

# Utjecaj natrijevog hipoklorita na prisutnost ksenobiotika u modelnim i realnim otpadnim vodama

---

Stanić, Doris

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:514065>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-17**



Repository / Repozitorij:

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



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

Doris Stanić

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

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

Kandidatkinja **Doris Stanić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 22. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Davor Dolar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

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

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Doris Stanić

**UTJECAJ NATRIJEVOG HIPOKLORITA NA PRISUTNOST KSENOBIOTIKA U  
MODELNIM I REALNIM OTPADNIM VODAMA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
2. doc. dr. sc. Dragana Vuk
3. doc. dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2023.

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

## **Zahvala**

*Za početak, želim se zahvaliti dragoj mentorici prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na stručnom vodstvu, prilici za suradnju, savjetima, pomoći i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se dragoj asistentici Bruni Babić Visković, mag. ing. ecoing. ponajprije na prijateljskom pristupu i ugodnoj radnoj atmosferi, na dostupnosti, savjetima, razumijevanju i svom znanju koje je samnom podijelila.*

*Nikad dovoljna zahvala mojim najmilijima, mom dragom suprugu Mateju, mojim divnim roditeljima, tati Milanu i mami Marijani, dragoj braći Ivanu Zvonimiru i Domagoju, baki Barbari i ostaloj obitelji koji su mi bili velika podrška i oslonac tijekom čitavog mog školovanja. Hvala im na bezuvjetnoj ljubavi, konstantnom podupiranju, strpljenju, razumijevanju i pomoći koju mi uvijek pružaju. Bez njih ovo ne bi bilo moguće!*

*Zahvaljujem se prijateljima i kolegama na faksu koji su bili uz mene tijekom svih ovih godina studija, posebice Luciji i prijateljima s Knežije koji su moj studentski život učinili lakšim i zanimljivijim.*

*Na kraju, najveća hvala dragom Bogu na svemu ranije navedenom. Hvala Mu što me svojom mudrošću i providnošću vodio i koji je učinio da sve ima smisla!*

## SAŽETAK

### UTJECAJ NATRIJEVOG HIPOKLORITA NA PRISUTNOST KSENOBIOTIKA U MODELNIM I REALNIM OTPADNIM VODAMA

Povećana upotreba antiparazitika u veterinarske i druge medicinske svrhe, te široka primjena pesticida u poljoprivredi, dovode do kontinuiranog i nekontroliranog ispuštanja ksenobiotika u okoliš. Iako se oni i njihovi razgradni i transformacijski produkti u okolišu nalaze u tragovima, mogu uzrokovati dugoročno visoku koncentraciju tih onečišćivala i tako štetno djelovati na okoliš. Prije ili kasnije ti spojevi ispiranjem ili otjecanjem voda dospijevaju u vodeni okoliš i otpadne vode. Brojna istraživanja pokazuju da je uklanjanje mnogih ksenobiotika u konvencionalnim uređajima za obradu otpadnih voda često nepotpuno te stoga dolazi do onečišćenja prirodnih vodotoka. Poznato je da sredstva za dezinfekciju također uklanjaju i organska onečišćenja stoga je cilj ovoga rada procijeniti utjecaj prisutnosti natrijevog hipoklorita kao dezinfekcijskog sredstva na uklanjanja ksenobiotika u otpadnim vodama nakon postupka šaržne biorazgradnje kao konvencionalne i često primjenjivane metode.

Provodio se proces biorazgradnje u tri aerirana šaržna reaktora različitih sadržaja. Prvi reaktor je sadržavao aktivni mulj i radnu otopinu ksenobiotika masene koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Kao kontrolni reaktori, drugi reaktor je sadržavao samo aktivni mulj, dok je treći reaktor sadržavao samo radnu otopinu ispitivanog ksenobiotika iste koncentracije. Uz ispitivanje fizikalno-kemijskih parametara biorazgradnje, praćena je koncentracija u vremenskim razmacima uzorkovanja. Nakon procesa biorazgradnje, otopine ksenobiotika podvrgnute su procesu fotolize kao obliku tercijarne obrade otpadnih voda. Fotoliza se provodila u četiri kvarcne posudice s različitim sadržajem. Tijekom procesa fotolize ispitivan je utjecaj prisutnosti natrijevog hipoklorita na uklanjanje ksenobiotika uz usporedno provođenje uklanjanja ksenobiotika s vodikovim peroksidom kao vrlo učinkovitom metodom. Rezultati su pokazali različit postotak uklanjanja šest ispitivanih ksenobiotika. Novonastali razgradni i/ili transformacijski produkti detektirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Također, procijenjena je toksičnost istraživanih otopina ksenobiotika pomoću bioluminiscentne metode određivanja akutne toksičnosti bakterijom *Vibrio fischeri*.

**Ključne riječi:** *ksenobiotici, antiparazitici, pesticidi, natrijev hipoklorit, aktivni mulj, biorazgradnja, toksičnost, Vibrio fischeri*

## ABSTRACT

### THE INFLUENCE OF SODIUM HYPOCHLORITE ON THE PRESENCE OF XENOBIOTICS IN MODEL AND REAL WASTEWATER

The increased use of antiparasitics for veterinary and other medical purposes, and the widespread use of pesticides in agriculture, lead to the continuous and uncontrolled release of xenobiotics into the environment. Although they and their degradation and transformation products are found in traces in the environment, they can cause a long-term high concentration of these pollutants and thus have a harmful effect on the environment. Sooner or later, these compounds end up in the water environment and waste water through washing or runoff. Numerous studies show that the removal of many xenobiotics in conventional waste water treatment devices is often incomplete and therefore pollution of natural waterways occurs. It is known that disinfectants also remove organic pollutants, therefore the aim of this work is to evaluate the influence of the presence of sodium hypochlorite as a disinfectant on the removal of xenobiotics in wastewater after batch biodegradation as a conventional and often applied method.

The biodegradation process was carried out in three aerated batch reactors with different contents. The first reactor contained activated sludge and a working solution of xenobiotics with a mass concentration of 10 mg L<sup>-1</sup>. As control reactors, the second reactor contained only activated sludge, while the third reactor contained only the working solution of the tested xenobiotic of the same concentration. In addition to testing the physico-chemical parameters of biodegradation, the concentration was monitored at sampling intervals. After the biodegradation process, the xenobiotic solutions are subjected to the photolysis process as a form of tertiary wastewater treatment. Photolysis was carried out in four quartz vessels with different contents. During the photolysis process, the influence of the presence of sodium hypochlorite on the removal of xenobiotics was examined, with a comparative performance of xenobiotic removal with hydrogen peroxide as a very effective method. The results showed a different percentage of removal of the six tested xenobiotics. Newly formed degradation and/or transformation products were detected by high performance liquid chromatography. Also, the toxicity of the investigated solutions of xenobiotics was evaluated using the bioluminescent method of determining acute toxicity by the bacterium *Vibrio fischeri*.

**Key words:** *xenobiotics, antiparasitics, pesticides, sodium hypochlorite, activated sludge, biodegradation, toxicity, Vibrio fischeri*



## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KSENOBIOTICI.....	2
2.1.1. Ksenobiotici u otpadnim vodama.....	3
2.2. PESTICIDI.....	3
2.2.1. Acetamiprid .....	5
2.2.2. Klotianidin .....	6
2.2.3. Tiakloprid .....	7
2.2.4. Pesticidi u okolišu .....	8
2.3. ANTIPARAZITICI.....	8
2.3.1. Albendazol .....	10
2.3.2. Febantel .....	11
2.3.3. Mebendazol.....	12
2.3.4. Antiparazitici u okolišu .....	14
2.4. OTPADNE VODE.....	15
2.5. METODE OBRADNE OTPADNIH VODA.....	16
2.5.1. Konvencionalne metode obrade otpadnih voda .....	17
2.5.2. Napredne metode obrade otpadnih voda .....	22
2.6. PRAĆENJE KSENOBIOTIKA U OKOLIŠU.....	23
2.6.1. Kromatografija (analitička metoda) .....	23
2.6.2. Toksičnost (biološka metoda).....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	28
3.1. MATERIJALI .....	28
3.1.1. Aktivni mulj.....	28
3.1.2. Korištene kemikalije.....	28
3.1.3. Ispitivani ksenobiotici .....	29
3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR.....	29
3.2.1. Analitička vaga .....	29
3.2.2. pH-metar .....	30
3.2.3. Elektroda za mjerenje koncentracije kisika .....	30
3.2.4. Pribor za filtriranje .....	31
3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti .....	31
3.2.6. Instrumenti za kemijsku potrošnju kisika – KPK .....	33

3.2.7.	Instrumenti za biokemijsku potrošnju kisika – BPK.....	34
3.2.8.	Instrument Suntest CPS+.....	35
3.2.9.	Instrument LUMIStox 300 s inkubacijskim blokom LUMIStherm.....	36
3.2.10.	Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju .....	37
3.2.11.	Uparivač (rotavapor) .....	38
3.2.12.	Sušionik .....	39
3.2.13.	Mufolna peć .....	40
3.3.	METODA RADA .....	40
3.3.1.	Priprema otopina .....	40
3.3.2.	Priprema aktivnog mulja .....	41
3.3.3.	Proces šaržne biorazgradnje - aeriranje otopina u 3 reaktora .....	41
3.3.4.	Uzorkovanje tijekom procesa šaržne biorazgradnje.....	42
3.3.5.	Mikrovalna ekstrakcija .....	43
3.3.6.	Fotoliza otopina ksenobiotika .....	45
3.3.7.	Suspendirane čestice u biorektoru (MLSS) .....	46
3.3.8.	Određivanje organske i anorganske tvari .....	48
3.3.9.	Određivanje kemijske potrošnje kisika – KPK.....	48
3.3.10.	Određivanje biokemijske potrošnje kisika – BPK .....	50
3.3.11.	Određivanje toksičnosti .....	51
3.4.	ODREĐIVANJE UČINKOVITOSTI RAZGRADNJE .....	55
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	59
4.1.	REZULTATI ŠARŽNE BIORAZGRADNJE .....	59
4.1.1.	Razgradnja acetamiprida .....	59
4.1.2.	Razgradnja klotianidina .....	68
4.1.3.	Razgradnja tiakloprida.....	77
4.1.4.	Razgradnja albendazola .....	86
4.1.5.	Razgradnja febantela .....	95
4.1.6.	Razgradnja mebendazola .....	103
4.2.	REZULTATI FOTOLIZE .....	113
4.2.1.	Fotoliza otopina acetamiprida.....	113
4.2.2.	Fotoliza otopina klotianidina .....	122
4.2.3.	Fotoliza otopina tiakloprida .....	129
4.2.4.	Fotoliza otopina albendazola .....	135
4.2.5.	Fotoliza otopina febantela.....	135
4.2.6.	Fotoliza otopina mebendazola .....	141

5. ZAKLJUČAK .....	148
6. LITERATURA .....	150
7. DODACI .....	154
7.1. Popis slika.....	154
7.2. Popis tablica .....	158
7.3. Životopis.....	160

## 1. UVOD

Ozbiljan problem današnjice je sve veća zagađenost vodenog okoliša. Pojava ksenobiotika te njihovih razgradnih i transformacijskih produkata u okolišu je izrazito zabrinjavajuća. Ksenobiotici se sve više koriste u humanoj i veterinarskoj medicini, u poljoprivredi te je zbog toga postalo nezaobilazno njihovo kontinuirano ispuštanje u okoliš, a time i dolazak u vodeni okoliš i otpadne vode. Iako se ti spojevi pojavljuju u vrlo niskim koncentracijama koje su u rasponu od nekoliko  $\text{ng L}^{-1}$  do  $\mu\text{g L}^{-1}$ , istraživanja pokazuju da i tako male količine predstavljaju rizik za okoliš i štetno djeluju na biljni i životinjski svijet, ali i na ljude. [1]

Kada se govori o negativnim utjecajima ksenobiotika, treba napomenuti da je dokazano da neki lijekovi izazivaju endokrine poremećaje, narušavaju normalno funkcioniranje hormonskog sustava. Mnoge sintetske kemikalije mogu djelovati kao endokrini disruptori, a posebice pesticidi. [2]

Kontinuirano izlaganje patogena, parazita i okolišnih bakterija ksenobioticima može dovesti do pojave rezistencije organizama na navedene spojeve. Dok rezistencija na lijekove, poput antiparazitika, predstavlja prirodnu prilagodbu parazita na okolišne uvijete u kojima borave, ona postaje veliki problem kada se organizmi počnu razmnožavati u prisustvu ksenobiotika, tj. kada organizmi postanu otporni na tvari koje bi ih trebale uništavati. [3]

Kako dolazi do sve veće upotrebe ksenobiotika tako dolazi i do njihovog nepravilnog odlaganja. Od presudne važnosti su procesi pročišćavanja otpadnih voda. Proces sorpcije i biorazgradnja smatraju se najvažnijim mehanizmima uklanjanja mikroonečišćujućih tvari. Učinkovitost tih procesa ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima onečišćujuće tvari, podrijetlu i sastavu otpadne vode i karakteristikama uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Prema tome, najučinkovitije uklanjanje ksenobiotika uključuje poticanje i poboljšanje procesa njihove biorazgradnje i korištenje naprednih oksidacijskih procesa. Također, potrebno je obratiti veću pažnju na detekciju i ukoliko je moguće identifikaciju razgradnih i/ili transformacijskih produkata ksenobiotika. Uz to, potrebno je provoditi i bioanalitičke metode određivanja toksikološkog utjecaja tih spojeva na okoliš. Time će se povećati trenutno slabo poznavanje podataka o akutnoj toksičnosti svih tih spojeva u okolišu. Mjerenje akutne toksičnosti najčešće se provodi bakterijom *Vibrio fischeri*.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KSENOBIOTICI

Ksenobiotici su kemijski spojevi koji se prirodno ne pojavljuju u živom svijetu. Naziv potječe od grčkih riječi "*xenos*" što znači stranac i "*bios*" što znači život. Ksenobiotici se često koriste kao opći termin za opisivanje različitih vrsta stranih spojeva, uključujući kemikalije, lijekove, industrijske tvari, pesticide, teške metale, organske onečišćujuće tvari i druge slične spojeve. [4]

Primjena ksenobiotika odnosi se na njihovu namjensku upotrebu u različitim područjima, kao što su medicina, poljoprivreda, industrija i istraživanje. Ksenobiotici imaju raznolike primjene zbog svojih kemijskih svojstava i biološke aktivnosti. Primjeri njihove primjene su:

#### 1. Medicina:

Farmaceutski proizvodi, uključujući lijekove i terapijske tvari česti su predstavnici ksenobiotika. Oni mogu imati terapijski učinak na tijelo, antibiotici za liječenje infekcija, antidepresivi za mentalno zdravlje ili kemoterapeutske agensi za borbu protiv kancerogenih bolesti. Lijekovi se dizajniraju kako bi ciljali specifične biološke procese u tijelu i pružali terapijske učinke.

#### 2. Poljoprivreda:

Ksenobiotici se koriste u poljoprivrednoj industriji za kontrolu štetnika, korova i bolesti biljaka. Pesticidi su jedan od primjera ksenobiotika koji se koriste kako bi se povećala produktivnost usjeva i smanjio utjecaj od štetnika. Međutim, važno je pravilno primjenjivati pesticide kako bi se minimizirali negativni učinci na okoliš i ljudsko zdravlje.

#### 3. Industrija:

Ksenobiotici se u industriji koriste u različite svrhe. Kemijski spojevi mogu se koristiti kao otapala, sredstva za čišćenje ili aditivi u proizvodnji. Neki ksenobiotici imaju posebna svojstva, kao što su termička stabilnost ili otpornost na oksidaciju, što ih čini korisnima u različitim industrijskim procesima.

#### 4. Istraživanje:

Ksenobiotici se koriste u istraživačkim studijama kako bi se razumjeli biokemijski i fiziološki procesi u živim organizmima. Oni se mogu koristiti kao alati za označavanje ili praćenje određenih bioloških procesa. Ksenobiotici se također mogu koristiti u

laboratorijskim istraživanjima kako bi se proučavale interakcije s biološkim sustavima i identificirali potencijalni terapijski ciljevi.

Važno je naglasiti da pravilna primjena ksenobiotika zahtijeva pažljivo upravljanje kako bi se minimizirali negativni učinci na okoliš i zdravlje ljudi. Također, važno je pratiti i istraživati njihovu sudbinu u okolišu kako bi se razumjelo kako se razgrađuju i akumuliraju te kako bi se osigurala održiva primjena ovih spojeva. [1]

### **2.1.1. Ksenobiotici u otpadnim vodama**

Ksenobiotici su strani kemijski spojevi koji se prirodno ne pojavljuju u okolišu. Često uključuju različite kemikalije koje nisu prirodno prisutne u okolišu i mogu imati potencijalno štetne učinke na živi svijet. U otpadnim vodama završavaju na nekoliko načina, ovisno o izvoru ksenobiotika i njihovoj primjeni. Industrijske aktivnosti mogu rezultirati otpadnim vodama koje sadrže različite ksenobiotike. Ksenobiotici iz industrijskog otpada mogu proći kroz procese obrade otpadnih voda, ali neki od njih mogu ostati prisutni u koncentracijama koje mogu biti štetne za okoliš. Nadalje, ksenobiotici iz kućanstva i komercijalnih objekata mogu završiti u otpadnim vodama putem ispiranja i odvoda. To uključuje razne tvari kao što su kemikalije iz kućanstava, sredstva za čišćenje, kozmetički proizvodi, lijekovi i drugi proizvodi koji se koriste u svakodnevnom životu. Zatim pesticidi i gnojiva, koji se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji, mogu završiti u otpadnim vodama. Kada se koriste na poljoprivrednim površinama, dolazi do ispiranja ovih spojeva kišnicom ili navodnjavanjem te mogu dospjeti u obližnje vodne tokove i otpadne vode. Veterinarski lijekovi i antiparazitici koji se koriste u veterinarskoj medicini mogu završiti u otpadnim vodama iz veterinarskih objekata i farmi. Otpadne vode iz ovih izvora mogu sadržavati ksenobiotike koji su se koristili u liječenju životinja. [1]

## **2.2. PESTICIDI**

Pesticidi su tvari namijenjene uništavanju organizama štetnih u poljoprivredi. Prema namjeni, pesticide dijelimo na:

- Akaricide – sredstva za suzbijanje štetnih grinja,
- Algicide – sredstva za suzbijanje algi,

- Avicide – sredstva za suzbijanje ptica,
- Baktericide – sredstva za suzbijanje bakterija,
- Fungicide – sredstva za suzbijanje gljiva,
- Herbicide – sredstva za suzbijanje korova,
- Insekticide – sredstva za suzbijanje štetnih insekata,
- Limacide – sredstva za suzbijanje puževa,
- Nematocide – sredstva za suzbijanje štetnih nematoda,
- Okvašivače – sredstva za poboljšanje kvašljivosti i ljepljivosti,
- Ovicidi – sredstva za suzbijanje jajašaca insekata i grinja,
- Rodenticide – sredstva za suzbijanje štetnih glodara,
- Repelente – sredstva za odbijanje divljači,
- Regulatori rasta – sredstva za regulaciju rasta biljaka.

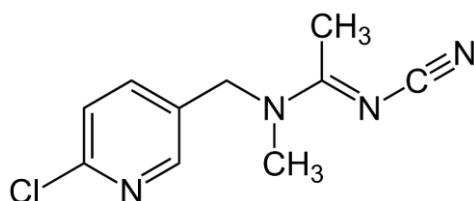
Korištenje pesticida ima svoje negativne posljedice na ekosustav. Zagađenje okoliša, onečišćenje vode i hrane su prvenstveni problemi. Budući da se pesticidi izabiru na temelju svoje sposobnosti ubijanja živih bića, ne čudi što mogu naštetiti i ljudima i živome svijetu. Zbog toga su doneseni strogi propisi i razvijene vrlo osjetljive analitičke metode. *Direktivom 98/83* Europske komisije propisuje se koncentracija pojedinih pesticida na  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , a ukupna koncentracija svih pesticida u uzorcima vode na  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Smanjena i odgovorna upotreba pesticida temelji su održive poljoprivrede i ideje održivog razvoja.

U ovom radu su ispitivani pesticidi acetamiprid, klotianidin i tiaklopid. Svi oni pripadaju skupini neonikotinoida, najraširenijih insekticida. Neonikotinoidni insekticidi su slični nikotinu i po strukturi, i po djelovanju jer djeluju na središnji živčani sustav insekata. Uzrokuju blokadu živčanih sustava što vodi do nagomilavanja acetilkolina, važnog neuroprijenosnika, te rezultira paralizom insekata i vrlo često smrću. Provedena su različita istraživanja o štetnosti ove skupine pesticida na ostale životinje. Neonikotinoidi su dokazani uzrok masovnog pomora pčela, ali mogu naštetiti i malim pticama, leptirima i vodenim

beskralješnjacima. Vrlo su toksični, čak i u minimalnim koncentracijama, zbog toga je njihova upotreba u Hrvatskoj zabranjena. [5]

### 2.2.1. Acetamiprid

Acetamiprid ( $C_{10}H_{11}ClN_4$ ) je bez mirisa i u obliku bijelog praha. Kemijska struktura acetamiprida prikazana je na **Slici 1**, a osnovna fizikalno-kemijska svojstva u **Tablici 1**. U **Tablici 2** prikazane su BIOWIN vrijednosti acetamiprida koje opisuju njegovu biorazgradivost.



**Slika 1.** Kemijska struktura acetamiprida [6]

**Tablica 1.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva acetamiprida [7]

<b>IUPAC ime</b>	<i>N</i> -[(6-chloropyridin-3-yl)methyl]- <i>N'</i> -cyano- <i>N</i> -methylethanamide
<b>CAS broj</b>	135410-20-7
<b>Kemijska formula</b>	$C_{10}H_{11}ClN_4$
<b>Molekulska masa</b>	222,67 g mol <sup>-1</sup>
<b>log<math>K_{ow}</math></b>	0,8 pri 25 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	4250 mg L <sup>-1</sup> pri 25 °C
<b><math>t_t</math></b>	98,9 °C
<b>p<i>K</i><sub>a</sub></b>	0,7

**Tablica 2.** BIOWIN vrijednosti acetamiprida [8]

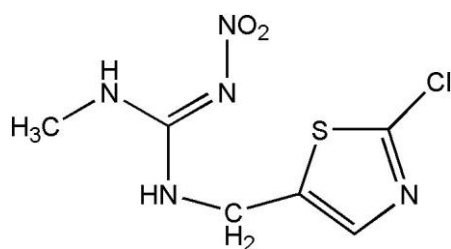
<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,2863	vremenski okvir biorazgradnje: tjedni - mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	-0,0079	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	0,6221	brzo dolazi do biorazgradnje



Koristi se za suzbijanje insekata koji sišu listove na usjevima kao što su lisnato povrće, agrumi, sjemenke, grožđe, pamuk i ukrasno bilje. Također, ključni je pesticid u komercijalnom uzgoju trešnje zbog svoje učinkovitosti protiv ličinki trešnjine voćne muhe.

### 2.2.2. Klotianidin

Klotianidin ( $C_6N_5H_8SO_2Cl$ ) je u obliku bezbojnih kristala. **Slika 2** prikazuje kemijsku strukturu klotianidina, a u **Tablici 3** su prikazana njegova osnovna fizikalno-kemijska svojstva. **Tablica 4** prikazuje BIOWIN vrijednosti klotianidina.



**Slika 2.** Kemijska struktura klotianidina [9]

**Tablica 3.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva klotianidina [10]

<b>IUPAC ime</b>	1-[(2-chloro-1,3-thiazol-5-yl)methyl]-3-methyl-2-nitroguanidine
<b>CAS broj</b>	210880-92-5
<b>Kemijska formula</b>	$C_6N_5H_8SO_2Cl$
<b>Molekulska masa</b>	$249,68 \text{ g mol}^{-1}$
<b>log<math>K_{ow}</math></b>	0,70 pri 25 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	$327 \text{ mg L}^{-1}$ pri 20 °C
<b><math>t_t</math></b>	176,8 °C
<b>p<math>K_a</math></b>	7,472

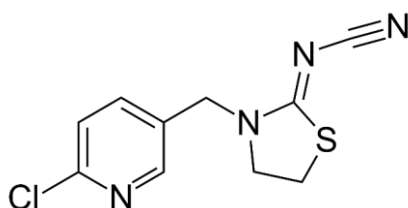
**Tablica 4.** BIOWIN vrijednosti klotianidina [8]

<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,4408	vremenski okvir biorazgradnje: tjedni - mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	-0,0715	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	0,2515	ne dolazi brzo do biorazgradnje

Klotianidin se koristi kao alternativa za organofosfate, karbamate i piretroidne pesticide koji su daleko toksičniji. Neonikotinoidna prašina koja nastaje prilikom primjene može se zadržati u okolišu i do nekoliko godina te toksično djelovati na biljke i životinje, poput pčela. U raznim istraživanjima analizom peludi ili nektara pčela pronađene su znatne količine klotianidina.

### 2.2.3. Tiakloprid

Tiakloprid (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub>S) je žućkasta kristalična tvar. Kemijska struktura tiakloprida prikazana je na **Slici 3**, a njegova osnovna fizikalno-kemijska svojstva u **Tablici 5**. BIOWIN vrijednosti tiakloprida prikazane su u **Tablici 6**.



**Slika 3.** Kemijska struktura tiakloprida [11]

**Tablica 5.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva tiakloprida [12]

<b>IUPAC ime</b>	[3-[(6-chloropyridin-3-yl)methyl]-1,3-thiazolidin-2-ylidene]cyanamide
<b>CAS broj</b>	111988-49-9
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S
<b>Molekulska masa</b>	252,72 g mol <sup>-1</sup>
<b>logK<sub>ow</sub></b>	1,26 pri 20 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	185 mg L <sup>-1</sup> pri 20 °C
<b>t<sub>i</sub></b>	136 °C
<b>pK<sub>a</sub></b>	-

**Tablica 6.** BIOWIN vrijednosti tiakloprida [8]

<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,2199	vremenski okvir biorazgradnje: mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	-0,0586	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	0,5412	brzo dolazi do biorazgradnje

Tiakloprid ometa prijenos podražaja u živčanom sustavu te je visoko učinkovit i na niskim i visokim temperaturama. Vrlo brzo ulazi u tkivo biljke, a djeluje na insekte čim dođu u kontakt s tretiranom biljkom. Učinkovitiji je od organofosfatnih i karbamatnih insekticida.

#### **2.2.4. Pesticidi u okolišu**

Pesticidi mogu završiti u rijekama i potocima na nekoliko načina: ispiranjem, prskanjem i otjecanjem. Studije smatraju otjecanje najvažnijim čimbenikom u pogledu onečišćenja površinskih voda u sušnim područjima. Kontaminirana voda pesticidima može imati štetne učinke na vodene biljke i organizme. Pesticidi mogu smanjiti koncentraciju kisika u vodi i uzrokovati fiziološke promjene u populaciji riba. Herbicidi koji se koriste za ubijanje vodenih biljaka mogu rezultirati drastično niskim razinama kisika, što dovodi do pomora riba. Osim riba, i ostali vodeni organizmi su izloženi pesticidima putem dermalne apsorpcije, disanja i oralnog unosa. [13, 14]

Pesticidi također mogu zagađivati zrak. Raspršivanje kapljica pesticida može rezultirati njihovim prijenosom u atmosferu putem vjetra. Hlapljive kemikalije mogu ispariti ovisno o tlaku pare, temperaturi i relativnoj vlažnosti zraka. Oborine mogu smanjiti isparavanje pesticida, ali i povećati njihovo ispiranje, što doprinosi njihovom širenju u okolišu.

Izrazito negativan utjecaj mogu imati na pčele i druge oprašivače insekata. Neonikotinoide, mogu biti otrovni za pčele i smanjiti njihov kapacitet za učenje i navigaciju u potrazi za hranom, a u povećanim količinama dovode do velike smrtnosti oprašivača. Sve veća upotreba pesticida, zajedno s drugim faktorima, može smanjiti broj oprašivača insekata. [15, 16]

Pesticidi mogu također imati posredni utjecaj na druge organizme u ekosustavu. Fungicidi mogu smanjiti populaciju ptica i sisavaca jer mogu utjecati na prehrambeni lanac kroz gliste koje su njihov izvor hrane. Herbicidi mogu inhibirati rast i aktivnost bakterija u tlu, što može utjecati na transformaciju dušika i plodnost tla. [14]

### **2.3. ANTIPARAZITICI**

Antiparazitici ili veterinarski farmaceutici su klasa kemikalija ili lijekova koji se koriste za liječenje infekcija uzrokovanih različitim vrstama parazita, kao što su crijevni, kožni ili sistemski paraziti. Antiparazitici se mogu podijeliti u nekoliko vrsta ovisno o organizmima koje ciljaju i načinu djelovanja. Antimikrobni lijekovi uništavaju mikroorganizme (bakterije,

viruse, gljivice, parazite itd.) ili usporavaju njihov rast, dok antibiotici spadaju u antimikrobne lijekove koji uništavaju ili usporavaju rast bakterija. Iako se antibiotici koriste i u liječenju bolesnih životinja, često se neopravdano koriste kao prevencija bolesti ili kao promotori rasta životinja. Antimikrobni lijekovi su među najčešće korištenim lijekovima, uglavnom zbog rastuće stočarske i poljoprivredne proizvodnje, što povećava rizik od zaraznih bolesti. Uvođenjem penicilina 1943. godine i drugih antibiotika, osigurani su lijekovi za mnoge infekcije kod ljudi i životinja, smanjujući smrtnost i gubitke u produktivnosti. [17]

Zbog prekomjerne uporabe kemoterapeutika kod životinja i subterapijskih dodataka u prehrani dolazi do pojave rezistentnosti organizama. Dugo izlaganje mikroorganizama subletalnim dozama antimikrobnih lijekova može rezultirati spontanom razvojem gena rezistencije i njegovim naknadnim prijenosom među životinjama, okolišem i životinjskim proizvodima u prehrambenom lancu, te prijenosom otpornosti na ljude. Dok je rezistentnost prirodan proces prilagodbe mikroorganizama na okolišne uvjete, pogrešna uporaba antibiotika značajno ubrzava taj proces. Posljedice rezistentnosti imaju širok utjecaj na društvene sektore i mogu biti izuzetno teške, od posljedica po pacijenta do utjecaja na globalnu ekonomiju.

Zbog iznimno velikog utjecaja na zdravlje ljudi, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2015. godine usvojila "*Global Action Plan*" (GAP) za praćenje rezistentnosti organizama. Ovaj plan ističe važnost "one health" pristupa koji uključuje suradnju različitih sektora, od humane i veterinarske medicine do poljoprivrede, financija, okoliša i informirane javnosti. S obzirom na sve veću pojavu zaraznih bolesti u zemljama u razvoju i intenzivnu uporabu antimikrobnih lijekova od 2010. do 2030. godine, očekuje se globalno povećanje primjene antibiotika za 67%, pri čemu će se trećina tih antibiotika koristiti u životinjskoj hrani. Slična se tendencija primjećuje i kod šire uporabe antimikrobnih lijekova, uključujući antihelmintike. [18]

Antihelmintici se koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih crijevnim crvima (helmitima) kao što su trakavice, gliste i kukaši. Primjeri antihelmintika uključuju albendazol, mebendazol, ivermektin, prazikvantel i piperazin. Neadekvatno upravljanje i odlaganje otpadnih voda, mulja i fekalnog otpada zagađuje usjeve, vodu i hranu koja, kada se konzumira, služe kao prijenosnici bolesti. Jaja helminta koja se nalaze u otpadnim vodama obično nisu zarazna. Postaju zarazna kada su u održivom stanju i kad se razvijaju u larve.

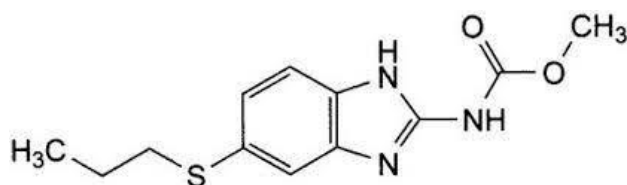
Lijekovi za liječenje helmintoza djeluju na živčani sustav parazita i rezultiraju mišićnom paralizom. Drugi lijekovi utječu na unos glukoze i time na zalihe energije. Svi su

antihelmintici kemijska sredstva i uglavnom se primjenjuju oralno. Mnogi se koriste i u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Međutim, antihelmintici nisu potpuno učinkoviti, ostavljaju određene toksične učinke na domaćina i nisu jednako djelotvorni protiv svih vrsta helminta.

U ovom radu ispitivani su antiparazitici albendazol, febantel i mebendazol.

### 2.3.1. Albendazol

Albendazol ( $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ ) je tvar koja je u obliku bijelog praha. Kemijska struktura albendazola prikazana je na **Slici 4**, a osnovna fizikalno-kemijska svojstva u **Tablici 7**. U **Tablici 8** prikazane su BIOWIN vrijednosti albendazola.



**Slika 4.** Kemijska struktura albendazola [19]

**Tablica 7.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva albendazola [20]

<b>IUPAC ime</b>	methyl N-(6-propylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate
<b>CAS broj</b>	54965-21-8
<b>Kemijska formula</b>	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$
<b>Molekulska masa</b>	265,33 g mol <sup>-1</sup>
<b>log<math>K_{ow}</math></b>	1,27 pri 25 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	41 mg L <sup>-1</sup> pri 25 °C
<b><math>t_t</math></b>	208 - 210 °C
<b>p<math>K_a</math></b>	6,9

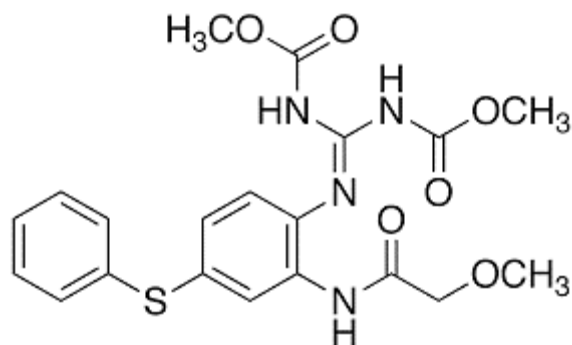
**Tablica 8.** BIOWIN vrijednosti albendazola [8]

<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,5661	vremenski okvir biorazgradnje: tjedni - mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	0,0036	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	0,4426	ne dolazi brzo do biorazgradnje

Albendazol ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u sva tri razvojna stupnja parazita. Manje od 5 % albendazola se apsorbira u probavnom sustavu zbog njegove slabe topljivosti u vodi. Apsorbirani albendazol se metabolizira u jetri, pretvarajući se u primarni metabolit albendazol-sulfoksid koji se veže za serumske bjelančevine. Albendazol se uglavnom koristi u liječenju ehinokokoze, infekcije uzrokovane helmintom koji stvara ciste u jetri i plućima. Biološki poluživot albendazola iznosi 8,5 sati, a izlučuje se putem mokraće. Komercijalni naziv lijeka je Valbazen. [21]

### 2.3.2. Febantel

Febantel ( $C_{20}H_{22}N_4O_6S$ ) je tvar koja je pri sobnoj temperaturi u obliku bijelog praha. Kemijska struktura febantela prikazana je na **Slici 5**. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva febantela prikazana su u **Tablici 9**, a u **Tablici 10** prikazane su BIOWIN vrijednosti.



**Slika 5.** Kemijska struktura febantela [22]

**Tablica 9.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva febantela [23]

<b>IUPAC ime</b>	methyl N-[N'-[2-[(2-methoxyacetyl)amino]-4-phenylsulfanylphenyl]-N-methoxycarbonylcarbamimidoyl]carbamate
<b>CAS broj</b>	58306-30-2
<b>Kemijska formula</b>	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$
<b>Molekulska masa</b>	446,50 g mol <sup>-1</sup>
<b>log<math>K_{ow}</math></b>	1,53 pri 25 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	76,92 mg L <sup>-1</sup> pri 25 °C
<b><math>t_i</math></b>	258,19 °C
<b>p<math>K_a</math></b>	-

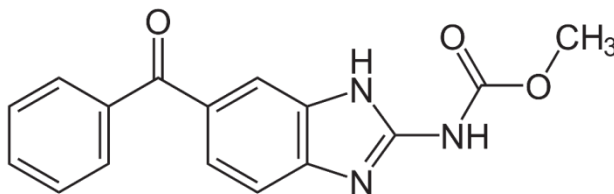
**Tablica 10.** BIOWIN vrijednosti febantela [8]

<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,0782	vremenski okvir biorazgradnje: mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	-0,4586	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	-0,7470	ne dolazi brzo do biorazgradnje

Febantel je predlijevak koji se u organizmu metabolizira u benzimidazol antihelmintik fenbendazol. Koristi se za liječenje i kontrolu helmintoza. Početni oblik lijeka je fenbendazol sulfid, koji se lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol. Svi navedeni lijekovi se koriste za liječenje stoke, koza, ovaca, konja i svinja. Studije provedene na životinjama pokazale su da su najzastupljeniji ostaci nakon tretmana febantelom, fenbendazolom i oksfendazolom bili fenbendazol, oksfendazol i fenbendazol sulfon. Slično kao i kod albendazola, fenbendazol i odgovarajući ostaci lijeka uglavnom su pronađeni u jetri i bubrezima, dok je manja količina pronađena u mišićima i masnom tkivu. Komercijalni nazivi lijeka su Rintal i Vercom. [21]

### 2.3.3. Mebendazol

Mebendazol ( $C_{16}H_{13}N_3O_3$ ) je antiparazitik koji je pri sobnoj temperaturi u obliku bijelog do blijedo žutog praha s ugodnim okusom. Kemijska struktura mebendazola prikazana je na **Slici 6**. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva mebendazola prikazana su u **Tablici 11**, a u **Tablici 12** prikazane su BIOWIN vrijednosti.



**Slika 6.** Kemijska struktura mebendazola [24]

**Tablica 11.** Osnovna fizikalno-kemijska svojstva mebendazola [25]

<b>IUPAC ime</b>	methyl N-(6-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate
<b>CAS broj</b>	31431-39-7
<b>Kemijska formula</b>	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
<b>Molekulska masa</b>	295,29 g mol <sup>-1</sup>
<b>logK<sub>ow</sub></b>	2,83 pri 25 °C
<b>Topljivost u vodi</b>	71,30 mg L <sup>-1</sup> pri 25 °C
<b>t<sub>t</sub></b>	288,5 °C
<b>pK<sub>a</sub></b>	6,6

**Tablica 12.** BIOWIN vrijednosti mebendazola [8]

<b>BIOWIN 3</b> (Ultimate Survey Model)	2,4994	vremenski okvir biorazgradnje: tjedni - mjeseci
<b>BIOWIN 5</b> (MITI Linear Model)	-0,0260	nije lako razgradivo
<b>BIOWIN 7</b> (Anaerobic Linear model)	-0,1806	ne dolazi brzo do biorazgradnje

Mebendazol nepovratno inhibira unos glukoze i drugih hranjivih sastojaka male molekulske mase. Veže se na mjesto tubulina, što uzrokuje degenerativne promjene u tegumentu i crijevnim stanicama helminta. Ovo sprječava polimerizaciju tubulina i prodor u mikrotubule. Gubitak citoplazmatskih mikrotubula rezultira smanjenim unosom glukoze u larvalnoj fazi i helminta, iscrpljujući njihove zalihe glikogena. Tako se smanjuje proizvodnja energije i uzrokuje imobilizacija parazita i na kraju njegovu smrt. Važno je napomenuti da mebendazol nema utjecaja na metabolizam glukoze kod sisavaca koji se liječe ovim lijekom. Mebendazol ima slabu topljivost u vodi, pa se slabo apsorbira u crijevnom traktu. Međutim, apsorpciju se može poboljšati ako se uzima uz obrok. Jetra je odgovorna za metabolizam mebendazola. Konjugati mebendazola i njegovih metabolita mogu se pronaći u žuči, dok se dio nepromijenjenog mebendazola izlučuje putem urina. Komercijalni nazivi lijeka su Telmintic, Telmin i Vermox. [17, 26]



#### 2.3.4. Antiparazitici u okolišu

Antiparazitici su u okolišu prisutni u niskim koncentracijama, međutim s obzirom na stalnu upotrebu, konstantno prispjevaju u okoliš. Trenutni sustavi za pročišćavanje otpadnih voda često nisu učinkoviti u uklanjanju farmaceutskih spojeva, uključujući antiparazitike, iz otpadnih voda. Kao rezultat toga, ti spojevi mogu dospjeti u vodne ekosustave. Utjecaj prisutnosti antiparazitika u otpadnim vodama na vodne ekosustave je složen i raznolik. Ti spojevi mogu negativno utjecati na živi svijet u vodi, uključujući ribe, vodozemce i ostale vodene organizme. Ometajući normalne biološke procese, antiparazitici mogu dovesti do poremećaja u ekosustavima. Nadalje, postoji mogućnost da se ovi spojevi nakupljaju u tkivima organizama i prelaze kroz lanac prehrane. Toksičnost i prisutnost antiparazitika u okolišu su tema brojnih istraživanja u posljednjih 20 godina. Posebna pažnja nedavno je usmjerena na antimikrobna sredstva, čija pojava u okolišu može rezultirati štetnim ishodima kao što su rezistencija i endokrini poremećaji kod neciljanih organizama [2]. Potrebno je provesti mnogo istraživanja kako bi se pronašao najefikasniji i najekonomičniji način za uklanjanje farmaceutika iz komunalnih i farmaceutskih otpadnih voda, kako bi se spriječio njihov potencijalni unos u okoliš. Mulj iz otpadnih voda također može sadržavati značajne količine antiparazitika koji se mogu adsorbirati na aktivnoj biomasi. Neproprisna odlagališta neiskorištenih lijekova i farme gdje se antihelmintici dodaju životinjskoj hrani također predstavljaju važan način ulaska antiparazitika u okoliš. Sastav farmaceutskih otpadnih voda ovisi o sirovinama, tehnološkim postupcima i otpadnim produktima. Specifična onečišćivala koja mogu dospjeti u otpadne vode iz farmaceutske proizvodnje uključuju organska otapala, katalizatore, aditive, neizreagirane reaktante, međuprodukte i aktivne farmaceutske sastojke. Industrijske otpadne vode predstavljaju posebnu opasnost za okoliš jer mogu sadržavati štetne i toksične tvari organskog i anorganskog podrijetla, koje negativno utječu na prijemnike tih otpadnih voda. Osim što troše kisik iz vode prilikom razgradnje, organska onečišćivala mogu izazvati akutno trovanje živih organizama i narušiti ravnotežu ekosustava. Kvaliteta industrijskih otpadnih voda i maksimalno dopuštene koncentracije onečišćivala u vodi regulirane su zakonskim propisima. Interes za prisutnost antiparazitika u okolišu potaknut je potencijalnim negativnim utjecajem na vodene i kopnene ekosustave. Nakupljanje toksičnih onečišćivala u organizmima može dovesti do prekoračenja maksimalno dopuštenih koncentracija putem bioakumulacije u prehrambenom lancu, što rezultira dugoročnom ili kumulativnom toksičnošću za organizme i okoliš. [27, 28]

## 2.4. OTPADNE VODE

Otpadne vode se definiraju kao tekuće tvari koje sadrže otpad. Prema njihovom izvoru, otpadne vode mogu se podijeliti na sljedeće kategorije:

- kućanske otpadne vode,
- industrijske otpadne vode,
- oborinske otpadne vode.

