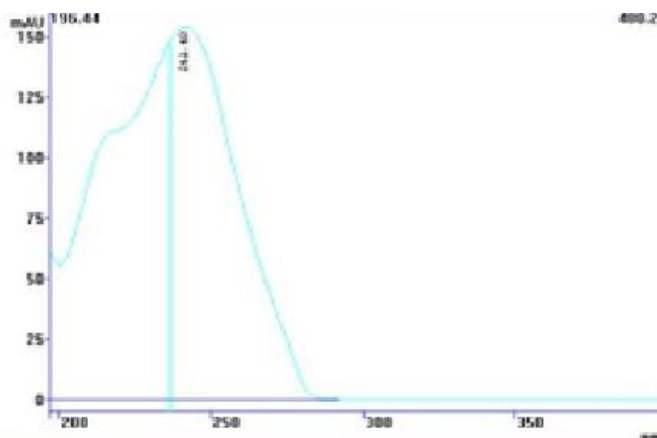


Slika 45. Grafički prikaz ovisnosti temperature o vremenu tijekom biorazgradnje tiakloprida

pH-Vrijednost tiakloprida bilježi blagi rast, dok je u ostalim reaktorima vidljiv pad vrijednosti nakon 4-og sata. Temperatura u svim reaktorima bilježi blagi pad uz manje oscilacije.

4.4.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma za tiakloprid iznosi 241 nm, a apsorpcijski spektar tiakloprida vidljiv je na **Slici 46**.



Slika 46. Apsorpcijski spektar tiakloprida

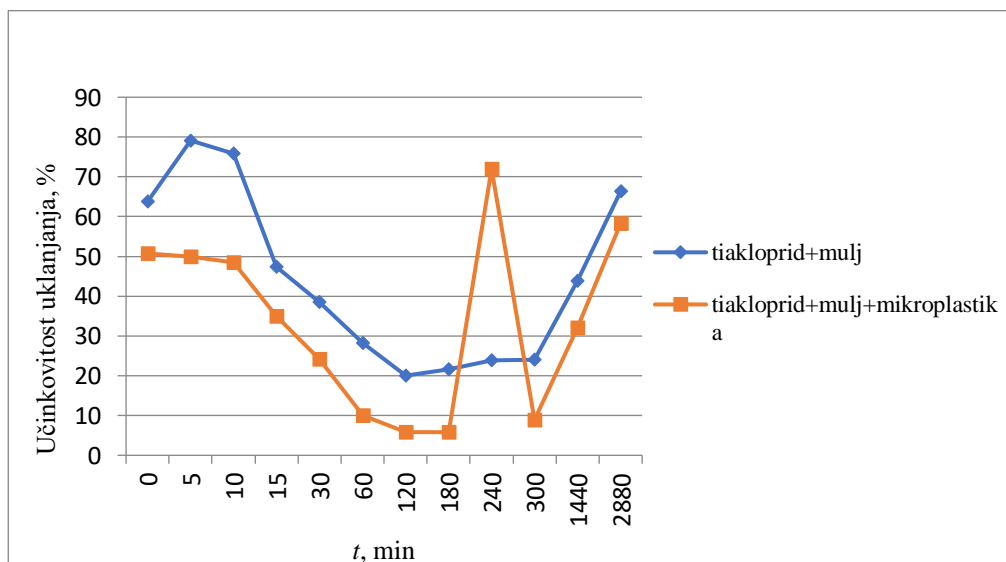
Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje se računalo u postotcima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 23** i **Tablici 24**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 47**.

Tablica 23. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu tiakloprida i mulja

Uzorak	t_R , min	A , mAUs	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
tiakloprid + mulj (0 min)	22,469	549	0	63,83
tiakloprid + mulj (5 min)	22,493	317	5	79,12
tiakloprid + mulj (10 min)	22,52	367	10	75,82
tiakloprid + mulj (15 min)	22,52	800	15	47,30
tiakloprid + mulj (30 min)	22,52	933	30	38,54
tiakloprid + mulj (1 h)	22,493	1090	60	28,19
tiakloprid + mulj (2 h)	22,493	1214	120	20,03
tiakloprid + mulj (3 h)	22,467	1189	180	21,67
tiakloprid + mulj (4 h)	22,493	1155	240	23,91
tiakloprid + mulj (5 h)	22,493	1153	300	24,04
tiakloprid + mulj (24 h)	22,467	854	1440	43,74
tiakloprid + mulj (48 h)	22,493	512	2880	66,27

Tablica 24. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu tiakloprida, mulja i mikroplastike

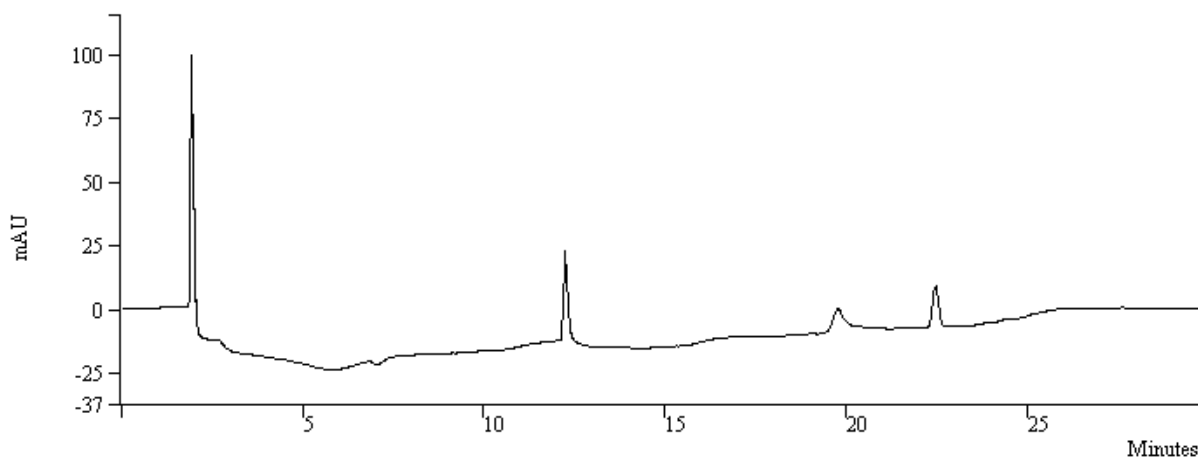
Uzorak	t_R , min	A, mAU	t , min	ućinkovitost uklanjanja, %
tiaklopid + mulj + mikroplastika (0 min)	22,493	749	0	50,66
tiaklopid + mulj + mikroplastika (5 min)	22,493	761	5	49,87
tiaklopid + mulj + mikroplastika (10 min)	22,467	782	10	48,48
tiaklopid + mulj + mikroplastika (15 min)	22,467	987	15	34,98
tiaklopid + mulj + mikroplastika (30 min)	22,493	1150	30	24,24
tiaklopid + mulj + mikroplastika (1 h)	22,467	1366	60	10,01
tiaklopid + mulj + mikroplastika (2 h)	22,467	1429	120	5,86
tiaklopid + mulj + mikroplastika (3 h)	22,467	1430	180	5,80
tiaklopid + mulj + mikroplastika (4 h)	22,467	425	240	72,00
tiaklopid + mulj + mikroplastika (5 h)	22,467	1383	300	8,89
tiaklopid + mulj + mikroplastika (24 h)	22,493	1031	1440	32,08
tiaklopid + mulj + mikroplastika (48 h)	22,493	632	2880	58,37



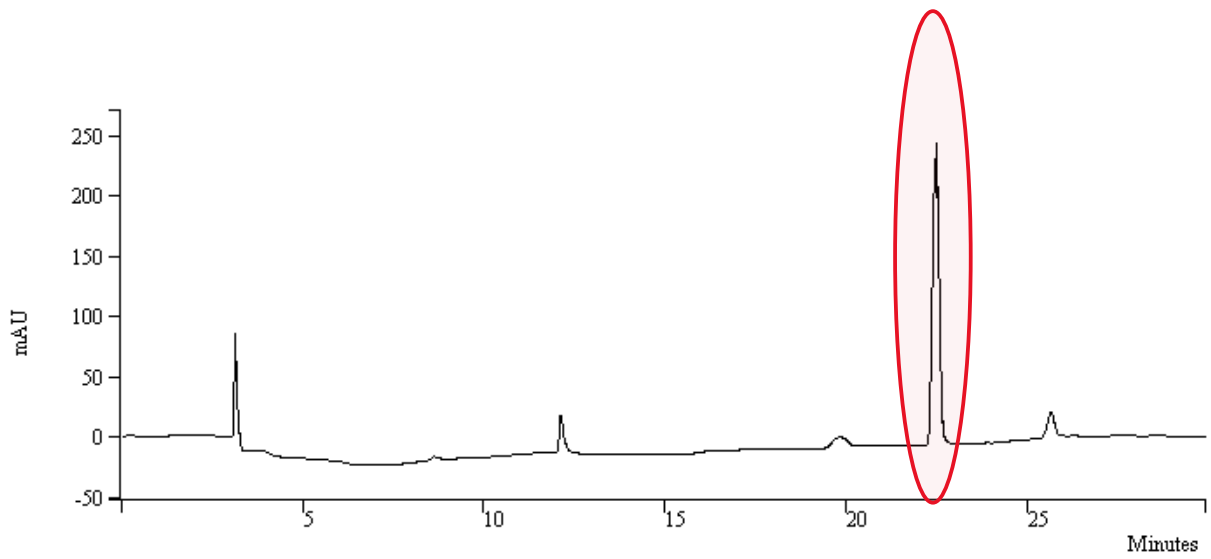
Slika 47. Grafićki prikaz ovisnosti uklanjanja tiakloprida o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

Rezultati kromatografske analize pokazuju da niti u jednom trenutku ne dolazi do potpune razgradnje tiakloprida. Promatrajući krivulje može se zaključiti da je razgradnja nešto bolja u reaktoru s muljem i tiaklopridom, ali je stupanj razgradnje približno jednak. Uklanjanje je na početku veće, što se može objasniti adsorpcijom tiakloprida na površinu mulja i mikroplastike, nakon čega dolazi do desorpcije.