Kućanske otpadne vode potječu iz urbanih ili ruralnih naselja i nazivaju se također "komunalne", "fekalne" ili "gradske" vode. One se generiraju u kućanstvima, ugostiteljskim objektima, školama, zdravstvenim ustanovama, uslužnim djelatnostima te drugim neproizvodnim sektorima. Glavna karakteristika kućanskih otpadnih voda je biološka razgradivost. One sadrže organske tvari koje se počinju razgrađivati čim dospiju u vodu. Svježe kućanske otpadne vode imaju sivo-smeđu boju. Nakon prolaska kroz kanalizacijski sustav, boja im postaje tamnija zbog napredovanja biološke razgradnje. Ove vode imaju miris trulih jaja zbog prisutnosti sumporovodika. Također, u njima se nalaze veće količine krupnih otpadnih tvari poput krpa, papira, plastičnih vrećica, ostataka voća i povrća itd. Kućanske otpadne vode su mutne zbog prisutnosti otpadnih tvari koje se nalaze u koloidnom i otopljenom obliku. Sadrže značajne količine mikroorganizama, uključujući bakterije i viruse, te druge patogene mikroorganizme. Važno je napomenuti da samo mali broj mikroorganizama, u određenim uvjetima, može izazvati bolesti. Temperatura kućanskih otpadnih voda obično se kreće između 10 i 20 °C te je prosječno viša od temperature vode iz vodoopskrbe. To je uglavnom posljedica tople vode iz kuhinje, kupaonice i sličnih izvora. Povišena temperatura, posebno ljeti u toplijim područjima, ubrzava biološki proces razgradnje i dovodi do brže potrošnje otopljenog kisika, što rezultira neugodnim mirisima u kanalizaciji. U područjima gdje nisu izgrađeni kanalizacijski sustavi, postoji problem prikupljanja kućanskih otpadnih voda u septičke jame. Ako se kućanske otpadne vode iz septičkih jama dovode u zajedničke postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, njihov udio u kanalizacijskom sustavu ne smije prelaziti 1 % zbog visoke koncentracije otpadnih tvari.

Industrijske otpadne vode su jedan od najznačajnijih izvora onečišćenja voda. Tijekom prošlog stoljeća, velike količine vode iz industrijskih procesa ispuštane su direktno u rijeke, jezera i obalna područja, što je rezultiralo ozbiljnim problemima onečišćenja voda i negativnim utjecajima na ekosustave i ljudsko zdravlje. Industrijske otpadne vode nastaju kao nusprodukt uporabe vode u industrijskim procesima. Budući da svaki industrijski sektor

proizvodi specifične kombinacije onečišćujućih tvari, postoji mnogo različitih vrsta industrijskih otpadnih voda, a njihova obrada mora biti prilagođena njihovim karakteristikama. Količina industrijskih otpadnih voda ovisi o tehnološkoj razini procesa u svakoj industriji, a njihov volumen se može smanjiti unapređenjem industrijskih tehnologija. Industrijske otpadne vode mogu sadržavati različite tvari kao što su teški metali, lužine, kiseline, soli, mineralna ulja, ugljikovodici, fenoli, aromatski organski spojevi i radioaktivne tvari. Općenito, industrijske otpadne vode se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine:

- Biološki razgradive ili spojive industrijske otpadne vode: Ove vode sadrže uglavnom organski otpad koji potječe iz kemijske industrije. Primjeri industrija koje proizvode takve otpadne vode su tvornice lijekova, kozmetike, bojila, ljepila, sapuna, sintetičkih deterdženata, pesticida, herbicida, tvornice kože, tekstilne tvornice, tvornice celuloze i papira, rafinerije nafte, pivovare i metaloprerađivačka industrija. Ove otpadne vode zahtijevaju posebnu obradu kako bi se uklonili organski spojevi prije nego što se miješaju s kućanskim otpadnim vodama.
- Biološki nerazgradive ili nespojive industrijske otpadne vode: Ove vode uglavnom proizlaze iz industrije ugljena, čelika, nemetalnih minerala i industrijskih pogona za površinsku obradu metala. Karakteriziraju se visokim udjelom suspendiranih tvari koje se mogu ukloniti taloženjem uz kemijsku flokulaciju, dodavanje soli željeza ili aluminija, sredstava za flokulaciju i organskih polimera.

Također, rashladne vode su dio industrijskih otpadnih voda i koriste se u mnogim industrijskim i energetske procesima za hlađenje dijelova sustava ili odvođenje viška topline. Kada se rashladne vode ispuštaju u prirodne vodne sustave bez odgovarajućeg hlađenja, dolazi do toplinskog onečišćenja voda. Toplinsko onečišćenje podrazumijeva povećanje ili smanjenje temperature vode zbog djelovanja čovjeka. To može dovesti do promjene fizikalnih i kemijskih svojstava vode te potencijalno uzrokovati mikrobiološko onečišćenje. [29, 30]

## **2.5. METODE OBRADNE OTPADNIH VODA**

Održivost optimalnog ekološkog sustava zahtijeva nužnost pročišćavanja otpadnih voda, što je u određenim dijelovima svijeta čak neophodno za preživljavanje. Problemi kontaminirane vode često se javljaju u industrijskim postrojenjima gdje se ne provodi uvijek adekvatna obrada ili se problem otpadnih voda potpuno zanemaruje. Za očuvanje okoliša i ljudskog

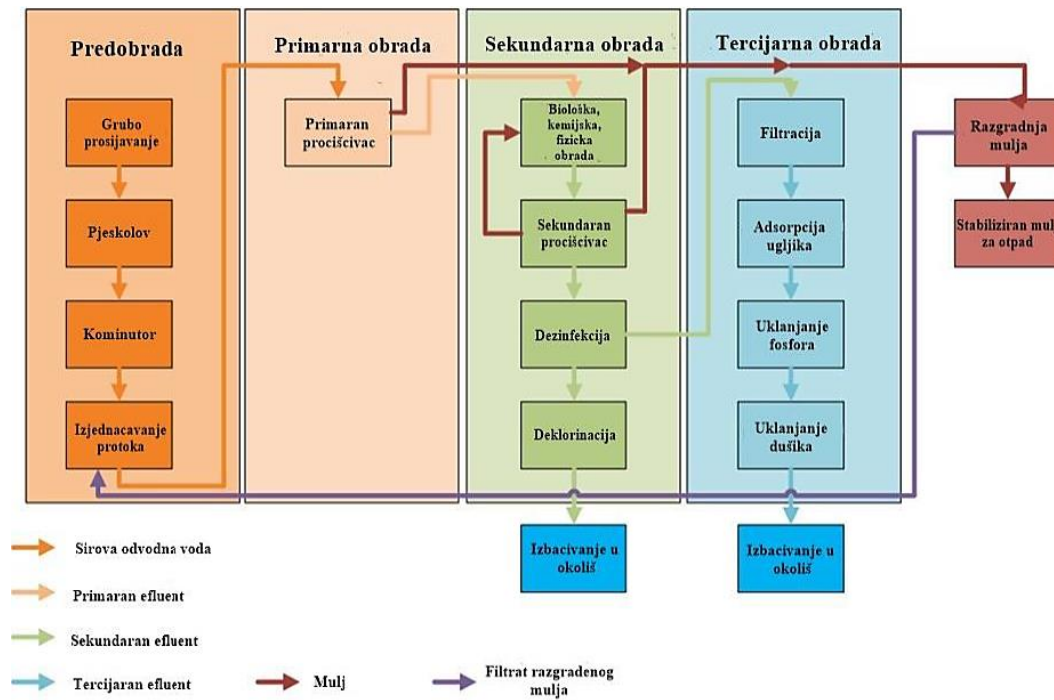
zdravlja, ključno je održavati ravnotežu između potrošnje vode i pravilne obrade otpadnih voda prije njihovog ispuštanja u okoliš. Najpoželjniji pristupi obradi vode su oni koji zadovoljavaju mikrobiološke i kemijske standarde za konačne proizvode, istovremeno osiguravajući održivost i izbjegavanje iscrpljivanja prirodnih resursa. Konvencionalne metode pročišćavanja otpadnih voda najčešće se primjenjuju u središnjim postrojenjima za obradu, ali sve veću pažnju privlače i napredne metode. To je zbog činjenice da konvencionalne metode često nisu ekonomski i vremenski isplative, te se također ne pokazuju potpuno učinkovitim u uklanjanju kemijskih onečišćivača. [31, 32]

### **2.5.1. Konvencionalne metode obrade otpadnih voda**

Konvencionalne metode obrade otpadnih voda uključuju:

- preobradu,
- primarni stupanj obrade,
- sekundarni stupanj obrade i
- tercijarni stupanj obrade.

Ove metode kombiniraju fizičke, kemijske i biološke procese s glavnim ciljem razgradnje čvrstih tvari, organskih tvari i nutrijenata. Sedimentacija, flokulacija, adsorpcija, filtracija i koagulacija su najčešće primijenjeni konvencionalni postupci. [33]



**Slika 7.** Koraci konvencionalnog pročišćavanja otpadnih voda: predobrada, primarni tretman, sekundarni tretman i tercijarni tretman [31]

Predobrada otpadnih voda se izvodi na uređajima namijenjenim toj svrsi neposredno prije prvog stupnja pročišćavanja otpadne vode. Uređaji koji su dio predobrade uključuju rešetke i sita koja uklanjaju veće tvari iz otpadne vode, kao i sjekače koji razbijaju otpad, te spremnike za izjednačavanje otpadnih voda. Uklanjanje krupnih tvari je prvi nužni korak u obradi otpadnih voda kako bi se zaštitile crpke i spriječilo začepljenje cjevovoda u sustavu obrade. Sita obično imaju valjkasti oblik i rotiraju se oko horizontalne osi. U nekim slučajevima, sita mogu zamijeniti pjeskolov ili prethodni taložnik. Krute tvari koje se sakupljaju na sitima se cijede i odvoze u zatvorenim spremnicima. Usitnjavanje je proces kojim se zamjenjuje mehaničko uklanjanje većih čestica iz otpadnih voda ili se koristi nakon grubih rešetki kako bi se izbjeglo začepljenje crpki i cjevovoda većim česticama. Međutim, usitnjavanje može rezultirati ponovnim pojavljivanjem čestica u otpadnoj vodi u obliku manjih čestica, kao i povećanim stvaranjem pjene i mulja, zbog čega se izbjegava primjena tog procesa. Izjednačavanje se odnosi na prilagođavanje otpadnih voda koje ulaze u sustav obrade u pogledu njihovog sastava, količine i koncentracije otpadnih tvari. Dimenzije uređaja za obradu otpadnih voda određene su prema specifičnom protoku i koncentraciji otpadnih tvari. Nagle promjene u protoku i koncentraciji otpadnih tvari mogu opteretiti dijelove ili čak cijeli sustav obrade, što dovodi do smanjenog učinka pročišćavanja. Izjednačavanje sastava otpadne vode smanjuje njezinu toksičnost, a često uključuje i izjednačavanje pH-vrijednosti. Sadržaj

spremnika za izjednačavanje se miješa i provjetrava kako bi se postiglo brže izjednačavanje otpadne vode. [30]

Primarna obrada otpadnih voda obuhvaća izdvajanje čestica veće gustoće (zrnate i pahuljaste) poput pijeska, čestica metala ili stakla i čestica manje gustoće koje isplivavaju na površinu poput ulja, masnoća i sapuna. Također, u ovoj fazi se provodi neutralizacija otpadne vode prije biološke obrade. Za odvajanje zrnatih i pahuljastih čestica koristi se proces taloženja, dok se plivajuće čestice izdvajaju procesom isplivavanja. Pjeskolov je dio sustava primarne obrade otpadnih voda koji se koristi za izdvajanje zrnatih čestica poput pijeska i šljunka. Ako postoji velika fluktuacija pH-vrijednosti otpadne vode u sustavu obrade, potrebno je provesti proces neutralizacije prije sekundarne obrade. Neutralizacija uključuje dodavanje kiselina ili lužina otpadnoj vodi kako bi se pH-vrijednost prilagodila povoljnoj razini za biološke procese razgradnje. Ovaj proces je često primjenjivan kod industrijskog otpada. [29]

Sekundarna ili biološka obrada otpadnih voda predstavlja drugi stupanj pročišćavanja nakon prethodnih faza čišćenja. U ovom stupnju se primjenjuju biološki procesi kako bi se uklonili otopljeni organski sastojci, anorganski sastojci i suspendirane čestice iz otpadne vode. Ovi procesi se temelje na aktivnostima mikroorganizama koji igraju ključnu ulogu u razgradnji i pretvorbi otpadnih tvari. Jedan od najčešće korištenih bioloških procesa je aerobna tvorba i razgradnja tvari. U ovom procesu, mikroorganizmi koriste organsku tvar kao izvor hrane za rast i razvoj. Kao rezultat ovog procesa, nove stanice mikroorganizama se razmnožavaju, a otpadni produkti uključuju ugljikov dioksid, vodu i nerazgradive tvari. Drugi važan biološki proces je anaerobno kiselo vrenje i metanska razgradnja stanica. U uvjetima nedostatka otopljenog kisika, mikroorganizmi koriste ugljik iz organskih molekula kao elektron-akceptor. Ovaj proces se odvija u dvije faze: prva je kisela ili tekuća faza, dok je druga metanska ili plinovita faza. U prvoj fazi, bakterije kiselog vrenja razgrađuju organsku tvar na organske kiseline, sumporovodik, amonijak i vodu. U drugoj fazi, metanske bakterije dalje razgrađuju organske kiseline proizvodeći metan, ugljikov dioksid i vodu. Tijekom ovog procesa također dolazi do rasta novih stanica mikroorganizama. Dodatno, postoji i bakteriološka oksidacija i redukcija koja se javlja u otpadnoj vodi koja sadrži spojeve ugljika i dušika. Određene vrste bakterija koriste dušik za svoj rast, što rezultira oksidacijom organskog dušika i amonijaka u nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ). Ovaj proces je poznat kao nitrifikacija i igra važnu ulogu u uklanjanju dušika iz otpadne vode. U ovom dijelu obrade vode je važno održavati optimalnu temperaturu i pH-vrijednost koji će biti povoljni za rast korištenih mikroorganizama. Sekundarna obrada otpadnih voda pridonosi značajnom smanjenju koncentracije organskih

tvori i drugih onečišćujućih tvari u otpadnoj vodi, čime se postiže veći stupanj čistoće prije ispuštanja u okoliš. [34]

U slučajevima kada kvaliteta otpadnih voda nakon biološke obrade nije zadovoljavajuća, primjenjuje se tercijarna obrada. Tercijarnom obradom otpadnih voda, koristeći fizikalne, kemijske i biološke procese, uklanjaju se ili smanjuju količine hranjivih soli dušika i fosfora, mikroorganizama, pesticida, otrovnih i radioaktivnih tvari. Koristi se kombinacija procesa poput ionske izmjene, adsorpcija aktivnim ugljenom, procesi filtracije, fotolize, reakcije hidrolize, koagulacija, flokulacija, dezinfekcija pomoću klora, ozona ili UV zračenja, reakcije redukcije, reakcije oksidacije primjerice pomoću  $H_2O_2$  te mnogi drugi procesi kako bi se postigao visok stupanj pročišćene otpadne vode. Glavni cilj tercijarne obrade je završna priprema vode prije korištenja. [35]

U ovom radu u laboratorijskim uvjetima je provedena sekundarna i tercijarna obrada otopina ksenobiotika kako bi se ispitalo ponašanje tih tvari tijekom obrade vode što sličnijoj stvarnoj obradi otpadnih voda u realnim procesima. Za proces sekundarne obrade vodenih otopina ksenobiotika koristili su se mikroorganizmi za pročišćavanje, odnosno aktivni mulj, iz lokalnog postrojenja za obradu otpadnih voda. Mikroorganizmi su propisno pripremljeni kako bi bili uporabljivi i reprezentativno djelovali i u laboratorijskim uvjetima. Za procese tercijarne obrade vodenih otopina koristili su se procesi fotolize, vrlo djelotvorne reakcije oksidacije pomoću  $H_2O_2$  te se paralelno uz navedene metode ispitivao utjecaj dezinficijensa natrijevog hipoklorita na uklanjanje spojeva ksenobiotika.

### **Obrada otpadne vode pomoću klora**

Klor je na sobnoj temperaturi zeleno - žuti, otrovni plin, koji u kombinaciji s vodom tvori mješavinu klorovodične i hipokloritne kiseline. Zbog svojih oksidirajućih karakteristika, klor i klorovi spojevi se koriste kao dezinficijensi u brojnim vodenim objektima jer su sposobni ukloniti potencijalno opasno mikrobiološko onečišćenje iz vode. Uklanjaju bakterije i predstavnike protozoa oksidirajući njihov stanični materijal te učinkovito djeluju i na razgradnju virusa. Neki od često prisutnih patogena u otpadnim vodama koji se uspješno uklanjaju primjenom klora su *E. coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* i *Pseudomonas*. Također, održavanje reziduala klora kroz vodoopskrbni sustav je važno zbog minimiziranja rasta bakterija. Klor se kao dezinficijens najčešće koristi u tri oblika: kao komprimirani plin u elementarnom obliku ( $Cl_2$ ), kao otopina natrijevog hipoklorita ( $NaOCl$ ) ili kao granule

čvrstog kalcijeva hipoklorita ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ). Spojevi reagiraju s vodom tvoreći hipokloritnu kiselinu ( $\text{HOCl}$ ). [36]

Prednosti korištenja klora kao dezinfekcijskog sredstva su manji ekonomski trošak u usporedbi s drugim dezinfekcijskim sredstvima poput UV zračenja i ozona, učinkovito djelovanje protiv širokog spektra patogenih organizama, uklanjanje neugodnih mirisa i produljuje vrijeme dezinfekcije nakon tretiranja zbog rezidualnog klora koji zaostaje u vodi. Nedostatak njegove primjene je moguće toksično djelovanje rezidualnog volumena klora na život u vodi i u takvim slučajevima potrebno je provoditi deklorinaciju vode koja nije ekonomski isplativa. Nadalje, klor oksidira pojedine organske tvari i nastaju štetne komponente poput trihalometana, a njegovo rukovanje, prijenos i skladištenje zahtijevaju veliki oprez i posebne protokole rukovanja. [31]

### **Natrijev hipoklorit u obradi otpadnih voda**

Natrijev hipoklorit je otopina blago žućkaste boje koja se često koristi kao sredstvo za izbjeljivanje. Nestabilan je, prilikom zagrijavanja i pod utjecajem svjetlosti dolazi do njegovog raspada te prilikom kontakta s određenim otrovnim, korozivnim plinovima, uključujući i sam klor, također se raspada. Još jedan problem s natrijevim hipokloritom je taj što je zapaljiv i to dodatno otežava njegovo rukovanje i skladištenje. [37]

Natrijev hipoklorit se najčešće dobiva kemijskom metodom propuštanja klora kroz otopinu natrijeva hidroksida i elektrokemijskom metodom gdje se otopina natrijevog klorida ili morske vode podvrgne elektrolizi. [38]

Natrijev hipoklorit se često koristi za dezinfekciju otpadnih voda zato jer djeluje kao snažan oksidans. Prilikom otapanja u vodi raspada se na natrij i hipokloritni ion koji djeluje kao sredstvo za dezinfekciju. Tijekom otapanja će nastati i hipoklorična kiselina čija je koncentracija određena s pH-vrijednosti. Klor iz hipokloritnog iona i hipoklorične kiseline ponaša se kao snažan elektrofil i reagira s dijelovima visoke elektronske gustoće supstrata poput proteina, aminokiselina i lipida odnosno peptidnih veza, amino skupina i tiolnih skupina koje se na njima nalaze. Također, hipoklorična kiselina i hipokloritni ion imaju sposobnost prolaska kroz staničnu stijenku i staničnu membranu mikroorganizama, a da pritom inhibiraju aktivnost enzima neophodnih za njihov rast. [39]



### 2.5.2. Napredne metode obrade otpadnih voda

Napredne metode obrade otpadne vode mogu biti svrstane pod tercijarni tretman konvencionalne obrade. One podrazumijevaju upotrebu membranske filtracije i naprednih oksidacijskih procesa za postizanje nižih vrijednosti nečistoća nego što je to moguće postići konvencionalnom obradom. Primjena ovih metoda se najviše fokusira na uklanjanju nutrijenata poput fosfora i dušika. [31]

Membranska separacija je proces prilikom kojeg se voda pod tlakom dovodi na membranu i zadržavaju se neželjene komponente s obzirom na veličinu nečistoća ili njihovih kemijskih svojstava. Postoje četiri vrste membranske separacije:

- mikrofiltracija koja zadržava čestice veličine 0,1 - 5  $\mu\text{m}$ ,
- ultrafiltracija koja zadržava čestice veličine 1-100 nm,
- nanofiltracija koja zadržava čestice veličine manje od 2 nm te
- reverzna osmoza koja zadržava čestice manje od 1 nm.

Membranska separacija može biti statična i dinamična. Statična membranska separacija je proces kojim voda prolazi okomito na membranu što uzrokuje nakupljanje nečistoća na membrani, a s vremenom se smanjuje funkcija membrane zbog stvaranja sloja čestica koje priječe prolaz vodi. Dinamična membranska separacija omogućuje da se voda kreće vodoravno uz membranu što smanjuje mogućnost njenog začepljenja. [40]

Napredni oksidacijski procesi uključuju razgradnju organskih tvari pomoću nastalih hidroksilnih ili sulfatnih radikala. Ovi radikali uklanjaju zaostale organske komponente, anorganska onečišćivala i djeluju kao predobrada odnosno poboljšavaju biorazgradivost vode prije biološke obrade. Zbog kratkog vremena poluživota radikala, oni nastaju istovremeno tijekom njihove primjene pomoću oksidirajućih agensa kao što su  $\text{O}_3$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pomoću UV zračenja ili katalizatora poput  $\text{Fe}^{2+}$ . Prema tome, razlikujemo napredne oksidacijske procese bazirane na ozonu, UV zračenju i Fenton - reakcijama. Rijetko se u primjeni nalaze napredni oksidacijski procesi bazirani na ultrazvučnom zračenju i zračenju elektronskim snopovima. Upravo zbog kratke duljine poluživota, napredni oksidacijski procesi nemaju široku primjenu u dezinfekciji. [41]

## **Vodikov peroksid u obradi otpadnih voda**

Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) je oksidirajući agens koji je ekološki prihvatljiv s obzirom da se razgrađuje na  $H_2O$  i  $O_2$ . To je bezbojan plin koji nema korozivna svojstva i primjenjuje se u raznim vrstama industrije. Njegova primjena je sigurna i jednostavna, općenito se koristi kao sredstvo za razgradnju neugodnih mirisa, dezinfekciju te razgradnju metala. Nalazi primjenu unutar konvencionalnih i naprednih metoda obrade otpadne vode. Mehaničkim miješanjem otpadne vode s  $H_2O_2$  se postiže nastanak mjehurića zraka koji oksidiraju otpadne tvari.  $H_2O_2$  se kao oksidirajući agens uobičajeno koristi u kombinaciji s drugim katalizatorima, oksidansima ili UV zračenjem kako bi došlo do nastanka reaktivnih kisikovih radikala. Katalizatori koji se često kombiniraju s  $H_2O_2$  u svrhu nastanka reaktivnih radikala su željezo i ozon. Razgradnja mikroorganizama odvija se pomoću hidroksilnih radikala. Upravo su potreba za upotrebom katalizatora prilikom naprednih oksidacijskih procesa obrade vode i veliki operacijski procesi dovođenja  $H_2O_2$  velik ekonomski trošak i samim time nedostatak njegove uporabe. Unatoč tome,  $H_2O_2$  se primjenjuje u procesima obrade i pročišćavanja vode sa svrhom dobivanja vode za piće i za obradu ispuštenih industrijskih voda i voda iz kućanstva kako bi se eliminirao njihov štetan utjecaj na okoliš. [31, 42]

## **Fotoliza**

Fotoliza je proces degradacije kemijskih spojeva uzrokovan energijom Sunčeva zračenja. Glavne faze fotolize su:

- apsorpcija svjetla - pobuđuje elektrone molekule,
- primarni fotokemijski proces - transformira molekulu,
- sekundarna termalna reakcija - transformira intermedijer nastao primarnim procesom.

Brzina fotokatalitičke razgradnje ovisi o svojstvu apsorpcije svjetla, reaktivnosti kemikalija i intenzitetu solarnog zračenja. [31]

## **2.6. PRAĆENJE KSENOBIOTIKA U OKOLIŠU**

### **2.6.1. Kromatografija (analitička metoda)**

Kromatografija je grupni naziv za laboratorijske tehnike koje se koriste za razdvajanje smjesa. To su jedne od vodećih analitičkih metoda koje omogućavaju razdvajanje i kvantitativno određivanje kemijskih spojeva prisutnih u različitim smjesama.

Sve kromatografske tehnike imaju jednak princip analize. Kromatografski sustav čine pokretna (mobilna) faza, nepokretna (stacionarna) faza i ispitivani spoj (uzorak). Tijekom kromatografske analize plinovita ili tekuća pokretna faza prenosi uzorak kroz nepokretnu fazu. Odijeljivanje spojeva u uzorku se temelji na različitim brzinama kojima se ti spojevi kreću kroz nepokretnu fazu. Kao rezultat dobije se kromatogram koji prikazuje koncentracijski ili maseni profil sastojaka uzorka. Kvalitativan parametar je vrijeme zadržavanja koje na temelju određenog položaja kromatografske krivulje daje informaciju o sastavu uzorka. Kvantitativan parametar je površina kromatografske krivulje.

Kromatografske tehnike se mogu podijeliti na nekoliko načina. Podjela obzirom na ravnotežu između pokretne i nepokretne faze:

- Razdjelna kromatografija,
- Adsorpcijska kromatografija,
- Afinitetna kromatografija,
- Kromatografija isključenjem,
- Ionska kromatografija.

Podjela na temelju sastava pokretne faze:

- Plinska kromatografija,
- Tekućinska kromatografija,
- Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima.

Podjela na temelju sastava nepokretne faze:

- Plošna kromatografija,
- Kromatografija na stupcu ili u koloni.

U ovom radu koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (**eng.** *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Ova tehnika kromatografije je jedna od najčešće korištenih analitičkih instrumentalnih metoda. [43]

## **Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je analitička separacijska metoda koja se danas primjenjuje u različitim područjima. Drugi naziv joj je tekućinska kromatografija pod visokim tlakom jer za postizanje dovoljne brzine protoka u kolonama potrebni su visoki tlakovi od nekoliko milijuna Pa. U sklopu uređaja može postojati i oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica iz pokretne faze jer mjehurići i čvrste tvari mogu ometati rad detektora i utjecati na širenje kromatografskih zona tj. krivulja pojedinih sastojaka uzorka te smanjiti njihovu razlučivost.

Zahtjevi koji se moraju zadovoljiti za rad crpke u tekućinskom kromatografu su vrlo strogi:

- tlakovi do 40 milijuna Pa,
- izlaz bez pulsiranja tlaka,
- brzine protoka od 0,1 do 10 mL min<sup>-1</sup>,
- reproducibilnost protoka > 99,5 %,
- otpornost na koroziju izazvanu različitim otapalima.

Uzorci se najčešće unose putem plinskog ventila. U kolonu se mogu unositi količine uzorka od 5 do 500 µL. Kolone su najčešće izrađene od čeličnih cijevi dužine 10 – 30 cm, unutrašnjeg promjera 4 – 10 mm. Promjer zrna punila je najčešće od 5 do 10 µm. Punilo je najčešće silikagel. [44]

Sustavi detektora u tekućinskoj kromatografiji nisu univerzalni. Ovisi o prirodi uzorka i uglavnom se temelje na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja. Za potrebe ovog rada koristio se detektor s nizom dioda (DAD).

### **2.6.2. Toksičnost (biološka metoda)**

Toksičnost je stupanj u kojem određena tvar, toksin, može oštetiti živi organizam. Toksini reagiraju sa staničnim komponentama, poremećuju metabolizam i tako štetno djeluju na žive organizme. Svojom djelovanjem mogu dovesti i do smrti živih bića. Vrlo su reaktivne tvari i zbog toga su štetni već i u malim koncentracijama. Toksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem toksina i njihovih utjecaja na žive organizme. Grana toksikologije koja proučava interakcije, transformacije i učinke prirodnih i sintetskih spojeva u biosferi naziva se ekotoksikologija.

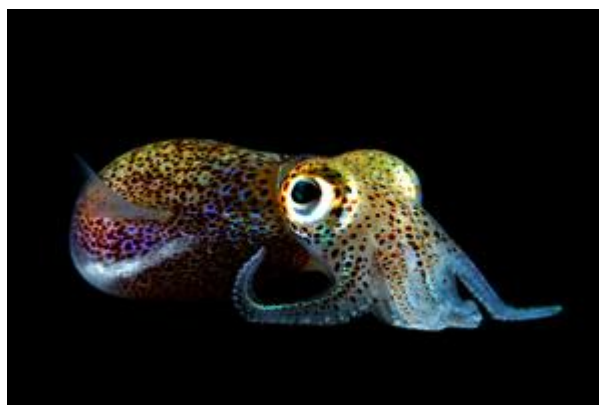
Ksenobiotici su najpoznatiji toksini. Sama analiza tih tvari daje informacije o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima, a kako bi se znao njihov biološki utjecaj potrebno je provesti testove toksičnosti. Postoji mnogo metoda određivanja toksičnosti poput testova na biljkama, algama, ribama, ali najčešće korišteni su testovi na bakterijama. Razlikuju se dva oblika ispitivanja toksičnosti:

- akutni test toksičnosti – ispituje preživljavanje organizama u vremenskom periodu od 24 do 96 sati, i
- kronični test toksičnosti – ispituje preživljavanje organizama u vremenskom periodu od minimalno tjedan dana.

U ovom radu ispitivana je akutna toksičnost ksenobiotika u čistim uzorcima nakon procesa šaržne biorazgradnje i fotolize.

### **Bakterija *Vibrio fischeri***

*Vibrio fischeri* (drugi naziv *Aliivibrio fischeri*) je bioluminiscentna, Gram-negativna, štapićasta bakterija koja se nalazi u morskom okolišu. Heterotrofna je te se kreće pomoću polarnih flagela (bičeva). U prirodi se pronalazi u simbiozama s raznim morskim životinjama (**Slika 8.**). U skupini bakterija *Vibrionaceae* postoji više vrsta bakterija koje imaju skupine gena koji su zaslužni za bioluminiscenciju. Emisija vidljive svjetlosti potječe od pet gena (*luxCDABEG*) dok dva gena (*luxR* i *luxI*) reguliraju operon. Bakterija *Vibrio fischeri* je mikroorganizam ključan za ispitivanja mikrobnog senzora te simbioze sa životinjama. [45]



**Slika 8.** Bakterija *Vibrio fischeri* u simbiozi s lignjom *Euprymna scolopes* [46]

### **Bioluminiscentna metoda – DIN 38412 – L34**

Bakterija *Vibrio fischeri* emitira vidljivu svjetlost kao sastavni dio svog metabolizma. Smanjenje intenziteta emitirane svjetlosti posljedica je nekakvog oblika oštećenja bakterija. Prema tome, iz mjerenja intenziteta bioluminiscencije bakterija može se utvrditi štetno djelovanje toksičnih tvari.

Određivanje biološke toksičnosti tvari pomoću svjetlećih bakterija opisano je DIN-ovim standardima. U ovom radu korištena je metoda DIN 38 412 – L34, bioluminiscentna metoda koja pripada skupini testova kratkog trajanja jer traje 30 minuta. Korišteni test organizmi su spomenute *Vibrio fischeri* bakterije.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj korišten u eksperimentalnom dijelu rada je iz lokalnog postrojenja za obradu voda. Prikupljen je svježi mulj 1-2 dana prije pokretanja procesa šaržne biorazgradnje.

##### 3.1.2. Korištene kemikalije

Sve korištene kemikalije u ovom eksperimentalnom dijelu navedene su u **Tablici 13** abecednim redom.

**Tablica 13.** Abecedni popis korištenih kemikalija

NAZIV	KEMIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
agar	$C_{14}H_{24}O_9$	<i>p.a.</i>	Liofilchem, Italija
činkov sulfat heptahidrat	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	<i>p.a.</i>	Lach-Ner, Češka
deionizirana voda	$H_2O$	<i>p.a.</i>	Mili Q
D-glukoza	$C_6H_{12}O_6$	<i>p.a.</i>	Lach-Ner, Češka
D-rafinoza pentahidrat	$C_{18}H_{32}O_{16}$	99%	Lach-Ner, Češka
etanol	$C_2H_5OH$	HPLC čistoća	J. T. Baker, Nizozemska
glicerol	$C_3H_8O_3$	<i>p.a.</i>	Lach-Ner, Češka
kalcijev karbonat	$CaCO_3$	<i>p.a.</i>	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid	$CaCl_2$	<i>p.a.</i>	Kemika, Hrvatska
kalijev bikromat	$K_2Cr_2O_7$	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Hrvatska
kalijev dihidrogen fosfat	$KH_2PO_4$	<i>p.a.</i>	Kemika, Hrvatska
klorovodična kiselina	HCl	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Hrvatska
kvašćev ekstrakt	$C_{19}H_{14}O_2$	<i>p.a.</i>	Biolife, Italija
magnezijev sulfat	$MgSO_4$	<i>p.a.</i>	T.T.T., Hrvatska
metanol	$CH_3OH$	HPLC čistoća	J. T. Baker, Nizozemska
natrijev hidroksid	NaOH	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Hrvatska
natrijev hipoklorit	NaOCl	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Jugoslavija
natrijev klorid	NaCl	<i>p.a.</i>	Lach-Ner, Češka
pepton	-	<i>p.a.</i>	Biolife, Italija
srebrov sulfat	$Ag_2SO_4$	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Hrvatska
sulfatna kiselina	$H_2SO_4$	<i>p.a.</i>	Kemika d.d., Hrvatska
vodikov peroksid	$H_2O_2$	<i>p.a.</i>	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
živin(II) sulfat	$Hg_2SO_4$	<i>p.a.</i>	Gram-Mol d.o.o., Hrvatska

### 3.1.3. Ispitivani ksenobiotici

Svi ksenobiotici korišteni u ovom radu popisani su u **Tablici 14** abecednim redom.

**Tablica 14.** Abecedni popis ispitivanih ksenobiotika

NAZIV	EMPIRIJSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
acetamiprid	$C_{10}H_{11}ClN_4$	$\geq 98,0 \%$	Sigma-Aldrich, Germany
albendazol	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	99 %	Veterina d.o.o., Hrvatska
febantel	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$	< 99 %	Veterina d.o.o., Hrvatska
klotianidin	$C_6N_5H_8SO_2Cl$	$\geq 98,0 \%$	Sigma-Aldrich, Switzerland
mebendazol	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	HPLC	Sigma-Aldrich, SAD
tiakloprid	$C_{10}H_9ClN_4S$	$\geq 98,0 \%$	Sigma-Aldrich, Germany

## 3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR

### 3.2.1. Analitička vaga

Odvage ksenobiotika potrebne za proces šaržne biorazgradnje, kao i odvage mulja nakon biorazgradnje, uzoraka za određivanje gustoće te uzoraka za određivanje organske i anorganske tvari, vagane su na preciznoj analitičkoj vagi XA105 DualRange proizvođača Mettler Toledo, Švicarska (**Slika 9.**).



**Slika 9.** Analitička vaga XA105 DualRange, Švicarska



### 3.2.2. pH-metar

Mjerenje pH- vrijednosti otopina u reaktorima tijekom šaržne biorazgradnje, otopina koje su se izlagale fotolizi te prilikom namještanja pH-vrijednosti resuspenzijske otopine kojom se priprema bakterijska suspenzija za ispitivanje toksičnosti koristio se pH-metar Seven Easy proizvođača Mettler Toledo, Švicarska (**Slika 10.**). Elektroda se između mjerenja ispire deioniziranom vodom. pH-vrijednost se očitava nakon ustaljenja vrijednosti na uređaju.



**Slika 10.** pH metar Seven Easy, Švicarska

### 3.2.3. Elektroda za mjerenje koncentracije kisika

Za mjerenje vrijednosti koncentracije kisika u otopinama u reaktorima i otopinama koje su se izlagale fotolizi koristila se kisikova elektroda Orion RDO Dissolved Oxygen Probe proizvođača Thermo Scientific, SAD (**Slika 11.**). Elektroda se između mjerenja ispire deioniziranom vodom. Koncentracija kisika izražena u  $\text{mg L}^{-1}$  očitava se nakon ustaljenja vrijednosti na uređaju.



**Slika 11.** Kisikova elektroda Orion RDO Thermo Scientific, SAD

### 3.2.4. Pribor za filtriranje

Dio uzoraka iz reaktora su sadržavali aktivni mulj te ih je bilo potrebno profiltrirati prije kromatografske analize. Za filtriranje uzoraka koristile su se šprice volumena 5 mL, Becton Dickinson, BD Discardit II, Indija i filteri FilterBio, Labex Ltd., Kina s veličinom pora 45  $\mu\text{m}$  i promjera 25 mm (Slika 12.).



**Slika 12.** Šprica i filteri korišteni za filtriranje uzoraka [47,48]

### 3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Uzorci ksenobiotika analizirani su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti proizvođača Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države (SAD) (Slika 13.).

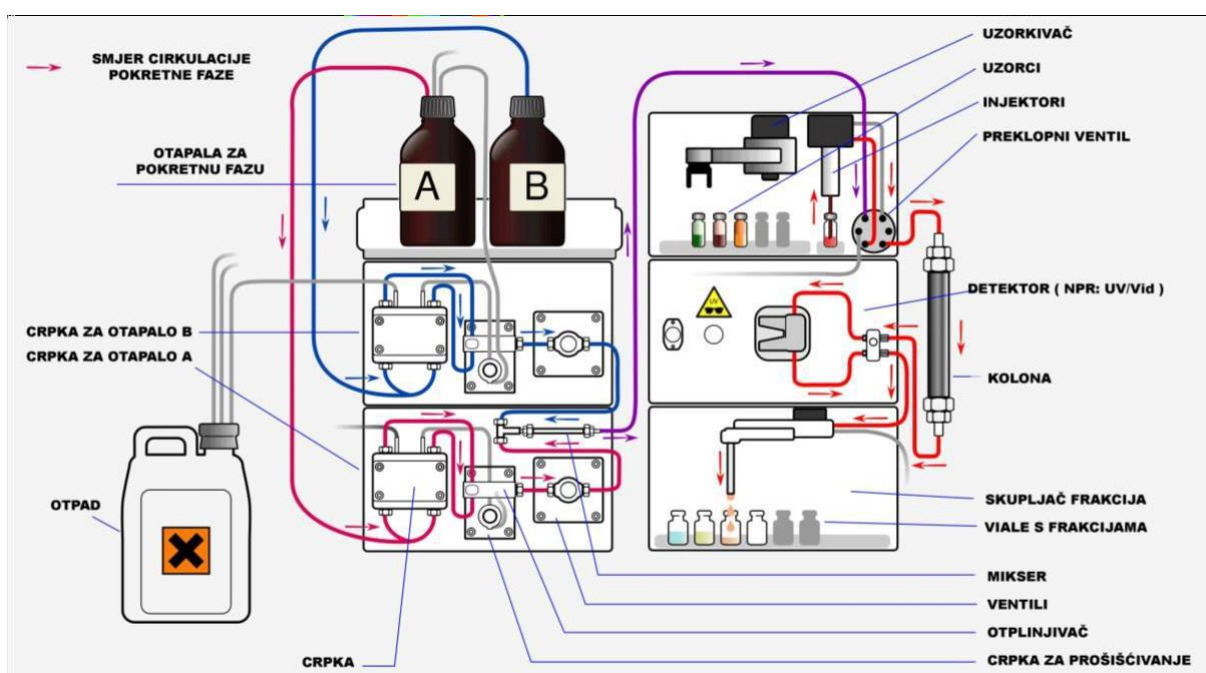
Kromatograf se sastoji od ProStar 330 detektora s nizom dioda, ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatiranog držača kolone, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala s programom STAR 5.2. preko kojeg se upravlja HPLC-om te prikupljaju i obrađuju podaci. Za analizu je korištena kolona InertSustain C<sub>18</sub> (GL Sciences, Japan) Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina čestica je 5 μm. Volumen injektiranja uzorka je 30 μL, a temperatura 20 – 25 °C. Svaki uzorak je injektiran tri puta.

Prije i nakon analize uzoraka kolona se pere 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat protokom od 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Volumen injektiranja acetonitrila je 10 μL. Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu). Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL min<sup>-1</sup>.



**Slika 13.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Varian ProStar, SAD

Procesna shema rada tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti prikazana je na **Slici 14**. Pokretna faza se pumpom provodi kroz sustav i kada je sustav spreman uzorak iz viala se injektira pomoću injektora u kromatografski sustav. Nakon što se uzorak injektira on prolazi kroz kromatografsku kolonu, koja ovisno o namjeni i vrsti uzorka ima različita fizikalna i kemijska svojstva. Na samoj koloni dolazi do separacije komponenti iz uzorka i nakon određenog vremena za pojedini analit, on izlazi iz kolone i dolazi do detektora. Detektori s nizom dioda, (**eng. diode array detector, DAD**), mjere koncentraciju svake pojedine komponente mjerenjem apsorbancije cijelog niza spektra u vidljivom i ultraljubičastom spektru elektromagnetskog zračenja.



**Slika 14.** Shematski prikaz rada kromatografa [49]

### 3.2.6. Instrumenti za kemijsku potrošnju kisika – KPK

Kemijska potrošnja kisika određena je korištenjem UV/VIS spektrofotometra DR2400, proizvođača HACH, SAD, prikazan je na **Slici 15**. Reakcijska smjesa sa uzorkom prije mjerenja termostatirala se u termostatu proizvođača HACH, SAD (**Slika 16**).