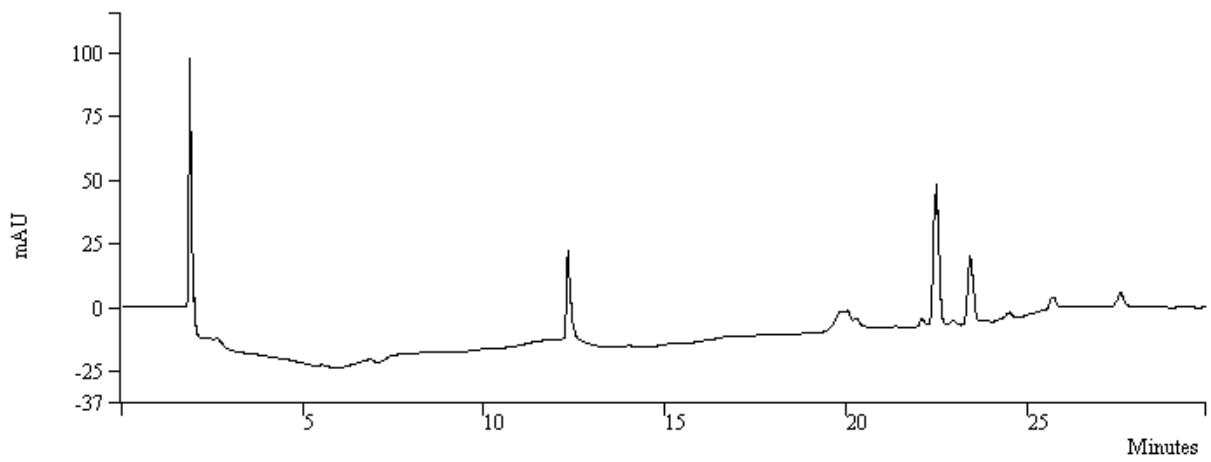
Slika 48 prikazuje kromatogram čistog mulja, a **Slika 49** kromatogram radne otopine tiakloprida. Usporedbom dvaju kromatograma možemo primijetiti kromatografsku krivulju između 22.-ge i 23.-će minute koja ukazuje na tiaklopid. Kromatogram za uzorak tiakloprida i mulja u $t = 0$ min vidljiv je na **Slici 50**, te u $t = 48$ h na **Slici 51**. Usporedbom ova dva kromatograma vidljivo je kako se tiaklopid ne razgrađuje u potpunosti iako je kromatografska krivulja nešto manja u 48-om satu nego što je na početku procesa. Također su jasno vidljive nove kromatografske krivulje koje ukazuju na nastanak novih spojeva tijekom biorazgradnje tiakloprida. Kromatogram uzorka tiakloprida, mulja i mikroplastike u $t = 0$ min prikazan je na **Slici 52**, te u $t = 48$ h na **Slici 53**. Rezultati su vrlo slični, dolazi do nastanka novih spojeva, ali razgradnja nije potpuna.



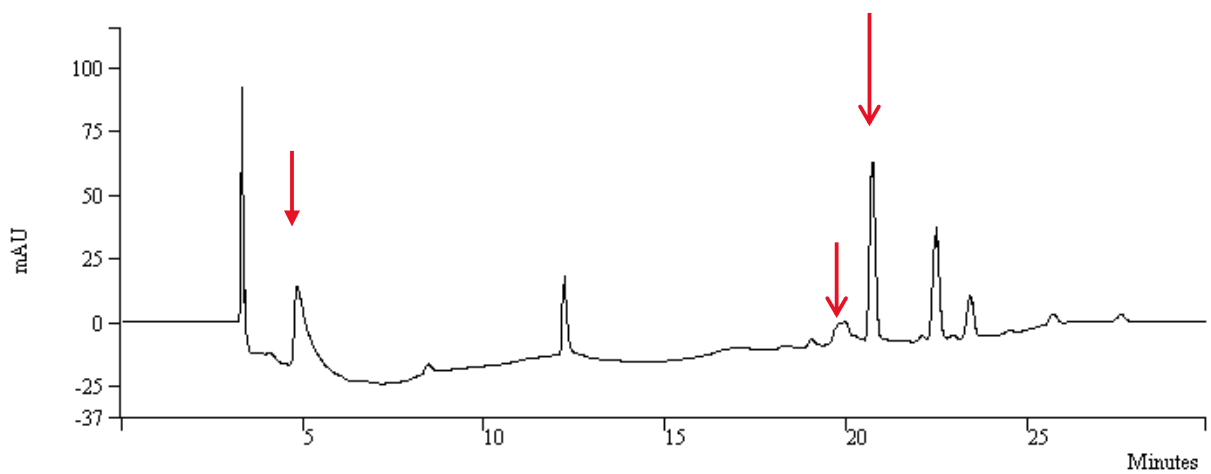
Slika 48. Kromatogram čistog mulja



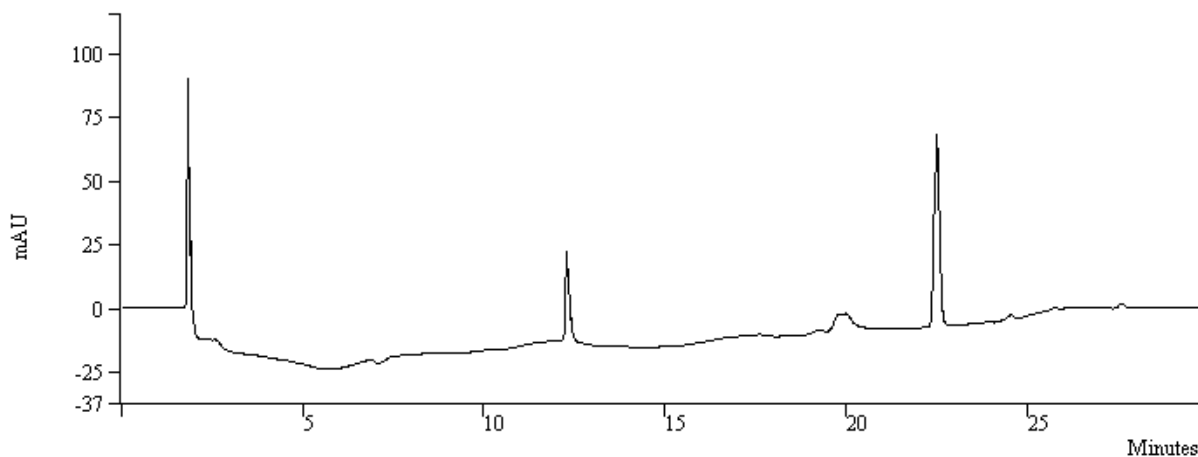
Slika 49. Kromatogram radne otopine tiakloprida



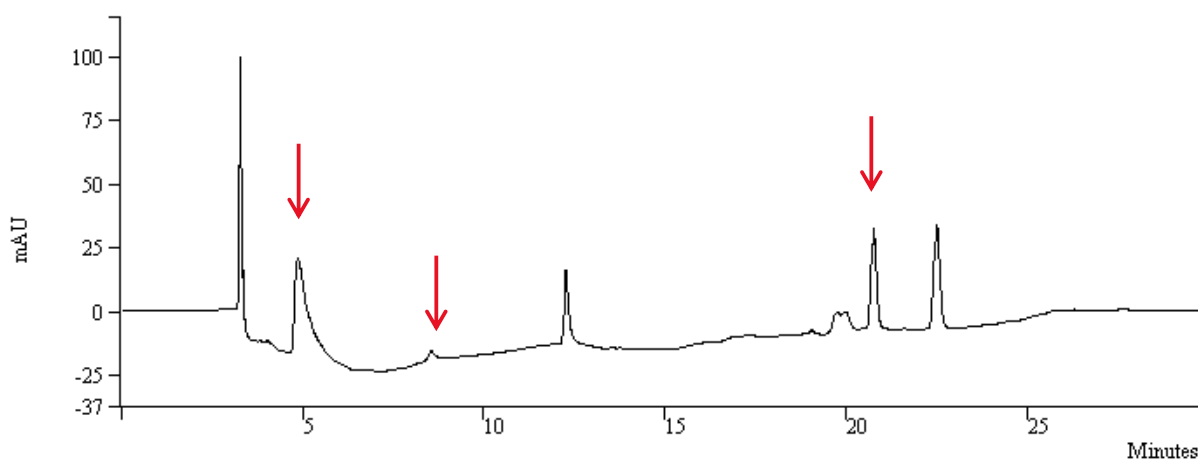
Slika 50. Kromatogram za uzorak tiakloprida i aktivnog mulja za $t = 0$ h



Slika 51. Kromatogram za uzorak tiakloprida i aktivnog mulja za $t = 48$ h



Slika 52. Kromatogram za uzorak tiakloprida, aktivnog mulja i plastike za $t = 0$ h



Slika 53. Kromatogram za uzorak tiakloprida, aktivnog mulja i plastike za $t = 48$ h

4.4.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 25** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. I iz ovih rezultata može se zaključiti da ne dolazi do potpune biorazgradnje tiakloprida, te da su vrijednosti slične u reaktoru s mikroplastikom i onom bez mikroplastike.

Tablica 25. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
tiaklopid	7,9
mulj	18,1
mulj + tiaklopid	15,82
mulj + mikroplastika	17,7
mulj + tiaklopid + mikroplastika	14,82

4.4.4. GUSTOĆA

U **Tablici 26** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i tiaklopid te mulj, mikroplastiku i tiaklopid nakon razgradnje.

Tablica 26. Gustoća za čisti mulj prije razgradnje, mulj i tiaklopid te mulj, mikroplastiku i tiaklopid nakon razgradnje.

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj	2,04
mulj + tiaklopid	2,17
mulj + tiaklopid + mikroplastika	2,17

Podaci iz tablice ukazuju na neznatno povećanje gustoće tijekom biorazgradnje, dok je gustoća u reaktoru bez mikroplastike jednaka gustoći u reaktoru s mikroplastikom.

4.4.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 27** prikazani su rezultati mikrobiološke analize za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za uzorke nakon provedenog procesa biorazgradnje. Broj gljiva bilježi mali rast, dok se broj bakterija smanjuje stoga se može zaključiti kako nema značajnijih promjena u broju mikroorganizama.