**Slika 15.** UV/VIS spektrofotometar DR 2400 HACH, SAD



**Slika 16.** Termostatski blok, HACH, SAD

### **3.2.7. Instrumenti za biokemijsku potrošnju kisika – BPK**

Za određivanje biokemijske potrošnje kisika uzorci su pripremljeni u bocama po Winkleru (**Slika 17.**) te su inkubirani 5 dana u inkubatoru proizvođača Inko Laboratorijska oprema, Hrvatska, prikazanom na **Slici 18.**



**Slika 17.** Različite boce po Winkler-u [50]



**Slika 18.** Inkubator Inko Laboratorijska oprema, Hrvatska

### 3.2.8. Instrument Suntest CPS+

Fotoliza uzoraka ksenobiotika nakon procesa šaržne biorazgradnje provedena je na instrumentu Suntest CPS+ proizvođača Atlas, Linsengericht, Njemačka (**Slika 19.**). U uređaju se nalazi ksenonska lampa koja generira zračenje elektromagnetskog spektra slično Sunčevom zračenju u prirodi (200-800 nm).



**Slika 19.** Instrument Suntest CPS+, Njemačka

### **3.2.9. Instrument LUMISTox 300 s inkubacijskim blokom LUMISTherm**

Ispitivanje toksičnosti uzoraka provedeno je na instrumentu LUMISTox 300 proizvođača Dr Lange, Njemačka (**Slika 20.**). Instrument je razvijen kako bi mjerio luminiscenciju bakterija. Za termostatiranje bakterijske suspenzije i uzoraka koristio se inkubacijski blok LUMISTherm. Instrument LUMISTox 300 u kombinaciji s inkubacijskim blokom LUMISTherm čini sustav koji odgovara tehničkim zahtjevima DIN 38412 L34 i L341 te međunarodnom standardu ISO DIS 11384. Operativni sustav instrumenta nalazi se na disketi. Nova programska proširenja i ažuriranja dolaze na novim disketama. LUMISTox 300 ima ugrađenu fotometarsku funkciju i automatsko mjerenje te je omogućeno prepoznavanje boja pri ispitivanju luminiscentnih bakterija. U slučaju obojene otopine uvodi se korekcija. Također, fotometarska funkcija omogućuje da se uređaj koristi za određivanje optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene rasta inhibicije u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost LUMIS24-tox (LCK486). Instrument posjeduje i automatski referentni upravljački sustav kojim se provjerava funkcioniranje cijelog mjerenja prije provedbe testa svake serije luminiscentnih bakterija. [51]



**Slika 20.** Instrument LUMISTox 300 s inkubacijskim blokom LUMISTherm, Njemačka

### 3.2.10. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju

Ekstrakcija pripremljenih uzoraka špikanog mulja i realnog uzorka nakon biorazgradnje provedena je djelovanjem mikrovalnog zračenja u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju, MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) 1200 W (**Slika 21.**). Uređaj omogućuje istovremenu ekstrakciju do 12 uzoraka smještenih u karusel. U referentnoj posudi nalazi se osjetilo tlaka i temperature što omogućuje izravno praćenje ovih parametara tijekom postupka ekstrakcije te automatsku regulaciju unaprijed definiranih uvjeta ekstrakcije. Za ekstrakciju su korištene 100 mL teflonske “GreenChem” posude (**Slika 22.**) zatvorene tijekom postupka ekstrakcije tako da se spriječi gubitak otapala i analita. [52]





**Slika 21.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s teflonskim posudama za uzorke prije pokretanja ekstrakcije



**Slika 22.** Teflonske “GreenChem” posude

### 3.2.11. Uparivač (rotavapor)

Za uparavanje ekstrakata nakon mikrovalne ekstrakcije korišten je rotavapor, Büchi Rotavapor R-114, Švicarska. Uređaj se sastoji od jedinice za rotiranje tikvice, vodene kupelji za održavanje povišene temperature te povratnog hladila i tikvice za prikupljanje kondenzata. Nakon mikrovalne ekstrakcije, profiltrirani ekstrakti preneseni su u tikvicu okruglog dna koja se uranja u vodenu kupelj zagrijanu na 40 °C. Tikvica je spojena na sustav u kojemu vlada sniženi tlak koji se postiže vodenom vakum sisaljkom. Tijekom uparavanja tikvica rotira u vodenoj kupelji zbog boljeg prijenosa topline.



**Slika 23.** Rotavapor, Büchi Rotavapor R–114

### 3.2.12. Sušionik

Za sušenje filter papirića i za sušenje papirića s uzorcima za određivanje suspendiranih čestica u biorekatoru (eng.- *Mixed liquor suspended solids*, MLSS) korišten je laboratorijski sušionik prikazan na **Slici 24**, proizvođača Instrumentarija Zagreb, Hrvatska (Jugoslavija).



**Slika 24.** Sušionik Instrumentarija Zagreb, Hrvatska (Jugoslavija)

### 3.2.13. Mufolna peć

Za žarenje uzoraka s ciljem određivanja anorganskog i organskog dijela u mulju nakon biorazgradnje, koristila se mufolna peć proizvođača Nabertherm GmbH, Njemačka (Slika 25.).



Slika 25. Mufolna peć, proizvođača Nabertherm GmbH, Njemačka [53]

## 3.3. METODA RADA

### 3.3.1. Priprema otopina

#### Otopine pesticida

Masene koncentracije temeljne standardne otopine (TSO) iznosile su  $100 \text{ mg L}^{-1}$  za sve pesticide, acetamiprid, klotianidin i tiaklopid. Priprema TSO obuhvaća otapanje  $10,0 \text{ mg}$  pesticida u deioniziranoj (MilliQ) vodi te nadopunjavanje u tikvici od  $100 \text{ mL}$ . Tikvica se dodatno uranja u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzao i poboljšao proces otapanja pesticida. Za svaki pesticid pripremljene su dvije takve TSO za dva reaktora od  $1 \text{ L}$  u kojima se provodio proces šaržne biorazgradnje. Te TSO su dodane direktno u reaktore kako bi koncentracija pesticida u reaktorima od  $1 \text{ L}$  iznosila  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### Otopine antiparazitika

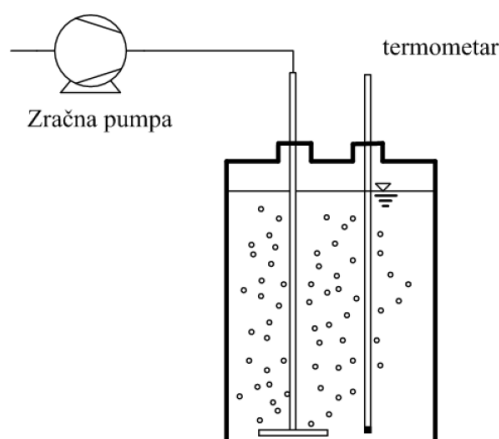
Masene koncentracije temeljne standardne otopine (TSO) iznosile su  $100 \text{ mg L}^{-1}$  za sve antiparazitike, albendazol, febantel i mebendazol. Priprema TSO obuhvaća otapanje  $10,0 \text{ mg}$  antiparazitika u metanolu te nadopunjavanje u tikvici od  $10 \text{ mL}$ . Tikvica se dodatno uranja u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzao i poboljšao proces otapanja antiparazitika. Za svaki antiparazitik također su pripremljene dvije TSO za dva reaktora od  $1 \text{ L}$  u kojima se provodio proces šaržne biorazgradnje. TSO su dodane direktno u reaktore kako bi koncentracija

pesticida u reaktorima od 1 L iznosila  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Pošto je u reaktorima u najvećem udjelu voda u kojoj se antiparazitici ne otapaju, nakon dodavanja TSO reaktori su uronjeni u ultrazvučnu kupelj kako bi se što više poboljšalo njihovo otapanje.

### 3.3.2. Priprema aktivnog mulja

Aktivni mulj koji se koristi u procesima šaržne biorazgradnje prije pokusa je potrebno pripremiti. Ugušćen je taloženjem tijekom 30 minuta i odekantiran je supernatant. Nakon dekantiranja, mulj je ispran vodovodnom vodom da bi se uklonili ostaci supstrata i odumrle stanice mikroorganizama. Postupak je ponovljen tri puta.

### 3.3.3. Proces šaržne biorazgradnje - aeriranje otopina u 3 reaktora



**Slika 26.** Shema aparature za biorazgradnju [17]

Proces šaržne biorazgradnje se provodio u staklenim bocama širokog grla volumena 1 L. Ukupan radni volumen se sastojao od radne otopine ksenobiotika masene koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  i aktivnog mulja u omjeru  $300 \text{ mL L}^{-1}$ . Reaktori su omatani aluminijskom folijom kako bi se spriječilo stvaranje foto-razgradnih produkata nastalih djelovanjem Sunčevog zračenja na ksenobiotike (**Slika 27.**). Reaktori su konstantno aerirani pomoću akvarijske zračne pumpe koja je gumenom cijevi preko filtera za zrak spojena sa staklenim štapićem koja je uronjena u sadržaj reaktora kako bi se osigurala dobava zraka na dno spremnika. Aeriranje otopine ujedno i osigurava miješanje sadržaja u reaktorima kako bi smjesa bila homogena.



**Slika 27.** Reaktori u kojima se provodio proces šaržne biorazgradnje

Proces biorazgradnje praćen je u dva reaktora (1. i 2. reaktor) te paralelno, uz pokuse biorazgradnje, za svaki odabrani ksenobiotik, u 3. reaktoru pri istim procesnim uvjetima, provedeni su pokusi bez dodanog aktivnog mulja. Taj 3. reaktor služio je i za praćenje hidrolitičkog raspada ksenobiotika. **Tablica 15** prikazuje sadržaje sva 3 reaktora.

**Tablica 15.** Sadržaj pojedinih reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje

REAKTOR	SADRŽAJ
1. reaktor	300 mL ugušćenog mulja + otopina ksenobiotika koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>
2. reaktor	300 mL ugušćenog mulja + deionizirana voda
3. reaktor	Otopina ksenobiotika koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>

### 3.3.4. Uzorkovanje tijekom procesa šaržne biorazgradnje

Prilikom provođenja pokusa bilo je potrebno pratiti niz parametara: pH-vrijednost otopina, temperaturu otopina u reaktorima, MLSS, organski i anorganski udio u mulju, KPK i BPK. Temperatura i pH-vrijednost pratila se na početku reakcije te u 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 8 h, 12 h, i 24 h. Uzorci za kromatografsku analizu uzimani su u istim vremenskim intervalima, dok su se uzorci za određivanje toksičnosti uzimali na kraju procesa biorazgradnje. Uzorci za određivanje KPK uzimani su iz prvog i drugog reaktora na početku

reakcije te nakon 4 h, 8 h, 12 h i 24 h. Uzorci za određivanje BPK također su uzimani iz prvog i drugog reaktora, ali samo na početku i na kraju reakcije. Uzorkovanje se vršilo pomoću plastičnih šprica te su uzorci profiltrirani.

### **3.3.5. Mikrovalna ekstrakcija**

#### **Priprema otopina za mikrovalnu ekstrakciju**

Uzorci aktivnog mulja se namjerno zagađuju otopinama ksenobiotika, tj. špikaju se s ciljem određivanja koncentracija ekstrahiranih ksenobiotika u odnosu na standardne otopine. Radne otopine kojim se špikao mulj pripremljene su u koncentracijama 0,1 , 0,5 , 1, 3, 5, 7, 10 i 15 mg L<sup>-1</sup>. Na temelju dobivenih kalibracijskih pravaca i jednadžbe pravca određivane su koncentracije ksenobiotika ekstrahirane sa mulja nakon procesa šaržne biorazgradnje.

#### **Priprema uzoraka za mikrovalnu ekstrakciju**

Nakon procesa šaržne biorazgradnje aktivni mulj iz prvog reaktora (reaktora koji je sadržavao ksenobiotik) priprema se za realni uzorak (RU), a mulj iz drugog reaktora (reaktora koji je sadržavao samo mulj) koristi se za pripremu uzoraka mulja koji će se špikati pripremljenim otopinama i za slijepu probu (SP).

Sadržaj reaktora se profiltrira te se u čaše od 100 mL na tehničkoj vagi važe 8,5 g aktivnog mulja zaostalog na filter papiru i u svaku čašu se dodaje deionizirane vode do oznake od 20 mL. Staklenim štapićem se dobro promiješa kako bi bilo homogeno. Pripremljeni i homogeni uzorci profiltriranog mulja važu se u lađice po 0,3 g. Od mulja iz prvog reaktora važe se za realni uzorak, a iz drugog reaktora se važe za slijepu probu i osam uzoraka koji se špikaju pripremljenim otopinama. Na **Slici 28** su prikazane dvage uzoraka mulja.



**Slika 28.** Odvage uzoraka aktivnog mulja

Zatim se u RU i SP dodaje 1 mL deionizirane vode, a u ostale uzorke se dodaje po 1 mL pripremljene otopine za špikanje odgovarajuće koncentracije. Staklenim štapićem se homogeniziraju uzorci u lađicama. Homogenizirani uzorci se pomoću 5 mL metanola prebacuju u teflonske posude za mikrovalnu ekstrakciju.

### **Proces mikrovalne ekstrakcije**

Teflonske posude sa uzorcima se postavljaju na karusel i dobro pričvršćuju kako tijekom ekstrakcije ne bi došlo do istjecanja para otapala. Na referentnu posudu je pričvršćen senzor za tlak i temperaturu i sve zajedno je smješteno u mikrovalnu pećnicu.

Radni uvjeti pri kojima se provodila ekstrakcija mikrovalovima iznose:

Napon: 220/110 V

Temperatura: 50 °C

Snaga: 600 W, 1200 W Tlak: 200 psi

Vrijeme: 15 min

Nakon mikrovalne ekstrakcije uzorci su filtrirani na standardnoj aparaturi za filtraciju prikazanoj na **Slici 29**. Neposredno prije filtracije filter papir je navlažen s otopinom etanola kako bi tijekom filtracije gubitak uzorka na filter papiru bio što manji.



**Slika 29.** Aparatura za filtraciju uzoraka nakon mikrovalne ekstrakcije

Filtrat se sakupljao u tikvice s okruglim dnom te se uparavao do suha na rotavaporu. Iz suhe tikvice uzorak je rekonstruiran s 1 mL metanola HPLC čistoće i prebačen u vialu za kromatografsku analizu.

### 3.3.6. Fotoliza otopina ksenobiotika

U svakom ciklusu bile su četiri kvarcne posudice s otopinama ksenobiotika nakon provedenog procesa šaržne biorazgradnje. **Tablica 16** prikazuje sadržaj posudica u svakom ciklusu.

**Tablica 16.** Sadržaj posudica u svakom ciklusu ispitivanja fotokatalitičke razgradnje

POSUDICA	SADRŽAJ
1.posudica	otopina iz 1. reaktora biorazgradnje s muljem
2.posudica	profiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje
3.posudica	profiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20 mmol L <sup>-1</sup> )
4.posudica	profiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje + NaOCl (1 mg L <sup>-1</sup> )

Sve četiri kvarcne posudice stavljene su na zračenje u instrument Suntest CPS+ koje imitira Sunčevo zračenje (**Slika 30.**). Temperatura pri kojoj su zračeni uzorci u Suntest CPS+ uređaju iznosila je 25 °C, intenzitet zračenja 500 W m<sup>-2</sup>, a vrijeme izlaganja uzoraka zračenju bilo je 5 sati.





**Slika 30.** Kvarcne posudice s pripremljenim otopinama za fotolizu

### **Uzorkovanje tijekom procesa fotolize**

Uzorci za kromatografsku analizu uzimani su na početku te u 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h i 5 h, dok su se uzorci za određivanje toksičnosti uzimali na kraju procesa biorazgradnje. Uzorkovanje iz prve posudice se vršilo pomoću plastičnih šprica te su uzorci profiltrirani. Prilikom provođenja pokusa fotolize na početku i na kraju se pratila pH-vrijednost i koncentracija kisika.

### **3.3.7. Suspendirane čestice u bioreaktoru (MLSS)**

Za određivanje suspendiranih čestica najprije je potrebno filter papir staviti u sušionik na 1 h na 105 °C. Nakon toga papir se ostavlja u eksikatoru dok se ne ohladi te se važe i postavlja u lijevak spojen na posudu za odsisavanje koja je gumenom cijevi spojena na izvor vakuuma. Nakon stvaranja vakuma dodaje se 5 mL uzorka s muljem. Filtracija uzorka prikazana je na **Slici 31**.



**Slika 31.** Filter lijevak s vakum sisaljkom

Nakon završetka filtracije, filtrat se spremi za daljnju analizu kemijske potrošnje kisika, a filter papir se suši u sušioniku sat vremena na 105 °C, a potom drži u eksikatoru 1 h. Osušeni papirići s uzorkom spremni za vaganje prikazni su na **Slici 32**. Nakon toga se važe, a MLSS se računa prema izrazima **(1)** i **(2)**:

$$m(\text{mulja}) = m(\text{uk}) - m(\text{papir}) \quad (1)$$

$$MLSS = m / V \quad (2)$$

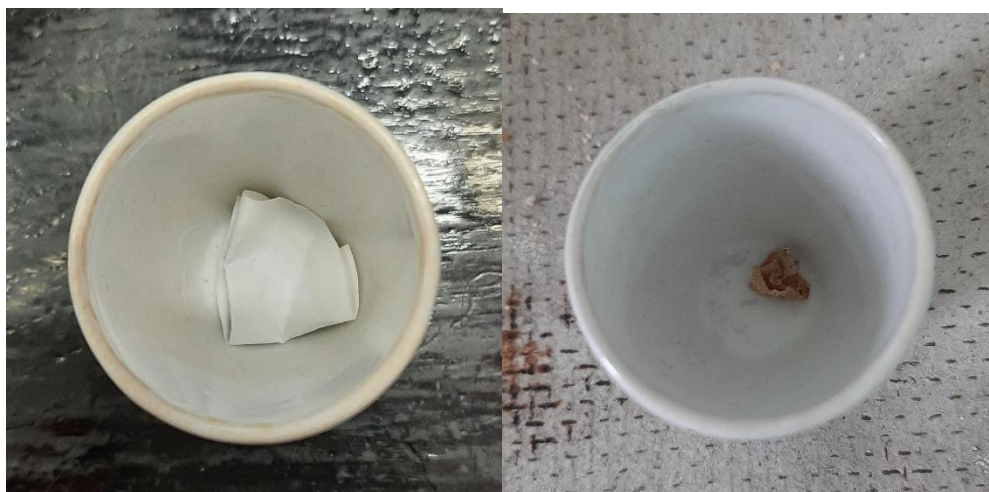
Nakon vaganja, papirić s uzorkom se stavlja u porculanski lončić za žarenje kako bi se odredila organska i anorganska tvar.



**Slika 32.** Osušeni uzorci za određivanje suspendiranih čestica u bioreaktoru

### **3.3.8. Određivanje organske i anorganske tvari**

Određivanje organske i anorganske tvari, odnosno gubitka i ostatka žarenjem, provodi se žarenjem papirića preostalog nakon određivanja suspendirane tvari s uzorkom u porculanskim lončićima. Porculanski lončić s uzorkom se prvo žari na plameniku otprilike 20 minuta, a zatim u mufolnoj peći na 550 °C 2 sata. Uzorak za žarenje prije i nakon žarenja prikazan je na **Slici 33.**



**Slika 33.** Uzorci za žarenje prije (lijevo) i nakon (desno) žarenja

### **3.3.9. Određivanje kemijske potrošnje kisika – KPK**

Kemijska potrošnja kisika definira se kao količina specifičnog oksidansa koja reagira s uzorkom pri kontroliranim uvjetima. Jaki kemijski oksidansi se u kiseloj otopini zagrijevaju s ciljem oksidacije organskog ugljika na ugljikov dioksid i vodu. Količina potrošenog

oksidansa se izražava kao ekvivalent kisika. Kemijska potrošnja kisika se već duže vrijeme koristi kao pokazatelj onečišćenja vode. Prednost ovakvih testova je da toksičnost ispitivanih uzoraka ne utječe na oksidanse i kratko vrijeme analize (90-180 min). [54]

KPK vrijednost u ovom radu određivana je standardnom metodom APHA 5520 C. U suhoj i čistoj staklenoj kiveti se nalazi 1,2 mL otopine kalijevog bikromata i živinog (II) sulfata u koju se trbušastom pipetom dodaje 2 mL profiltriranog uzorka, a zatim se još pažljivo uz rub kivete doda 2,8 mL otopine sulfatne kiseline i srebrovog sulfata. Čvrsto se zatvori i pažljivo promiješa jer se stvara visoka temperatura. Staklene kivete s uzorcima prikazane su na **Slici 34**. Kivete se stave u zagrijani termoreaktor na 2 h na 150 °C, kivete se hlade i zatim se direktno očitava KPK vrijednost u  $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$  spektrofotometrijski pri  $\lambda=600 \text{ nm}$ .

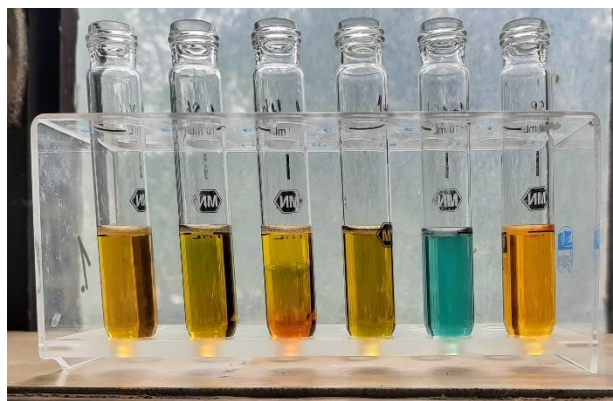


**Slika 34.** Staklene kivete s uzorcima za određivanje KPK

Ukoliko se tijekom pripreme uzorka otopina u kivetici oboji zeleno-plavo, uzorak je prekoncentriran te ga je potrebno razrijediti prema formuli:

$$\text{razrijeđenje} = \frac{V(\text{ukupan})}{V(\text{uzorak})}$$

Na **Slici 35** je prikazana razlika obojenja obzirom na koncentraciju uzorka. Uzorak koji je obojan plavo-zeleno je prekoncentriran i nije mu moguće spektrofotometrijski izmjeriti kemijsku potrošnju kisika.



**Slika 35.** Staklene kivete s različito koncentriranim uzorcima za određivanje KPK

### 3.3.10. Određivanje biokemijske potrošnje kisika – BPK

Biokemijska potrošnja kisika je količina kisika koja je potrebna da se izvrši biokemijska oksidacija prisutnih biološki razgradljivih sastojaka vode. BPK vrijednost predstavlja količinu kisika koju potroše mikroorganizmi pri prirodnom aerobnom samoprociscavanju u vodi. U praksi se određuje ili potpuna BPK ili za period od 21 dan ( $BPK_{21}$ ), ali kako je proces najintenzivniji prvih pet dana, najčešće se određuje vrijednost za 5 dana ( $BPK_5$ ). [55]

U ovom radu korišten je postupak određivanja  $BPK_5$  uzoraka metodom po Winkler-u. Za svaku analizu i za svaki uzorak potrebno je imati dvije boce po Winkler-u (A i B boca) te ih napuniti do polovine vodom za razrijeđenje. U bocu B dodaje se 2 mL uzorka trbušastom pipetom, a boca A služi kao slijepa proba te se dodaje 1 mL cjeviva u obje boce. Boce se pažljivo napune do vrha vodom za razrijeđenje tako da u boci nema mjehurića zraka te se pažljivo zatvore. Bocu B se odmah stavlja na inkubaciju 5 dana pri 20 °C. U boci A se odmah određuje otopljeni kisik metodom po Winkler-u.

Bocu se pažljivo otvori te se doda 1 mL otopine  $MnSO_4$  tako da vrh graduirane pipete od 1 mL bude malo uronjen ispod površine. Na isti način se doda 1 mL KI, bocu se začepi i dobro promućka. Zatim je potrebno pustiti da se stvoreni talog do polovine istaloži te se ponovno promućka. Doda se 1 mL koncentrirane  $H_2SO_4$  (u digestoru), ponovno se začepi i odmah promućka toliko dugo dok se nastali talog potpuno ne otopi. Bocu se ostavlja 5 min da odstoji. U Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL se otpipetira trbušastom pipetom 100 mL otopine iz boce i odmah se titrira s  $0,01 \text{ mol L}^{-1} Na_2S_2O_3$  do svijetložute boje. Zatim se doda 1 mL škrobnog indikatora i ponovno se titrira do nestanka plave boje. Titracija je završena kod prvog nestanka plave boje te je potrebno zabilježiti volumen utrošenog  $0,01 \text{ mol L}^{-1} Na_2S_2O_3$ .

Titriraju se uvijek paralelno dvije probe i u izračun se uzima srednja vrijednost. Prilikom računanja količine otopljenog kisika u mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> treba uzeti u obzir da 1 mL 0,01 mol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> odgovara 0,08 mg kisika. [56]

### 3.3.11. Određivanje toksičnosti

#### Hranjiva podloga

Hranjiva podloga služi za uzgajanje bakterija *in vitro* i održavanje čiste kulture. Priprema se otapanjem sastojaka (**Tablica 17.**) u deioniziranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja. Pošto neotopljeni kalcijev karbonat može zagoriti, otopina se zagrijava u tikvici uronjenoj u vodenu kupelj. Čim zavrije, hranjivu podlogu je potrebno maknuti iz kupelji kako ne bi iskipila. Zatim se hranjiva podloga sterilizira u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Kada se sterilizirana hranjiva podloga ohladi na 45 °C, izlije se u sterilizirane Petrijeve zdjelice u sloj maksimalne debljine od 5 mm. Pripremljena hranjiva podloga čuva se u hladnjaku na 4 °C. [5]

**Tablica 17.** Abecedni popis sastojaka hranjive podloge

Sastojci	Kemijska formula	u 1000 mL
agar	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	15 g
glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	10 g
kalcijev karbonat	CaCO <sub>3</sub>	3 g
kvašćev ekstrakt	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	5 g
natrijev klorid	NaCl	30 g
pepton	-	5 g

#### Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. Priprema se otapanjem sastojaka (**Tablica 18.**) u deioniziranoj vodi te se prokuha, ohladi i profiltrira. Profiltriranu otopinu se sterilizira u autoklavu 15 minuta na 121 °C. Otopinu za resuspenziju moguće je čuvati u hladnjaku na 4 °C oko dva tjedna ili do pojave zamućenja. Također, sterilnu otopinu moguće je prelići u manje bočice i zamrznuti. Prije svakog korištenja otopine potrebno je provjeriti pH-vrijednost. Ukoliko je pH-vrijednost otopine u intervalu od 6,8 do 7,2 otopina se može koristiti, u suprotnom pH-vrijednost se podešava dodavanjem kapi NaOH ili HCl.

**Tablica 18.** Abecedni popis sastojaka otopine za resuspenziju

Sastojci	Kemijska formula	u 1000 mL
D - glukoza	$C_6H_{12}O_6$	10 g
D - rafinoza pentahidrat	$C_{18}H_{32}O_{16}$	10 g
glicerol	$C_3H_8O_3$	0,5 mL
kalcijev klorid	$CaCl_2$	0,5 g
kalijev dihidrogen fosfat	$KH_2PO_4$	0,2 g
magnezijev sulfat	$MgSO_4$	0,2 g
natrijev klorid	$NaCl$	36 g

### **Radna otopina za resuspenziju i otopina referentnih tvari**

Radna otopina koja se koristi za pripremu niza razrijeđenja je 2 % NaCl, otapa se 20 g NaCl u 1 L deionizirane vode. Dobivena otopina se sterilizira 15 minuta u autoklavu na 121 °C. Otopina referentnih tvari je otopina  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  masene koncentracije 25 mg L<sup>-1</sup>. Otopina referentnih tvari je radni standard koji se koristi za provjeru valjanosti bakterijske suspenzije. Bakterija *Vibrio fischeri* se u prirodi nalazi u morskom okruženju i dodavanjem otopine NaCl imitira se njeno prirodno stanište, a otopina soli kao što je  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  ubija ovu bakteriju. Kivete za ispitivanje toksičnosti moraju biti u termostatom bloku 15 minuta na 15 °C prije početka izvođenja testa.

### **Sterilna tehnika rada**

Nužna je sterilna tehnika rada kako bi radnu okolinu zaštitili od mikroorganizama, odnosno kako bi se radni pribor i ispitivani uzorci osigurali od nečistoća s radne površine i iz zraka. U sterilnoj tehnici rada prvo se pali plamenik na oksidirajući plamen, zatim se radna površina pošprica i očisti etanolom (anisolom, izosanom, antiseptikom ili bilo kojom drugom hlapljivom tvari koja sterilizira). Sav pribor (eza, kiveta, grlo bočice) potrebno je sterilizirati provlačenjem kroz plamen. Tijekom rada pribor je potrebno držati u neposrednoj blizini plamenika i sve radnje obavljati oprezno uz plamen.

### **Aktivacija liofiliziranih bakterija**

Koristi se sterilna tehnika rada. Kivetu s liofiliziranim bakterijama se izvadi iz zamrzivača i odmah se u nju ulije 1 do 2 mL 2 % - tne otopine NaCl ili otopine za reaktivaciju. Pripremljena suspenzija se termostatira 15 minuta na 15 °C kako bi se bakterijska kultura adaptirala. Zatim se provjerava aktivnost bakterijske kulture. Mjeri se relativna luminiscencija bakterija na instrumentu LUMIStox 300 programom LU. Luminiscencija suspenzije mora biti najmanje 1000. U tom slučaju pripremljena suspenzija je valjana i izlije se na sterilnu hranjivu podlogu te razvuče sterilnom ezom po cijeloj podlozi *cik-cak* potezima. Tako pripremljena kultura bakterija čuva se u Petrijevim zdjelicama, u mračnoj prostoriji na temperaturi od 15 do 22 °C , optimalna temperatura je 18 °C. Nakon 24 do 48 sati bakterije bi trebale intenzivno svijetliti u mraku što je znak da su zdrave i spremne za mjerenje toksičnosti. Kulture bakterija mogu se koristiti 2 dana nakon pripreme, pa sve do 9 dana, optimalno je 2 do 4 dana nakon pripreme jer već nakon toga uočava se smanjena luminscencija bakterija što je znak smanjene stabilnosti bakterijske suspenzije. [5]

### **Bakterijska suspenzija**

Sterilnom tehnikom rada, kivetu se napuni otopinom za resuspenziju otprilike 2/3 ukupnog volumena. Steriliziranom i ohlađenom ezom se po hranjivoj podlozi skupi grudica bakterijske kulture i otapa se u otopini za resuspenziju u kiveti. Bakterijska suspenzija iz kivete se prelije u sterilnu staklenu bočicu s čepom te dolijeva otopine za resuspenziju dok se ne dobije dovoljno bakterijske suspenzije za mjerenje toksičnosti. Prije provođenja testa toksičnosti potrebno je suspenziju ostaviti 15 minuta u termostatu na 15 °C kako bi se bakterijska kultura adaptirala.

### **Priprema mjerenja**

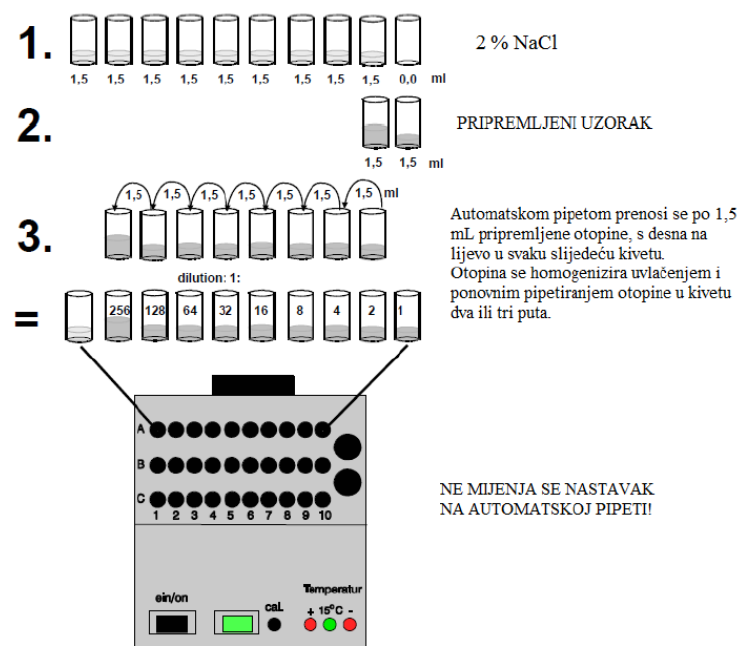
Prije svakog mjerenja izvodi se test valjanosti bakterijske kulture. Postavljaju se dvije kivete. U prvu kivetu, referentnu, stavlja se 0,5 mL 2 % - tne otopine NaCl i 0,5 mL bakterijske suspenzije. U drugu kivetu, test kivetu, stavlja se 0,5 mL otopine ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O masene koncentracije 25 mg L<sup>-1</sup> i 0,5 mL bakterijske suspenzije. Pripremljene kivete se termostatiraju 15 minuta na 15 °C te se pokreće SCRIN program. U luminometar se prvo stavlja referentna kiveta, a zatim testna. Inhibicija referentne otopine mora biti između 20 % i 80 % da bi se



moglo započeti s mjerenjem toksičnosti, u suprotnom potrebno je pripremiti novu bakterijsku suspenziju.

### Geometrijski niz razrjeđenja

Termostatni blok LUMIStherm ima tri reda, A, B i C red, svaki red ima 10 mjesta za kivete. U A red se pripremi kiveta za niz željenih razrjeđenja. U prvu kivetu se pipetira otprilike 2/3 volumena kivete 2 % - tne otopine NaCl, u zadnju se pipetira 2/3 otopine pesticida, a u ostale kivete iz A reda se pipetira po 1,5 mL 2 % - tne otopine NaCl. Zatim, počevši od kivete A10 prebacuje se po 1,5 mL otopine iz kivete u kivetu na lijevo. U kivetu A1 se ne prebacuje ništa, u njoj ostaje čista 2 % - tna otopina NaCl. Kod pripreme ovih razrjeđenja važno je paziti na homogenost uzoraka u svim kivetama. U B i C red se pripreme kivete u koje se stavi 0,5 mL bakterijske otopine. Na **Slici 36** prikazana je shema pripreme geometrijskog niza razrjeđenja.



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

**Slika 36.** Priprema geometrijskog niza razrjeđenja [51]

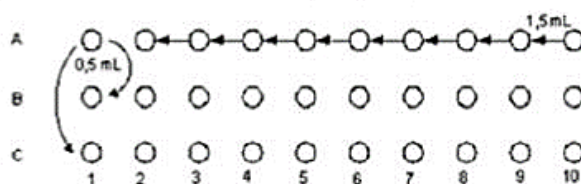
### Mjerenje i očitavanje rezultata

Na glavnom izborniku instrumenta LUMIStox 300 odabere se program EC koji mjeri luminiscenciju i odabiru se željeni parametri mjerenja (**Tablica 19.**). Kiveta B1 se stavlja u luminometar, očitava i zapisuje se njezina vrijednost, zatim se vraća u termostatski blok, a u

luminometar se postavlja kiveta C1. Za vrijeme dok je kiveta C1 u luminometru, iz kivete A1 u kivetu B1 se pipetira 0,5 mL otopine. Očitava se i zapisuje vrijednost za kivetu C1, vraća ju se u termostatski blok i u luminometar se stavlja kiveta B2. Ponovno, za vrijeme dok se kiveta B2 nalazi u luminometru, iz kivete A1 u kivetu C1 se pipetira 0,5 mL otopine. Ovaj postupak se ponavlja sve do kraja niza. Potom se sve kivete ponovno termostatiraju 30 minuta. Po isteku tog vremena ponovno se mjeri luminiscencija uzoraka na opisan način (Slika 37.), počevši s kivetom B1.

**Tablica 19.** Eksperimentalni uvjeti EC programa na instrumentu LUMIStox 300

$\lambda$	480 nm
<b>dilution steps</b>	8
<b>type of dilution</b>	2
<b>unit</b>	%
<b>inic. conc.</b>	100 %
<b>time of inc.</b>	30 min



**Slika 37.** Shematski prikaz mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz [51]

### 3.4. ODREĐIVANJE UČINKOVITOSTI RAZGRADNJE

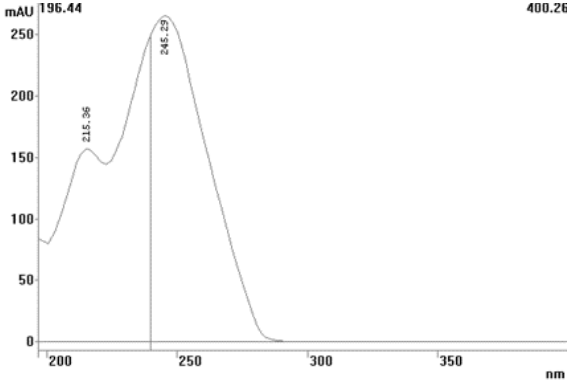
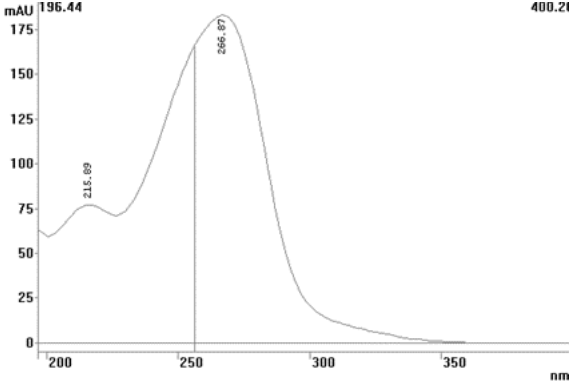
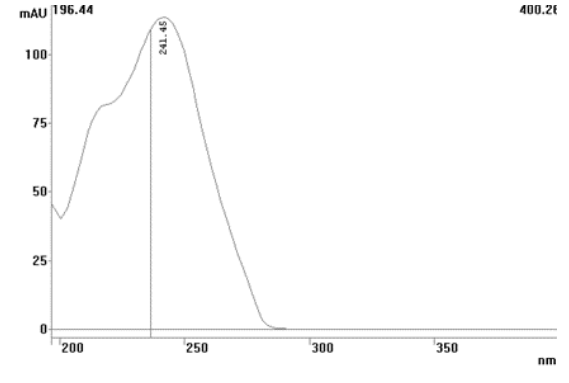
Kako bi bilo moguće detektirati ispitivane antiparazitike i pesticide korišteni su kvalitativni parametri kromatograma, a to su vrijeme zadržavanja ( $t_R$ , min) i apsorpcijski spektri, karakteristični za svaku ispitivanu komponentu. Da bi bilo moguće kromatografskim metodama analizirati ksenobiotike snimljeni su apsorpcijski spektri za svaku istraživanu komponentu kako bi se odredio maksimum apsorpcije. Nužno je detektirati istraživane komponente i prema vremenu zadržavanja kako bi se sa sigurnošću znalo da u sustavu određujemo upravo traženi analit. Dakle, prilikom detekcije kada provodimo ciljanu analizu, poželjno je imati što više kvalitativnih parametara pomoću kojih će se sa sigurnošću moći odrediti istraživane spojeve čak i u vrlo složenim maticama poput ovih nastalih tijekom

procesa biorazgradnje. Parametri za detekciju istraživanih spojeva antiparazitika u ovome radu prikazani su u **Tablici 20** te spojeva pesticida u **Tablici 21**.

**Tablica 20.** Apsorpcijski spektri, maksimumi adsorpcije i vrijeme zadržavanja istraživanih čistih antiparazitika u standardnoj otopini masene koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup>

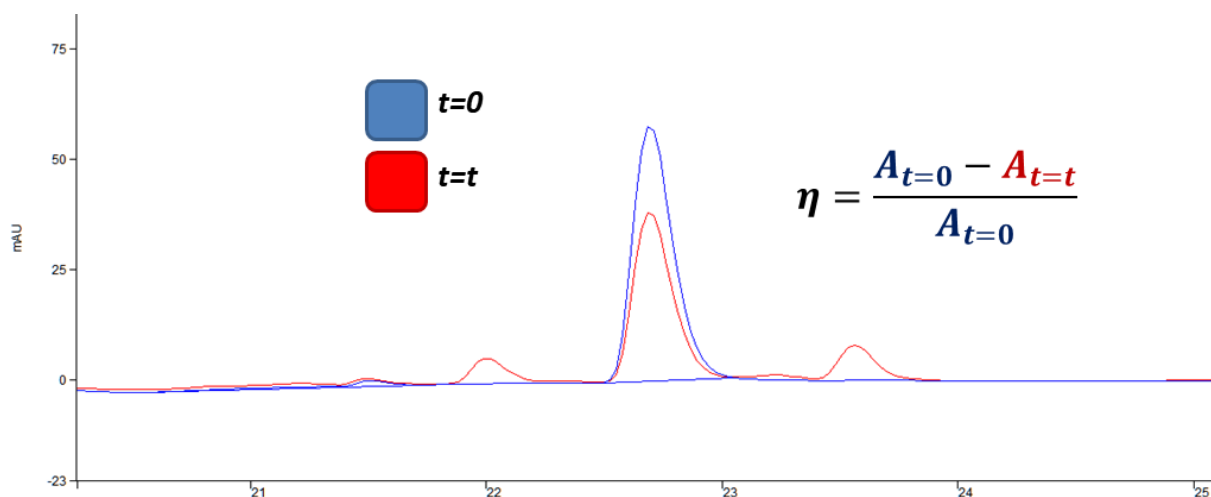
Antiparazitik	Apsorpcijski spektar	$\lambda$ , nm	$t_R$ , min
Albendazol		210	19,334
Febantel		210	22,093
Mebendazol		254	18,986

**Tablica 21.** Apsorpcijski spektri, maksimumi adsorpcije i vrijeme zadržavanja istraživanih čistih pesticida u standardnoj otopini masene koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup>

Pesticid	Apsorpcijski spektar	$\lambda$ , nm	$t_R$ , min
Acetamiprid		245	21,853
Klotianidin		265	21,480
Tiaklopid		241	22,653

U programskom paketu Star 5.2 nalazi se aplikacija *Interactive Graphics Application* koja omogućava vizualizaciju rezultata u obliku kromatograma. Pošto se kromatogrami dobivaju kao rezultati kromatografske analize, svaku ispitanu komponentu moguće je odrediti

kvalitativno i kvantitativno. Očitavanjem površine ispod kromatografske krivulje za svaki pojedini ksenobiotik moguće je pratiti kako se mijenja prisutnost pojedine komponente pod različitim utjecajima ispitivanja provedenim u ovom eksperimentalnom dijelu. Prema tome, usporednom površina kromatografskih krivulja svakog pojedinog ksenobiotika bilo je moguće izračunati učinkovitost njegove razgradnje preko relativne površine između uzorka u  $t=0$  h i  $t=t$  prema jednadžbi vidljivoj na **Slici 38**.