Tablica 27. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$6,8 \cdot 10^4$
-3	$2,24 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^3$
-4	$1,5 \cdot 10^4$	-
-5	$1 \cdot 10^3$	-
MULJ + TIAKLOPRID ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$2 \cdot 10^5$
-3	$5,4 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$
-4	$1,7 \cdot 10^4$	-
-5	$9 \cdot 10^3$	-
MULJ + TIAKLOPRID + MIKROPLASTIKA ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$4,6 \cdot 10^4$
-3	$5,6 \cdot 10^4$	$165 \cdot 10^4$
-4	$1,8 \cdot 10^4$	-
-5	$2 \cdot 10^3$	-

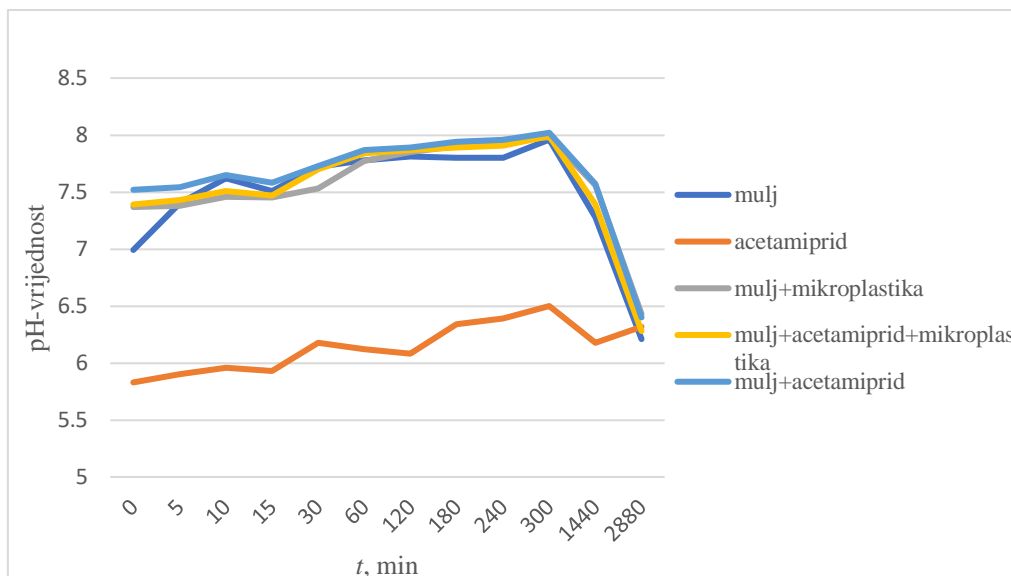
4.5. BIORAZGRADNJA ACETAMIPRIDA

4.5.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

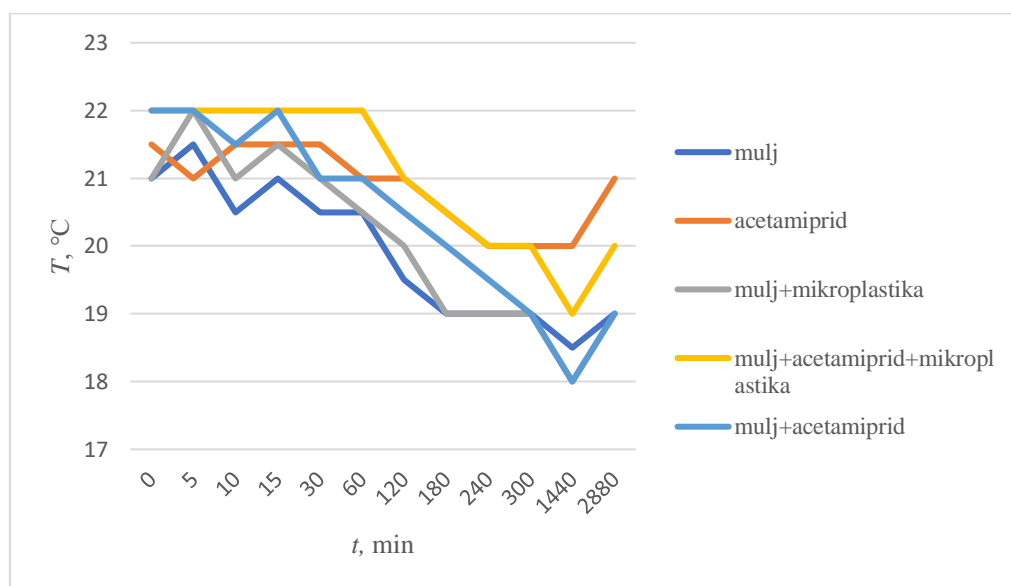
U **Tablici 28** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s acetamidom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički na **Slikama 54 i 55**.

Tablica 28. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s acetamidom

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	6,99	7,40	7,62	7,51	7,72	7,78	7,81	7,80	7,80	7,96	7,28	6,21
	T/°C	21	21,5	20,5	21	20,5	20,5	19,5	19	19	19	18,5	19
acetamid	pH	5,83	5,90	5,96	5,93	6,18	6,12	6,08	6,34	6,39	6,50	6,18	6,32
	T/°C	21,5	21	21,5	21,5	21,5	21	21	20,5	20	20	20	21
mulj+mikroplastika	pH	7,37	7,38	7,46	7,45	7,53	7,77	7,85	7,90	7,96	7,98	7,56	6,43
	T/°C	21	22	21	21,5	21	20,5	20	19	19	19	18	19
mulj+acetamid+mikroplastika	pH	7,39	7,43	7,51	7,47	7,70	7,84	7,87	7,89	7,91	7,99	7,39	6,28
	T/°C	22	22	22	22	22	22	21	20,5	20	20	19	20
mulj+acetamid	pH	7,52	7,54	7,65	7,58	7,73	7,87	7,89	7,94	7,96	8,02	7,57	6,40
	T/°C	22	22	21,5	22	21	21	20,5	20	19,5	19	18	19



Slika 54. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednosti o vremenu tijekom biorazgradnje acetamidrida

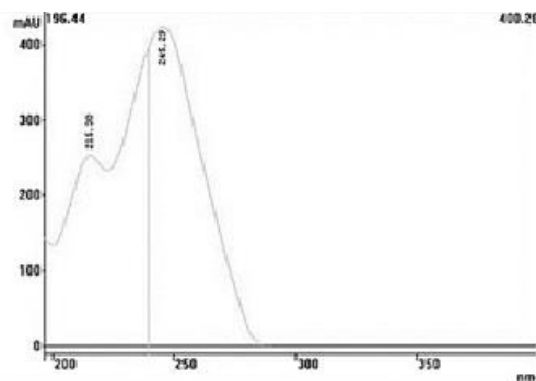


Slika 55. Grafički prikaz ovisnosti temperature o vremenu tijekom biorazgradnje acetamidrida

Iz grafičkih prikaza vidljiv je rast pH-vrijednosti za acetamidrid, dok svi drugi reaktori bilježe blagi rast, a nakon 5-og sata vrijednosti počinju padati. Temperatura bilježi stalni pad do 24-og sata nakon čega poraste.

4.5.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma za acetamiprid iznosi 241 nm, a apsorpcijski spektar acetamiprida vidljiv je na **Slici 56**.



Slika 56. Apсорpcijski spektar acetamiprida

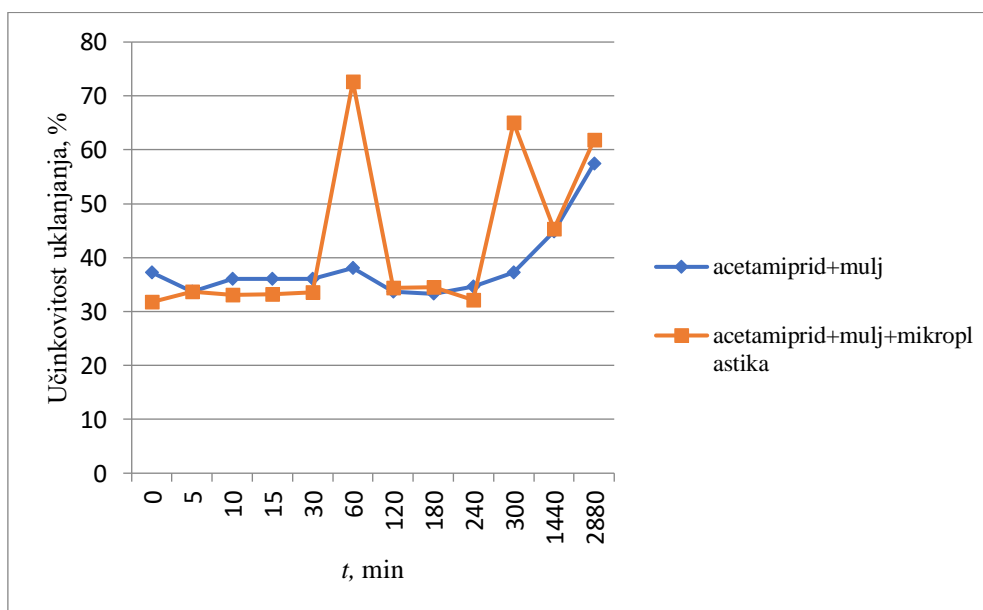
Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje se računalo u postocima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 29** i **Tablici 30**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 57**.

Tablica 29. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu acetamiprida i mulja

Uzorak	t_R , min	A , mAU	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
acetamiprid + mulj (0 min)	21,693	1950	0	37,26
acetamiprid + mulj (5 min)	21,693	2060	5	33,72
acetamiprid + mulj (10 min)	21,693	1988	10	36,04
acetamiprid + mulj (15 min)	21,693	1989	15	36,00
acetamiprid + mulj (30 min)	21,667	1988	30	36,04
acetamiprid + mulj (1 h)	21,699	1924	60	38,09
acetamiprid + mulj (2 h)	21,68	2061	120	33,69
acetamiprid + mulj (3 h)	21,685	2074	180	33,27
acetamiprid + mulj (4 h)	21,696	2033	240	34,59
acetamiprid + mulj (5 h)	21,688	1950	300	37,26
acetamiprid + mulj (24 h)	21,672	1715	1440	44,82
acetamiprid + mulj (48 h)	21,64	1322	2880	57,46

Tablica 30. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu acetamiprida, mulja i mikroplastike

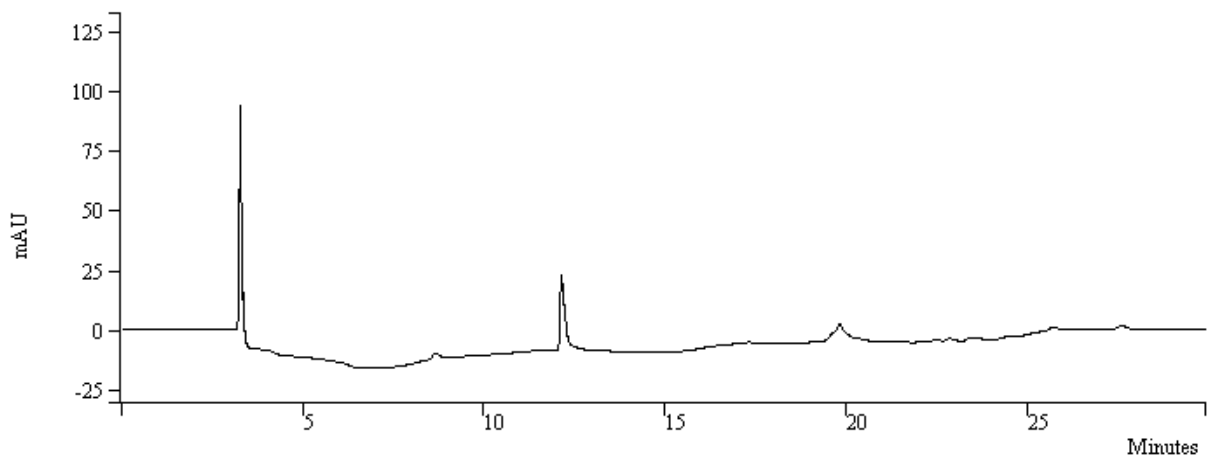
Uzorak	t_R , min	A, mAU	t, min	ućinkovitost uklanjanja, %
acetamiprid + mulj + mikroplastika (0 min)	21,672	2121	0	31,76
acetamiprid + mulj + mikroplastika (5 min)	21,667	2060	5	33,72
acetamiprid + mulj + mikroplastika (10 min)	21,667	2079	10	33,11
acetamiprid + mulj + mikroplastika (15 min)	21,667	2077	15	33,17
acetamiprid + mulj + mikroplastika (30 min)	21,64	2065	30	33,56
acetamiprid + mulj + mikroplastika (1 h)	21,664	850	60	72,65
acetamiprid + mulj + mikroplastika (2 h)	21,64	2039	120	34,40
acetamiprid + mulj + mikroplastika (3 h)	21,667	2036	180	34,49
acetamiprid + mulj + mikroplastika (4 h)	21,635	2108	240	32,18
acetamiprid + mulj + mikroplastika (5 h)	21,64	1085	300	65,09
acetamiprid + mulj + mikroplastika (24 h)	21,64	1699	1440	45,33
acetamiprid + mulj + mikroplastika (48 h)	21,64	1187	2880	61,81



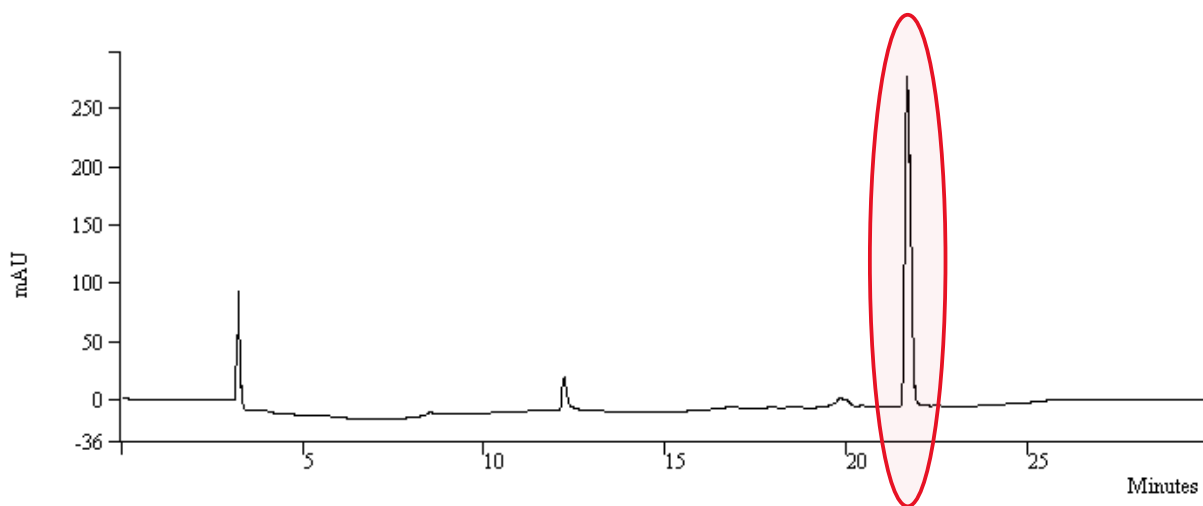
Slika 57. Grafićki prikaz ovisnosti uklanjanja acetamiprida o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

Prema rezultatima kromatografske analize može se zaključiti da ne dolazi do potpunog uklanjanja acetamiprida niti u jednom reaktoru. Kako je vrijednost $\log K_{ow}$ za acetamiprid 0,80, mogućnost adsorpcije na aktivni mulj i mikroplastiku je mala. Učinkovitost uklanjanja nakon 5 sati bilježi rast, stoga se može pretpostaviti kako je mikroorganizmima potrebno određeno vrijeme prilagodbe na pesticid kako bi kasnije došlo do razgradnje.

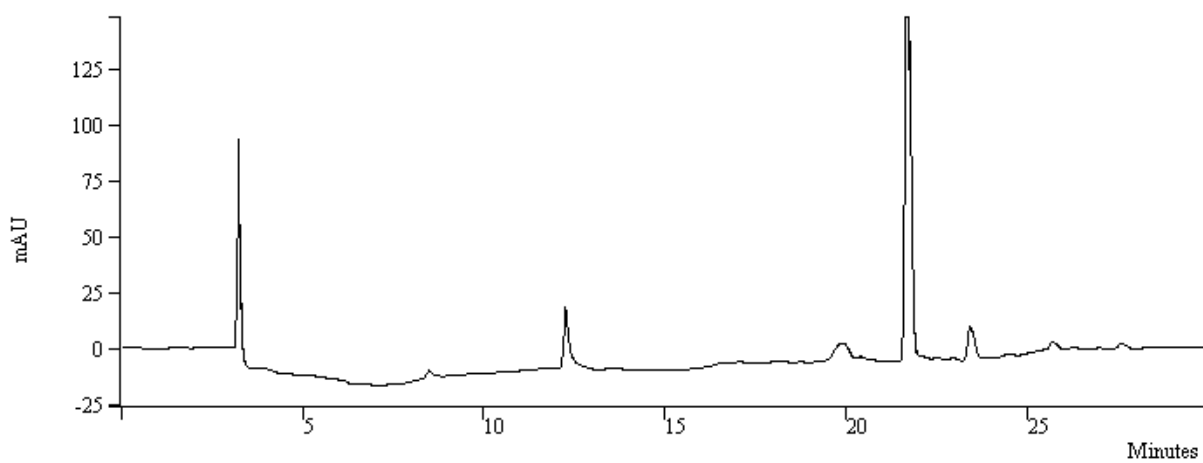
Na **Slici 58** prikazan je kromatogram čistog mulja, a na **Slici 59** kromatogram radne otopine acetamiprida. Usporedbom ova dva kromatograma primjetna je kromatografska krivulja oko 22.-ge minute koja ukazuje na acetamiprid. Na **Slici 60** prikazan je kromatogram za uzorak acetamiprida i mulja u $t = 0$ min, te na **Slici 61** u $t = 48$ h. Usporedbom ova dva kromatograma vidljivo je kako uklanjanje acetamiprida nije potpuno, međutim nastaju nove kromatografske krivulje što ukazuje na nastajanje novih spojeva. Nadalje je vidljiv kromatogram uzorka acetamiprida, mulja i mikroplastike u $t = 0$ min na **Slici 62**, te u $t=48$ h na **Slici 63**. Iz ovih prikaza je također vidljivo uklanjanje acetamiprida uz nastajanje produkata, međutim nepotpuno kao i u prethodnom slučaju za reaktor bez mikroplastike.



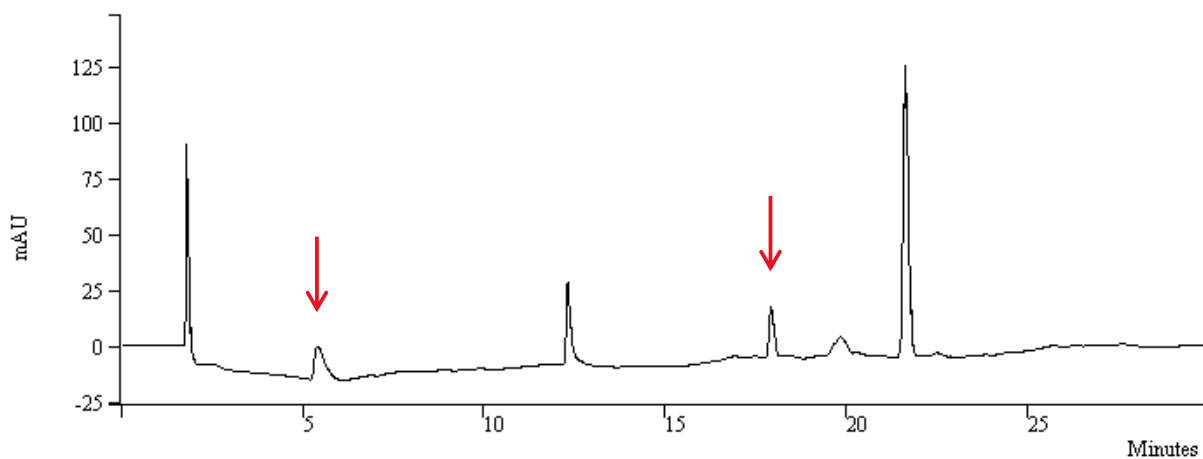
Slika 58. Kromatogram čistog mulja



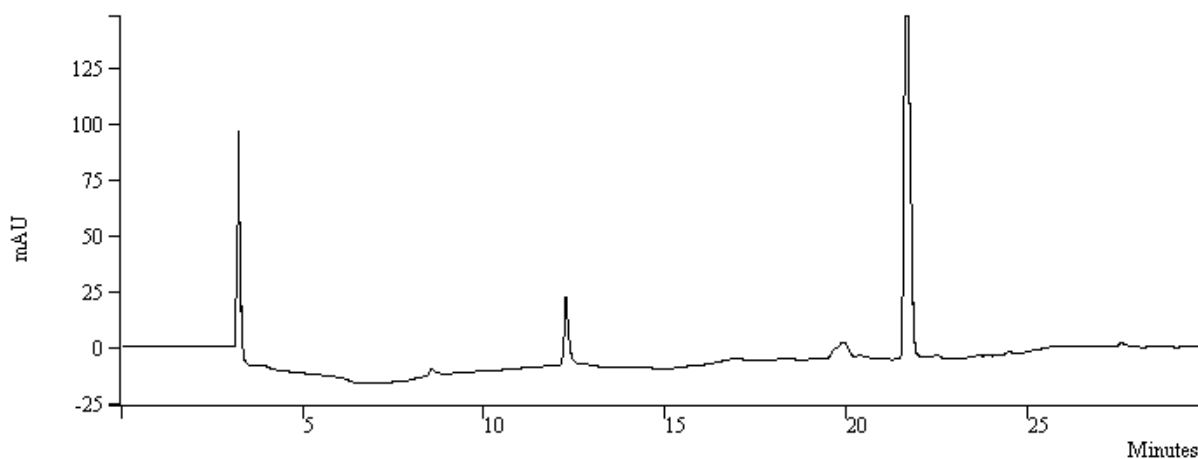
Slika 59. Kromatogram radne otopine acetamiprida