**Slika 38.** Prikaz kromatograma ksenobiotika u  $t=0$  i  $t=t$  uz jednadžbu za izračun učinkovitosti razgradnje [31]

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI ŠARŽNE BIORAZGRADNJE

Tijekom provođenja procesa šaržne biorazgradnje pojedinačnih ksenobiotika praćene su promjene fizikalno-kemijskih parametara. Praćeni su pH-vrijednost, temperatura svakog reaktora, koncentracija kisika, suspendirane čestice u bioreaktoru (MLSS), gubitak žarenjem (organska tvar), žareni ostatak (anorganska tvar), kemijska potrošnja kisika (KPK), biokemijska potrošnja kisika (BPK<sub>5</sub>) i količina adsorbiranog ksenobiotika na mulj (mikrovalna ekstrakcija).

#### 4.1.1. Razgradnja acetamiprida

##### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za acetamiprid za pH-vrijednost, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 22**. U reaktorima s muljem se ne uočavaju značajne promjene pH-vrijednosti te su one unutar intervala od 6,5 – 8,5 koji odgovara optimalnoj biološkoj aktivnosti. [57] Treći reaktor ima nižu vrijednost pH od prva dva reaktora što je očekivano jer nema prisutnog mulja. Ne dolazi do značajne promjene temperature tijekom 24 sata. Uslijed aeracije u prva dva reaktora dolazi do povećanja vrijednosti koncentracije kisika.

**Tablica 22.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida

t, h	1.reaktor MULJ + ACETAMIPRID			2.reaktor MULJ			3.reaktor ACETAMIPRID	
	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C
0	7,37	22,0	6,00	7,57	21,5	4,74	5,80	21,0
0,5	7,51	22,0	-	7,36	21,5	-	5,56	21,0
1	7,48	21,5	-	7,54	21,0	-	5,61	20,5
2	7,76	21,5	-	7,74	20,5	-	5,71	20,0
3	7,78	21,0	-	7,77	20,5	-	6,19	19,5
4	7,77	21,0	-	7,75	20,0	-	5,78	19,0
5	7,81	21,0	-	7,79	19,5	-	5,74	19,0
8	7,79	20,5	8,09	7,77	19,5	7,95	5,71	19,0
12	7,79	20,5	8,23	7,78	19,5	8,10	5,85	19,0
24	7,71	20,0	8,29	7,69	19,0	8,19	5,82	19,0

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za suspendirane čestice, MLSS, u procesu biorazgradnje acetamiprida prikazane su u **Tablici 23**. MLSS govori o količini aktivnog mulja

u pojedinim uzorcima od 5 mL. Iz dobivenih podataka uočava se porast ukupnih suspendiranih čestica u prvom reaktoru, dok u drugom reaktoru opada.

**Tablica 23.** Dobivene vrijednosti ukupne suhe tvari prilikom biorazgradnje acetamiprida

	1.rektor MULJ + ACETAMIPRID	2.reaktor MULJ
<i>t, h</i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>
0	1,86	2,06
4	1,86	-
8	1,86	-
12	1,98	-
24	1,98	2,00

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem, odnosno za udio anorganske i organske tvari kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 24**. Za biorazgradnju acetamiprida ne uočava se pravilna promjena organskog i anorganskog udjela tvari. Promjena udjela organske tvari, odnosno njezino smanjenje upućuje na to da mikrobiologija aktivnog mulja odumire te odumiranjem dolazi do povećanja anorganskog udjela u bioreaktor u koje nije značajno.

**Tablica 24.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje acetamiprida

<i>t, h</i>	<i>m(org), g</i>	<i>m(anorg), g</i>
0	0,0022	0,1506
4	0,0019	0,1500
8	0,0021	0,1466
12	0,0018	0,1469
24	0,0022	0,1526

U **Tablici 25** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Također, u tablici je prikazan odnos KPK/BPK<sub>5</sub>, ukoliko je ta vrijednost manja od 2 tada se za ispitivanu tvar može zaključiti da je biorazgradiva. Svi ispitivani uzorci iz procesa biorazgradnje acetamiprida, prema izmjerenim vrijednostima KPK i BPK<sub>5</sub>, su biorazgradivi. Takvi rezultati su u skladu s BIOWIN vrijednostima prikazanim u **Tablici 2** koji govore da je

acetamidrid biorazgradiv u vremenskom periodu od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Stoga bi za njegovo značajnije uklanjanje u konvencionalnim postrojenjima za obradu otpadnih voda šaržnom biorazgradnjom u prisutnosti aktivnog mulja bilo potrebno znatno duže zadržavanje otpadnih voda što nije prihvatljivo. Prema tome, ta metoda nije prihvatljiva za njegovo uklanjanje u realnim sustavima te je potrebno tražiti dodatne metode poput naprednih oksidacijskih, membranskih procesa i sl.

**Tablica 25.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje acetamidrida

Uzorak	<i>BPK</i> <sub>5</sub> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK</i> <sub>5</sub>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	484,9818	101	0,2083	da
1. reaktor - 24h	264,3614	115	0,4350	da
2. reaktor - 0h	469,8924	85	0,1809	da
2. reaktor - 24h	446,7533	94	0,2104	da

Uzorci dobiveni nakon provođenja mikrovalne ekstrakcije su kromatografski analizirani. Rezultati računalne obrade podataka dobivenih kromatografskom analizom prikazani su u **Tablici 26.**

**Tablica 26.** Dobivene vrijednosti koncentracije acetamidrida prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

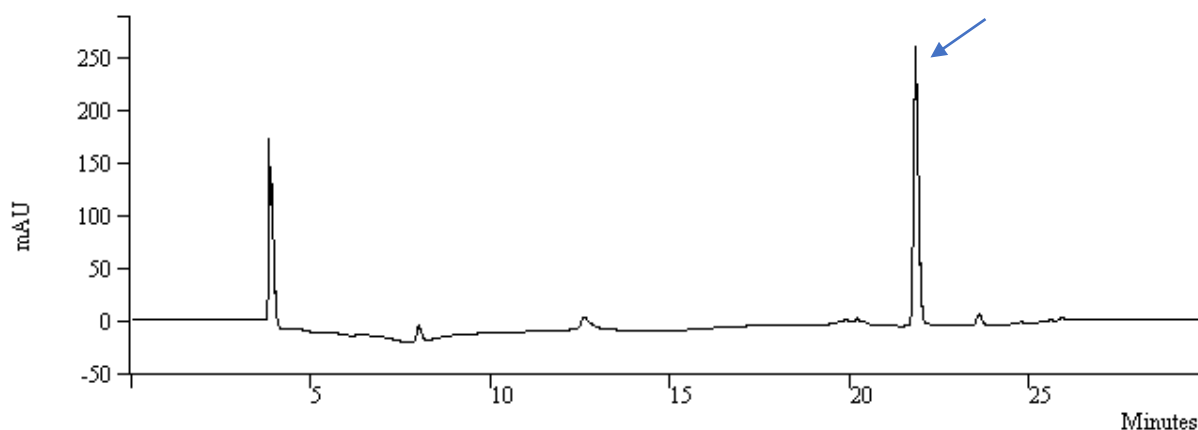
	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija acetamidrida ekstrahirana sa mulja nakon 24 h	0,99
koncentracija acetamidrida u 1. reaktoru nakon 24 h	6,42
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	7,41
početna koncentracija pripremljene otopine acetamidrida	8,11

Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskorištenje mikrovalne ekstrakcije od 57,76 %. Prema dobivenim podacima, na mulj u reaktoru se adsorbiralo 0,99 mg L<sup>-1</sup> acetamidrida. Konačno, prema svim dobivenim podacima acetamidrid je u provedenim pokusima biorazgradiv. Mala količina acetamidrida se uklanja adsorbicijom na pahuljice mulja. Treba napomenuti da adsorbirana količina acetamidrida nije razgrađena, ona je samo uklonjena iz otopine.

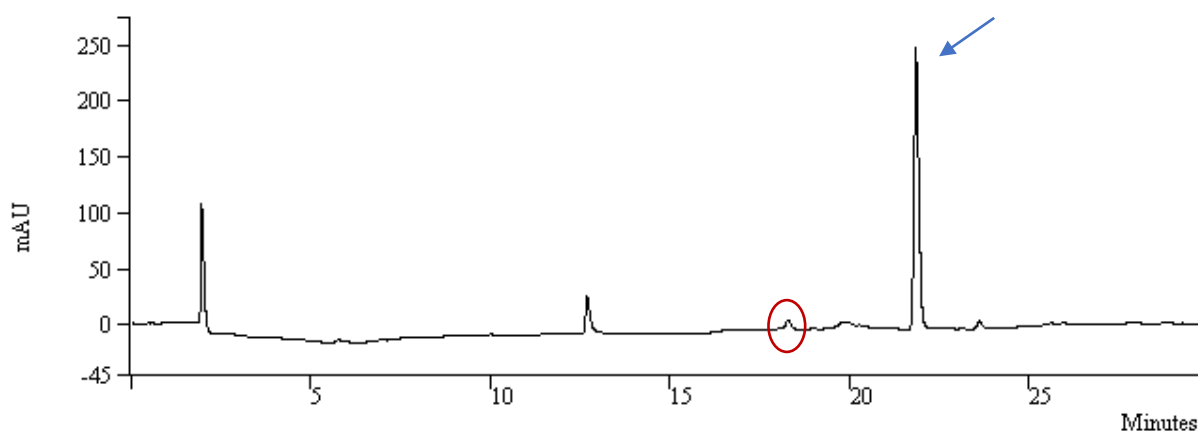


## Kromatografska detekcija i analiza

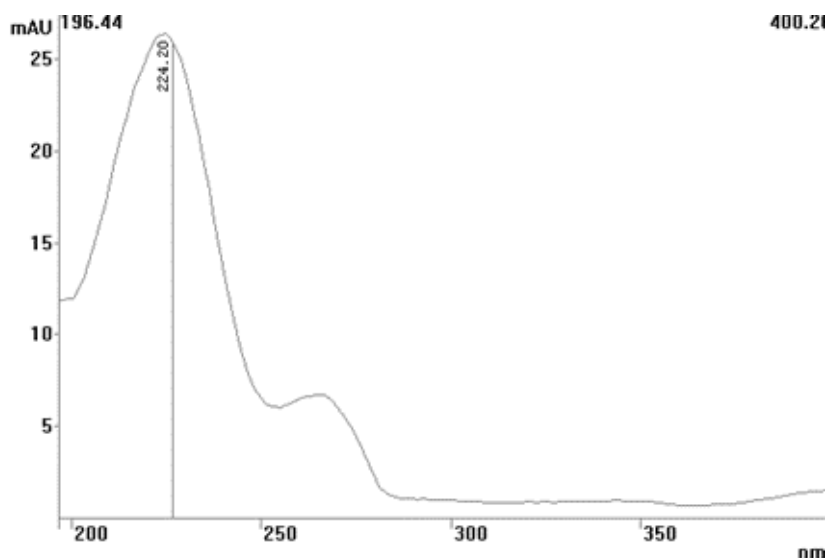
Kromatogrami uzoraka otopine acetamiprida iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 39** i **40**. Kromatografska krivulja koja pripada acetamipridu je označena plavom strelicom, a transformacijski i razgradni produkti tijekom procesa šaržne biorazgradnje su zaokruženi crveno. Na kromatogramu uzorka nakon 24 sata aeriranja otopine u prvom reaktoru (**Slika 40.**) uočava se nova kromatografska krivulja. Ta nova krivulja pripada novonastaloj komponenti u reaktoru. Iz kromatografske analize uzoraka iz drugog kontrolnog reaktora uočava se da ta nova komponenta ne nastaje u drugom reaktoru u kojem se odvija proces aeracije isključivo mulja. U prvom reaktoru dolazi do nastanka razgradnog ili transformacijskog produkta acetamiprida tijekom procesa šaržne biorazgradnje. Na **Slici 41** prikazan je apsorpcijski spektar nastalog razgradnog produkta acetamiprida, njegovo vrijeme zadržavanja iznosi 18,281 min. Također, nakon 24 sata u prvom reaktoru je i dalje prisutna velika količina acetamiprida pošto navedenim procesima nije učinkovito uklonjen iz otopine.



**Slika 39.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h

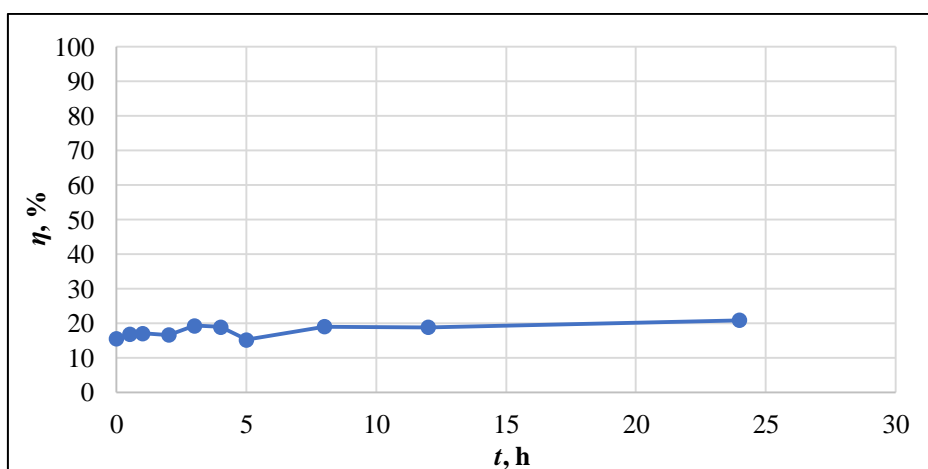


**Slika 40.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h



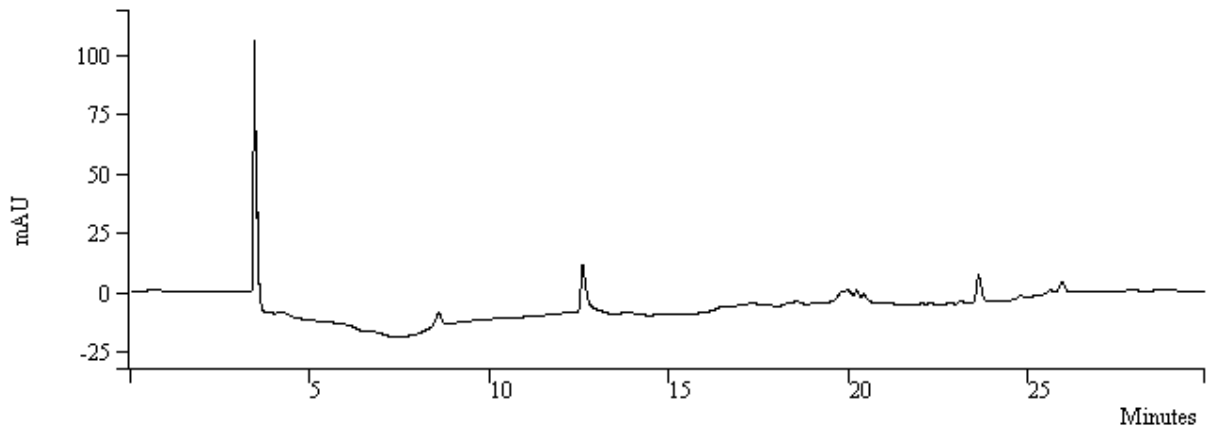
**Slika 41.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=18,281$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom šaržne biorazgradnje acetamiprida

Na **Slici 42** prikazana je učinkovitost uklanjanja acetamiprida šaržnom biorazgradnjom u 1. reaktoru tijekom 24 sata. Prema grafičkom prikazu jasno je da ne dolazi do značajnog uklanjanja acetamiprida iz otopine prvog reaktora. Ipak, u prvom reaktoru tijekom procesa šaržne biorazgradnje dolazi do razgradnje male količine acetamiprida prilikom koje nastaje njegov razgradni ili transformacijski produkt. Pošto se iz ranije navedenih podataka zaključilo kako se i mali dio acetamiprida adsorbirao na mulj, u budućim istraživanjima trebalo bi ispitati što se događa s tom količinom adsorbiranom na mulj, odnosno dolazi li do desorpcije i time ponovno vraćanje acetamiprida u otopinu.

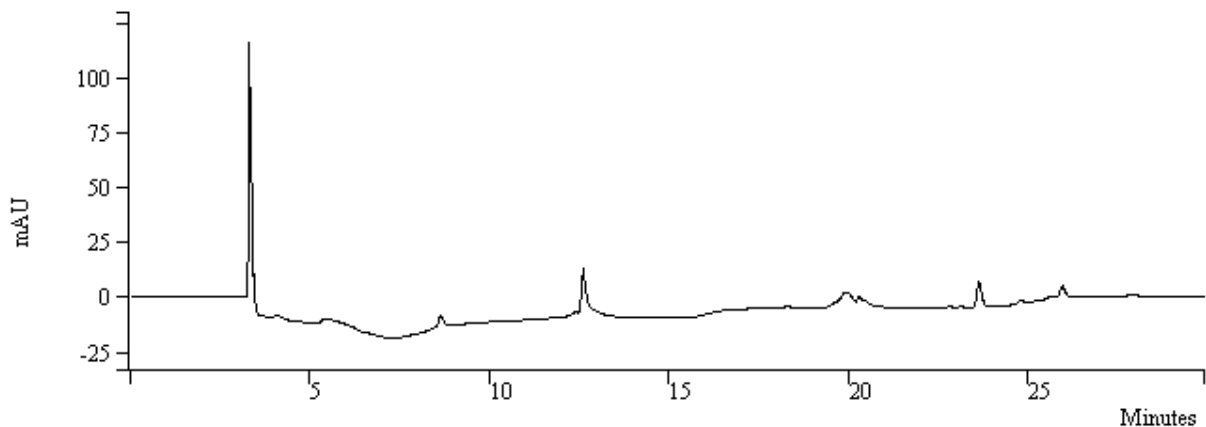


**Slika 42.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida iz 1. reaktora tijekom 24 sata

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 43** i **44**. Ne uočavaju se nikakve znatnije promjene u reaktoru u kojem se nalazi samo mulj.

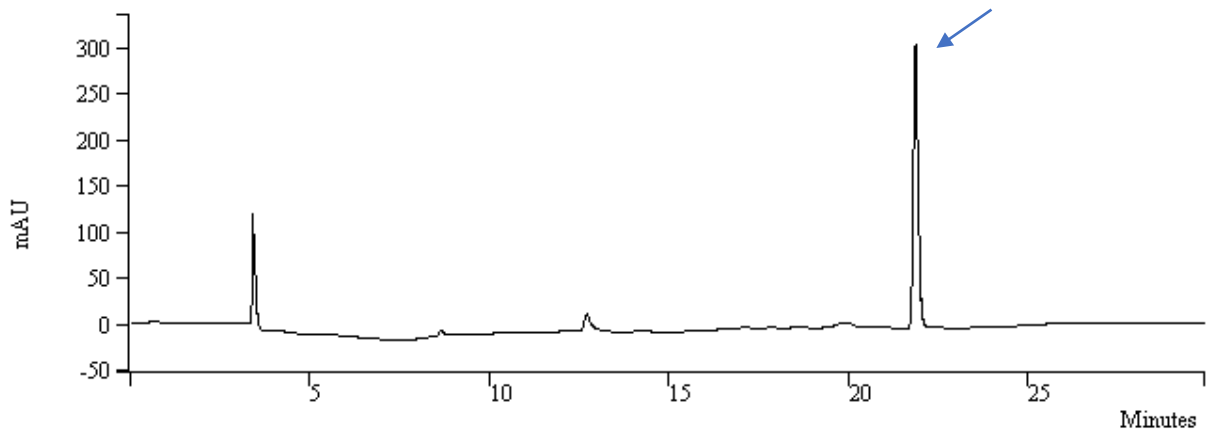


**Slika 43.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h

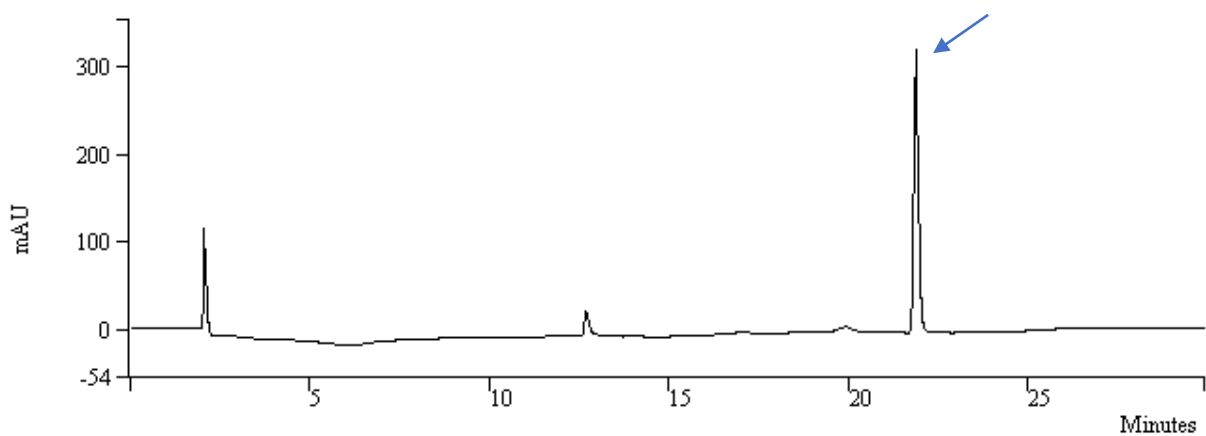


**Slika 44.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo acetamiprid u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 45** i **46**. U uzorcima iz 3. reaktora zamotanog u foliji nije došlo do razgradnje acetamiprida i nastanka novih spojeva što ukazuje da nije došlo do hidrolize aktivne komponente. Također, iz kromatograma se uočava da nije došlo ni do promjene u koncentraciji acetamiprida.

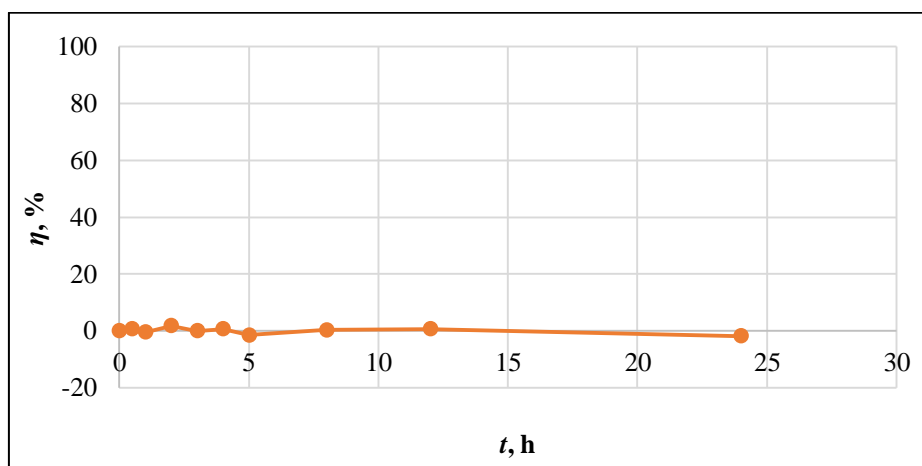


**Slika 45.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h



**Slika 46.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 47** prikazana je učinkovitost uklanjanja acetamiprida šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata te se jasno zaključuje da ne dolazi do nikakvog uklanjanja acetamipride iz otopine 3. reaktora.

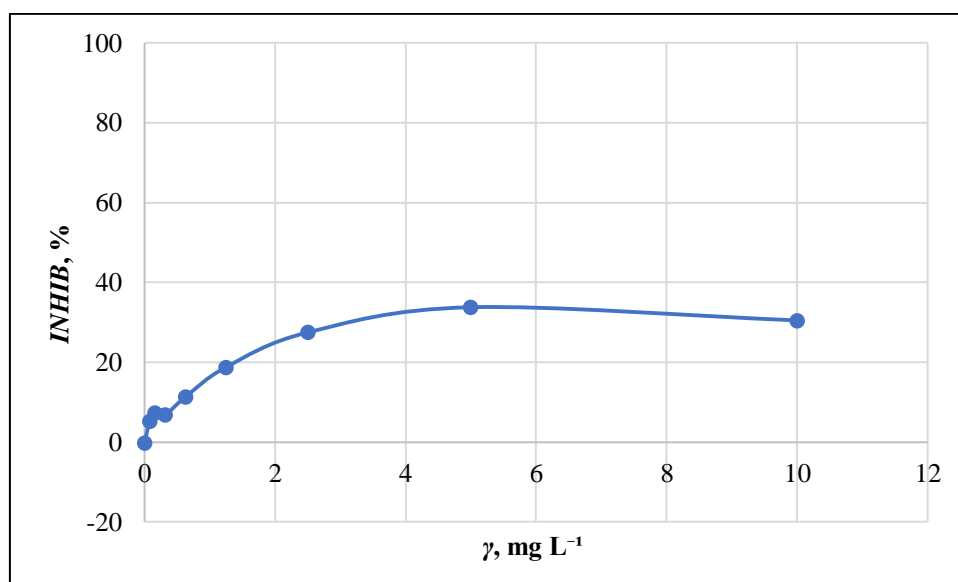


**Slika 47.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Zaključno, prema svim dobivenim rezultatima, acetamiprid se iz vodenih otopina jako slabo uklanja procesima šaržne biorazgradnje tijekom 24 h. Do uklanjanja acetamiprida dolazi dijelom zbog procesa adsorpcije male količine acetamiprida na mulj te zbog razgradnje male količine acetamiprida pomoću mikroorganizama aktivnog mulja što se potvrđuje nastankom nove kromatografske krivulje.

### Toksičnost

Na **Slici 48** prikazuje se graf toksičnosti otopine acetamiprida u deioniziranoj vodi odmah nakon pripreme otopine, prije šaržne biorazgradnje. Dolazi do porasta inhibicije s porastom koncentracije uzorka, otopina acetamiprida koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  je toksična. Inhibicija kulture bakterije *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku acetamiprida iznosi oko 30 %.



**Slika 48.** Graf toksičnosti otopine acetamiprida u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

U **Tablici 27** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima acetamiprida iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja acetamiprida nakon 24 sata iznosi oko 40 %. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture. Izmjerena je inhibicija od oko -24 % što upućuje na to da se u samom mulju nalaze tvari koje hrane bakterije i time raste njihova luminiscencija. Inhibicija uzorka otopine acetamiprida odmah nakon pripreme je oko 30 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine poraste na otprilike 45 %. Porast inhibicije ukazuje na to da pod utjecajem aeracije vjerojatno dolazi do boljeg otapanja acetamiprida u otopini time i

veće toksičnosti otopine. To se može potvrditi iz kvantitavnih podataka kromatografske analize. U 3. reaktoru tijekom 24 sata dolazi do malog povećanja površine ispod kromatografske krivulje, otprilike za 50 mAU.

Uočava se da je inhibicija bakterijske kulture najveća za 3. reaktor koji sadrži maksimalnu količinu otopljenog acetamiprida i time najtoksičniju otopinu. Šaržnom biorazgradnjom se u 1. reaktoru uklanja manji dio acetamiprida što pridonosi smanjenju toksičnosti. Također, u 1. reaktoru nastaje i razgradni produkt acetamiprida za koji ne možemo točno predvidjeti na koji način pridonosi toksičnosti.

**Tablica 27.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka acetamiprida

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Čista otopina acetamiprida koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	30,4883
Otopina iz 1. reaktora (mulj + acetamiprid)	24	40,2549
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-24,3202
Otopina iz 3. reaktora (acetamiprid)	24	45,5650

#### 4.1.2. Razgradnja klotianidina

##### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za klotianidin za pH-vrijednost, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 28**. U prva dva reaktora su tijekom cijelog procesa šaržne biorazgradnje pH-vrijednosti optimalne za život i rad mikroorganizama aktivnog mulja. U trećem reaktoru je pH-vrijednost nešto niža što je očekivano jer vodena otopina klotianidina ima niže pH-vrijednosti od vode, a reaktor ne sadrži mulj. Temperature u reaktorima se mijenjaju unutar intervala od 2 °C tijekom 24 sata. Koncentracija kisika u prva dva reaktora se povećava kroz 24 sata procesa šaržne biorazgradnje uslijed provođenja aeracije otopina u reaktorima.

**Tablica 28.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje klotianidina

<i>t, h</i>	1.reaktor MULJ + KLOTIANIDIN			2.reaktor MULJ			3.reaktor KLOTIANIDIN	
	pH	<i>T, °C</i>	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	<i>T, °C</i>	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	<i>T, °C</i>
0	7,13	20,5	6,55	6,78	21,5	5,68	5,78	20,5
0,5	7,47	20,5	-	7,45	21,5	-	6,19	20,0
1	7,86	20,0	-	7,80	21,0	-	6,07	20,0
2	7,82	19,5	-	7,81	20,5	-	6,41	19,5
3	7,79	19,5	-	7,78	20,5	-	5,83	19,5
4	7,79	19,5	7,78	7,84	20,5	7,83	6,23	19,0
5	7,84	19,5	-	7,89	20,5	-	5,95	19,0
8	7,86	19,5	-	7,89	20,5	-	5,83	19,5
12	7,98	19,5	8,02	7,99	20,5	8,12	6,17	19,0
24	8,10	18,5	7,45	8,08	19,5	7,05	6,12	18,0

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za MLSS, u procesu biorazgradnje klotianidina prikazane su u **Tablici 29**. Iz dobivenih podataka ne uočava se pravilan trend promjene ukupne suspendirane tvari u prvom reaktoru. Do takvih rezultata može doći zbog nehomogenosti aktivnog mulja te uslijed aeracije dolazi do miješanja otopine, ali ne i jednolike raspršenosti pahuljica mulja koje mjestimično mogu biti gušće. Za drugi reaktor se može reći da ukupna suspendirana tvar opada.

**Tablica 29.** Dobivene vrijednosti ukupne suhe tvari prilikom biorazgradnje klotianidina

	1.rektor MULJ + KLOTIANIDIN	2.reaktor MULJ
<i>t, h</i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>
0	2,62	2,76
4	2,72	-
8	2,30	-
12	2,60	-
24	2,70	2,54

Ekperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 30**. Za biorazgradnju klotianidina uočava se pad organske tvari što upućuje na odumiranje mikroorganizama aktivnog mulja. Može se reći da dolazi do blagog porasta udjela anorganske tvari.

**Tablica 30.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje klotianidina

<i>t, h</i>	<i>m(org), g</i>	<i>m(anorg), g</i>
0	0,0024	0,1477
4	0,0024	0,1501
8	0,0020	0,1452
12	0,0019	0,1484
24	0,0021	0,1504

U **Tablici 31** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Svi ispitivani uzorci iz procesa biorazgradnje klotianidina, prema izmjerenim vrijednostima KPK i BPK<sub>5</sub> te njihovog međusobnog odnosa koji je manji od 2, zaključuje se da su biorazgradivi. Dobiveni rezultati su u skladu s BIOWIN vrijednostima za klotianidin prema kojima on iako nije lako biorazgradiv, ali ipak dolazi do njegove razgradnje u vremenu kroz nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Daljnjom analizom uzoraka će se utvrditi dolazi li u ovim procesnim uvjetima do razgradnje klotianidina ili samo do adsorpcije na mulj.



**Tablica 31.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje klotianidina

Uzorak	<i>BPK</i> <sub>5</sub> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK</i> <sub>5</sub>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	242,9701	100,33	0,4129	da
1. reaktor - 24h	163,8732	60,67	0,3702	da
2. reaktor - 0h	173,4051	81,33	0,4690	da
2. reaktor - 24h	188,6980	62,33	0,3303	da

Obrađeni podaci dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom daju rezultate prikazane u **Tablici 32.**

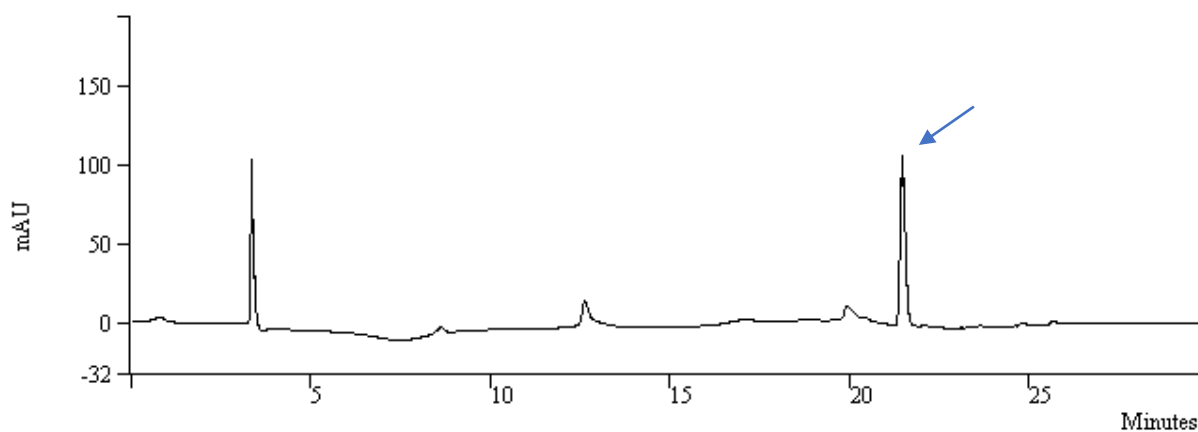
**Tablica 32.** Dobivene vrijednosti koncentracije klotianidina prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija klotianidina ekstrahirana u mulju nakon 24 h	1,82
koncentracija klotianidina u 1. reaktoru nakon 24 h	8,64
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	10,47
početna koncentracija pripremljene otopine klotianidina	9,91

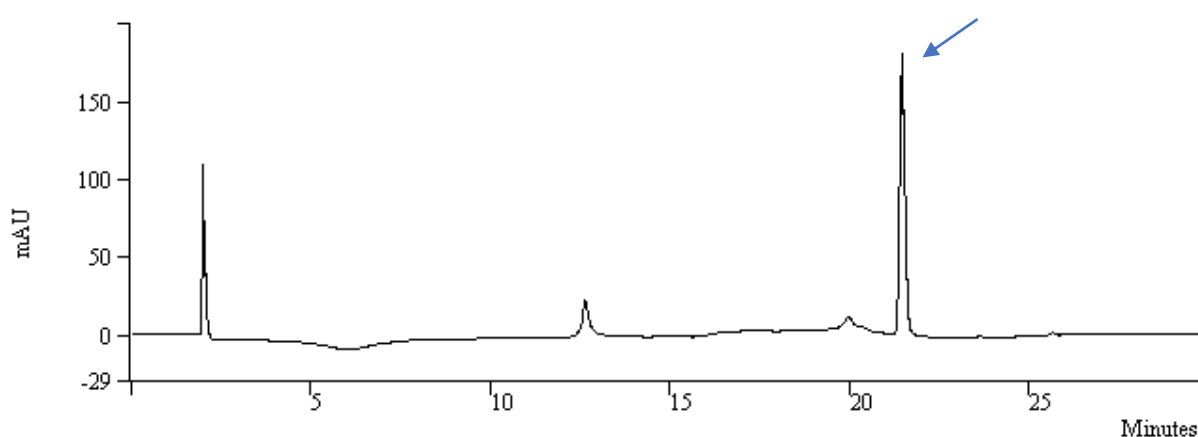
Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskoristivnost postupka mikrovalne ekstrakcije od 68,15 %. Prema dobivenim podacima, mulj u reaktoru je adsorbirao količinu klotianidina od 1,82 mg L<sup>-1</sup> te ostatak klotianidina u otopini prvog reaktora iznosi 8,64 mg L<sup>-1</sup>. Ova adsorbirana količina klotianidina nije razgrađena, ona je samo uklonjena iz otopine.

### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine klotianidina iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 49 i 50.** Kromatografska krivulja koja pripada klotianidinu je označena plavom strelicom. Tijekom analize dobivenih kromatograma uočava se pojava nove kromatografske krivulje, odnosno novog spoja, s vremenom zadržavanja 14,995 min, ali je ispod granica detekcije. Uočava se mala promjena na krivulji koju se ne može kvantitativno odrediti. Također, uočava se porast površine ispod kromatografske krivulje klotianidina. Tijekom procesa biorazgradnje vjerojatno dolazi do desorpcije s mulja i/ili poboljšanja topljivosti klotianidina i time povećanja udjela klotianidina u otopini.

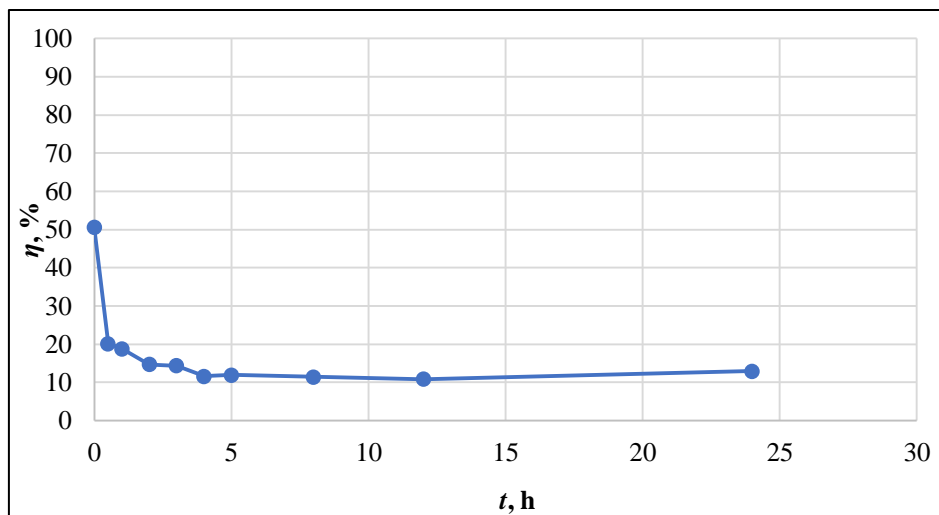


**Slika 49.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h



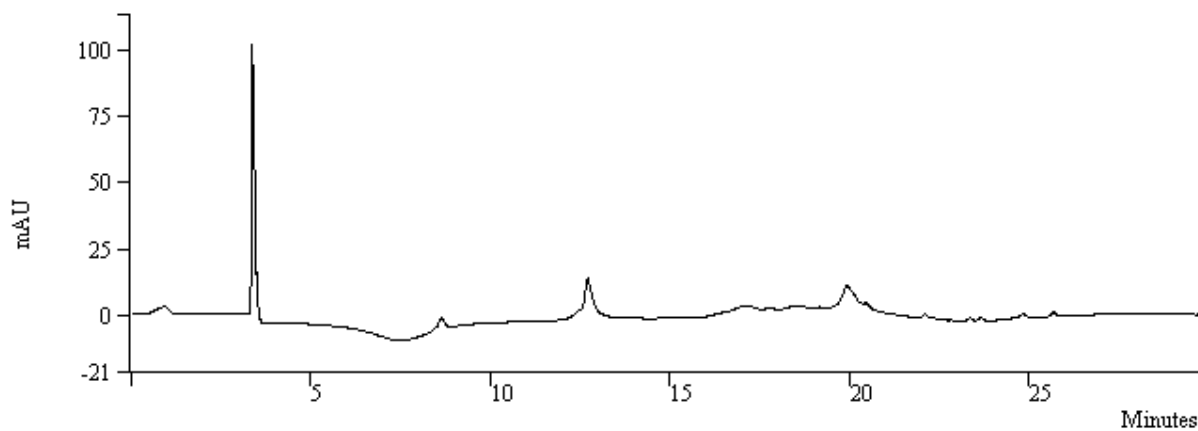
**Slika 50.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 51** prikazana je učinkovitost uklanjanja klotianidina šaržnom biorazgradnjom u 1. reaktoru tijekom 24 sata. Prva točka na grafu ima višu vrijednost od ostalih jer se klotianidin vjerojatno nije u potpunosti otopio te uslijed aeracije dolazi do povećanja njegovog udjela u otopini. Učinkovitosti uklanjanja klotianidina ovim postupkom gotovo da i nema, ove vrijednosti koje su oko 10 % učinkovitosti uklanjanja su zbog toga jer se ipak određena količina klotianidina adsorbira na mulj, što se potvrdilo rezultatima mikrovalne ekstrakcije.

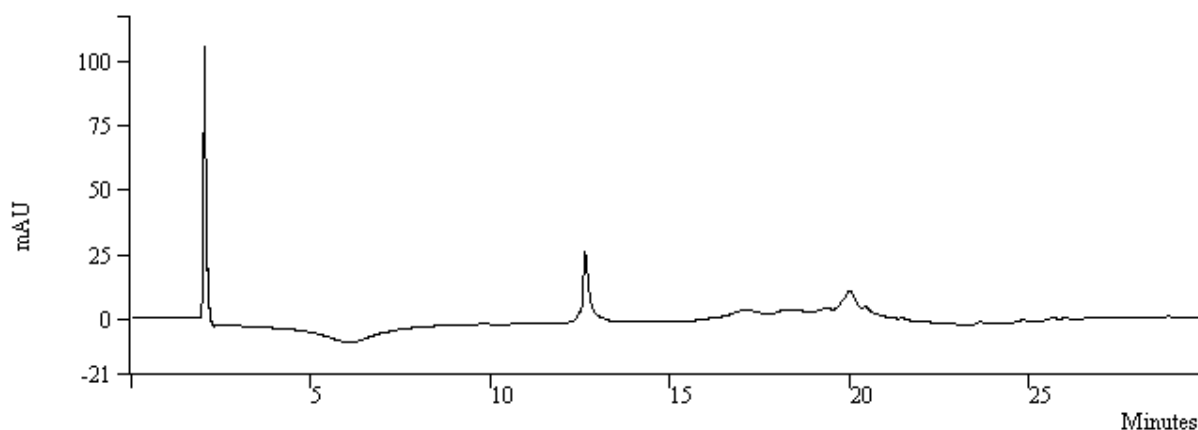


**Slika 51.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina iz 1. reaktora tijekom 24 sata

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 52** i **53**. Ne uočava se nikakva značajna promijena tijekom 24 sata. Prema tome, sam mulj tijekom ovog procesa uslijed aeriranja ne daje nikakve nove komponente u otopini.