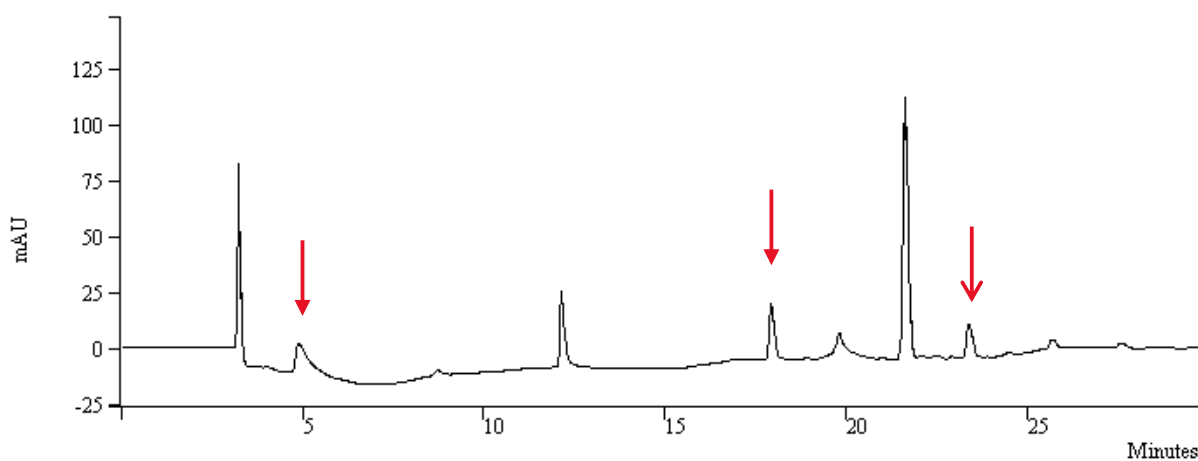
Slika 60. Kromatogram acetamiprida i aktivnog mulja za $t = 0$ h



Slika 61. Kromatogram acetamiprida i aktivnog mulja za $t = 48$ h



Slika 62. Kromatogram acetamiprida, aktivnog mulja i plastike za $t = 0$ h



Slika 63. Kromatogram acetamiprida, aktivnog mulja i plastike za $t = 48$ h

4.5.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 31** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. Može se primijetiti da se rezultati poklapaju s onima dobivenim kromatografskom analizom. Ukupna količina ugljika ima gotovo istu vrijednost u reaktorima sa i bez mikroplastike stoga se može pretpostaviti da je uklanjanje približno jednako te da mikroplastika ne sprječava sam proces biorazgradnje acetamiprida.

Tablica 31. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
acetamiprid	8,02
mulj	14,02
mulj + acetamiprid	16,81
mulj + mikroplastika	11
mulj + acetamiprid + mikroplastika	17,66

4.5.4. GUSTOĆA

U **Tablici 32** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i acetamiprid te mulj, plastiku i acetamiprid nakon razgradnje.

Tablica 32. Gustoća čistog mulj prije razgradnje, mulja i acetamiprida te mulja, mikroplastike i acetamiprida nakon razgradnje

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj	2
mulj + acetamiprid	2,05
mulj + acetamiprid + mikroplastika	2,11

Podaci iz tablice ukazuju na blago povećanje gustoće tijekom biorazgradnje. Iz toga možemo zaključiti da dolazi do povećanja biomase unutar reaktora.

4.5.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 33** prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka iz reaktora koji sadrže acetamiprid nakon provedenog procesa biorazgradnje te iz reaktora s čistim muljem prije procesa biorazgradnje. Iz tablica je vidljivo značajno povećanje broja mikroorganizama u uzorcima. Iz ovih rezultata zaključuje se kako je biorazgradnja uspješna te se mikroorganizmi mogu hraniti acetamipridom. Tome u prilog ide i povećanje gustoće nakon procesa biorazgradnje koje ukazuje na rast biomase. U reaktoru s mikroplastikom imamo nešto manje

povećanje broja mikroorganizama što bi ukazivalo na to da mikroplastika u manjoj mjeri sprječava mikroorganizame u opskrbi hranjivim tvarima.

Tablica 33. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$2 \cdot 10^4$
-3	$2,9 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$
-4	$2,6 \cdot 10^4$	-
-5	$3 \cdot 10^3$	-
MULJ + ACETAMIPRID ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	NB
-3	NB	NB
-4	NB	-
-5	NB	-
MULJ + ACETAMIPRID + MIKROPLASTIKA ($t=48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$9 \cdot 10^4$
-3	NB	$5,2 \cdot 10^4$
-4	NB	-
-5	$3,7 \cdot 10^4$	-

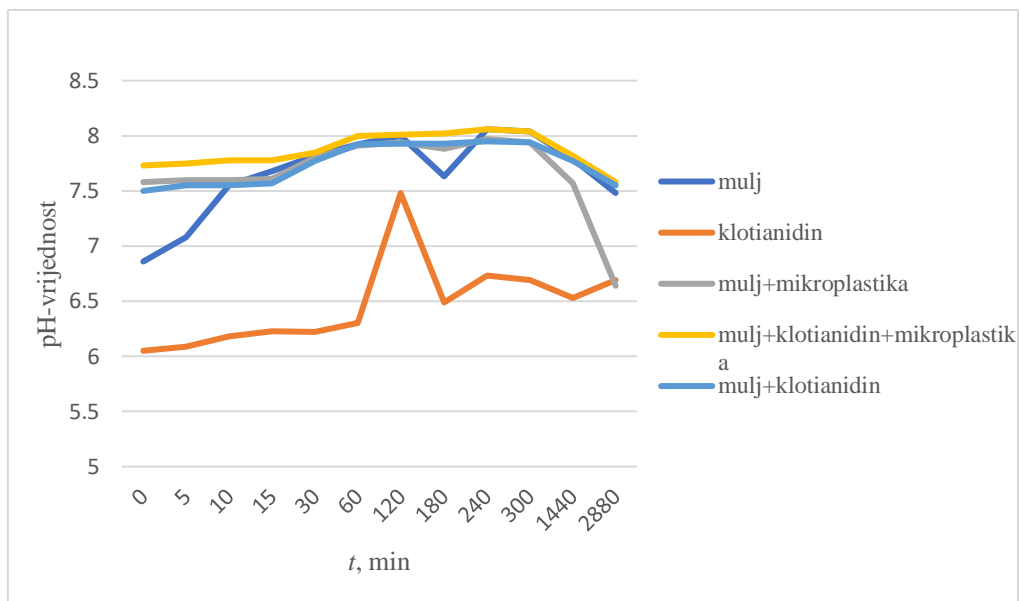
4.6. BIORAZRGADNJA KLOTIANIDINA

4.6.1. PRAĆENJE TEMPERATURE I pH-VRIJEDNOSTI

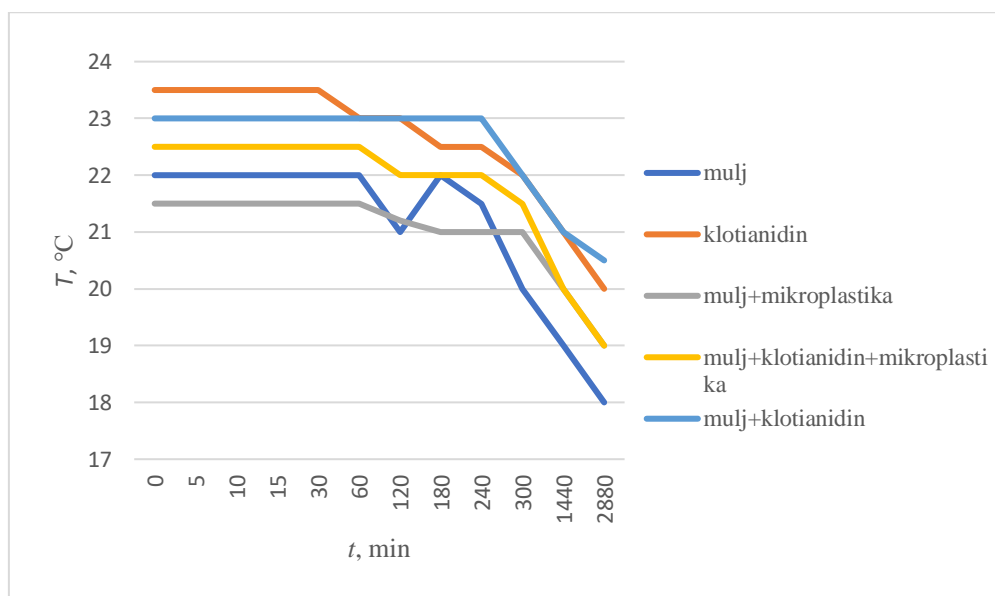
U **Tablici 34** prikazane su izmjerene pH-vrijednosti i temperature sadržaja reaktora s klotianidinom u vremenu (t , min), a iste vrijednosti prikazane su i grafički na **Slikama 64** i **65**.

Tablica 34. Vrijednosti temperature i pH u reaktorima s klotianidinom tijekom biorazgradnje

Uzorak	t , min	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440	2880
mulj	pH	6,86	7,08	7,55	7,68	7,82	7,92	8,00	7,63	8,06	8,04	7,79	7,48
	T/°C	22	22	22	22	22	22	21	22	21,5	20	19	18
klotianidin	pH	6,05	6,09	6,18	6,23	6,22	6,30	7,48	6,49	6,73	6,69	6,53	6,69
	T/°C	23,5	23,5	23,5	23,5	23,5	23	23	22,5	22,5	22	21	20
mulj+mikroplastika	pH	7,58	7,60	7,60	7,61	7,80	7,91	7,94	7,88	7,97	7,94	7,57	6,64
	T/°C	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,2	21	21	21	20	19
mulj+klotianidin+mikroplastika	pH	7,73	7,75	7,78	7,78	7,85	8,00	8,01	8,02	8,06	8,04	7,82	7,58
	T/°C	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22,5	22	22	22	21,5	20	19
mulj+klotianidin	pH	7,50	7,55	7,55	7,57	7,77	7,92	7,93	7,93	7,95	7,94	7,77	7,55
	T/°C	23	23	23	23	23	23	23	23	23	22	21	20,5



Slika 64. Grafički prikaz ovisnosti pH-vrijednosti o vremenu tijekom biorazgradnje klotianidina

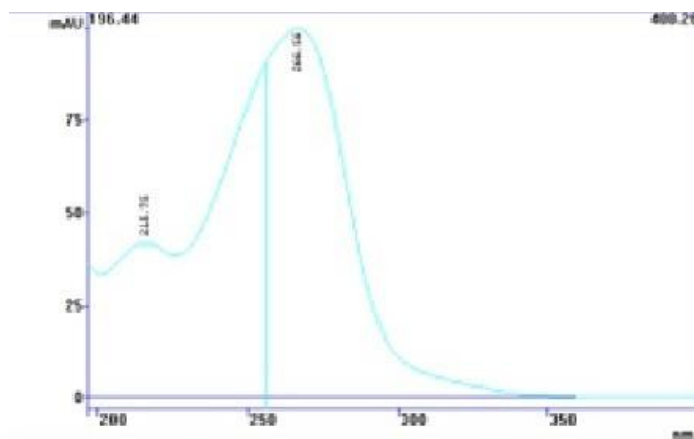


Slika 65. Grafički prikaz ovisnosti temperature o vremenu tijekom biorazgradnje klotianidina

Kao i kod drugih parazitika i klotianidin pokazuje blagi rast pH-vrijednosti s vremenom, dok se u drugim reaktorima događa pad nakon 5-og sata. Temperatura u svim reaktorima prvo stagnira, a zatim pada.