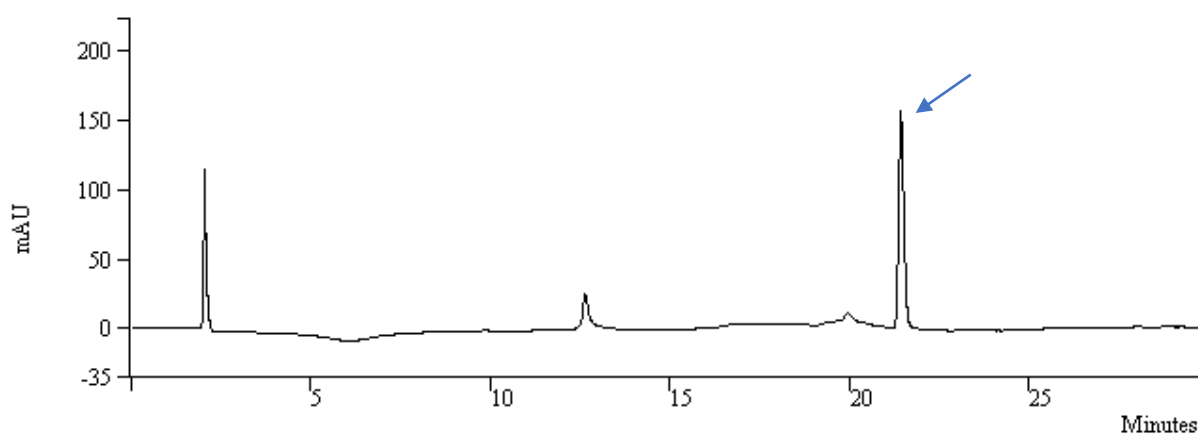


**Slika 52.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h

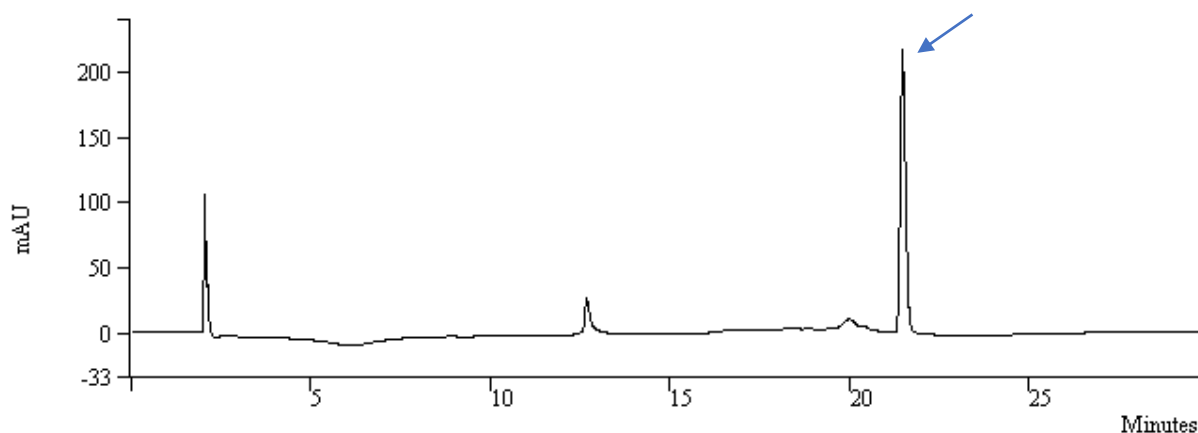


**Slika 53.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo klotianidin u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 54** i **55**. Ponovno, uočava se porast površine ispod kromatografske krivulje klotianidina, ovdje se to ne može pripisati desorpciji nego vjerojatno tijekom aeracije dolazi do povećanja topljivosti klotianidina u reaktoru što rezultira povećanjem udjela klotianidina u otopini. Vjerojatno onda i u prvom reaktoru dolazi do povećanog udjela klotianidina u otopini i to većim dijelom zbog aeriranja otopine u reaktoru i boljeg otapanja klotianidina. Ne dolazi do nastanka razgradnih produkata i može se zaključiti da u navedenim uvjetima ne dolazi do hidrolize klotianidina.

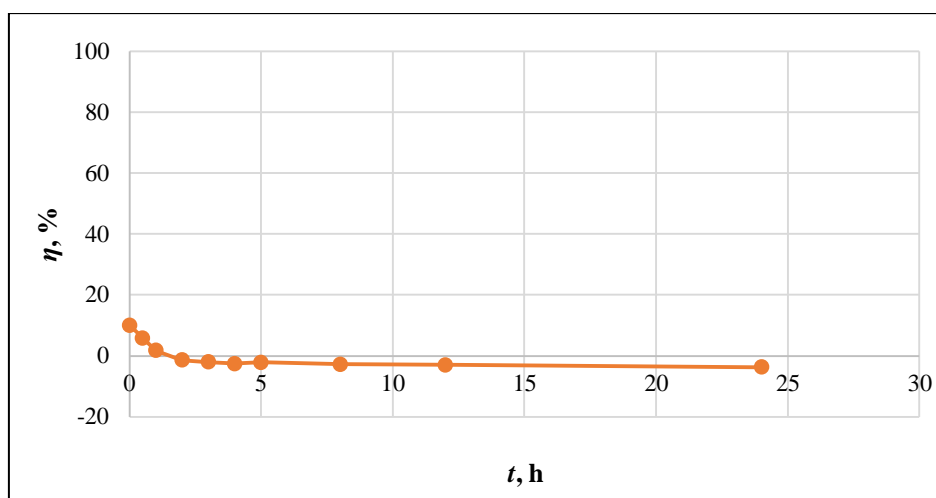


**Slika 54.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h



**Slika 55.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 56** prikazana je učinkovitost uklanjanja klotianidina šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata. Ne dolazi do uklanjanja klotianidina te se čak uočava pad krivulje u negativno područje, to se može pripisati upravo tome što uslijed aeriranja otopine dolazi do boljeg otapanja i time sve veće udjela klotianidina u otopini.

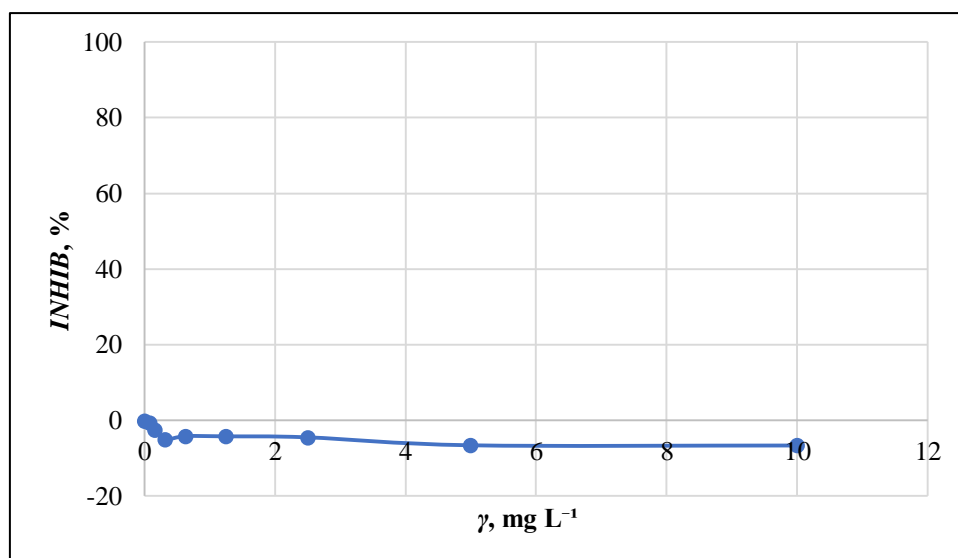


**Slika 56.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Promjena na krivulji koja je uočljiva u prvom reaktoru je posljedica biorazgradnje klotianidina. Iako skoro nevidljiva i ispod granica detekcije, uočljiva je te ukazuje da u ovim procesnim uvjetima dolazi do biorazgradnje jako male količine klotianidina. Prema podacima ekstrahiranja s mulja, klotianidin se dijelom uklanja iz otopine uslijed adsorpcije na pahuljice aktivnog mulja. Do hidrolize klotinidina ne dolazi.

## Toksičnost

Na **Slici 57** je prikazana grafička ovisnost inhibicije svježe pripremljene otopine o koncentraciji uzorka. Originalni uzorak je otopina klotianidina koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Inhibicija bakterija *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku klotianidina iznosi oko -7 %, odnosno dolazi do porasta luminiscencije bakterija. Ovakav rezultat nije očekivan pošto nije u skladu s prethodnim mjerenjima. [5] Ipak se očekuje blaga toksičnost klotianidina te ovakav nesklad rezultata se može pripisati lošijoj, nezdravoj bakterijskoj kulturi koja u ovom slučaju nije dala dobre rezultate.



**Slika 57.** Graf toksičnosti otopine klotianidina u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

U **Tablici 33** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima klotianidina iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja klotianidina nakon 24 sata iznosi oko 9 %, ovakav rezultat je u skladu s prethodnih ispitivanjima. Također, pošto se u otopini nalazi i mala količina nove komponente i ona može utjecati na toksičnost. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture, izmjerena je inhibicija od oko -10 %. Inhibicija uzorka otopine klotianidina odmah nakon pripreme iznosi oko -7 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine poraste na otprilike 27 %. Inhibicija je veća u odnosu na prvi reaktor zbog toga što uslijed aeracije dolazi do boljeg otapanja klotianidina i njegovoj većoj koncentraciji u otopini te u trećem reaktoru nema mulja, ne dolazi do adsorpcije klotianidina na mulj i tako njegovog uklanjanja iz otopine kao što je to slučaj u prvom reaktoru.

**Tablica 33.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka klotianidina

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Čista otopina klotianidina koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	-6,6751
Otopina iz 1. reaktora (mulj + klotianidin)	24	8,9130
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-9,6645
Otopina iz 3. reaktora (klotianidin)	24	27,5192

### 4.1.3. Razgradnja tiakloprida

#### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za tiaklopid za pH-vrijednost, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 34**. U reaktorima s muljem ne uočavaju se značajne promjene pH-vrijednosti. Sve izmjerene pH-vrijednosti su unutar intervala od 6,5 – 8,5 koji je optimalan biološkoj aktivnosti mulja. Ne dolazi do značajne promjene temperature tijekom 24 sata. Uslijed aeracije u prva dva reaktora dolazi do povećanja vrijednosti koncentracije kisika u otopinama u reaktorima.

**Tablica 34.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida

t, h	1.reaktor MULJ + TIAKLOPRID			2.reaktor MULJ			3.reaktor TIAKLOPRID	
	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C
0	7,25	22,0	4,31	7,31	22,0	6,06	5,88	24,0
0,5	7,72	22,0	-	7,76	22,0	-	6,36	24,0
1	7,74	21,5	-	7,77	22,0	-	6,32	24,0
2	7,78	21,5	-	7,80	21,5	-	6,41	23,5
3	7,76	21,5	-	7,81	21,5	-	6,33	23,5
4	7,75	21,0	6,65	7,79	21,0	7,02	6,20	23,0
5	7,75	21,0	-	7,79	21,0	-	6,12	22,5
8	7,76	21,0	6,78	7,79	21,0	6,98	6,29	22,5
12	7,50	21,0	6,90	7,50	21,0	7,10	6,30	22,5
24	7,18	20,5	7,08	7,43	20,5	7,29	6,49	22,0

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za MLSS, u procesu biorazgradnje tiakloprida prikazane su u **Tablici 35**. Iz dobivenih podataka uočava se porast ukupne suhe tvari u oba reaktora.



**Tablica 35.** Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje tiakloprida

	1.rektor MULJ + TIAKLOPRID	2.reaktor MULJ
<i>t, h</i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>
0	3,02	3,24
4	2,98	-
8	3,42	-
12	3,47	-
24	3,5	3,54

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem, odnosno za udio anorganske i organske tvari kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 36**. Za biorazgradnju tiakloprida uočava se malo opadanje organske tvari i porast anorganske tvari tijekom 24 sata. Opadanje organske tvari upućuje na odumiranje bakterijskih kultura aktivnog mulja. Odumiranje mikroorganizama aktivnog mulja se može dogoditi uslijed toga što je sama aktivna komponenta čija se biorazgradnja ispituje toksična, u ovom slučaju toksičnost tiakloprida uzrokuje odumiranje manjeg broja mikroorganizama.

**Tablica 36.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje tiakloprida

<i>t, h</i>	<i>m(org), g</i>	<i>m(anorg), g</i>
0	0,0028	0,1509
4	0,0029	0,1491
8	0,0026	0,1574
12	0,0027	0,1576
24	0,0024	0,1578

U **Tablici 37** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Svi ispitivani uzorci iz procesa biorazgradnje tiakloprida, prema izmjerenim vrijednostima KPK i BPK<sub>5</sub>, su biorazgradivi. Prema BIOWIN vrijednostima, tiaklopid se može razgraditi tijekom nekoliko mjeseci. KPK vrijednost se koristi kao pokazatelj onečišćenja vode te iz dobivenih podataka se vidi da je otopina u prvom reaktoru, koja sadrži tiaklopid, više onečišćenja nego otopina u drugom reaktoru koja sadrži samo aktivni mulj.

**Tablica 37.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje tiakloprida

Uzorak	<i>BPK</i> <sub>5</sub> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK</i> <sub>5</sub>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	232,6170	64	0,2751	da
1. reaktor - 24h	343,2560	102	0,2972	da
2. reaktor - 0h	265,9650	33	0,1241	da
2. reaktor - 24h	193,4070	74,33	0,3843	da

Analizom uzoraka tiakloprida dobivenih nakon mikrovalne ekstrakcije, dobiveni podaci su računalno obrađeni i rezultati su prikazani u **Tablici 38**.

**Tablica 38.** Dobivene vrijednosti koncentracije tiakloprida prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

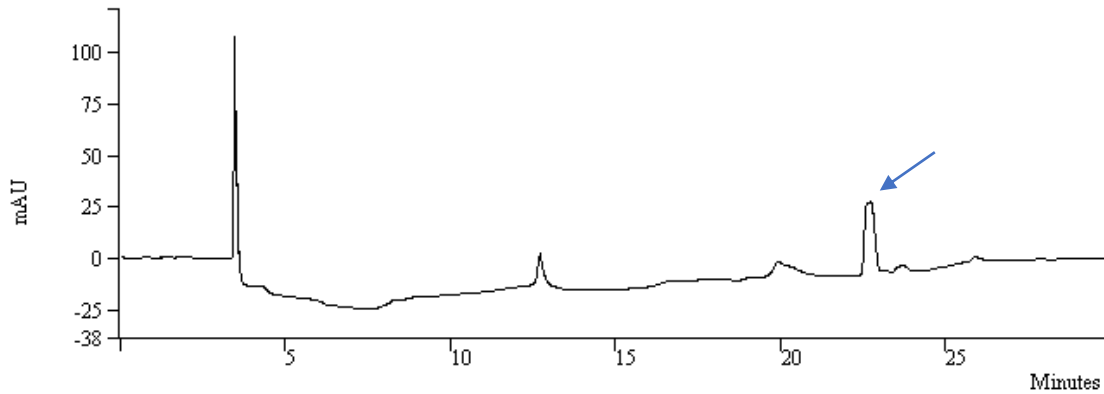
	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija tiakloprida ekstrahirana u mulju nakon 24 h	3,72
koncentracija tiakloprida u 1. reaktoru nakon 24 h	4,54
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	8,27
početna koncentracija pripremljene otopine tiakloprida	10,43

Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskorištenje postupka mikrovalne ekstrakcije od 68,15 %. Prema dobivenim podacima, mulj u reaktoru je adsorbirao količinu tiakloprida od 3,72 mg L<sup>-1</sup> te ostatak tiakloprida u otopini prvog reaktora iznosi 4,54 mg L<sup>-1</sup>. Ipak, prema dobivenim rezultatima, pripremljena je početna otopine dobre koncentracije, 10 mg L<sup>-1</sup>. Ovakvi rezultati upuću na to da je došlo i do razgradnje jednog dijela tiakloprida, to će se utvrditi kromatografskom analizom.

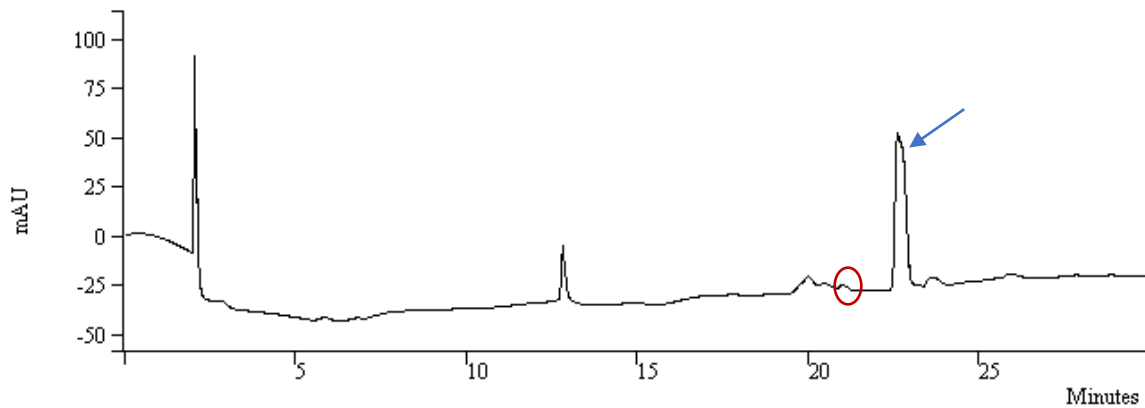
### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine tiakloprida iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 58** i **60**. Kromatografska krivulja koja pripada tiaklopridu je označena plavom strelicom, a transformacijski i razgradni produkti tiakloprida tijekom procesa šaržne biorazgradnje su zaokruženi crveno. Uočava se nastajanje razgradnog produkta tiakloprida već nakon jednog sata biorazgradnje (**Slika 59**). S vremenom površina kromatografske

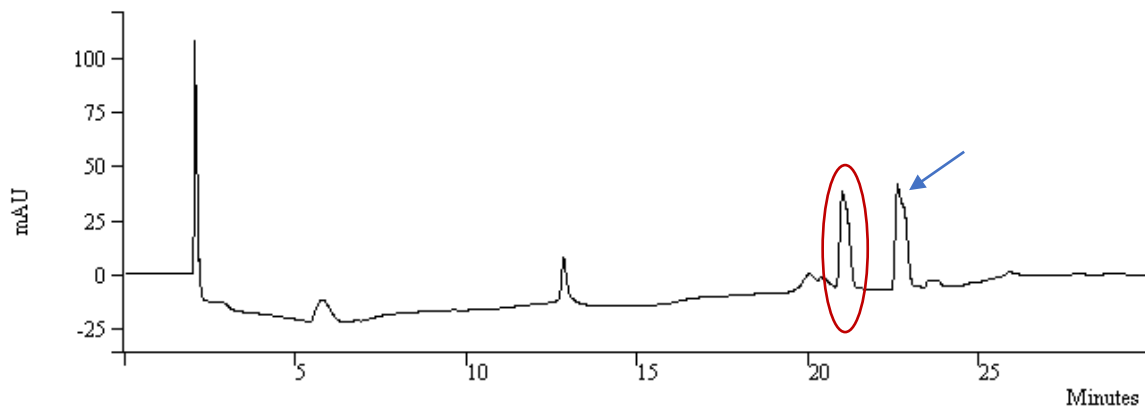
krivulje razgradnog produkta raste, te nakon 24 sata iznosi 797 mAU's dok mu je vrijeme zadržavanja 21,000 min. Na **Slici 61** prikazan je apsorpcijski spektar dobivenog razgradnog produkta tiakloprida. Novonastali produkt se ne uočava u kontrolnom drugom reaktoru ni u trećem reaktoru te se za njega može reći da on nastaje isključivo zbog razgradnje tiakloprida.



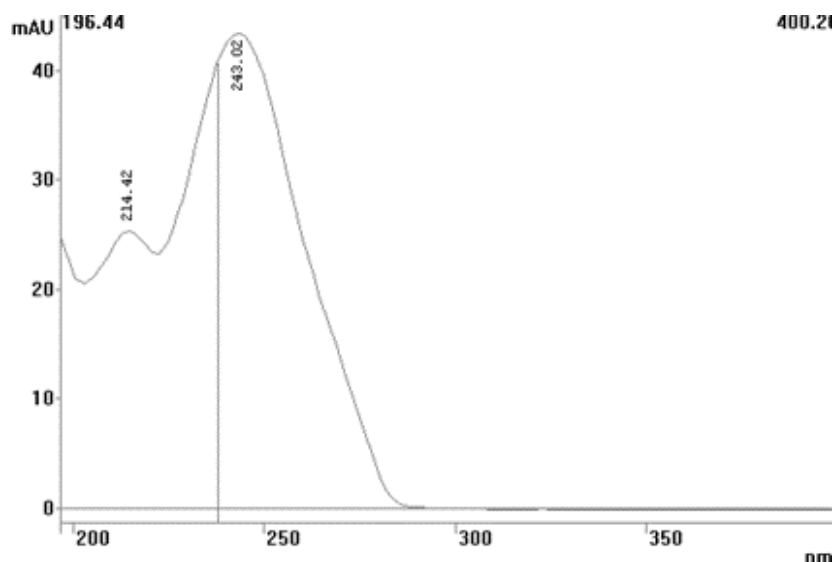
**Slika 58.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h



**Slika 59.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=1$  h

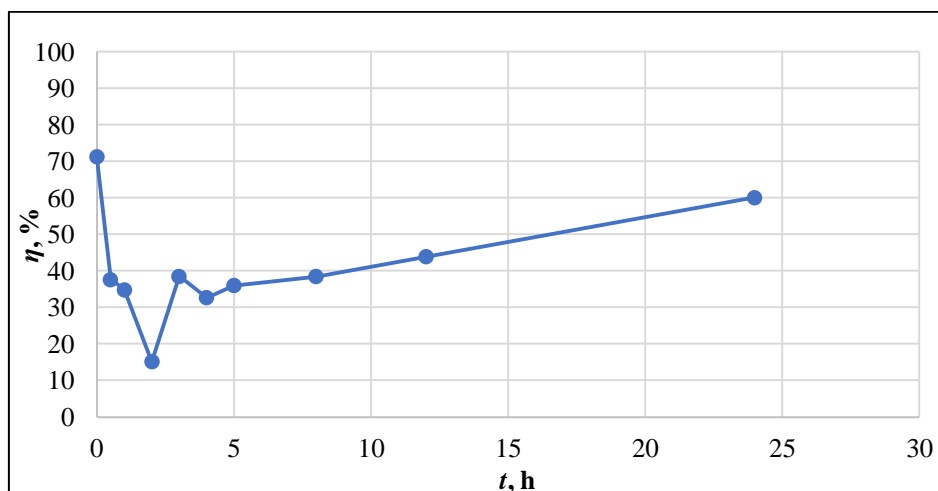


**Slika 60.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h



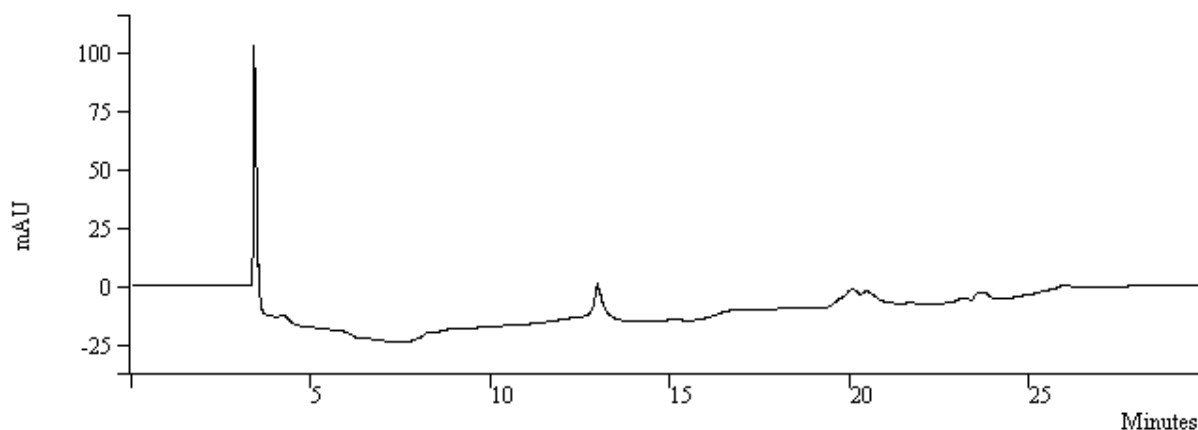
**Slika 61.** ApSORPCIJSKI SPEKTAR RAZGRADNOG PRODUKTA ( $t_R=21,000$  min) TIAKLOPRIDA KOJI JE NASTAO TIJEKOM ŠARŽNE BIORAZGRADNJE TIAKLOPRIDA

Na **Slici 62** prikazana je učinkovitost uklanjanja tiakloprida šaržnom biorazgradnjom u 1. reaktoru tijekom 24 sata. Učinkovitost uklanjanja tiakloprida iz otopine prvog reaktora iznosi oko 60 %, što je najbolji rezultat od svih analiziranih pesticida. Tijekom procesa šaržne biorazgradnje dolazi do adsorpcije tiakloprida na mulj i do njegove biorazgradnje. Biorazgradnja tiakloprida je potvrđena prisutnošću nastalih razgradnih ili transformacijskih produkata u otopini, a prema podacima mikrovalne ekstrakcije uočava se da je dio tiakloprida adsorbiran na mulj. Sudbina adsorbiranog tiakloprida je nepoznata i u budućnosti bi trebalo istražiti kojom brzinom dolazi do adsorpcije tiakloprida na mulj obzirom na realno vrijeme koje otpadne vode provode u sektorima s aktivnim muljem te dolazi li do njegove desorpcije s mulja i time ponovno vraćanje u otopinu.

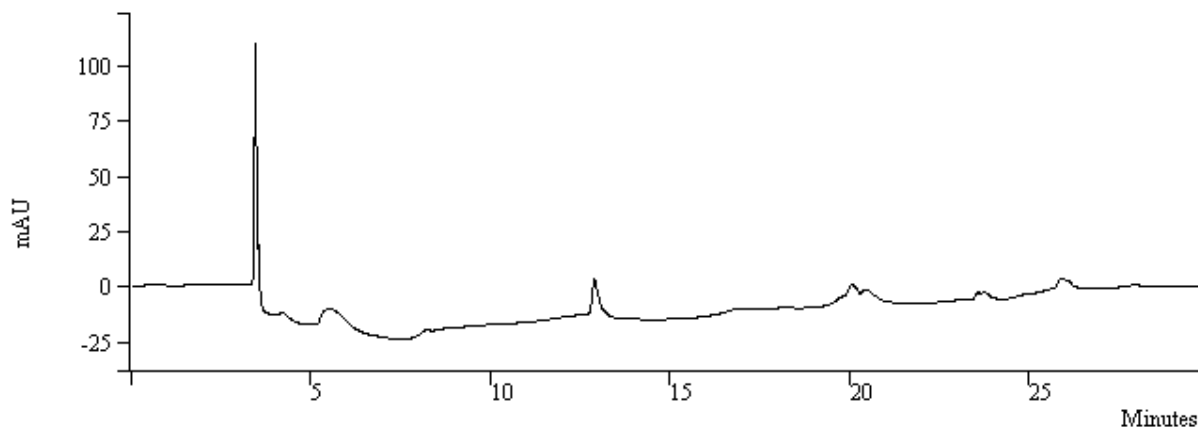


**Slika 62.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida iz 1. reaktora tijekom 24 sata

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 63** i **64**. Ne uočava se nikakva promjena.

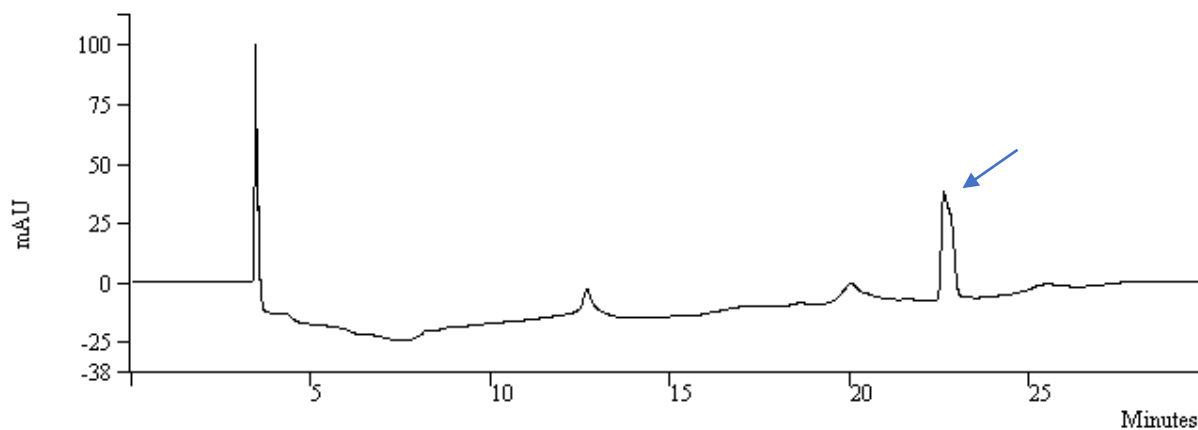


**Slika 63.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h

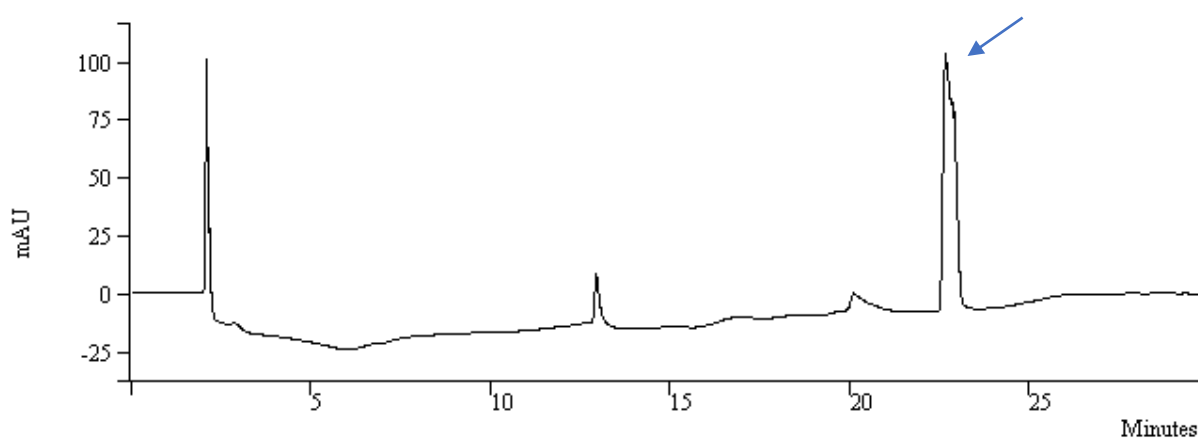


**Slika 64.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo tiaklopid u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 65** i **66**. Vidljiv je porast površine ispod kromatografske krivulje tiakloprida, uslijed aeracije dolazi do povećanja topljivosti tiakloprida u reaktoru. Ne dolazi do nastanka razgradnih produkata i zaključuje se da u navedenim uvjetima ne dolazi do hidrolize aktivne tvari. Time se potvrđuje biorazgradnja tiakloprida iz otopine prvog reaktora.

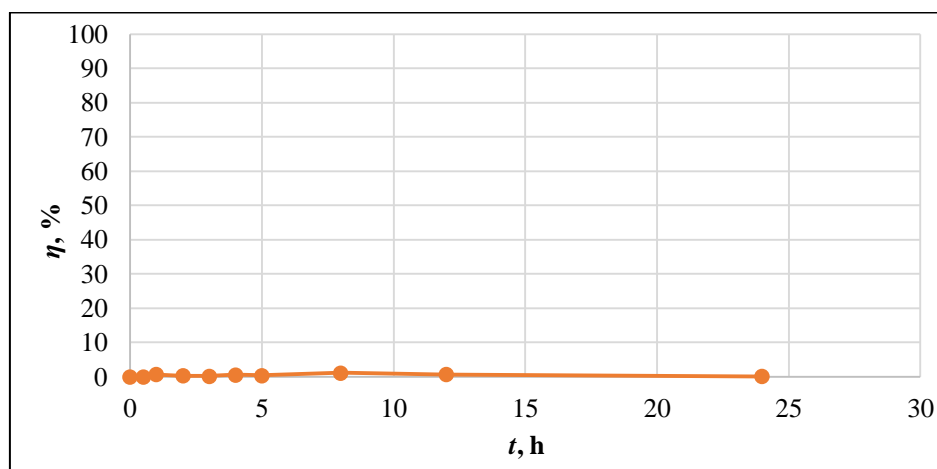


**Slika 65.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h



**Slika 66.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 67** prikazana je učinkovitost uklanjanja tiakloprida šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata. Uklanjanja tiakloprida iz otopine trećeg reaktora nema.

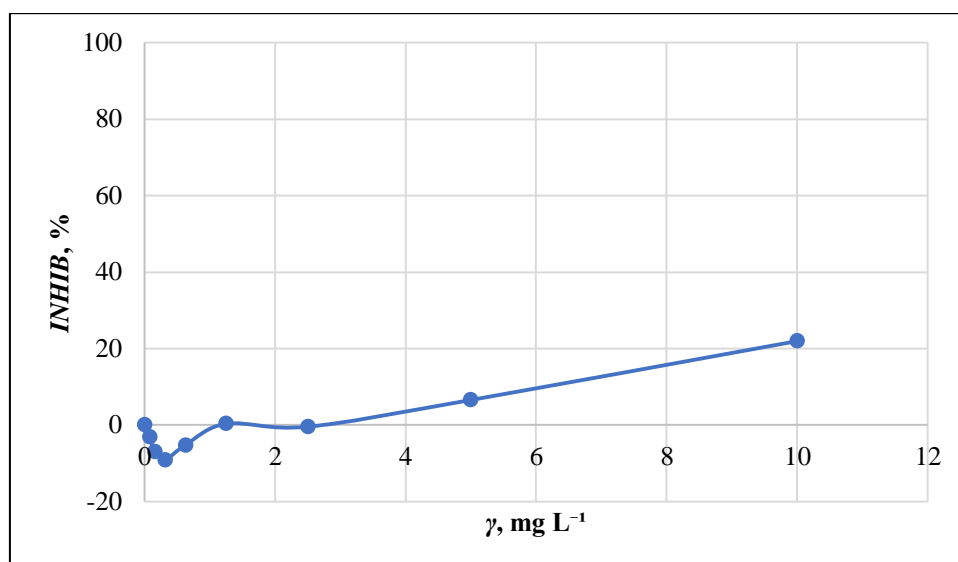


**Slika 67.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Zaključno, tijekom šaržne biorazgradnje tiakloprida dolazi do relativno učinkovitog uklanjanja tiakloprida procesima biorazgradnje te adsorpcije na mulj. Ne dolazi do hidrolitičkog raspada tiakloprida.

### Toksičnost

Na **Slici 68** je grafički prikaz toksičnosti otopine tiakloprida u deioniziranoj vodi odmah nakon pripreme otopine tiakloprida koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , prije šaržne biorazgradnje. Porastom koncentracije uzorka raste inhibicija bakterijske kulture. Otopina tiakloprida koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  je toksična. Inhibicija kulture bakterije *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku tiakloprida iznosi oko 22 %.



**Slika 68.** Graf toksičnosti otopine tiakloprida u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

U **Tablici 39** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima tiakloprida iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje(t). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja tiakloprida nakon 24 sata iznosi oko 14 %. Dolazi do uklanjanja tiakloprida iz otopine te se smanjuje i toksičnost otopine. Utjecaj novonastalog produkta na toksičnost je nepoznat. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko -15 % što ponovno potvrđuje tezu da se u samom mulju nalaze tvari koje hrane bakterije. Inhibicija uzorka otopine tiakloprida odmah nakon pripreme je oko 22 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine poraste na otprilike 38 %. Porast inhibicije ukazuje na to da pod utjecajem

aeracije dolazi do boljeg otapanja tiakloprida te povećanja njegove koncentracije u otopini. To se može potvrditi iz kvantitavnih podataka kromatografske analize. U 3. reaktoru tijekom 24 sata dolazi do povećanja površine ispod kromatografske krivulje, otprilike za 400 mAU.

**Tablica 39.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka tiakloprida

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Čista otopina tiakloprida koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	21,9510
Otopina iz 1. reaktora (mulj + tiaklopid)	24	14,4767
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-15,3810
Otopina iz 3. reaktora (tiaklopid)	24	38,1334



#### 4.1.4. Razgradnja albendazola

##### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za albendazol za pH-vrijednost, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 40**. Sve izmjerene pH-vrijednosti u reaktorima s muljem su optimalne za biološku aktivnost mikroorganizama aktivnog mulja. Uslijed aeracije reaktora dolazi do povećanja koncentracije kisika u otopini tijekom 24 sata. Promjena temperature je neznatna.

**Tablica 40.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje albendazola

t, h	1.reaktor MULJ + ALBENDAZOL			2.reaktor MULJ			3.reaktor ALBENDAZOL	
	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C
0	6,80	23,0	5,59	6,80	22,0	2,43	5,90	22,0
0,5	7,31	23,0	-	7,15	21,5	-	5,92	22,0
1	7,63	22,5	-	7,08	21,5	-	6,04	21,5
2	7,70	22,5	-	7,75	21,5	-	6,06	21,0
3	7,73	22,0	-	7,68	21,0	-	6,17	20,5
4	7,76	22,0	4,90	7,71	21,0	6,24	6,07	20,0
5	7,61	22,0	-	7,62	21,0	-	7,26	20,0
8	7,60	22,0	5,48	7,64	21,0	6,59	8,26	20,0
12	7,63	22,0	5,62	7,60	21,0	6,60	7,83	20,0
24	7,66	22,0	6,19	7,53	20,5	6,57	6,85	19,0

Ekperimentalno dobivene vrijednosti za MLSS, u procesu biorazgradnje albendazola prikazane su u **Tablici 41**. Iz dobivenih podataka uočava se porast ukupne suhe tvari u prvom reaktoru, dok u drugom reaktoru opada.

**Tablica 41.** Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje albendazola

	<b>1.rektor MULJ + ALBENDAZOL</b>	<b>2.rektor MULJ</b>
<b><i>t, h</i></b>	<b><i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i></b>	<b><i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i></b>
0	4,18	5,56
4	4,72	-
8	4,88	-
12	4,94	-
24	5,1	4,44

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem, odnosno za udio anorganske i organske tvari kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 42**. Za biorazgradnju albendazola ne uočava se pravilna promjena organskog i anorganskog udjela tvari. Prema dobivenim podacima može se reći da albendazol nema utjecaja na odumiranje mikroorganizama mulja, odnosno smanjenje organske tvari.

**Tablica 42.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje albendazola

<b><i>t, h</i></b>	<b><i>m(org), g</i></b>	<b><i>m(anorg), g</i></b>
0	0,0048	0,1546
4	0,0053	0,1591
8	0,0050	0,1587
12	0,0048	0,1572
24	0,0049	0,1569

U **Tablici 43** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Prema dobivenim rezultatima mjerenja, svi uzorci osim uzorka otopine albendazola iz 1. reaktora prije procesa šaržne biorazgradnje su biorazgradivi. Valja napomenuti kako je prilikom mjerenja kemijske i biokemijske potrošnje kisika za sve antiparazitike bilo potrebno razrijeđivanje uzoraka kako bi se mogla provoditi mjerenja. Prema BLOWIN vrijednostima, kao i za do sada analizirane ksenobiotike, do biorazgradnje dolazi kroz vremenski interval od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Jedino rezultat za otopinu iz prvog reaktora prije procesa biorazgradnje nije u skladu s BLOWIN vrijednostima. Može se pretpostaviti da na

rezultat za 0 h za 1. reaktor utječe to što je temeljna standardna otopina pripravljena u metanolu te se uzorak za 0 h uzima odmah nakon dodavanja standardne otopine. Metanolna standardna otopina te kristalizacija antiparazitika zbog slabe topljivosti u vodi značajno utječu na rezultate na samom početku procesa. S vremenom dolazi do prilagodbe mikroorganizama na medij (pH-vrijednost je u optimalnom području za život mikroorganizama) pa se dobiva za uzorak nakon 24 sata podatak da je biorazgradiv.

**Tablica 43.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje albendazola

Uzorak	<i>BPK<sub>5</sub></i> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK<sub>5</sub></i>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	4179,3287	9213,33	2,2045	ne
1. reaktor - 24h	-947,4813	5443,33	-5,7451	da
2. reaktor - 0h	765,2190	357,67	0,4674	da
2. reaktor - 24h	215,0040	69,00	0,3209	da

Obrađeni podaci dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom daju rezultate prikazane u **Tablici 44.** Tijekom kromatografske analize uzoraka uočava se kako se krivulja albendazola preklapa s krivuljom određene komponente iz mulja i zbog toga nije bilo moguće kromatografskom analizom kvantitativno odrediti komponentu albendazola. Shodno tome, obradom rezultata nakon mikrovalne ekstrakcije nije moguće doći do podatka kolika je koncentracija albendazola u 1. reaktoru nakon 24 sata.

**Tablica 44.** Dobivene vrijednosti koncentracije albendazola prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

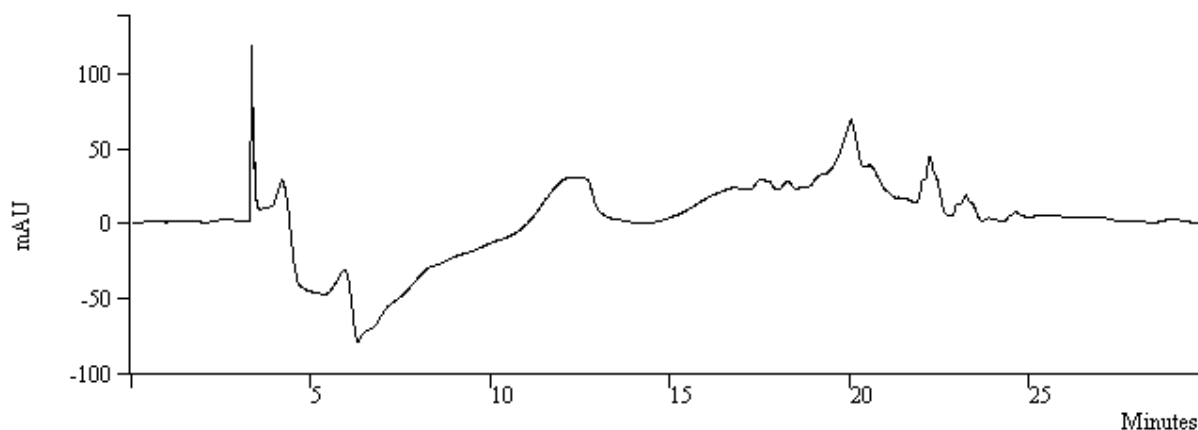
	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija albendazola ekstrahirana u mulju nakon 24 h	9,58
koncentracija albendazola u 1. reaktoru nakon 24 h	-
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	-
početna koncentracija pripravljene otopine albendazola	4,29

Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskorištenje mikrovalne ekstrakcije od 90,36 %. Prema dobivenim podacima, mulj u reaktoru je adsorbirao količinu albendazola od 9,58 mg L<sup>-1</sup> što bi značilo da je mulj u reaktoru adsorbirao skoro svu količinu dodanog albendazola.