4.6.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Valna duljina apsorpcijskog maksimuma za klotianidin iznosi 241 nm, a apsorpcijski spektar klotianidina vidljiv je na **Slici 66**.



Slika 66. Apsorpcijski spektar klotianidina

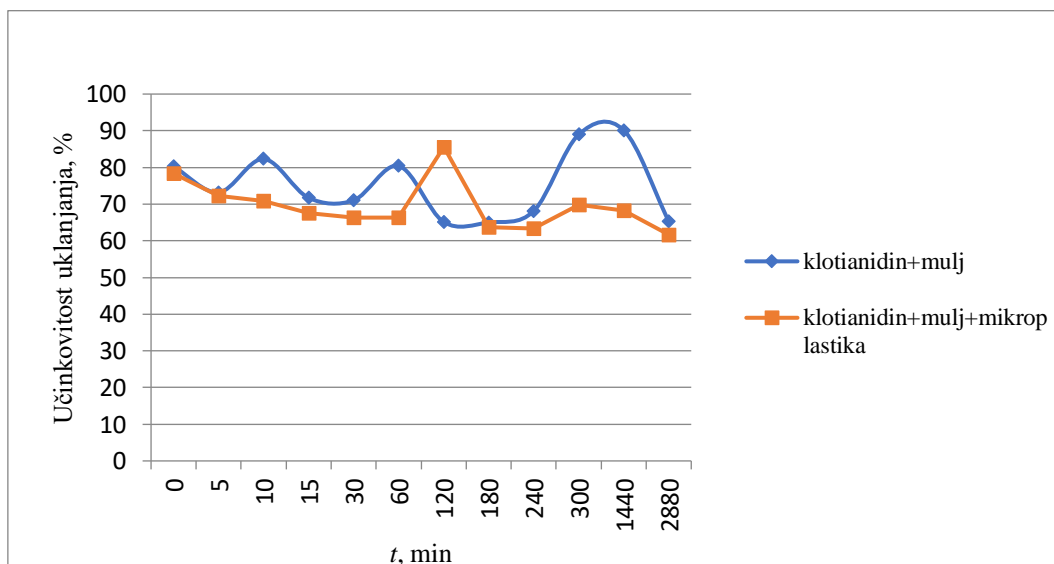
Tijekom analize pratilo se vrijeme zadržavanja (t_R) i površina ispod krivulje (A), a uklanjanje se računalo u postocima prema izrazu (4) što je prikazano u **Tablici 35** i **Tablici 36**. Ovisnost uklanjanja o vremenu prikazana je grafički na **Slici 67**.

Tablica 35. Parametri praćeni tijekom kromatografske analize za smjesu klotianidina i mulja

Uzorak	t_R , min	A, mAUs	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
klotianidin + mulj (0 min)	21,24	614	0	80,24
klotianidin + mulj (5 min)	21,24	833	5	73,20
klotianidin + mulj (10 min)	21,24	550	10	82,30
klotianidin + mulj (15 min)	21,24	879	15	71,72
klotianidin + mulj (30 min)	21,267	900	30	71,04
klotianidin + mulj (1 h)	21,24	609	60	80,40
klotianidin + mulj (2 h)	21,267	1083	120	65,15
klotianidin + mulj (3 h)	21,24	1088	180	64,99
klotianidin + mulj (4 h)	21,267	991	240	68,11
klotianidin + mulj (5 h)	21,24	343	300	88,96
klotianidin + mulj (24 h)	21,267	307	1440	90,12
klotianidin + mulj (48 h)	21,293	1078	2880	65,32

Tablica 36. Parametri praćeni tijekom HPLC analize za smjesu klotianidina, mulja i mikroplastike

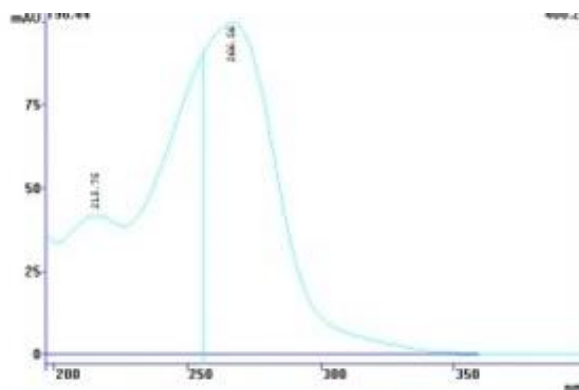
Uzorak	t_R , min	A, mAUs	t , min	učinkovitost uklanjanja, %
klotianidin + mulj + mikroplastika (0 min)	21,293	674	0	78,31
klotianidin + mulj + mikroplastika (5 min)	21,267	861	5	72,30
klotianidin + mulj + mikroplastika (10 min)	21,267	905	10	70,88
klotianidin + mulj + mikroplastika (15 min)	21,267	1008	15	67,57
klotianidin + mulj + mikroplastika (30 min)	21,267	1048	30	66,28
klotianidin + mulj + mikroplastika (1 h)	21,24	1046	60	66,35
klotianidin + mulj + mikroplastika (2 h)	21,267	448	120	85,58
klotianidin + mulj + mikroplastika (3 h)	21,267	1127	180	63,74
klotianidin + mulj + mikroplastika (4 h)	21,267	1140	240	63,32
klotianidin + mulj + mikroplastika (5 h)	21,24	940	300	69,76
klotianidin + mulj + mikroplastika (24 h)	21,24	988	1440	68,21
klotianidin + mulj + mikroplastika (48 h)	21,267	1191	2880	61,68



Slika 67. Grafički prikaz ovisnosti uklanjanja klotianidina o vremenu sa i bez prisutnosti mikroplastike

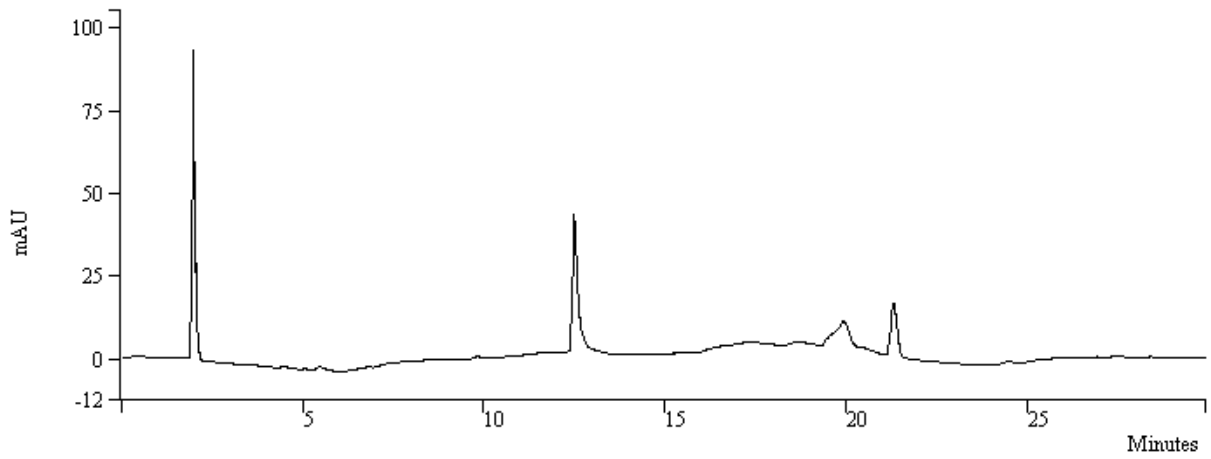
Promatrajući rezultate dobivene kromatografskom analizom može se zaključiti da se klotianidin ne razgrađuje. Kako je vrijednost $\log K_{ow}$ jednaka 0,7, vjerojatnost adsorpcije je vrlo mala. Kako bi se donio konačan zaključak o uspješnosti uklanjanja klotianidina, potrebno je proučiti rezultate dodatnih analiza.

Slika 69 prikazuje kromatogram čistog mulja, a **Slika 70** kromatogram radne otopine klotianidina. Usporedbom dvaju kromatograma može se primijetiti kromatografska krivulja oko 21.-ve minute koja ukazuje na klotianidin. Međutim, i u kromatogramu čistog mulja nastaje kromatografska krivulja u istom vremenu. To je komponenta čistog mulja čiji je apsorpcijski spektar prikazan na **Slici 68**.