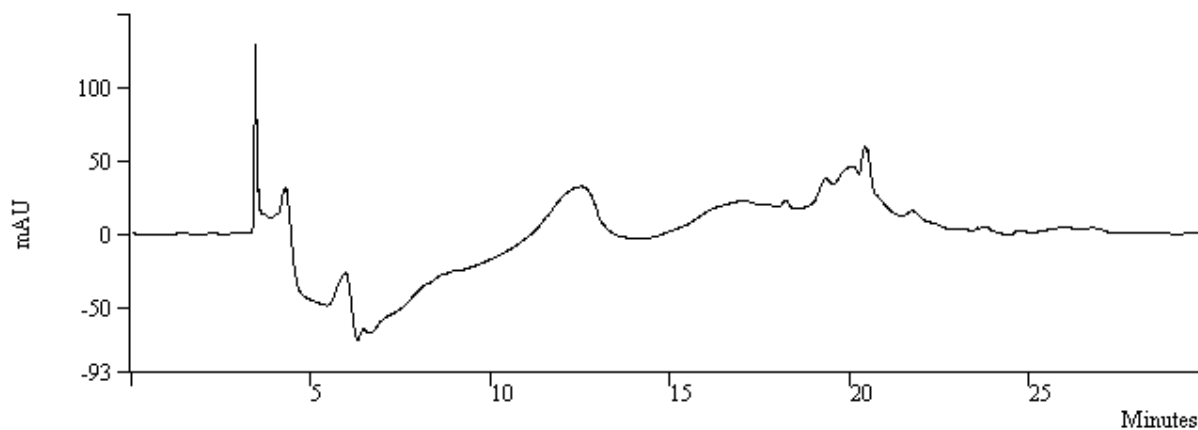
Dalje prema podacima se uočava da početna otopina albendazola ima koncentraciju od 4,29 mg L<sup>-1</sup>. Ova dva podatka su potpuno isključiva jedan prema drugome, te ovaj podatak za početnu koncentraciju albendazola sigurno nije točan. Vrlo lako objašnjivo je samim time što albendazol nije topljiv u vodi te sigurno u reaktoru dolazi do rekristalizacije albendazola i njegove manje koncentracije u otopini. Zbog njegove rekristalizacije cijeli proces analize albendazola je otežan i dobiveni rezultati nisu reprezentativni.

### Kromatografska detekcija i analiza

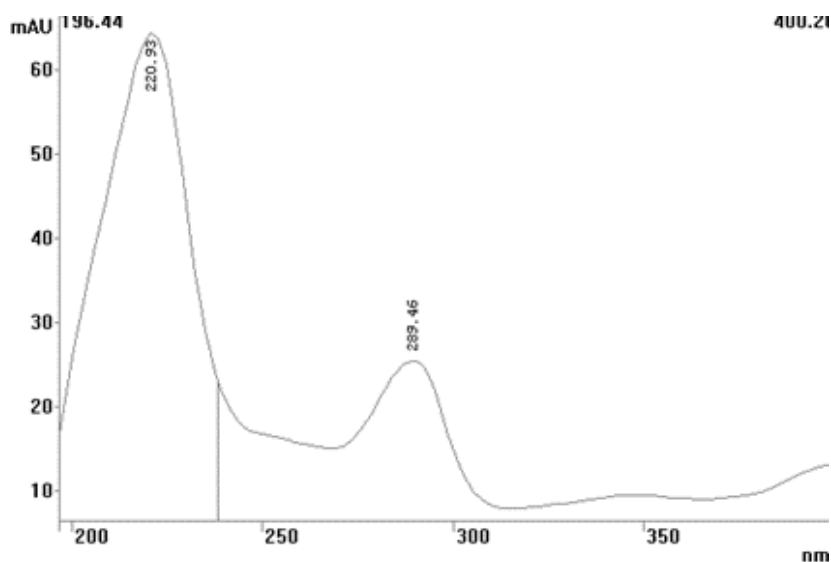
Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 69** i **70**. Kromatografska krivulja koja pripada albendazolu se ne može sa sigurnošću odrediti jer se poklapa sa nepoznatom komponentom prisutnom u mulju. Na **Slici 71** je prikazan apsorpcijski spektar dobivenog razgradnog produkta albendazola kojem je vrijeme zadržavanja 20,451 min. Na krivuljama prije i nakon biorazgradnje se uočavaju promjene, ali te promjene su vidjeljive i na krivuljama uzoraka iz kontrolnog reaktora u kojem je prisutan samo mulj prema tome te promjene ne nastaju isključivo zbog promjena koje se događaju s albendazolom.



**Slika 69.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h

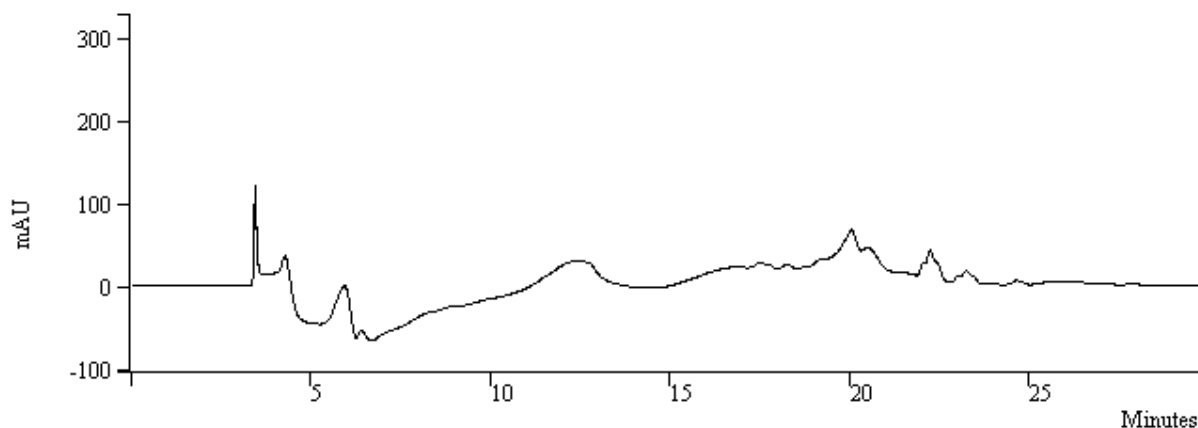


**Slika 70.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h

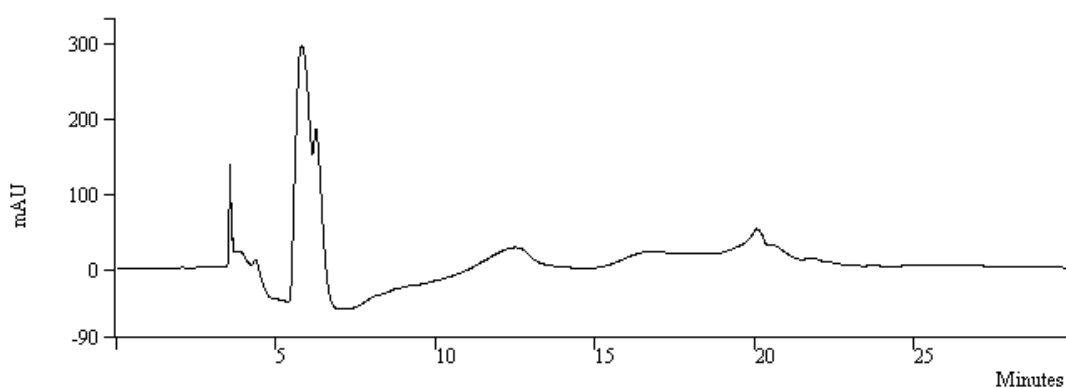


**Slika 71.** ApSORpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=20,451$  min) albendazola koji je nastao tijekom šaržne biorazgradnje albendazola

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 72 i 73**.

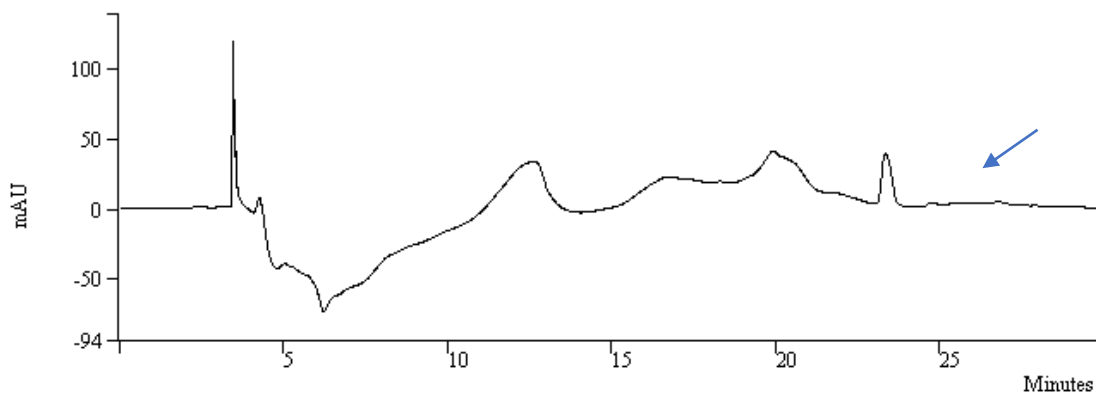


**Slika 72.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h

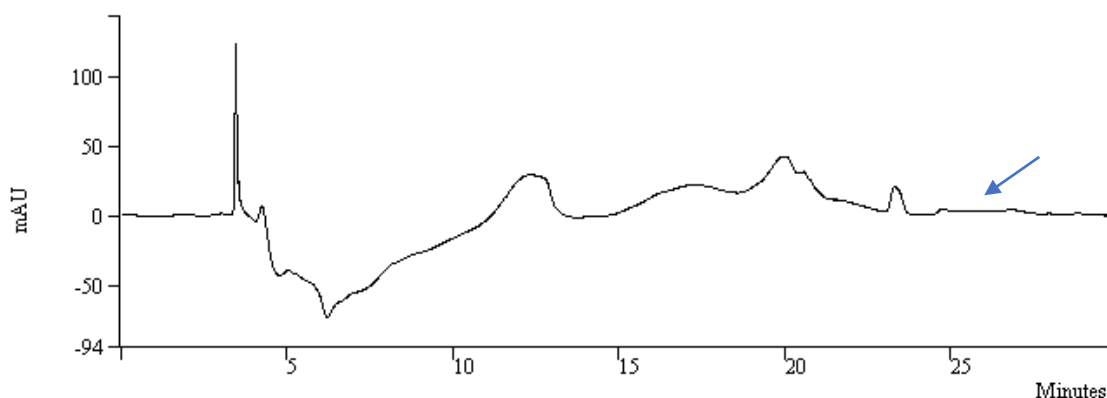


**Slika 73.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo albendazol u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 74 i 75**. Prilikom dodavanja albendazola u reaktor s vodom dolazi do smanjenja topljivosti albendazola i zbog toga su kromatografske krivulje koje pripadaju albendazolu manje površine od onih pripremanih u čistom metanolu za istu koncentraciju. Vidljivo je da dolazi do rekristalizacije jer se tijekom aeriranja otopine u reaktoru na površini otopine uočavao bijeli prah. U uzorcima iz 3. reaktora zamotanog u foliji nije došlo do razgradnje albendazola i nastanka novih spojeva što ukazuje da nije došlo do hidrolize aktivne komponente.

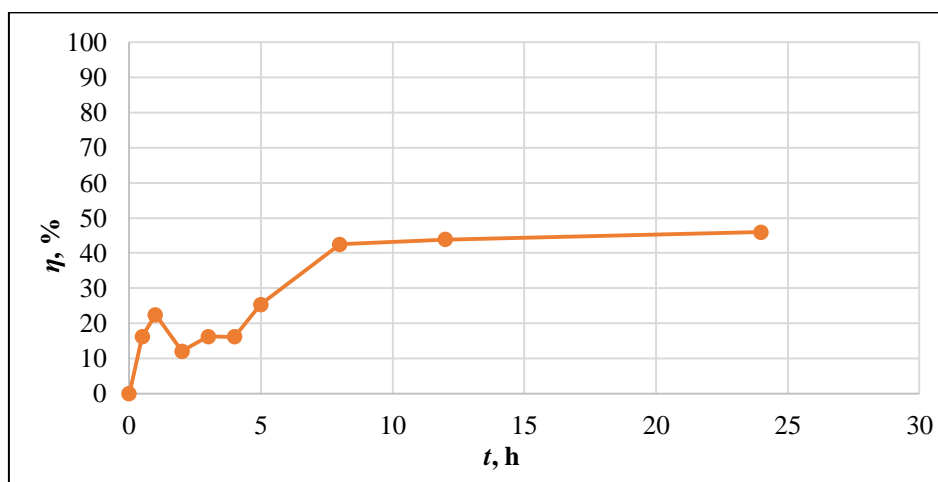


**Slika 74.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h



**Slika 75.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 76** prikazana je učinkovitost uklanjanja albendazola šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata. Na grafu se uočava učinkovitost uklanjanja od skoro 50 %, ali nije došlo do uklanjanja albendazola iz otopine nego do njegove rekristalizacije iz otopine.

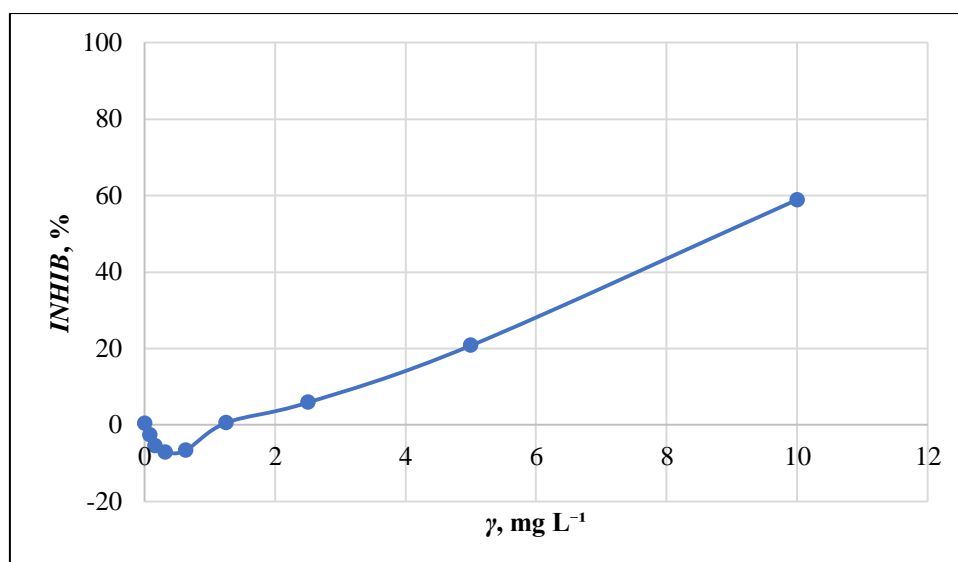


**Slika 76.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja albendazola iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Prema svim dobivenim rezultatima, ne može se sa sigurnošću tumačiti dolazi li do uklanjanja albendazola i kojim procesima pošto se albendazol loše otapa u vodenim otopinama. Pojava njegove rekristalizacije u reaktorima smanjuje njegovu koncentraciju u samim otopinama te time dobiveni rezultati nisu pouzdani, odnosno ne može se utvrditi dolazi li do njegovog uklanjanja iz otopine uslijed biorazgradnje ili adsorpcije na mulj. Može se potvrditi samo teza da tijekom 24 sata ne dolazi do hidrolize albendazola.

### Toksičnost

Na **Slici 77** prikazan je graf toksičnosti otopine albendazola u deioniziranoj vodi odmah nakon pripreme otopine, prije šaržne biorazgradnje. Dolazi do porasta inhibicije s porastom koncentracije uzorka, otopina albendazola koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  je toksična. Inhibicija kulture bakterije *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku albendazola iznosi oko 59 %.



**Slika 77.** Graf toksičnosti otopine albendazola u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

U **Tablici 45** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima albendazola iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja albendazola nakon 24 sata iznosi oko 6 %. Mala inhibicija je sigurno uslijed toga što se albendazol uklonio iz otopine i to najvećim dijelom zbog rekristalizacije, a vjerojatno i zbog adsorpcije na mulj. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture. Izmjeren je inhibicija od oko -36 %. Inhibicija uzorka otopine albendazola odmah nakon pripreme je oko 59 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine iznosi otprilike 37 %. Pad inhibicije ukazuje na to da u 3. reaktoru nakon što se TSO albendazola



doda u deioniziranu vodu dolazi do ponovne kristalizacije pošto je albendazol inače netopljiv u vodi. Prema tome, iako ne dolazi do uklanjanja albendazola uslijed hidrolize, uslijed rekristalizacije nije otopljena tolika količina albendazola u uzorku.

**Tablica 45.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka albendazola

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Čista otopina albendazola koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	58,9254
Otopina iz 1. reaktora (mulj + albendazol)	24	5,9060
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-35,8386
Otopina iz 3. reaktora (albendazol)	24	37,2860

#### 4.1.5. Razgradnja febantela

##### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za febantel za pH, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 46**. U reaktorima s muljem očitane pH-vrijednosti su unutar intervala od 6,5 – 8,5 koji odgovara optimalnoj biološkoj aktivnosti. Ne dolazi do značajne promjene temperature tijekom 24 sata. Koncentracija kisika u otopini prvog reaktora blago opada tijekom zadnjih 16 sati, dok u drugom reaktoru raste.

**Tablica 46.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje febantela

t, h	1.reaktor MULJ + FEBANTEL			2.reaktor MULJ			3.reaktor FEBANTEL	
	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C
0	7,47	22,0	-	7,25	22,5	-	5,86	21,5
0,5	7,91	21,5	-	7,72	22,5	-	6,00	21,5
1	8,02	21,5	-	7,91	22,5	-	6,27	21,5
2	7,99	21,5	-	7,92	22,5	-	5,98	21,5
3	8,09	21,0	-	8,00	22,0	-	6,54	21,0
4	7,95	21,0	8,02	7,99	22,0	7,61	6,09	21,0
5	8,07	21,0	-	7,97	22,0	-	6,46	20,5
8	7,95	21,0	7,91	7,99	22,5	7,53	6,33	20,5
12	8,11	21,0	7,90	8,04	22,0	7,61	6,02	20,5
24	8,13	20,0	7,91	7,98	21,5	7,98	6,57	19,5

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za MLSS, u procesu biorazgradnje febantela prikazane su u **Tablici 47**. Iz dobivenih podataka uočava se pad vrijednosti ukupne suspendirane tvari u oba reaktora.

**Tablica 47.** Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje febantela

	1.rektor MULJ + FEBANTEL	2.reaktor MULJ
<i>t, h</i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>
0	2,56	2,16
4	4,42	-
8	1,84	-
12	1,76	-
24	1,80	1,98

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem, odnosno za udio anorganske i organske tvari kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 48**. Za biorazgradnju febantela ne uočava se pravilna promjena organskog i anorganskog udjela tvari. Prema tim podacima, febantel nema utjecaj na odumiranje mikroorganizama aktivnog mulja.

**Tablica 48.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje febantela

<i>t, h</i>	<i>m(org), g</i>	<i>m(anorg), g</i>
0	0,0029	0,1486
4	0,0055	0,1574
8	0,0024	0,1450
12	0,0021	0,1476
24	0,0020	0,1443

U **Tablici 49** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Prema izmjerenim vrijednostima KPK i BPK<sub>5</sub>, uzorci iz procesa biorazgradnje febantela odnosno iz 1. reaktora nisu biorazgradivi. Prema BIOWIN vrijednostima može se reći da je febantel biorazgradiv, nije lako biorazgradiv, ali do njegove razgradnje dolazi kroz period od nekoliko mjeseci. Dobeni rezultati nisu u skladu s BIOWIN podacima. U ovim procesnim uvjetima, pripremljena i analizirana otopina febantela iz prvog reaktora nije biorazgradiva.

**Tablica 49.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje febantela

Uzorak	<i>BPK<sub>5</sub></i> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK<sub>5</sub></i>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	2637,0205	8340	3,1627	ne
1. reaktor - 24h	335,2083	4820	14,3791	ne
2. reaktor - 0h	-462,1867	123,67	-0,2676	da
2. reaktor - 24h	-407,0701	86,67	-0,2129	da

Obrađeni podaci dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom daju rezultate prikazane u **Tablici 50**.

**Tablica 50.** Dobivene vrijednosti koncentracije febantela prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

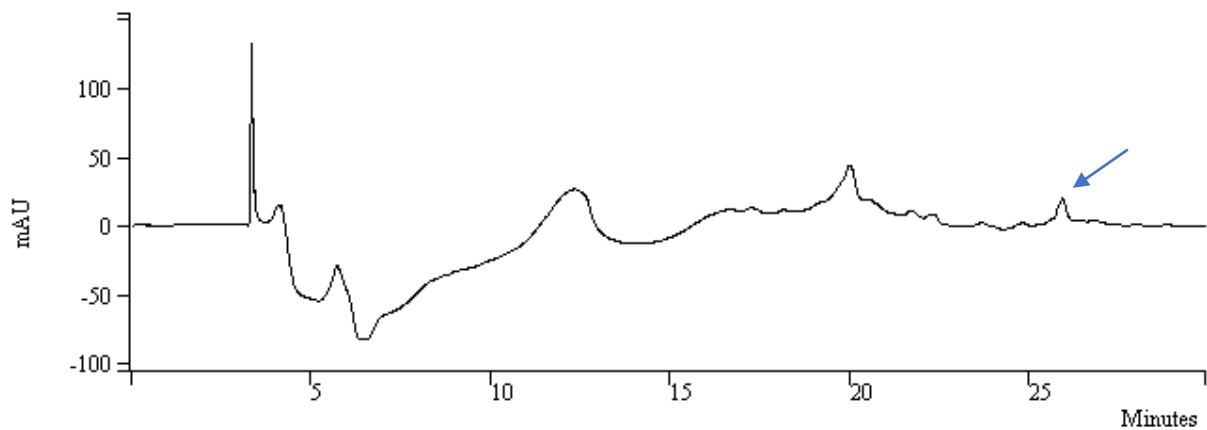
	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija febantela ekstrahirana u mulju nakon 24 h	7,38
koncentracija febantela u 1. reaktoru nakon 24 h	0,49
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	7,87
početna koncentracija pripremljene otopine febantela	3,23

Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskoristivost postupka mikrovalne ekstrakcije od 66,47 %. Prema dobivenim podacima, mulj u reaktoru je adsorbirao količinu febantela od 7,38 mg L<sup>-1</sup> te ostatak febantela u otopini prvog reaktora iznosi 0,49 mg L<sup>-1</sup>. Provođenje ove analize vidljivo je otežano upravo zbog netopljivosti antiparazitika u vodenom mediju i to uzrokuje nesklad u rezultatima. Netopljivost febantela u vodi nam onemogućava praćenje kolika se količina febantela uklonila iz otopine rekristalizacijom, ali odstupanja nisu velika. Može se reći da dolazi do uklanjanja dijela febantela iz otopine upravo zbog adsorpcije na mulj jer je detektirana količina febantela ekstrahirana upravo iz mulja. Kromatografskom analizom će se doći do jasnije slike na koji način dolazi do uklanjanja febantela iz otopine.

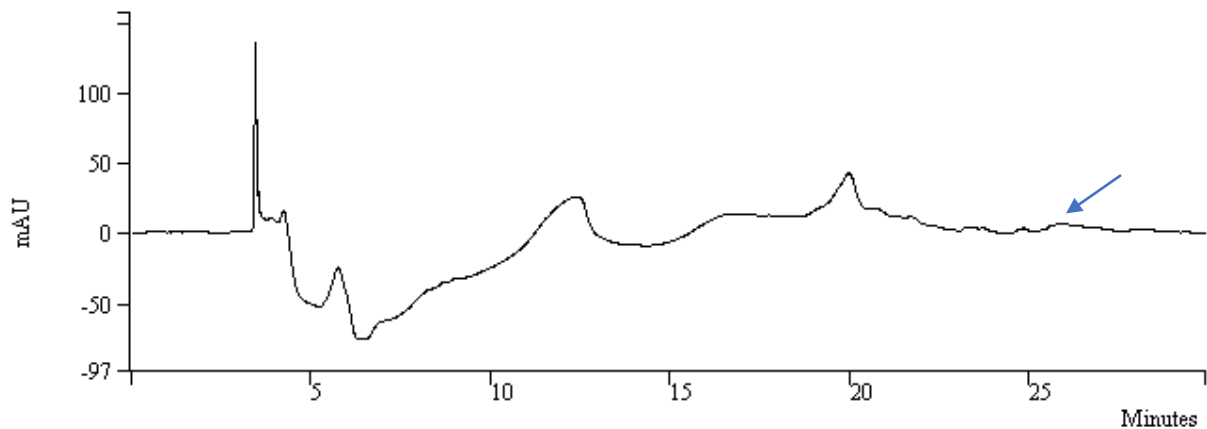
### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 78 i 79**. Kromatografska krivulja koja pripada febantelu je označena plavom strelicom. Tijekom šaržne biorazgradnje ne dolazi do nastajanja razgradnih produkata. Na početku

procesa uočava se prisutnost febantela u otopini te nakon 24 sata dolazi do gotovo potpunog nestanka febantela. To uklanjanje febantela dolazi ili uslijed adsorpcije na mulj ili uslijed rekristalizacije. Prema kromatogramima otopine iz trećeg reaktora koja je sadržavala samo otopinu febantela može se zaključiti da u prvom reaktoru sigurno dolazi i do adsorpcije febantela na mulj pošto dolazi gotovo do potpunog uklanjanja. Premda, sigurno i rekristalizacija febantela ima utjecaj na njegovo uklanjanje iz otopine pošto se ona događa i u trećem reaktoru.



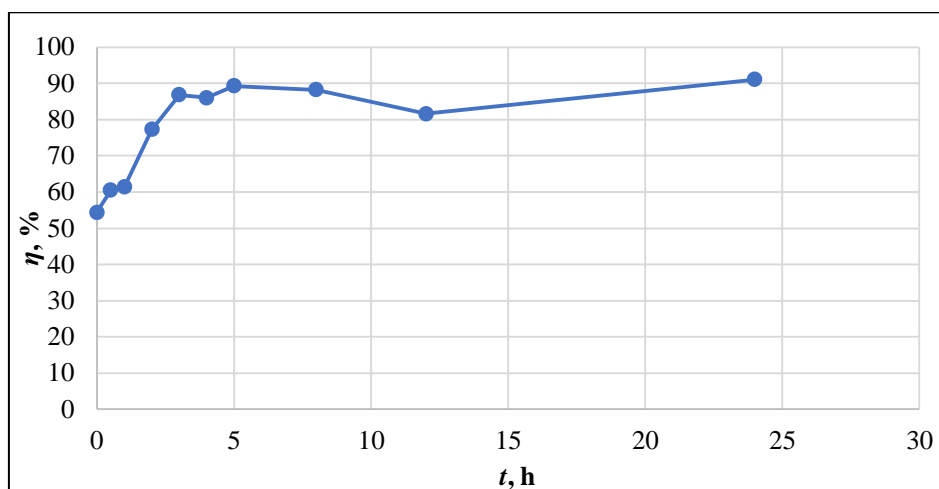
**Slika 78.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$  h



**Slika 79.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$  h

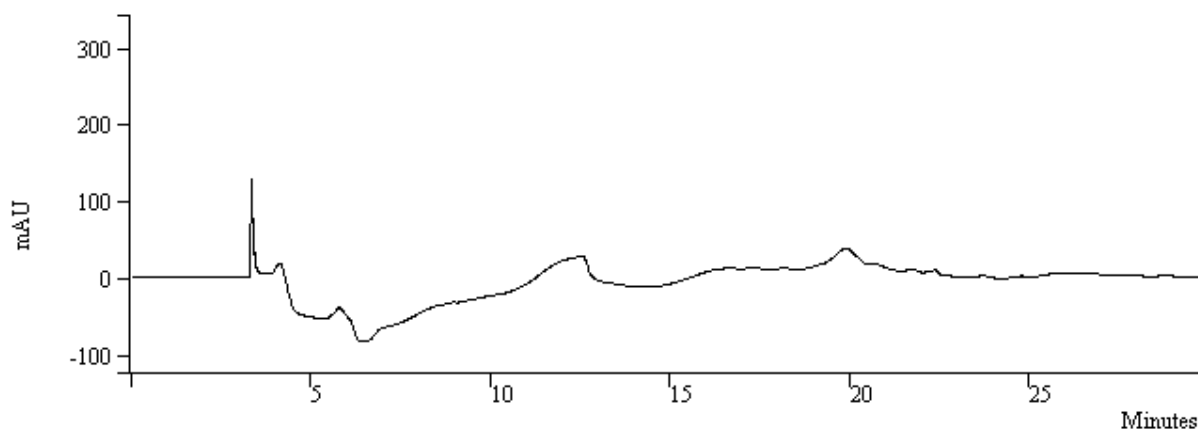
Na **Slici 80** prikazana je učinkovitost uklanjanja febantela šaržnom biorazgradnjom u 1. reaktoru tijekom 24 sata. Prema grafičkom prikazu učinkovitost uklanjanja febantela iznosi oko 90 %. Tako visokom postotku pridonose dijelom rekristalizacija febantela te dijelom

adsorpcija na mulj. Ne dolazi do nastanka razgradnih ili transformacijskih produkata te u slučaju febantela možemo reći da ne dolazi do biorazgradnje tijekom 24 sata, a to potvrđuju i dobiveni rezultati odnosa vrijednosti  $BPK_5/KPK$ . Prema prethodno provedenim ispitivanjima [17] očekivano je da je febantel najpostojaniji pri procesima biorazgradnje od sva tri ispitivana farmaceutika. Međutim, prema prethodno provedenoj biorazgradnji tijekom 96 sati, dobivena je mala količina transformacijskih ili razgradnih produkata febantela koji tijekom provedbe biorazgradnje febantela u ovom radu nisu nastali i nisu detektirani. Moguće da je vrijeme od 24 sata prekratko da uopće započnu procesi biorazgradnje pošto su febantelu prema BIOWIN podacima potrebni mjeseci za razgradnju.

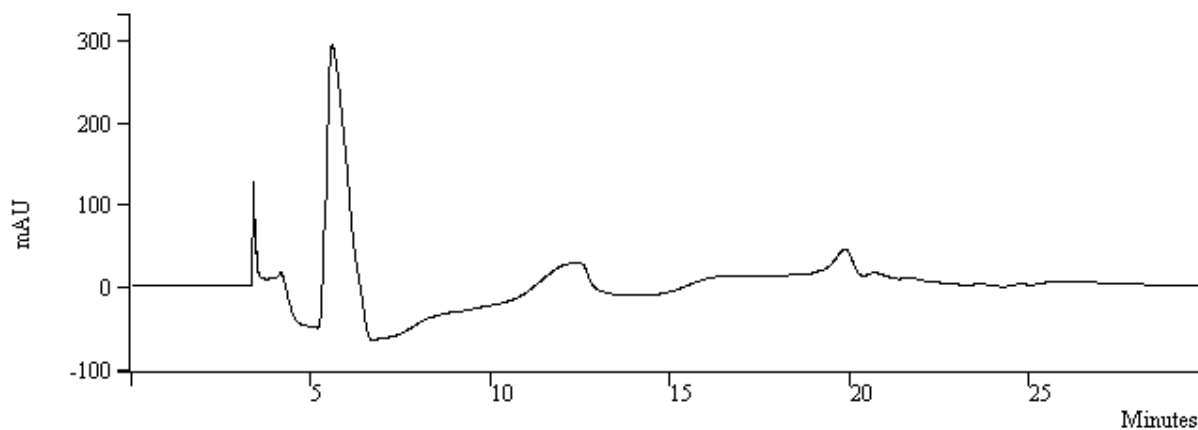


**Slika 80.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela iz 1. reaktora tijekom 24 sata

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 81 i 82**.

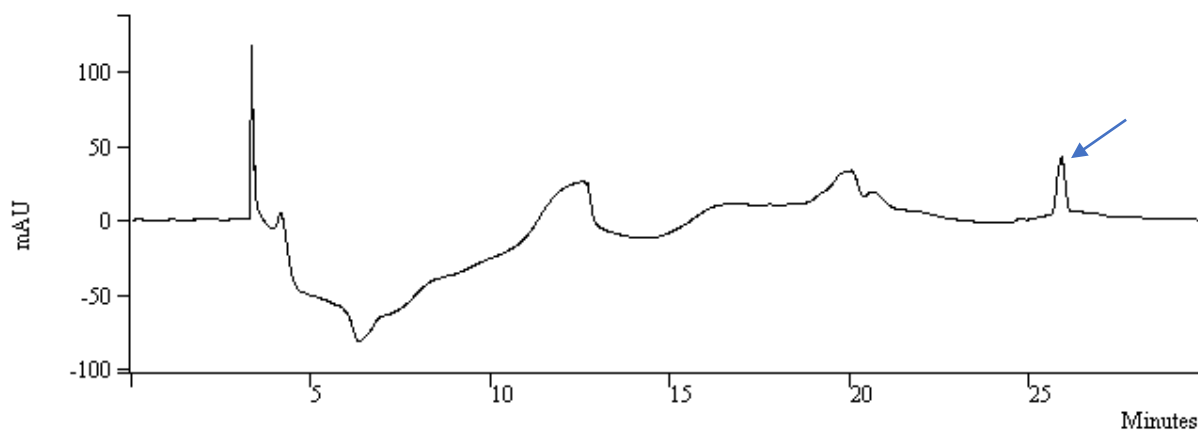


**Slika 81.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$  h

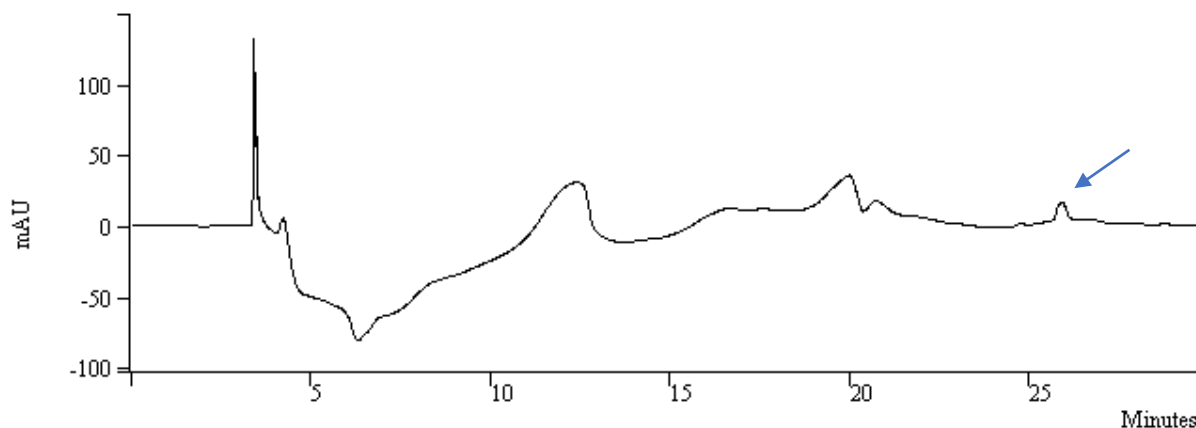


**Slika 82.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo febantel u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 83** i **84**. U uzorku nakon 24 sata uočava se znatno manja kromatografska krivulja te samim time je uklanjanje febantela izraženo, ali nije došlo do nastanka novih spojeva što ukazuje da nije došlo do hidrolize febantela.

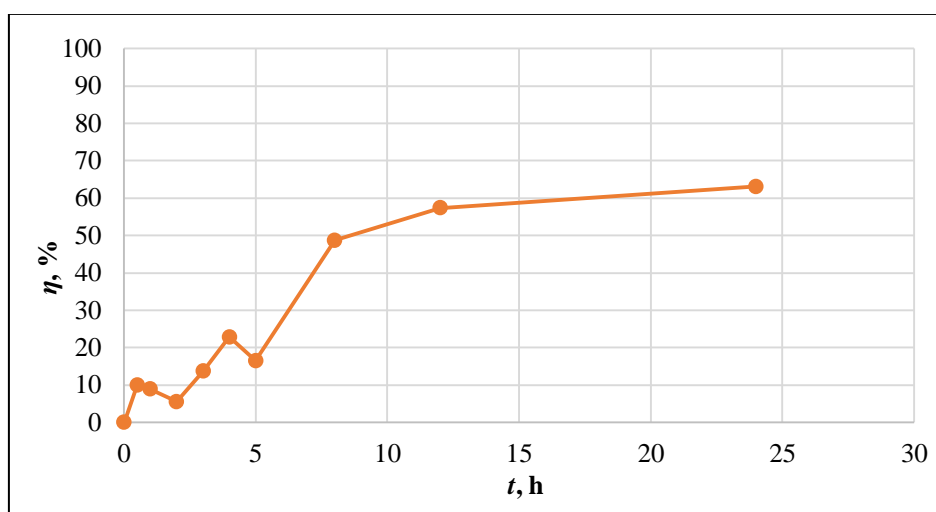


**Slika 83.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$  h



**Slika 84.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$  h

Na **Slici 85** prikazana je učinkovitost uklanjanja febantela šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata. Učinkovitost uklanjanja od oko 60 % može se pripisati isključivo rekristalizaciji febantela zbog njegove netopljivosti u vodi.



**Slika 85.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela iz 3. reaktora tijekom 24 sata

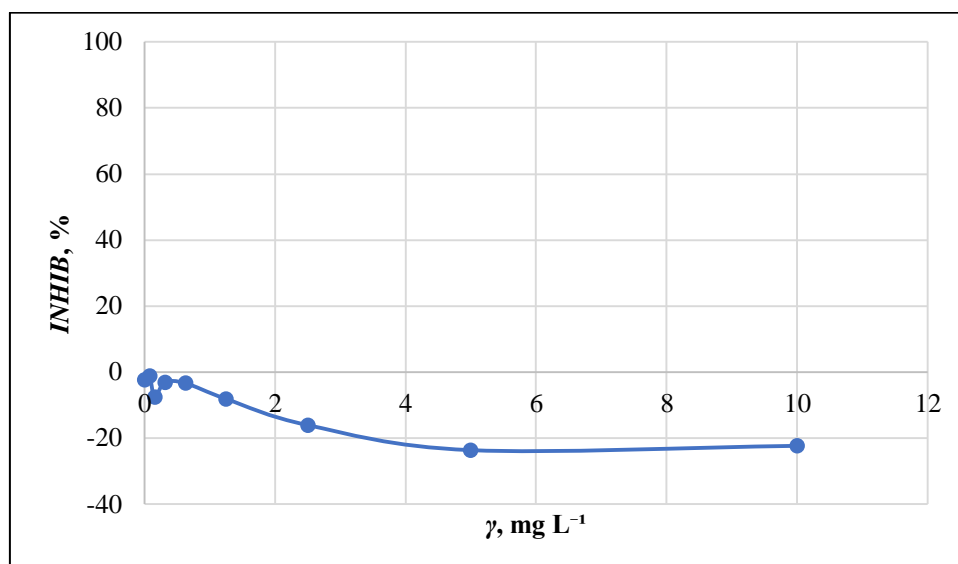
Iz kromatografske analize je vidljivo da ne dolazi do razgradnje febantela ni biorazgradnjom ni hidrolizom. U prvom reaktoru dolazi do adsorpcije febantela na pahuljice mulja što je potvrđeno rezultatima mikrovalne ekstrakcije.

### Toksičnost

**Slika 86** prikazuje graf toksičnosti otopine febantela u deioniziranoj vodi odmah nakon pripreme otopine, prije šaržne biorazgradnje. Dolazi do pada inhibicije s porastom koncentracije uzorka, otopina febantela koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  nije toksična. Inhibicija



kulture bakterije *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku febantela iznosi oko -22%. Ponovno, ovakvi rezultati su neočekivati obzirom na ranije provedena ispitivanja toksičnosti febantela [58]. Ovakvi rezultati mogu se objasniti time što u vodenim otopinama dolazi do rekristalizacije febantela te se ne može sa sigurnošću znati koliko iznosi stvarna koncentracija otopljenog febantela u otopini. Možda je ta stvarna koncentracija otopljenog febantela premala da uzorkuje inhibiciju bakterijske kulture.



**Slika 86.** Graf toksičnosti otopine febantela u deioniziranoj vodi koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup>

U **Tablici 51** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima febantela iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja febantela nakon 24 sata iznosi oko 37 %. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata ponovno ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture, izmjerena je inhibicija od oko -39 %. Inhibicija uzorka otopine febantela odmah nakon pripreme je oko -22 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine poraste na otprilike 1 %. Porast inhibicije ukazuje na to da pod utjecajem aeracije dolazi do boljeg otapanja febantela u otopini, ali to svakako nije količina koja bi znatno utjecala na porast toksičnosti otopine.

**Tablica 51.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka febantela

Uzorak	t, h	%INHIB (orig. uzorka)
Čista otopina febantela koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	-22,3613
Otopina iz 1. reaktora (mulj + febantel)	24	37,4797
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-39,0202
Otopina iz 3. reaktora (febantel)	24	0,9867

#### 4.1.6. Razgradnja mebendazola

##### Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Izmjerene vrijednosti za mebendazol za pH-vrijednost, temperaturu i koncentraciju kisika prikazani su u **Tablici 52**. Sve izmjerene pH-vrijednosti u reaktorima s muljem su optimalne za biološku aktivnost mikroorganizama aktivnog mulja. Uslijed aeracije reaktora dolazi do povećanja koncentracije kisika u otopini tijekom 24 sata. Promjena temperature je neznatna.