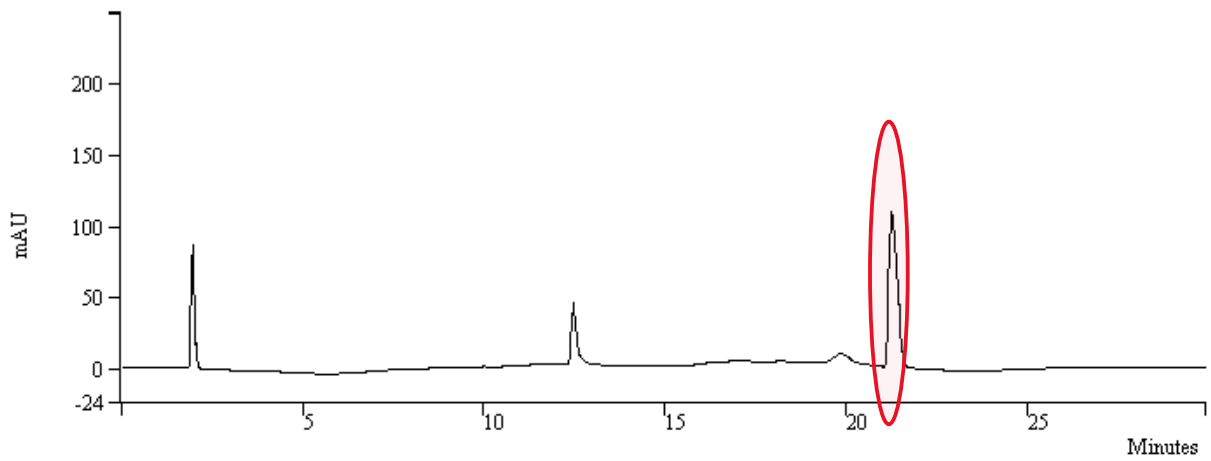


Slika 68. Apсорpcijski spektar komponente mulja

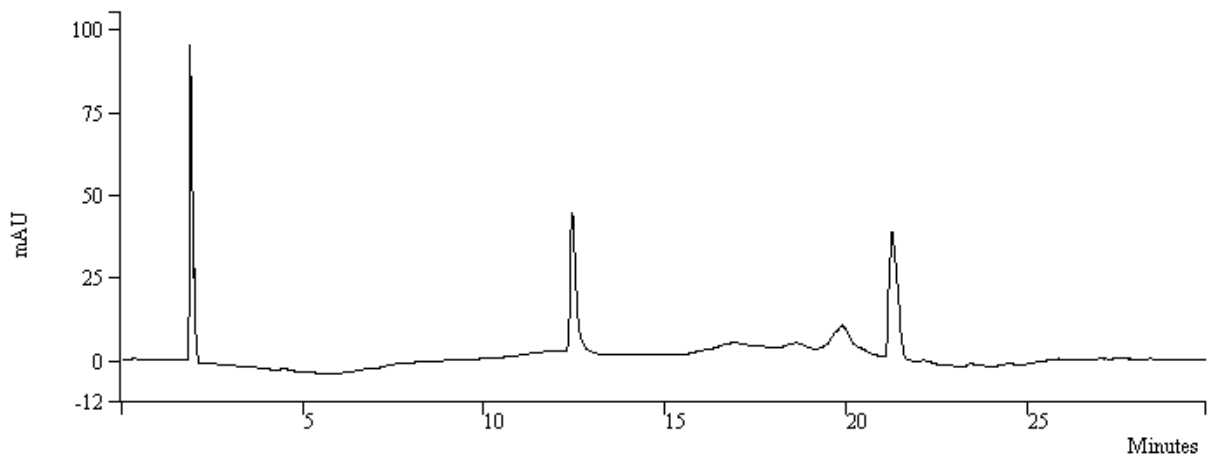
Kromatogram za uzorak klotianidina i mulja u $t = 0$ min vidljiv je na **Slici 71**, te u $t = 48$ h na **Slici 72**. Usporedbom kromatograma vidljivo je kako se klotianidin ne razgrađuje jer se ne pojavljuju nove kromatografske krivulje koje bi ukazivale na nove spojeve i/ili transformacijske produkte. Kromatogram uzorka klotianidina, mulja i mikroplastike u $t = 0$ min prikazan je na **Slici 73**, te u $t = 48$ h na **Slici 74**. Ni u ovom reaktoru ne dolazi do razgradnje klotianidina što se može zaključiti i po tome što nisu nastale nove kromatografske krivulje koje bi ukazivale na nastanak novih spojeva i/ili transformacijskih produkata.



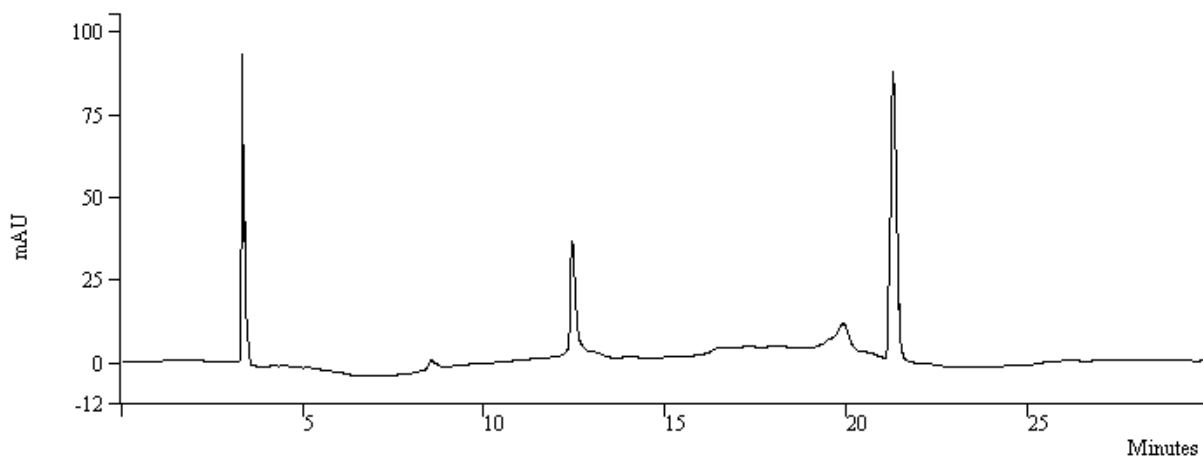
Slika 69. Kromatogram čistog mulja



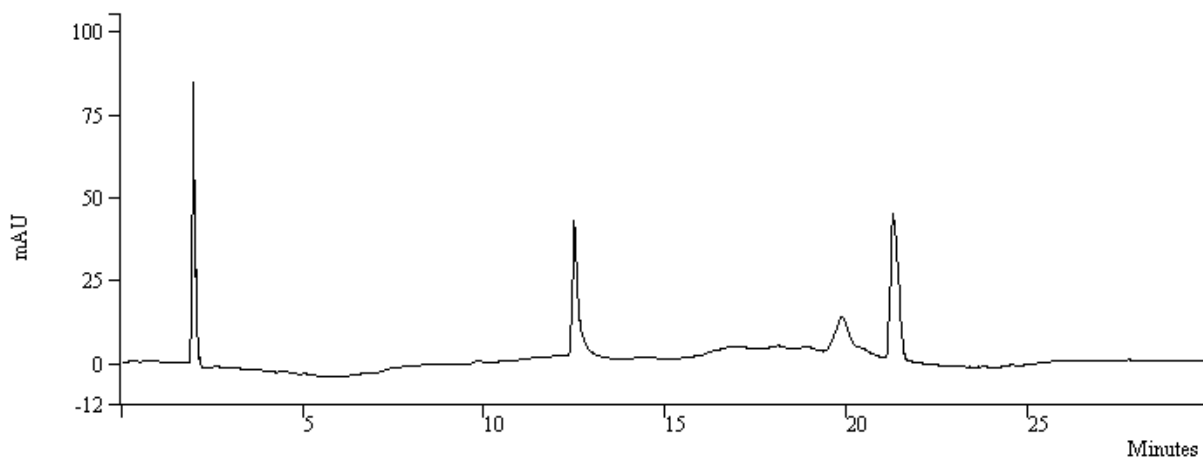
Slika 70. Kromatogram radne otopine klotianidina



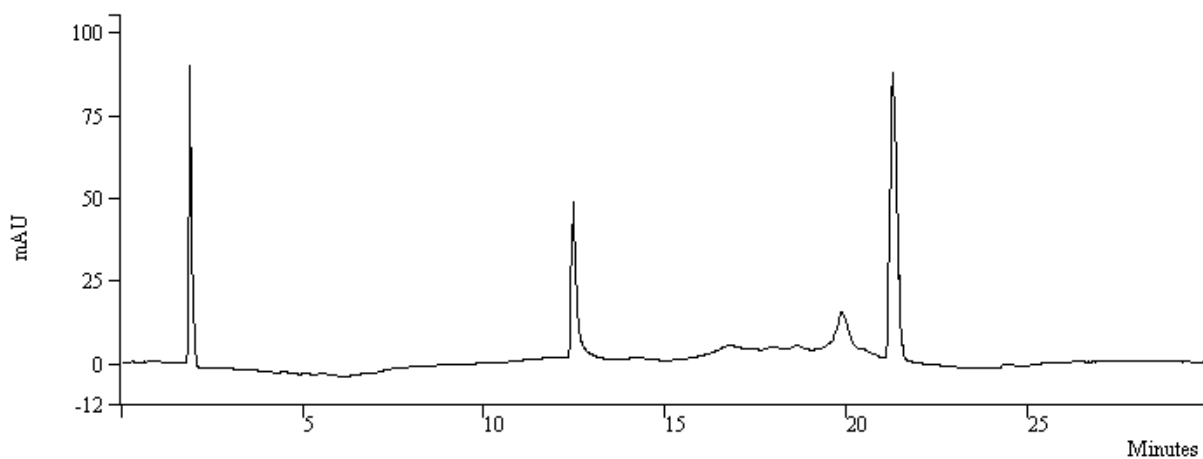
Slika 71. Kromatogram za uzorak klotianidina i aktivnog mulja za $t = 0$ h



Slika 72. Kromatogram za uzorak klotianidina i aktivnog mulja za $t = 48$ h



Slika 73. Kromatogram za uzorak klotianidina, aktivnog mulja i plastike za $t = 0$ h



Slika 74. Kromatogram za uzorak klotianidina, aktivnog mulja i plastike za $t = 48$ h

4.6.3. ODREĐIVANJE UKUPNE KOLIČINE UGLJIKA

U **Tablici 37** prikazani su rezultati mjerenja TC vrijednosti. Rezultati ove analize slažu se sa rezultatima dobivenim kromatografskom analizom jer se mogu primijetiti slične vrijednosti dobivene za reaktor sa i bez mikroplastike. Ovaj podatak ukazuje na to da mikroplastika ne utječe na biorazgradnju klotianidina.

Tablica 37. TC vrijednosti uzoraka

Uzorak	TC, mg/L
klotianidin	15,05
mulj	49,6
mulj + klotianidin	17,9
mulj + mikroplastika	14,35
mulj + klotianidin + mikroplastika	17,04

4.6.4. GUSTOĆA

U **Tablici 38** prikazane su vrijednosti gustoće za čisti mulj prije razgradnje, mulj i klotianidin te mulj, mikroplastiku i klotianidin nakon razgradnje.

Tablica 38. Gustoća čistog mulja prije razgradnje, mulja i klotianidina te mulja, mikroplastike i klotianidin nakon razgradnje

Uzorak	Gustoća, g/L
mulj	2
mulj + klotianidin	2,10
mulj + klotianidin + mikroplastika	2,12

Podaci iz tablice ukazuju na povećanje gustoće tijekom biorazgradnje. Iz toga se može zaključiti da dolazi do povećanja biomase unutar reaktora. Gustoća u reaktoru s mikroplastikom je najveća.

4.6.5. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

U **Tablici 39** prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka iz reaktora koji sadrže klotianidin nakon provedenog procesa biorazgradnje te čistog mulja prije biorazgradnje. Promatrajući navedene tablice možemo vidjeti kako ne dolazi do značajnih promjena u broju mikroorganizama, međutim njihov broj se ipak smanjuje. Kako nam kromatografska analiza nije dala podatke koji bi upućivali na uspješnu biorazgradnju klotianidina, može se pretpostaviti kako je pesticid toksičan za vrstu mikroorganizama prisutnih u mulju, pa stoga dolazi do smanjenja njihovog broja.