**Tablica 52.** Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje mebendazola

t, h	1.reaktor MULJ + MEBENDAZOL			2.reaktor MULJ			3.reaktor MEBENDAZOL	
	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C	konc. O <sub>2</sub> , mg L <sup>-1</sup>	pH	T, °C
0	7,25	23,5	5,88	7,29	22,0	4,02	6,12	23,0
0,5	7,63	23,5	-	7,43	22,0	-	6,03	23,0
1	7,78	23,0	-	7,51	21,5	-	6,06	22,5
2	7,74	23,0	-	7,66	21,5	-	6,23	22,0
3	7,75	23,0	-	7,67	21,0	-	6,30	22,0
4	7,76	23,0	6,80	7,66	21,0	6,89	6,18	22,0
5	7,75	22,5	-	7,65	21,0	-	6,49	21,5
8	7,72	22,0	6,88	7,65	20,5	7,05	6,40	21,0
12	7,67	22,0	6,37	7,69	20,0	7,12	6,18	20,5
24	7,79	21,5	7,34	7,50	19,0	7,38	6,55	19,5

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za MLSS, u procesu biorazgradnje mebendazola prikazane su u **Tablici 53**. Iz dobivenih podataka uočava se pad ukupne suhe tvari u oba reaktora.

**Tablica 53.** Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje mebendazola

	1.rektor MULJ + MEBENDAZOL	2.reaktor MULJ
<i>t, h</i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>	<i>MLSS, g L<sup>-1</sup></i>
0	4,32	4,28
4	4,28	-
8	4,02	-
12	4,00	-
24	3,76	3,96

Eksperimentalno dobivene vrijednosti za ostatak i gubitak žarenjem, odnosno za udio anorganske i organske tvari kroz 24 sata u prvom reaktoru, prikazane su u **Tablici 54**. Za biorazgradnju mebendazola uočava se porast anorganske tvari i opadanje organske tvari, odnosno dolazi do odumiranja mikroorganizama mulja.

**Tablica 54.** Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje mebendazola

<i>t, h</i>	<i>m(org), g</i>	<i>m(anorg), g</i>
0	0,0053	0,1480
4	0,0050	0,1542
8	0,0048	0,1532
12	0,0049	0,1491
24	0,0041	0,1554

U **Tablici 55** prikazane su izmjerene vrijednosti za kemijsku i biokemijsku potrošnju kisika. Prema podacima u tablici, svi uzorci, osim uzorka otopine mebendazola iz 1. reaktora prije procesa šaržne biorazgradnje, su biorazgradivi. Prema BIOWIN vrijenostima do biorazgradnje mebendazola dolazi u vremenskom intervalu kroz tjedne i mjesec. U procesnim uvjetima u ovom radu, samo prvi uzorak iz prvog reaktora daje podatak da nije biorazgradiv. Ponovno se može se pretpostaviti utjecaj metanolne standardne otopine na rezultat za 0 h za 1. reaktor. Kao i kod albendazola, vjerojatno i kod mebendazola tijekom 24 sata dolazi do prilagodbe mikroorganizama na medij (pH-vrijednost je u optimalnom području za život mikroorganizama) te se dobiva podatak da je uzorak nakon 24 sata biorazgradiv. U

budućim mjerenjima bi bilo dobro detaljnije analizirati što se zaista događa u tim uzorcima jer antiparazitici nisu topljivi u vodi te otopine antiparazitika u ovom radu u reaktorima nisu bile koncentrirane u mjeri u kojoj su bile koncentrirane otopine pesticida.

**Tablica 55.** Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje mebendazola

Uzorak	<i>BPK</i> <sub>5</sub> , mgO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	<i>KPK</i> , mg L <sup>-1</sup>	<i>KPK/BPK</i> <sub>5</sub>	Biorazgradivo?
1. reaktor - 0h	2438,1887	8770	3,5969	ne
1. reaktor - 24h	-692,7622	6855	-9,8951	da
2. reaktor - 0h	-462,1867	84.33	-0,1825	da
2. reaktor - 24h	-407,0701	37.33	-0,0917	da

Obrađeni podaci dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom daju rezultate prikazane u **Tablici 56.**

**Tablica 56.** Dobivene vrijednosti koncentracije mebendazola prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom

	$\gamma$ , mg L <sup>-1</sup>
koncentracija mebendazola ekstrahirana u mulju nakon 24 h	46,56
koncentracija mebendazola u 1. reaktoru nakon 24 h	0,28
ukupna koncentracija u mulju i reaktoru nakon 24 h	46,84
početna koncentracija pripremljene otopine mebendazola	1,76

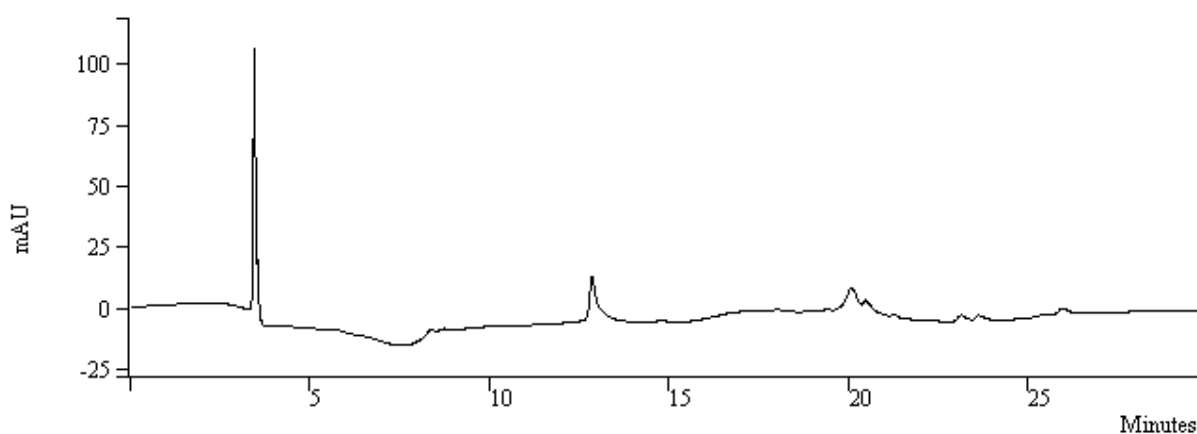
Podaci navedeni u tablici su dobiveni uz iskorištenje postupka mikrovalne ekstrakcije od 57,36 %. Prema dobivenim podacima, mulj u reaktoru je adsorbirao količinu mebendazola od 46,56 mg L<sup>-1</sup> što je nemoguće. Upravo zbog netopljivosti mebendazola u vodi, samim time dolazi i do nehomogenosti otopine, odnosno rekristaliziran mebendazol se u obliku sitnih čestica može nalaziti među pahuljicama mulja. Takvi uzorci nisu reprezentativni i upravo zbog toga može doći do ovakvih rezultata koji su krivi. Može se zaključiti da je metoda mikrovalne ekstrakcije za otopinu mebendazola pri ovim procesnim uvjetima nepogodna metoda.

Valja napomenuti, tijekom provođenja procesa analize antiparazitika brojna mjerenja su se ponavljala upravo zbog netopljivosti tih tvari u vodenom mediju. Tijekom budućih analiza bilo bi dobro odabrati otapalo u kojem se i pesticidi i antiparazitici dobro otapaju. Prilikom

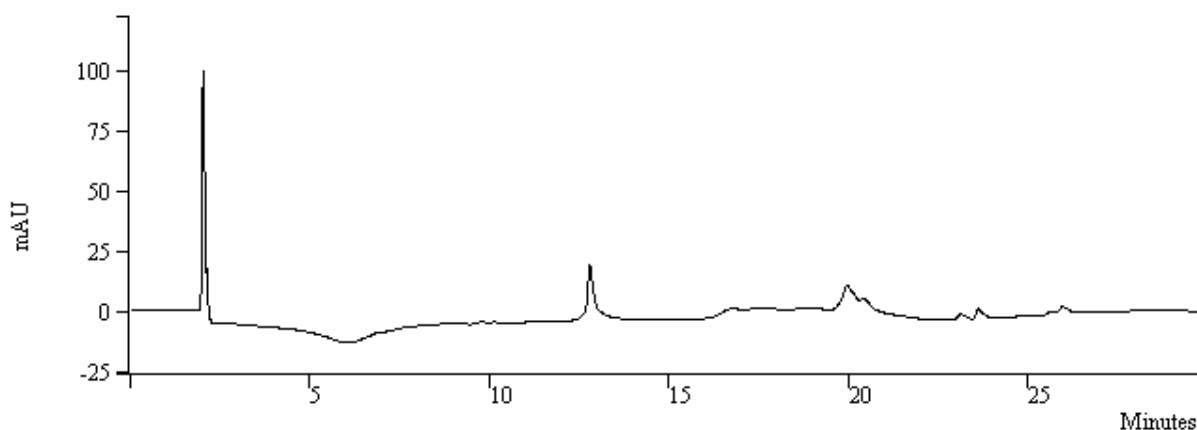
odabira otapala treba uzeti u obzir i utjecaj otapala na mikrobiologiju aktivnog mulja, odnosno da odabrano otapalo ne narušava mikrobiologiju mulja.

### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 87 i 88**. U 1. reaktoru mebendazol se odmah adsorbira na mulj i ne uočava ga se na kromatogramima uzoraka otopine. Ovakvo ponašanje mebendazola je očekivano jer mebendazol pripada skupini farmaceutika srednjeg sorpcijskog potencijala te je u njegovom slučaju moguća pojava trenutne adsorpcije na pahuljice mulja. [59]



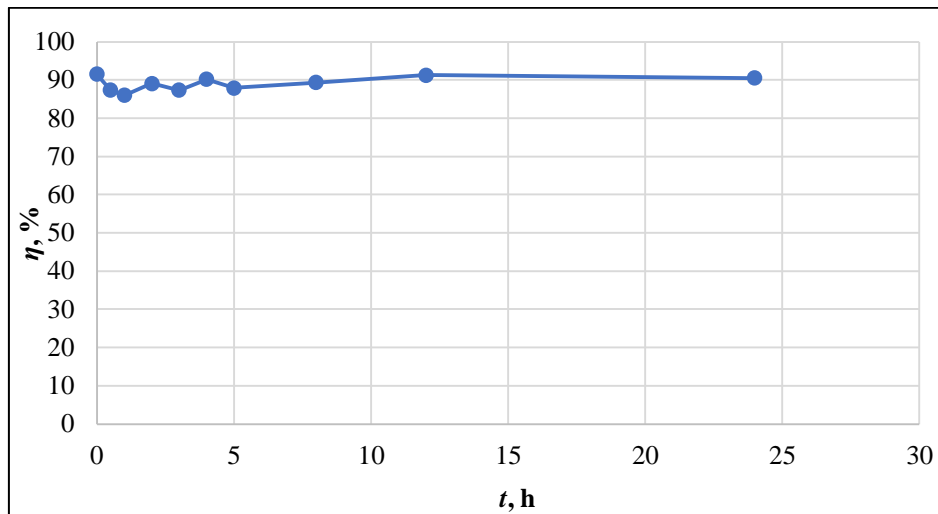
**Slika 87.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h



**Slika 88.** Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h

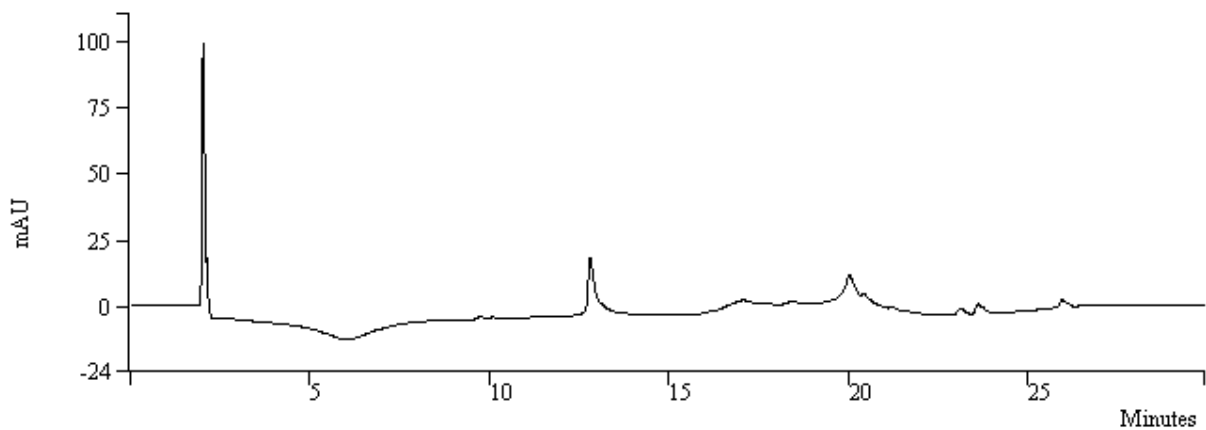
Na **Slici 89** prikazana je učinkovitost uklanjanja mebendazola šaržnom biorazgradnjom u 1. reaktoru tijekom 24 sata. Učinkovitost uklanjanja iznosi oko 90 % što se može pripisati upravo tom trenutnom adsorbiranju na pahuljice mulja. Iz kromatograma je vidljivo da nije

došlo do nastanka razgradnih ili transformacijskih produkata te se može reći da do biorazgradnje aktivnim muljem ne dolazi.

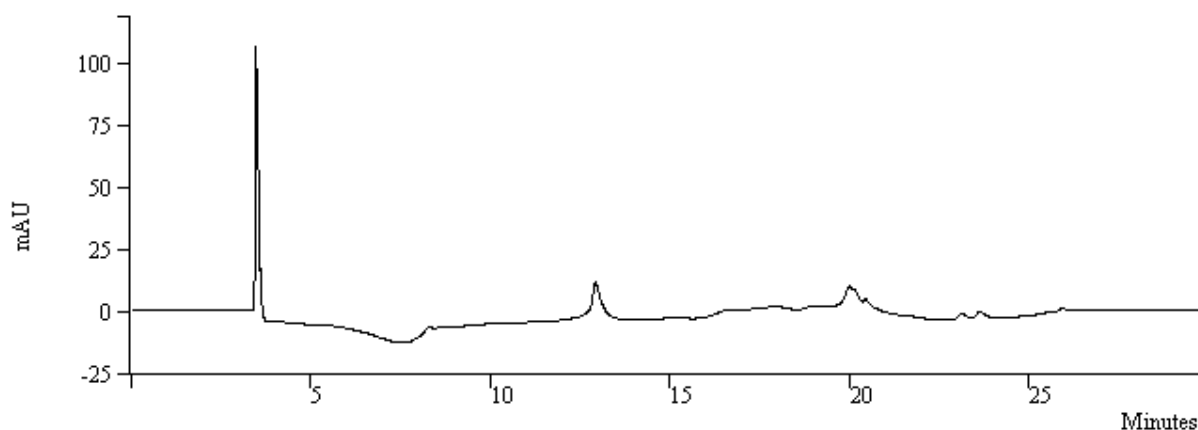


**Slika 89.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola iz 1. reaktora tijekom 24 sata

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. reaktora u kojem se nalazio samo mulj u vremenu 0 h i 24 h prikazani su na **Slikama 90** i **91**. Ne dolazi do nikakve promijene.

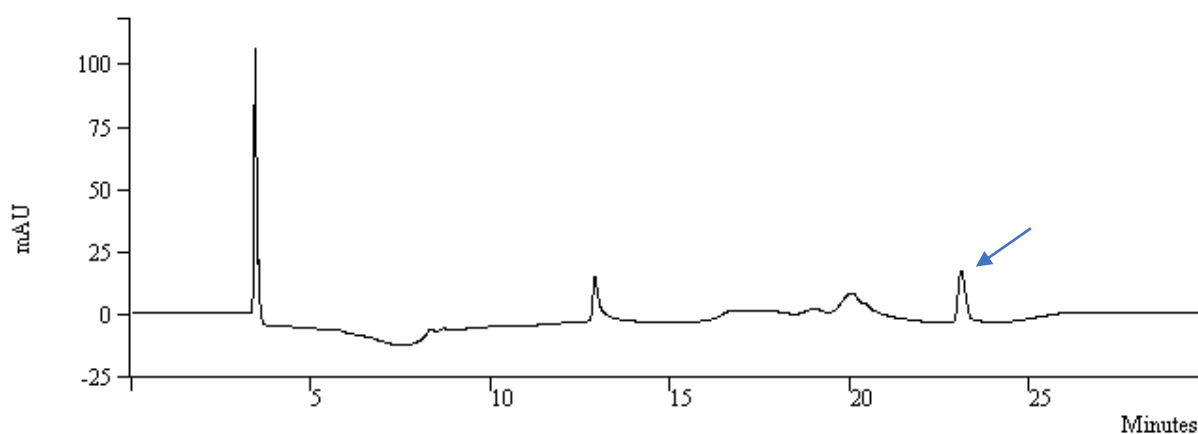


**Slika 90.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h

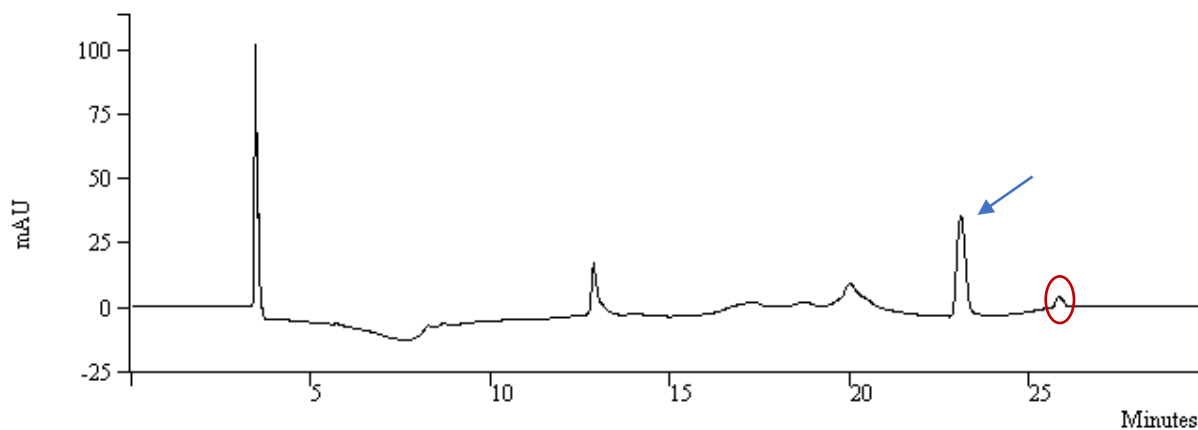


**Slika 91.** Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h

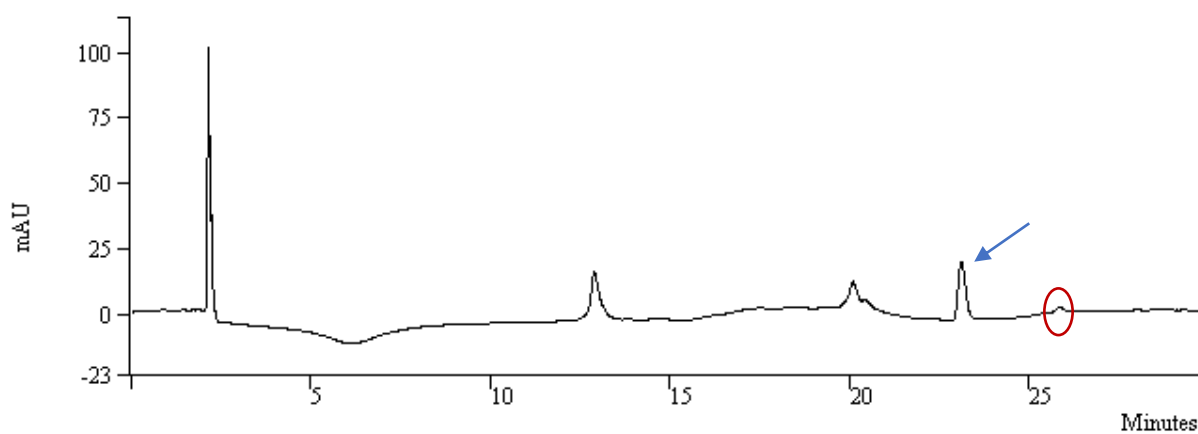
Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. reaktora u kojem se nalazio samo mebendazol u vremenu 0 h, 12 h i 24 h prikazani su na **Slikama 92, 93 i 94**. Kromatografska krivulja koja pripada mebendazolu je označena plavom strelicom, a transformacijski i razgradni produkti mebendazola su zaokruženi crveno. Tijekom aeracije dolazi do povećanja količine otopljenog mebendazola. U uzorcima iz 3. reaktora zamotanog u foliji dolazi do nastanka razgradnog produkta koji ima vrijeme zadržavanja na 25,869 min, što ukazuje na vjerojatnu hidrolitičku razgradnju mebendazola tijekom 24 sata. Nakon 12. sata dolazi do smanjenja i tog novog razgradnog produkta.



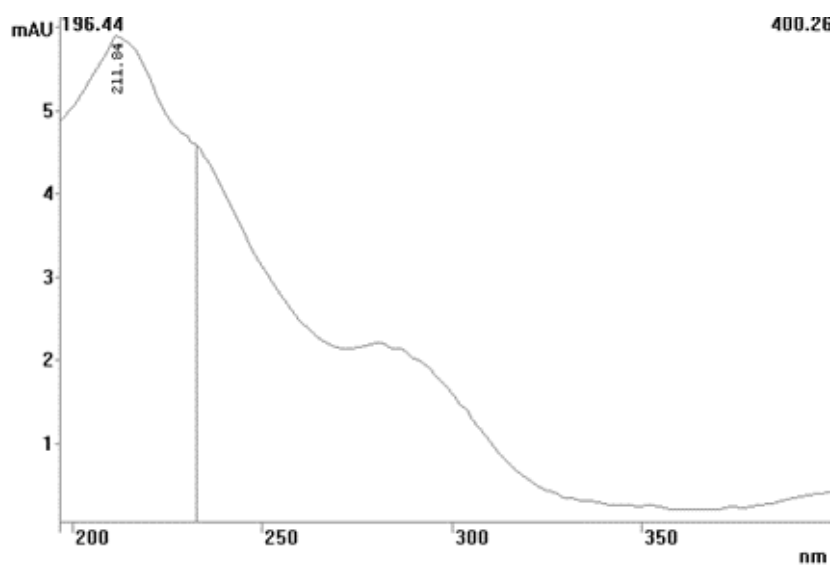
**Slika 92.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h



**Slika 93.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=12$  h



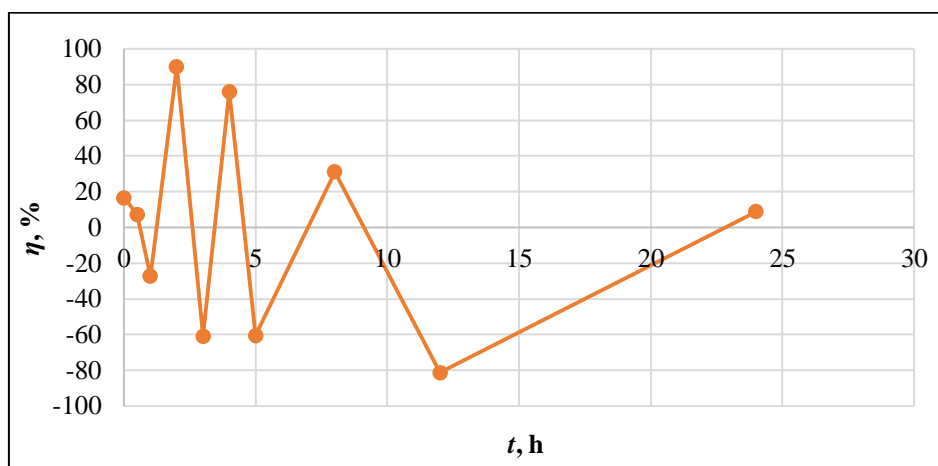
**Slika 94.** Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h



**Slika 95.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=25,869$  min) mebendazola koji je nastao tijekom hidrolize mebendazola



Na **Slici 96** prikazana je učinkovitost uklanjanja mebendazola šaržnom biorazgradnjom u 3. reaktoru tijekom 24 sata. Iz grafičkog prikaza vidi se krivulja koja ima izražene padove i uspone. U trećem reaktoru dolazi do uklanjanja dijela mebendazola hidrolizom. Skokove prikazane na grafu uzrokuju kristalizacija zbog netopljivosti mebendazola u vodenom mediju, sorpcija na same stijenke reaktora te ponovno otapanje zbog intenzivnog miješanja tijekom aeracije.



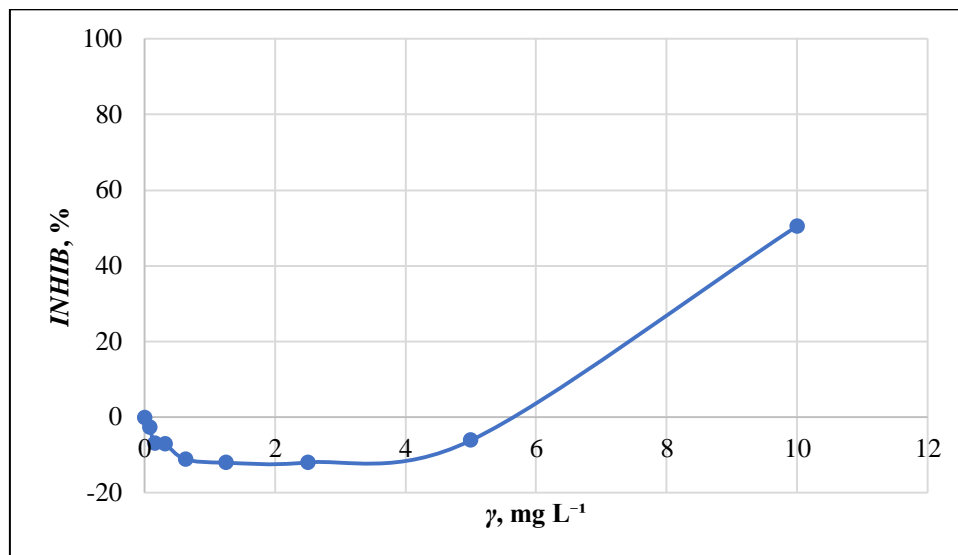
**Slika 96.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Wei i suradnici [59] su dokazali kako je hidroliza prvi stupanj u procesu biorazgradnje nekih farmaceutika. Premda u ovom radu ne dolazi do biorazgradnje mebendazola tijekom 24 sata, valjalo bi u budućim ispitivanjima provoditi duže procese šaržne biorazgradnje jer prema BIOWIN vrijednostima mebendazol je biorazgradiv kroz duži vremenski period. Zaključuje se kako je glavni proces uklanjanja mebendazola iz otopine prvog reaktora adsorpcija na mulj. Pošto u trećem reaktoru dolazi do uklanjanja dijela mebendazola zbog hidrolize, sigurno se taj proces odvija i u prvom reaktoru. Taj proces nije uočljiv zbog velike adsorpcije na mulj. Prema tome, u procesu biorazgradnje mebendazola pridonose i adsorpcija na pahuljice mulja i hidrolitički raspad mebendazola. U budućim istraživanjima bi trebalo proučiti hidrolizu mebendazola kako bi se identificirali nastali produkti te otkrio njihov toksični utjecaj.

### Toksičnost

Na **Slici 97** prikazuje se graf toksičnosti otopine mebendazola u deioniziranoj vodi odmah nakon pripreme otopine, prije šaržne biorazgradnje. Dolazi do porasta inhibicije s porastom

koncentracije uzorka, otopina mebendazola koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$  je toksična. Inhibicija kulture bakterije *Vibrio fischeri* u koncentriranom uzorku mebendazola iznosi oko 50 %.



**Slika 97.** Graf toksičnosti otopine mebendazola u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

U **Tablici 57** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima mebendazola iz reaktora u vremenu šaržne biorazgradnje ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 1. reaktora u kojem se provodila šaržna biorazgradnja mebendazola nakon 24 sata iznosi oko 13 %. Očekivana je manja inhibicija u odnosu na početnu otopinu pošto se mebendazol odmah adsorbira na mulj i tako uklanja iz otopine. Otopina iz 2. reaktora, koji je sadržavao samo mulj, nakon 24 sata ne pokazuje inhibiciju bakterijske kulture (0 %). Inhibicija uzorka otopine mebendazola odmah nakon pripreme je oko 50 % i nakon 24 sata aeracije u reaktoru inhibicija otopine padne na otprilike -21,4 %. Iz ove negativne vrijednosti inhibicije zaključuje se da nastali razgradni produkt nije toksičan. Svakako ovakav podatak nije očekivan obzirom da je kromatografski detektirana prisutnost mebendazola, pa se ovakva inhibicija može pripisati i nezdravoj bakterijskoj kulturi.

**Tablica 57.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka mebendazol

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Čista otopina mebendazola koncentracije 10 mg L <sup>-1</sup>	0	50,4924
Otopina iz 1. reaktora (mulj + mebendazol)	24	13,3723
Otopina iz 2. reaktora (mulj)	24	-0,0094
Otopina iz 3. reaktora (mebendazol)	24	-21,4158

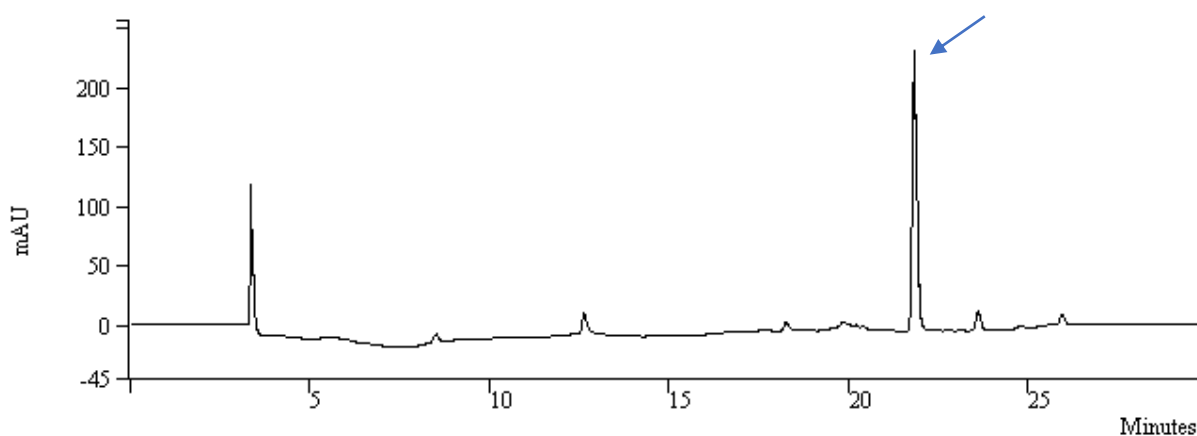
## 4.2. REZULTATI FOTOLIZE

Nakon 24-satnog provođenja procesa šaržne biorazgradnje, otopina iz 1. reaktora je podvrgnuta daljnjoj analizi izlaganjem Sunčevom zračenju kako bi se ispitaio utjecaj fotolize. U ovom koraku eksperimentalnog dijela praćena je fotoliza otopine u različitim uvjetima kako je opisano ranije i navedeno u **Tablici 16**.

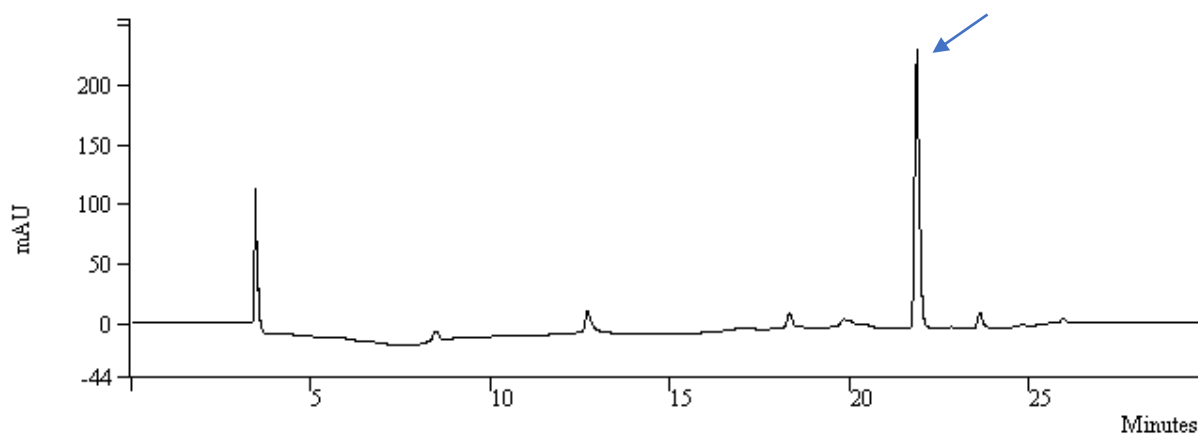
### 4.2.1. Fotoliza otopina acetamiprida

#### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. prve posudice fotolize u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 98** i **99**. U prvoj posudici se nalazila neprofiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon 24 sata procesa biorazgradnje. Kromatografska krivulja koja pripada acetamipridu je označena plavom strelicom. Tijekom fotolize koja se provodila 5 sati u prvoj posudici ne dolazi do značajne promjene u koncentraciji acetamiprida u otopini, ne dolazi do njegovog uklanjanja fotokatalitičkim raspadom. Prisutnost mulja u posudici tijekom fotolize nema nikakvu ulogu.

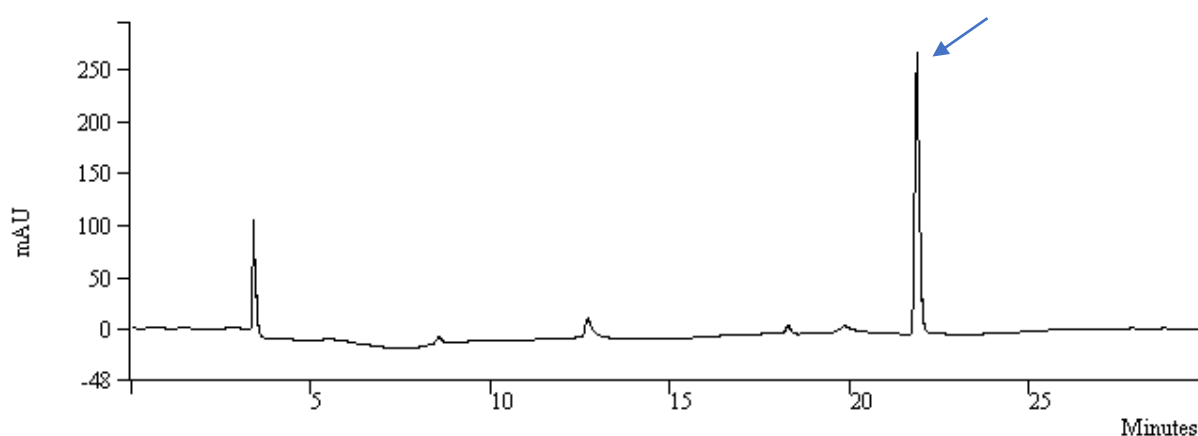


**Slika 98.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0$  h

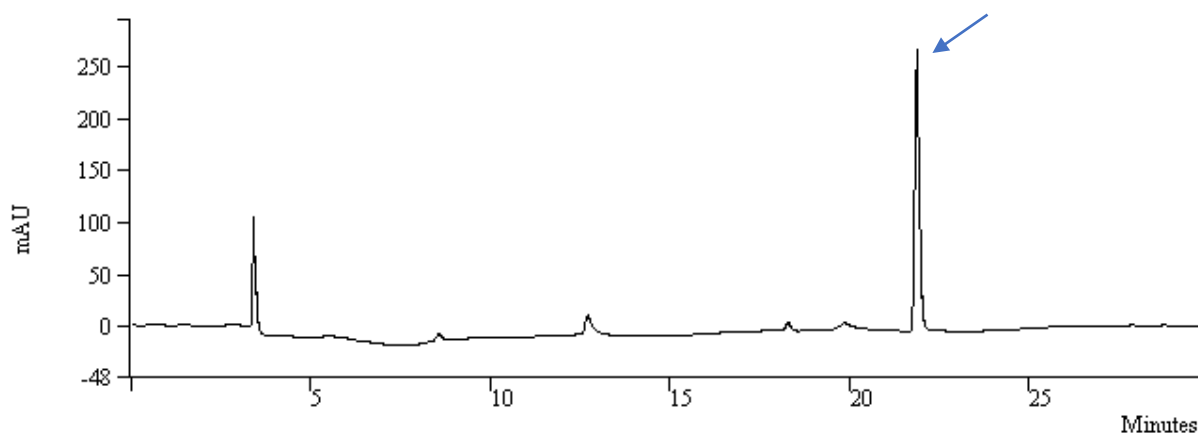


**Slika 99.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. posudice u kojoj se nalazila samo profiltrirana otopina iz 1. reaktora u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 100 i 101**. Očekivano, pošto mulj nema utjecaja u prethodnoj posudici, u odsutnosti mulja također ne dolazi do nikakvih promjena u otopini.



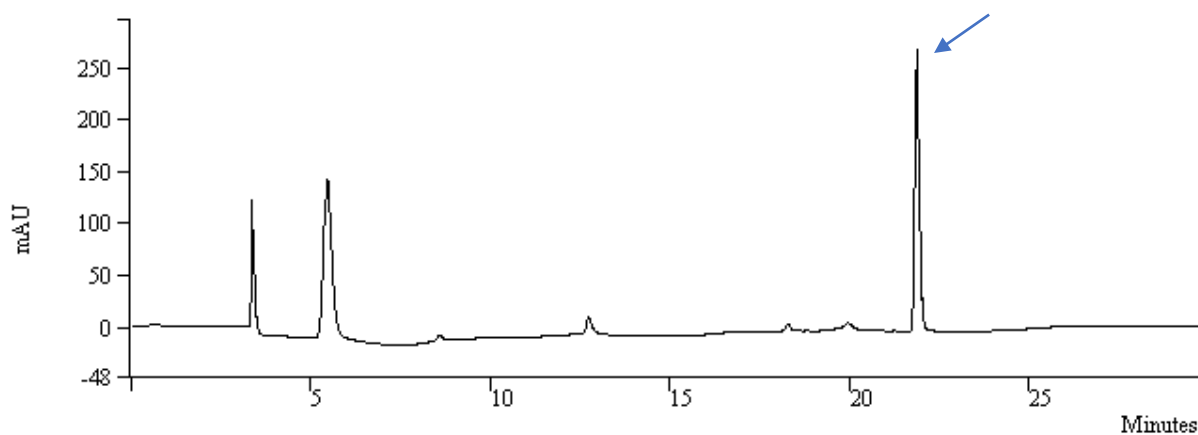
**Slika 100.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0$  h



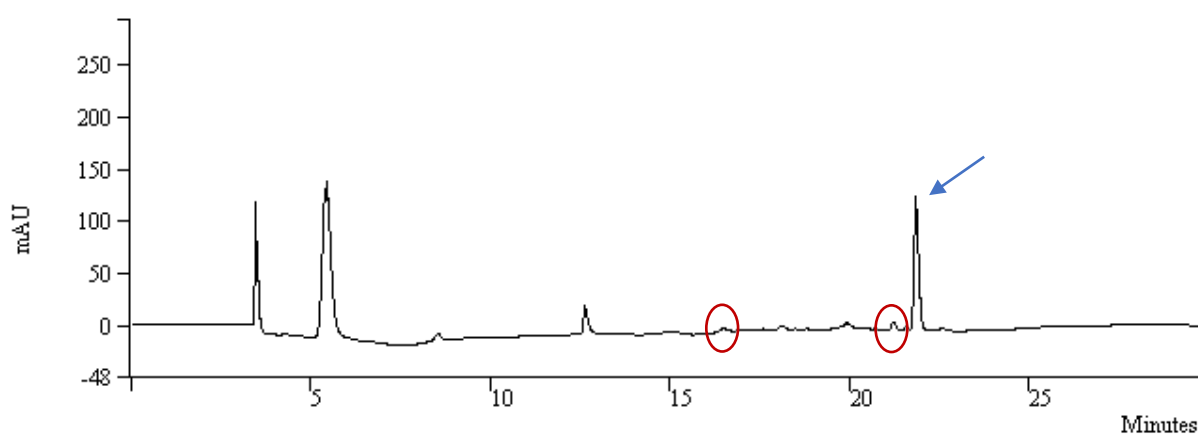
**Slika 101.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5$  h

Acetamiprid je fotokatalitički stabilan u ovim uvjetima provođenja fotolize. Ovakvi dobiveni rezultati za otopine acetamiprida su u skladu s dosadašnjim istraživanjima [5,60]. Acetamiprid je relativno stabilan pod utjecajem Sunčevog zračenja te ne dolazi lako do njegovog fotokatalitičkog raspada. Do boljeg uklanjanja uslijed fotolize može doći ukoliko se otopinu osvjetljava svjetlošću odgovarajuće valne duljine za raspad acetamiprida (254 nm).

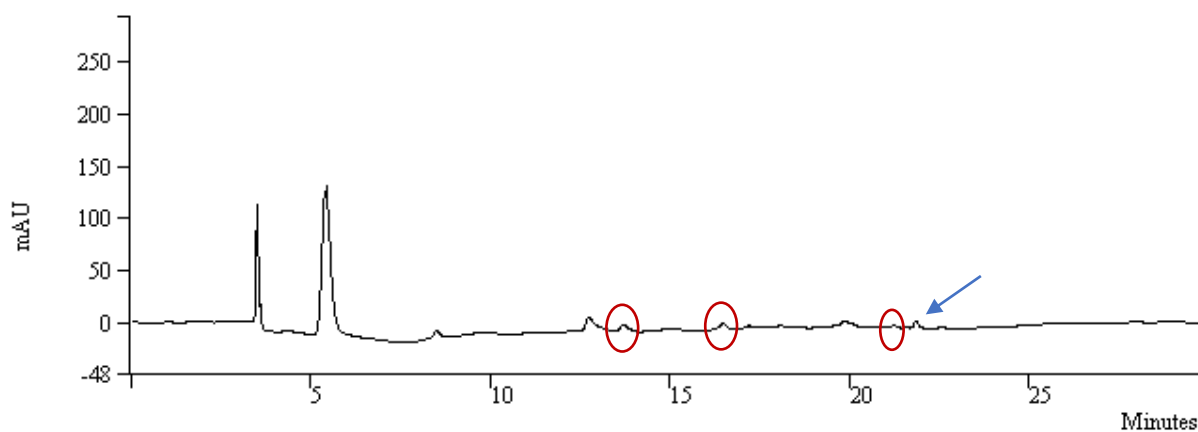
Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i vodikov peroksid u koncentraciji od  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  u vremenu 0 h, 1 h i 5 h prikazani su na **Slikama 102, 103 i 104**. Razgradni i/ili transformacijski produkti su zaokruženi crveno. Uz dodatak vodikovog peroksida kao oksidacijskog sredstva uočava se da već nakon 1 sat dolazi do uklanjanja dijela acetamiprida te nastanka razgradnih i transformacijskih produkata. Reakcija tu ne staje te se do kraja pokusa ukloni gotovo sva količina acetamiprida te u otopini ga zaostane malo. Također, u otopini zaostanu i njegovi produkti nastali uslijed izlaganja otopine Sunčevom zračenju uz prisutnost jakog oksidansa vodikovog peroksida. Takvi rezultati su u skladu s literaturom [60], uklanjanje fotokatalitički stabilnog acetamiprida se uvelike poboljšava ukoliko se otopini koja se izlaže zračenju doda jaki oksidans poput vodikovog peroksida ili persulfat uz koji se postižu još bolji rezultati uklanjanja.