Tablica 39. CFU bakterija i gljiva za čisti mulj prije procesa biorazgradnje te za ispitivane uzorke nakon 48 sati

MULJ ($t = 0$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$3 \cdot 10^4$
-3	$1,55 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^3$
-4	$2,1 \cdot 10^4$	-
-5	$8 \cdot 10^3$	-
MULJ + KLOTIANIDIN ($t = 48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$2,1 \cdot 10^4$
-3	$3,9 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^3$
-4	$4 \cdot 10^3$	-
-5	0	-
MULJ + KLOTIANIDIN + MIKROPLASTIKA ($t=48$ h)		
razrjeđenje	CFU (bakterije)	CFU (gljive)
-2	-	$8,6 \cdot 10^4$
-3	$9 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^4$
-4	$4,4 \cdot 10^4$	-
-5	$5 \cdot 10^3$	-

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih eksperimenata razgradnje antiparazitika albendazola, febantela i mebendazola te pesticida iz skupine insekticida tiakloprida, acetamiprida i klotianidina aktivnim muljem mogu se donijeti sljedeći zaključci o učinkovitosti biorazgradnje pojedinog ksenobiotika.

Podaci kromatografske analize ukazuju na potpuno uklanjanje albendazola i to u reaktoru s mikroplastikom i onom bez nje. Mjerenjem ukupne količine ugljika potvrđuju se rezultati kromatografske analize jer se uočava višestruko smanjenje količine ugljika. Iz rezultata mikrobiološke analize vidljivo je kako albendazol nema značajan štetni utjecaj na mikroorganizme iz aktivnog mulja.

Kod febantela situacija je nešto drugačija. Rezultati kromatografske analize ukazuju na potpuno uklanjanje febantela u prisutnosti mikroplastike, dok je u reaktoru s febantelom i muljem uklanjanje 96,8 %. Rezultati TC analize potkrepljuju one dobivene kromatografskom analizom. Može se zaključiti kako je uzrok ovim rezultatima adsorpcija i desorpcija farmaceutika na površinu pahuljica aktivnog mulja te na površinu mikroplastike. Mikrobiološka analiza pokazuje povećanje broja mikroorganizama.

Mebendazol pokazuje veliku sklonost adsorpciji i desorpciji, što potvrđuju i rezultati kromatografske i TC analize. Vrijednost $\log K_{ow}$ za mebendazol iznosi 2,83 što također ukazuje na sklonost adsorpciji koja se vidi već pri samom dodavanju mebendazola u otopinu jer se u analiziranom uzorku ne detektira mebendazol niti u vremenu $t = 0$ h. Međutim, dolazi do pojave kromatografske krivulje karakteristične za mebendazol za uzorak uzorkovan u 24-om satu što ukazuje na to da farmaceutik nije razgrađen već da je došlo prvo do adsorpcije mebendazola koji se je potom nakon 24 sata desorbirao.

Pesticidi istraživani u ovom radu su iz skupine insekticida poznatiji kao neonikotinoidi. Prvi ispitivani pesticid bio je tiaklopid. Rezultati kromatografske analize pokazuju da niti u jednom trenutku ne dolazi do potpune razgradnje tiakloprida. Promatrajući krivulje može se zaključiti da je razgradnja nešto bolja u reaktoru s muljem i tiaklopidom, ali je stupanj razgradnje približno jednak. Također se u oba reaktora jasno vide nove kromatografske krivulje koje ukazuju na nastanak razgradnih i/ili transformacijskih produkata. Vrijednost $\log K_{ow}$ za tiaklopid je 1,26 što ukazuje na smanjenu mogućnost adsorpcije stoga se može zaključiti kako

se mikroorganizmi neko vrijeme privikavaju na pesticid nakon čega dolazi do uklanjanja tiakloprida.

Prema rezultatima kromatografske analize može se zaključiti da ne dolazi do potpunog uklanjanja acetamiprida niti u jednom reaktoru. Kako je vrijednost $\log K_{ow}$ za acetamiprid 0,80, mogućnost adsorpcije na aktivni mulj i mikroplastiku je mala. Učinkovitost uklanjanja nakon 5 sati bilježi rast, stoga se može pretpostaviti kako je mikroorganizmima potrebno određeno vrijeme prilagodbe na pesticid kako bi kasnije došlo do razgradnje.

Promatrajući rezultate dobivene kromatografskom analizom može se zaključiti da se klotianidin ne razgrađuje. Kako je vrijednost $\log K_{ow}$ jednaka 0,7, vjerojatnost adsorpcije je vrlo mala. Također ne nastaju nove kromatografske krivulje što ukazuje na to da nisu nastali novi spojevi. Iz mikrobiološke analize može se pretpostaviti toksičnost klotianidina za vrste mikroorganizama prisutnih u mulju.

6. LITERATURA

1. Vinayagam, V., Murugan, S., Kumaresan, R., Sustainable adsorbents for the removal of pharmaceuticals from wastewater: A review, *Chemosphere*, **300** (2022) 134597
2. Ghazal, H., Koumaki, E., Hoslett, J., Insights into current physical, chemical and hybrid technologies used for the treatment of wastewater contaminated with pharmaceuticals, *Journal of Cleaner Production*, **361** (2022) 132079
3. Sipma, J., Osuna, B., Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems, *Desalination*, **250** (2010) 653-659
4. Zhang, Z., Wang, Y., Chen, B., Xenobiotic pollution affects transcription of antibiotic resistance and virulence factors in aquatic microcosms, *Environmental Pollution*, **306** (2022) 1-3
5. Rađenović, J., Petrović, M., Barcelo, D., Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, *Analytical and bioanalytical chemistry*, **387** (2007) 1365-1377
6. Knapp, J. S., Bromley-Challoner, K. C. A., Recalcitrant organic compounds, *Handbook of water and wastewater microbiology*, (2003) 559-595
7. Antiparazitici na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31334971/> (Pristupljeno 24. srpnja 2022.)
8. Belew, S., Sultan, S., Wynendaele, E., Environmental risk assessment of the anthelmintic albendazole in Eastern Africa, based on a systematic review, *Environmental pollution*, **269** (2021) 1-55
9. Albendazol na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Albendazole> (Pristupljeno 1. siječnja 2023.)
10. Divya, K., Narayana, B., A novel spectrophotometric approach for the determination of febantel in pure and dosage forms, *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, **19** (2016) 23-28
11. Febantel na: <https://www.medchemexpress.com/Febantel.html> (Pristupljeno 1. siječnja 2023.)
12. Mebendazol na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole> (Pristupljeno 1. siječnja 2023.)
13. Mebendazol na: <https://www.wikidata.org/wiki/Q422194> (Pristupljeno 1. siječnja 2023.)
14. Zhang, A., Prakash Sutar, P., Bian, Q., Pesticide residue elimination for fruits and vegetables: the mechanisms, applications, and future trends of thermal and non-thermal technologies, **2** (2022) 223-240

15. Insekticidi na: [Insecticide | Description, Modes of Action, Types, & Environmental Impacts | Britannica](#) (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
16. Acetamidrid na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamidrid#section=Uses> (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
17. Wallace, D. R., Acetamidrid, Encyclopedia of Toxicology (Second Edition), (2015) 23-25
18. Clothianidin, Evaluation of active substances, Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Njemačka (2014) 5-10
19. Klotianidin na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/33589> (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
20. Klotianidin na: [Clothianidin – toxicity, side effects, diseases and environmental impacts \(naturalpedia.com\)](#) (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
21. Tiaklopid na: [Thiaclopid — toxicity, side effects, diseases and environmental impacts \(naturalpedia.com\)](#) (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
22. Tiaklopid na: [Thiaclopid | C10H9ClN4S | 673982 | 111988-49-9 \(hpc-standards.com\)](#) (Pristupljeno 3. siječnja 2023.)
23. Manoli, K., Naziri, A., Ttöfi, I., Investigation of the effect of microplastics on the UV inactivation of antibiotic-resistant bacteria in water, Water Research, **222** (2022) 1-3
24. Obaideen, K., Shehata, N., The role of wastewater treatment in achieving sustainable development goals (SDGs) and sustainability guideline, Energy Nexus, **7** (2022) 1-13
25. Woodard, Curran, Methods for treating wastewaters from industry, Industrial Waste Treatment Handbook, Second Edition, Sjedinjene Američke Države (2004) 149-334
26. Nyirenda, J., Mwanza, A., Lengwe, C., Assessing the biodegradability of common pharmaceutical products (PPs) on the Zambian market, Heliyon, **6** (2020) 1-10
27. Gauthier, H., Biodegradation of pharmaceuticals by microorganisms, Department of Chemical Engineering, McGill University, Montreal, (2008) 15-16
28. Porto, A. L. M., Melgar, G. Z., Kasemodel, M. C., Biodegradation of Pesticides, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Brazil, (2011) 421-429
29. Pročišćavanje otpadnih voda s aktivnim muljem na: [How Does Activated Sludge Wastewater Treatment Work? | AOS \(aosts.com\)](#) (pristupljeno 24. kolovoza 2022.)
30. Min, X., Li, W., Wei, Z., Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study, [Chemical Engineering Journal](#), **342** (2018) 211-219

31. Wei, Z., Seo, Y., Zhao, D., Electrophilicity index as a critical indicator for the biodegradation of the pharmaceuticals in aerobic activated sludge processes, [Water Research](#), **160** (2019) 10-17
32. Papagiannaki, D., H.Belay, M., From monitoring to treatment, how to improve water quality: The pharmaceuticals case, [Chemical Engineering Journal Advances](#), **10** (2022) 1-17
33. Vasilescu, M. N., Medvedovici, A. V., Pesticides, Encyclopedia of Analytical Science (second edition), (2005) 55-71
34. Masena spektrometrija na: [What is Mass Spectrometry? | Broad Institute](#) (Pristupljeno 2. kolovoza 2022.)
35. Maseni spektrometar na: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/massspec/masspec1.htm> (Pristupljeno 21. kolovoza 2022.)
36. Mikroskopija na: <https://www.ed.ac.uk/clinical-sciences/edinburgh-imaging/for-patients-study-participants/tell-me-more-about-my-scan/what-is-microscopy> (Pristupljeno 21. kolovoza 2022.)
37. Eksikator na: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=eksikator> (Pristupljeno 28. srpnja 2022.)
38. Assmann, C., Scott, A., Biller, D., Online Total Organic Carbon (TOC) monitoring for water and wastewater treatment plants processes and operations optimization, *Drinking Water Engineering and Science*, **10** (2017) 61-68