**Slika 102.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0$  h



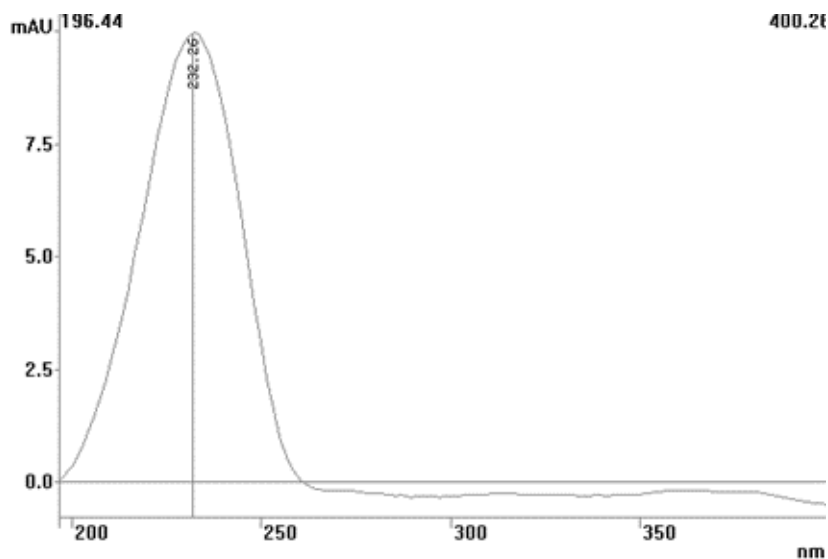
**Slika 103.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=1$  h



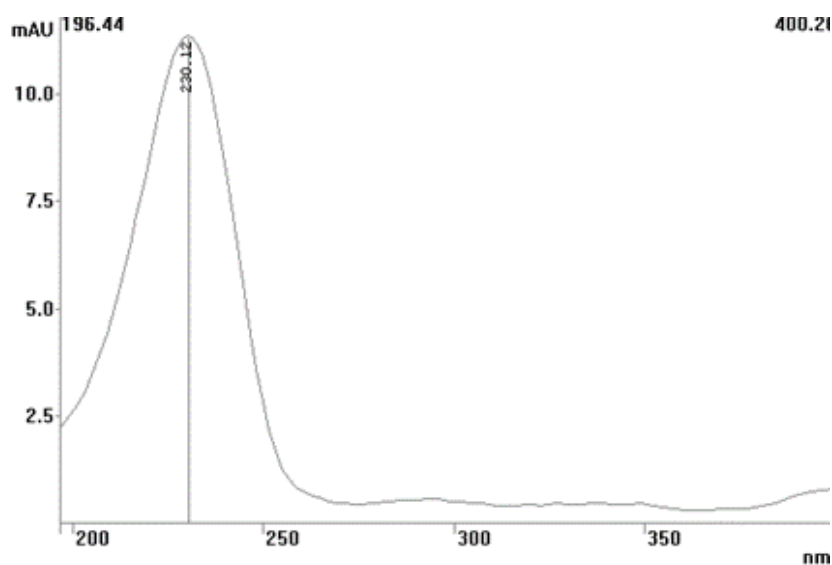
**Slika 104.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5$  h

Na **Slikama 105, 106 i 107** prikazani su apsorpcijski spektri razgradnih produkata acetamiprida nastalih tijekom fotolize otopine acetamiprida s dodanim vodikovim peroksidom. Vremena zadržavanja razgradnih produkata iznose 13,699 min, 15,141 min,

21,229 min. Ostale promjene koje se uočavaju na kromatografskoj krivulji su ispod granica detekcije.

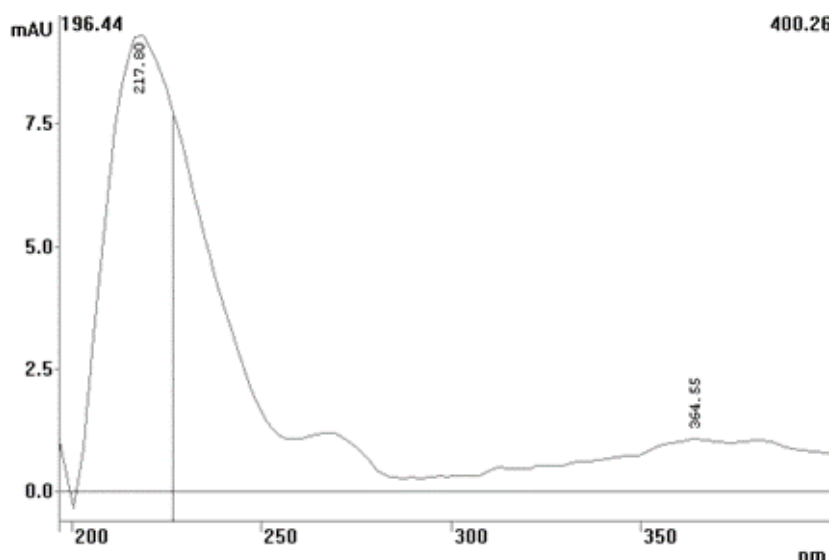


**Slika 105.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=13,699$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida



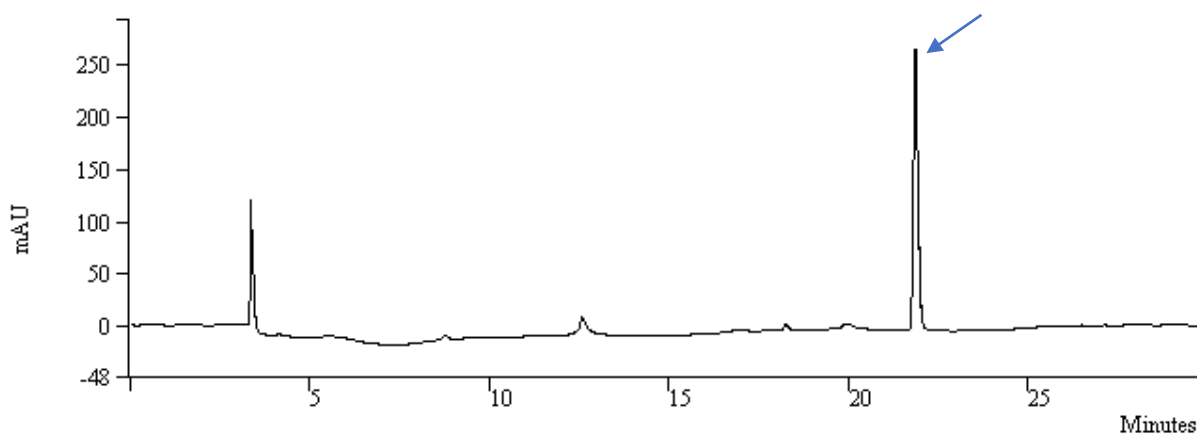
**Slika 106.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=16,459$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida



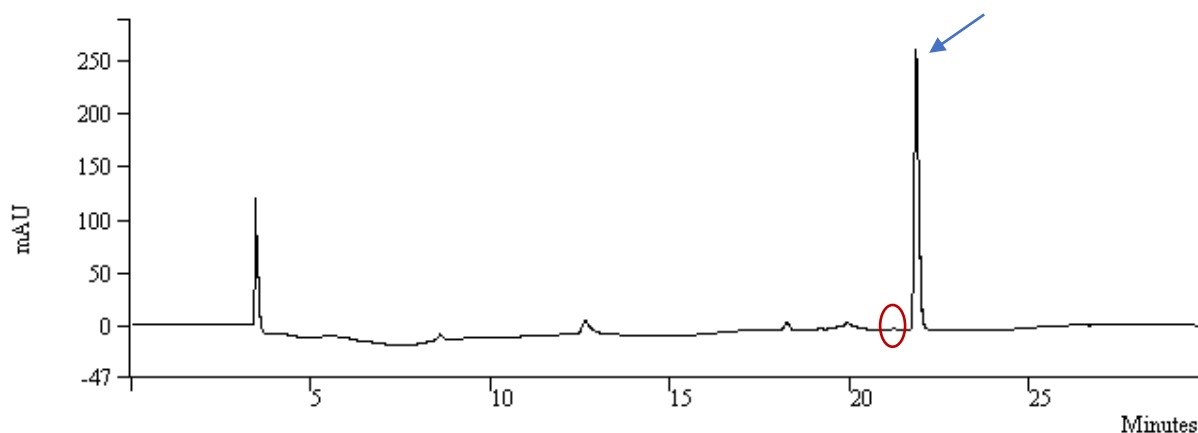


**Slika 107.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=21,229$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida

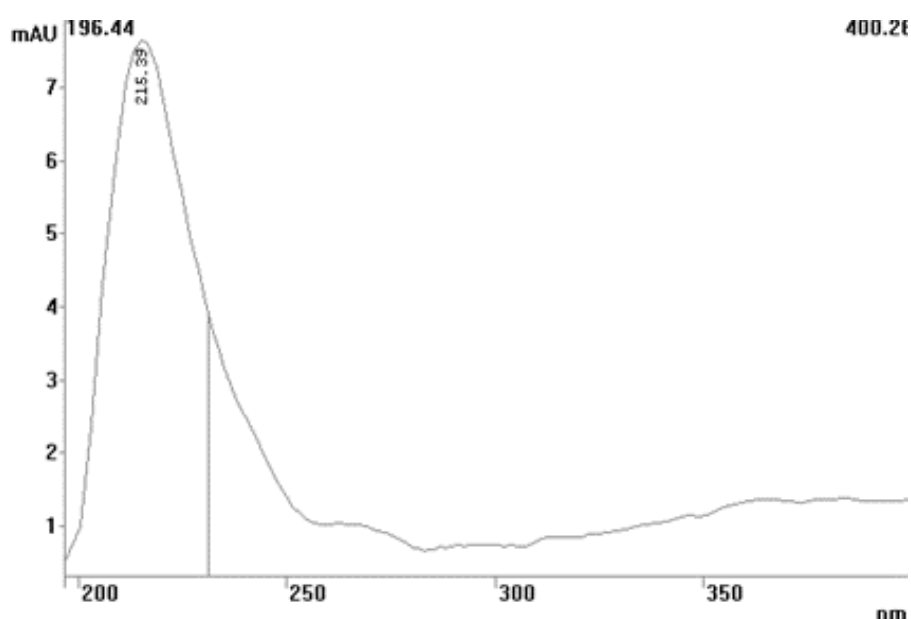
Kromatogrami uzoraka otopine iz 4. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i natrijev hipoklorit u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 108** i **109**. Apsorpcijski spektar nastalog razgradnog produkta prikazan je na **Slici 110**. Nakon 5 sati provođenja fotolize uz prisutnost dezinficijensa natrijevog hipoklorita dolazi do slabog uklanjanja acetamiprida, površina ispod njegove kromatografske krivulje se malo smanji, na samom kromatogramu je to gotovo nezatno, ali uočava se prisutnost nastalog razgradnog produkta. Za uklanjanje acetamiprida, prisutnost natrijevog hipoklorita nije učinkovita, barem ne pri ovoj koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Slika 108.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0$  h



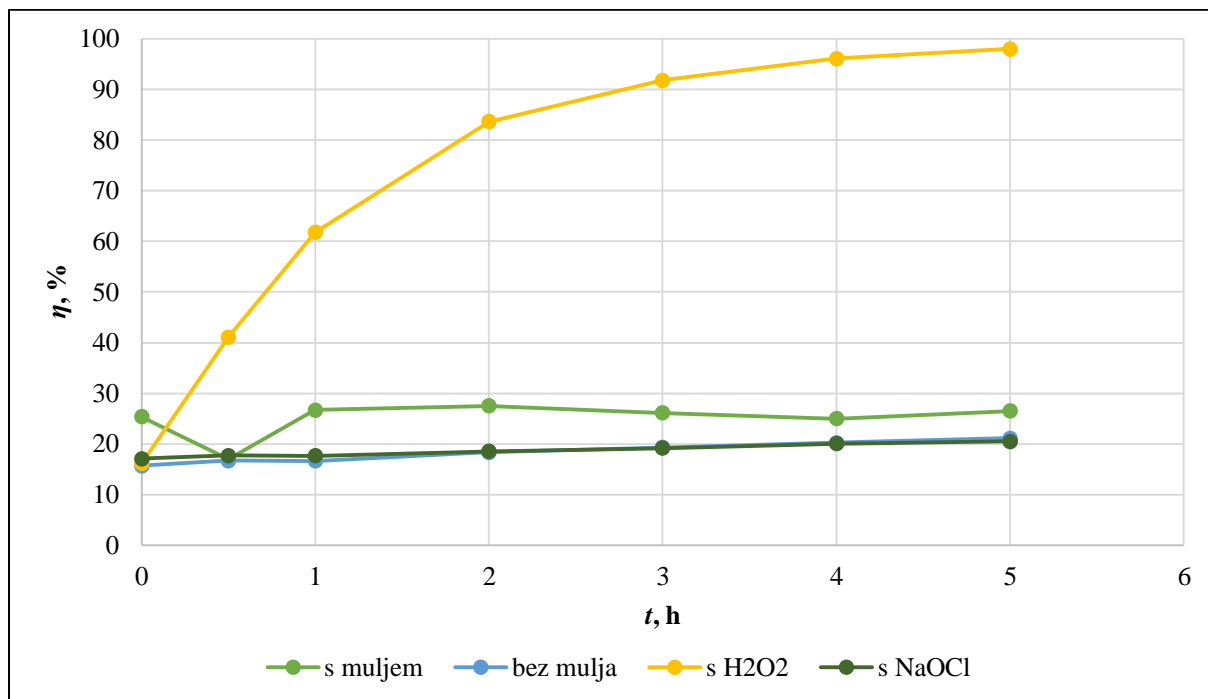
**Slika 109.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5$  h



**Slika 110.** Apсорpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=21,227$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost natrijevog hipoklorita

Na **Slici 111** prikazana je usporedno učinkovitost uklanjanja acetamiprida u svim posudicama, odnosno pri različitim procesnim parametrima. Utjecaj natrijevog hipoklorita kao dezinfekcijskog sredstva na uklanjanje ksenobiotika, a time i pesticida, relativno je slabo istraženo područje. Pošto se u ovom radu za acetamiprid ta metoda nije pokazala učinkovitom za uklanjanje acetamiprida iz otopine, u budućim istraživanjima bilo bi dobro ispitati utjecaj natrijevog hipoklorita na uklanjanje, ali pri većim koncentracijama od ovdje provedene. Prema tome, ovu metodu se može uspoređivati s bolje istraženim i učinkovitim metodama poput uklanjanja pomoću vodikovog peroksida. Metoda uklanjanja acetamiprida izlaganjem otopine Sunčevom zračenju uz dodatak vodikovog peroksida se pokazala najučinkovitijom te je uklonila gotovo svu količinu acetamiprida. U ostala 3 slučaja acetamiprid je uklonjen

relativno podjednako. Do malo boljeg uklanjanja dolazi u posudici koja je tijekom fotolize sadržavala i mulj, ali to uklanjanje se može pripisati adsorpciji acetamiprida na mulj, a ne njegovoj razgradnji ili fotokatalitičkom raspadu pošto u toj posudici ne dolazi do detekcije nove komponente.



**Slika 111.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

### Toksičnost

U **Tablici 58** prikazani su podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima iz kvarcnih posudica u kojima se provodila fotoliza otopina acetamiprida u vremenu ( $t$ ). Inhibicija uzorka otopine iz 2. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina 1. reaktora, nakon 5 sati fotolize iznosi oko 40 %. Otopina iz 3. posudice, odnosno filtrirana otopina iz 1. reaktora kojoj je dodan vodikov peroksid u koncentraciji od 20 mM, nakon 5 sati fotolize pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko 99 %. Također, mjerena je i toksičnost otopine samog vodikovog peroksida u koncentraciji od 20 mM, takva otopina pokazuje inhibiciju bakterija od oko 99 %. U 4. posudici za fotolizu nalazila se također otopina iz 1. reaktora kojoj je dodan natrijev hipoklorit u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Inhibicija otopine iz 4. posudice iznosi oko 52 %. Povećana vrijednost inhibicije za otopine u 3. i 4. posudici u

odnosu na 2. posudicu upućuje na to kako su dodane tvari, vodikov peroksid i natrijev hipoklorit, toksične i samim time povećavaju inhibiciju bakterijske kulture. Također, detektirana je i pristunost razgradnih ili transformacijskih produkata, priroda tih spojeva nije poznata te i oni mogu pridonositi toksičnosti otopine.

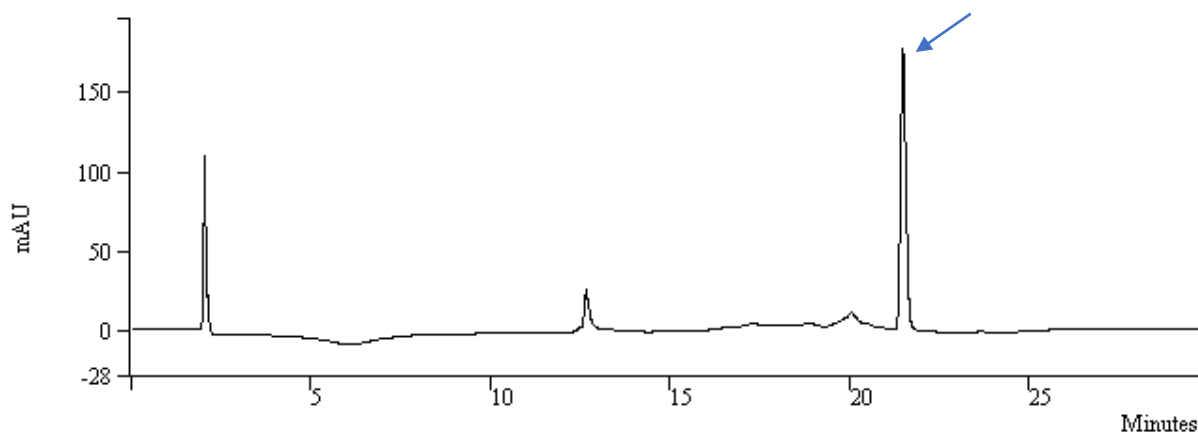
**Tablica 58.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka otopina acetamiprida nakon fotolize

Uzorak	t, h	%INHIB (orig. uzorka)
Otopina acetamiprida iz 2. posudice (filtrirana otopina)	5	40,3662
Otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (slijepa proba)	5	99,3998
Otopina acetamiprida iz 3. posudice (filtrirana otopina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	99,2960
Otopina acetamiprida iz 4. posudice (filtrirana otopina + NaOCl)	5	52,4150

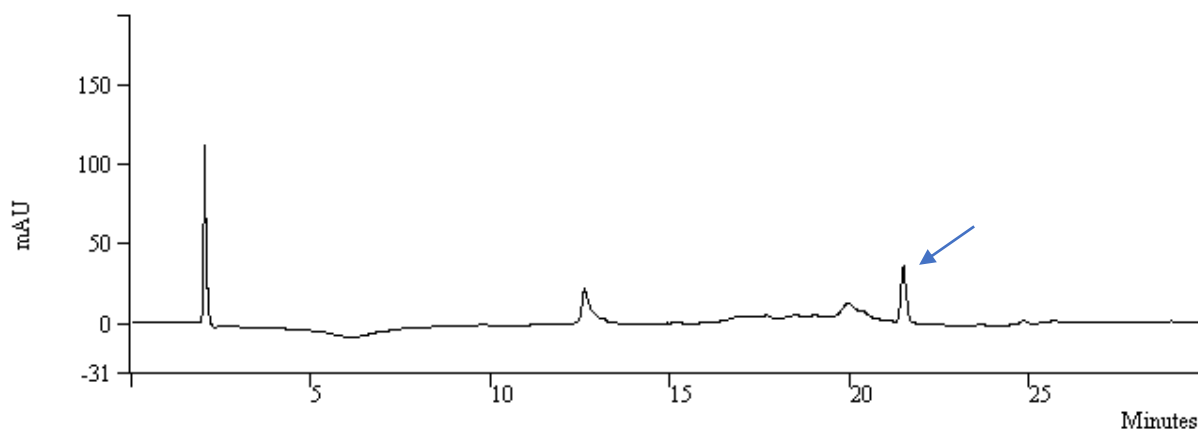
#### 4.2.2. Fotoliza otopina klotianidina

##### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine klotianidina iz 1. posudice fotolize u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 112** i **113**. U prvoj posudici se nalazila neprofiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje klotianidina. Kromatografska krivulja koja pripada klotianidinu je označena plavom strelicom. Klotianidin se uklanja iz otopine tijekom 5 sati, ali ne dolazi do nastanka razgradnog ili transformacijskog produkta.



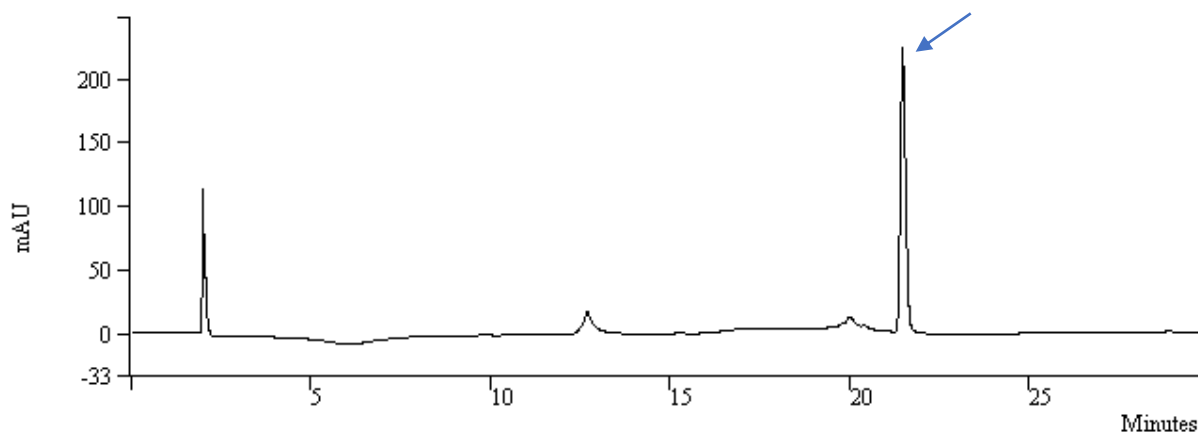
**Slika 112.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0$  h



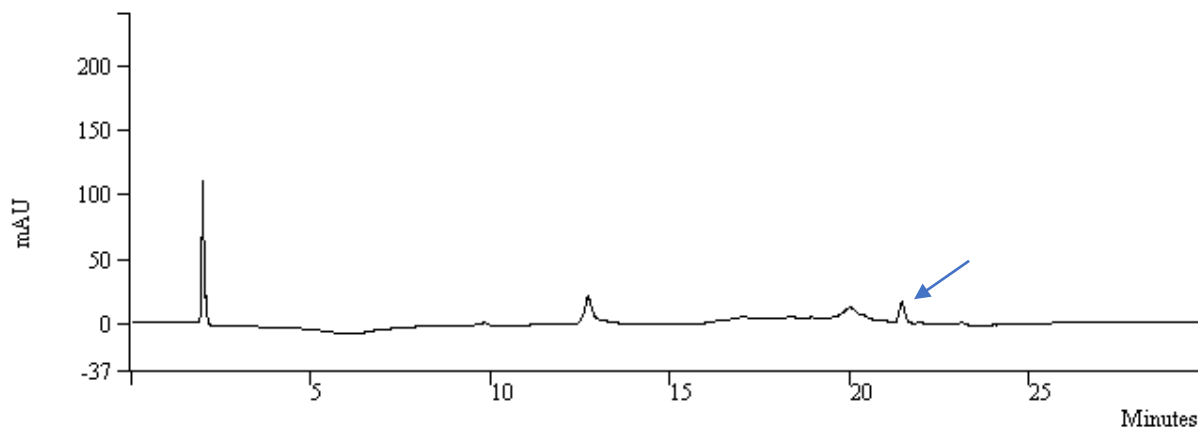
**Slika 113.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. posudice u kojoj se nalazila samo profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 114** i **115**. Ponovno se uočava uklanjanje klotianidina iz otopine, ali izostaje detekcija razgradnih ili transformacijskih produkata. Takvi rezultati su u skladu s očekivanjima jer i pri ranije

provedenim ispitivanjima dolazi do uklanjanja klotianidina bez nastanka razgradnih produkata. [5]

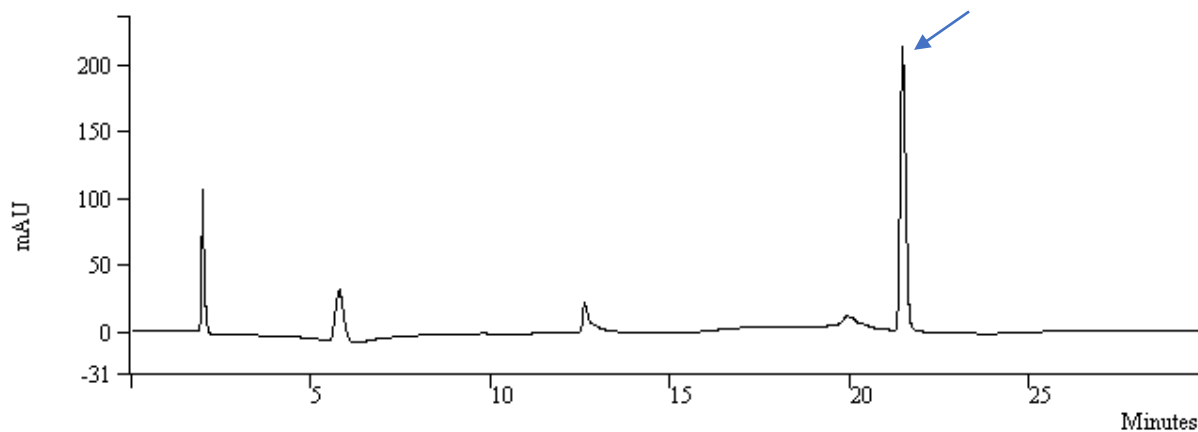


**Slika 114.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0$  h

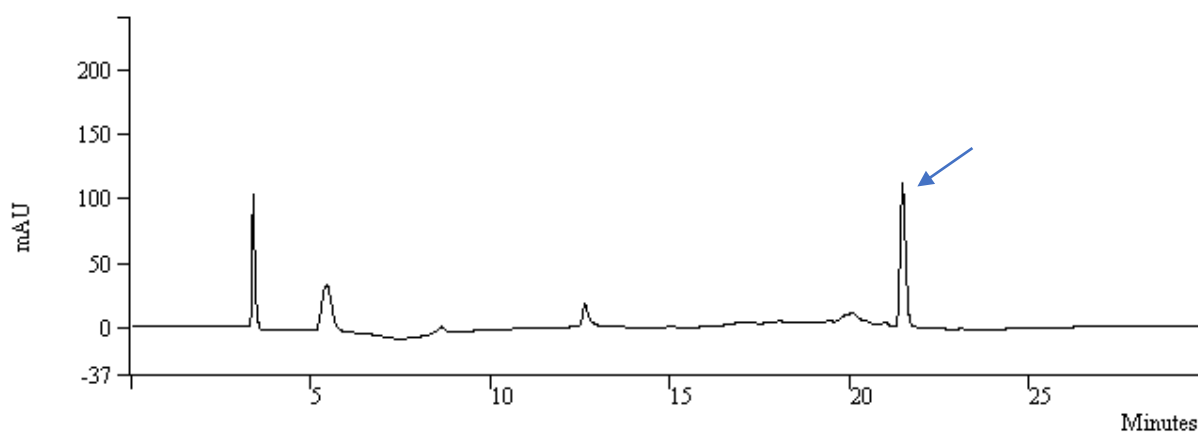


**Slika 115.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5$  h

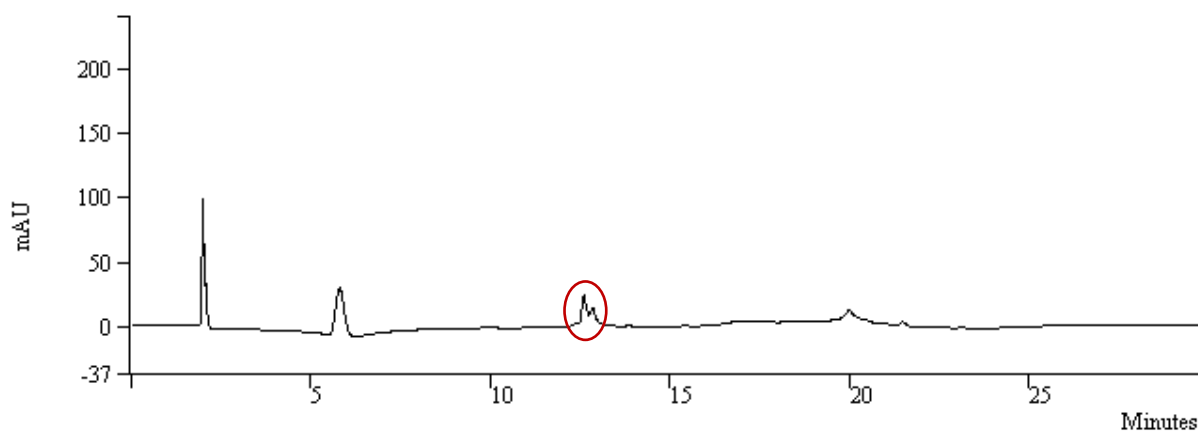
Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i vodikov peroksid u koncentraciji od 20 mM u vremenu 0 h, 30 min, 3 h i 5 h prikazani su na **Slikama 116, 117, 118 i 119**. Razgradni ili transformacijski produkt uočava se nakon 3 sata fotolize, zaokružen je crveno. Uslijed dodatka vodikovog peroksida kao jakog oksidacijskog sredstva i klotianidin i nastali produkt nestaju do kraja provođenja fotolize. Metoda uklanjanja ksenobiotika uz dodatak vodikovog peroksida je ponovno vrlo učinkovita.



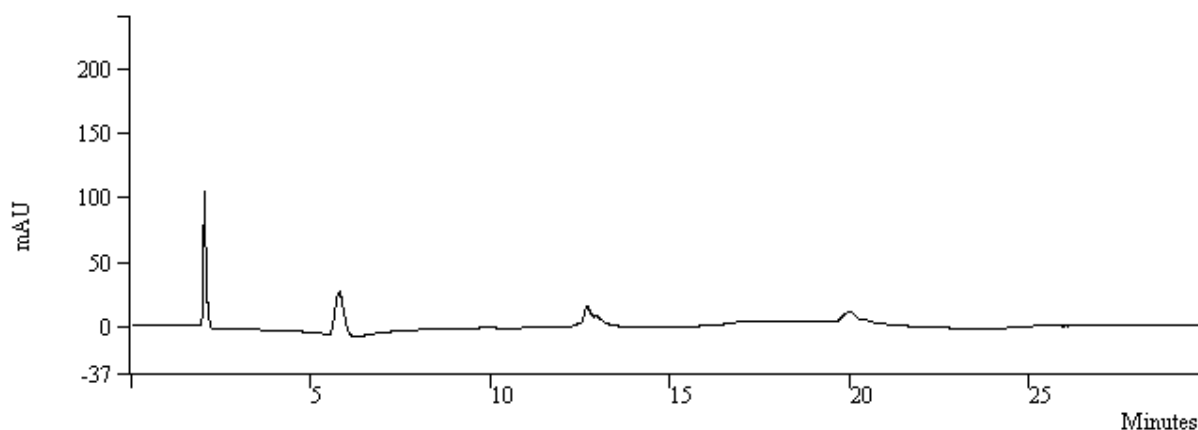
**Slika 116.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0$  h



**Slika 117.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=30$  min

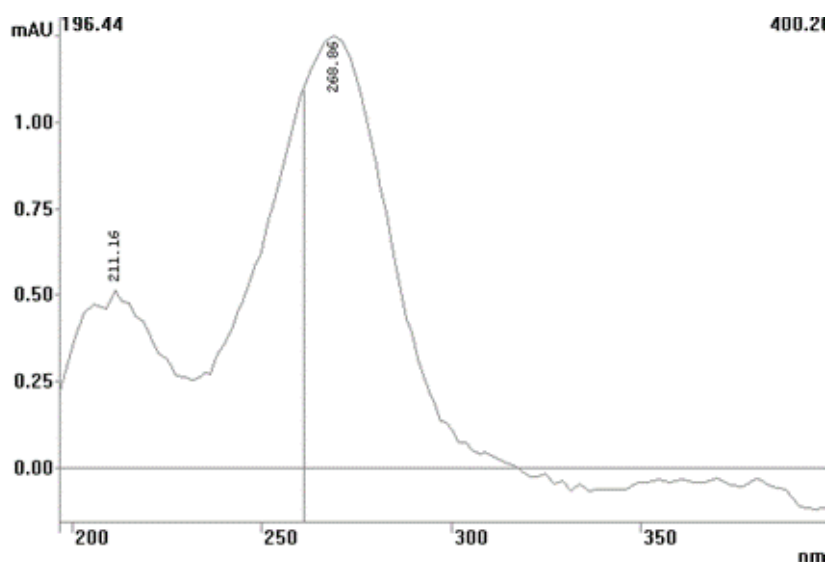


**Slika 118.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=3$  h



**Slika 119.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5$  h

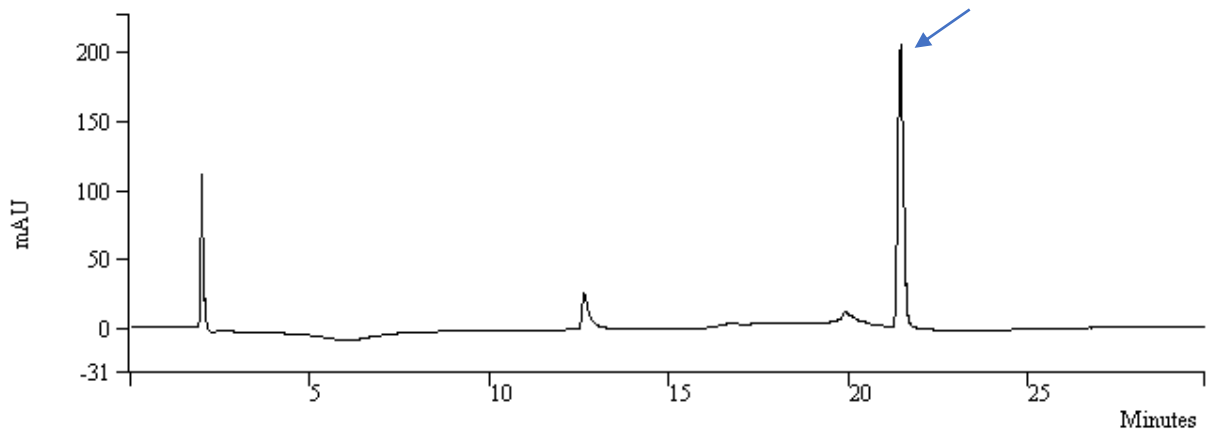
Na **Slici 120** je prikazan apsorpcijski spektar razgradnog produkta zaokruženog na **Slici 118**. Njegovo vrijeme zadržavanja iznosi 13,541 min. Nakon 5 sati fotolize svi razgradni produkti, ovaj koji je kvantitativno određen i produkti koji su bili ispod granica detekcije, nestaju.



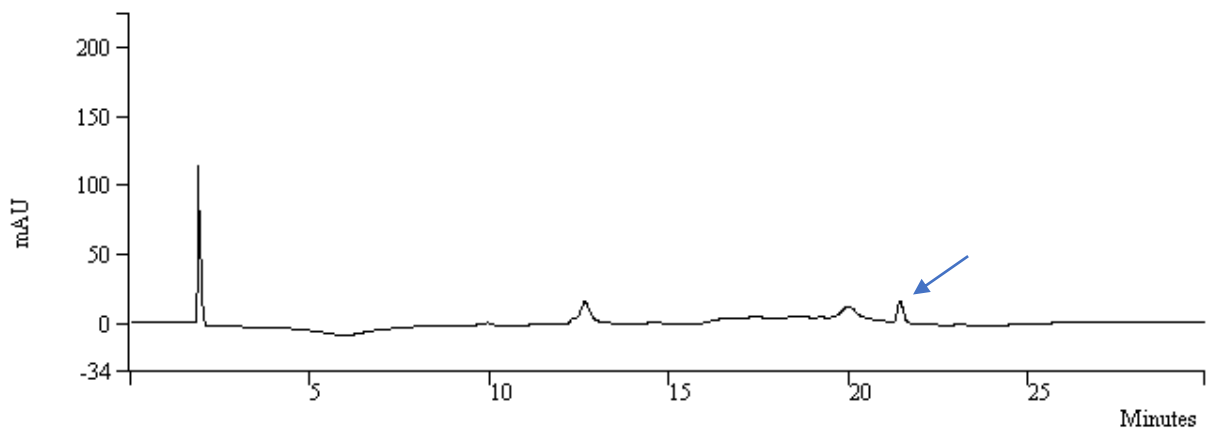
**Slika 120.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=13,541$  min) klotianidina koji je nastao tijekom fotolize otopine klotianidina uz prisutnost vodikovog peroksida

Kromatogrami uzoraka otopine klotianidina iz 4. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i natrijev hipoklorit u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 121** i **122**. Nema razgradnih produkata. Uočava se uklanjanje klotianidina iz otopine, ali to se ne može pripisati učinkovitosti natrijevog hipoklorita pošto i do takvog uklanjanja dolazi samo uslijed izlaganja otopine Sunčevom zračenju.



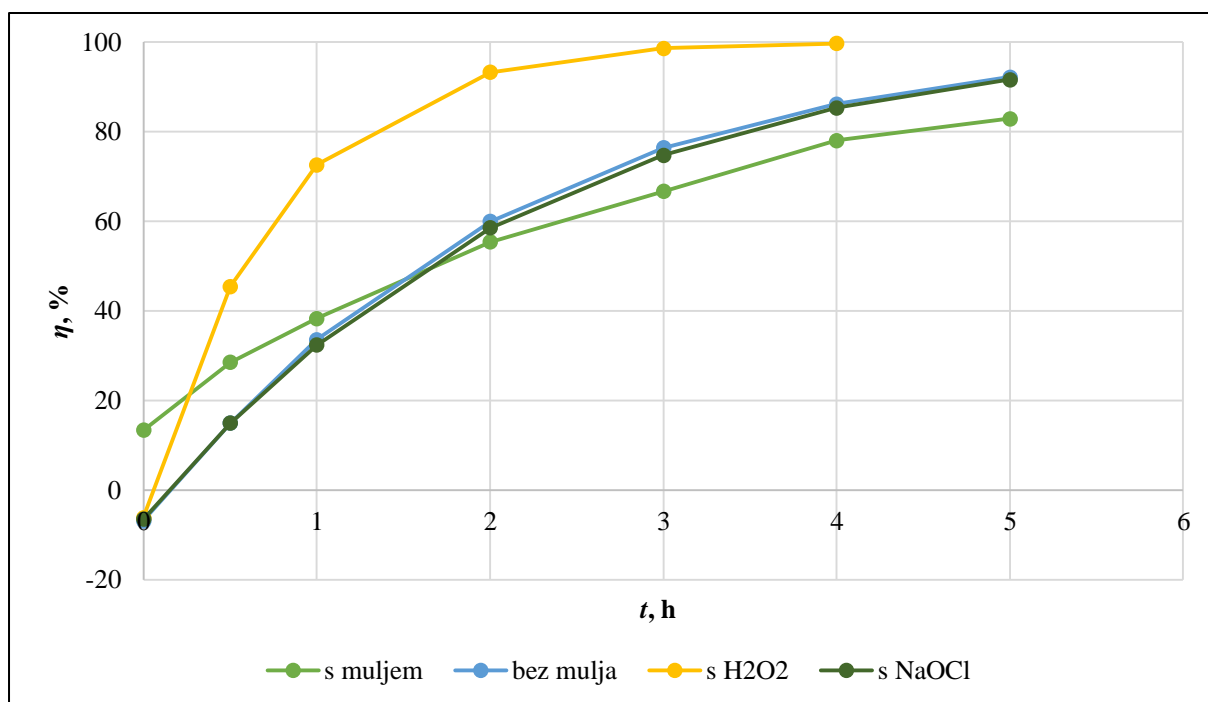


**Slika 121.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0$  h



**Slika 122.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5$  h

Na **Slici 123** prikazana je usporedno učinkovitost uklanjanja klotianidina u svim posudicama tijekom fotolize. Metoda uklanjanja klotianidina izlaganjem otopine samom Sunčevom pokazuje se učinkovitom jer dolazi do uklanjanja klotianidina iz otopine. Najučinkovitijom se ponovno pokazala metoda uz dodatak vodikovog peroksida jer je uklonila gotovo svu količinu klotianidina. Utjecaj natrijevog hipoklorita na uklanjanje klotianidina iz otopine se ne može procijentirati pošto se, već navedeno, klotianidin velikim dijelom uklanjanja samim izlaganjem Sunčevom zračenju.



**Slika 123.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

### Toksičnost

U **Tablici 59** Error! Reference source not found. su prikazani podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima iz kvarcnih posudica u kojima se provodila fotoliza otopina klotianidina. Inhibicija uzorka otopine iz 2. posudice nakon 5 sati fotolize iznosi oko 24 %. Otopina iz 3. posudice, odnosno otopina klotianidina kojoj je dodan vodikov peroksid, nakon 5 sati fotolize pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko 98 %, što je skoro jednako referentnoj vrijednosti inhibicije otopine samog vodikovog peroksida od oko 99 %. Iz 4. posudice otopina kojoj je dodan natrijev hipoklorit pokazuje inhibiciju od oko 1 %.

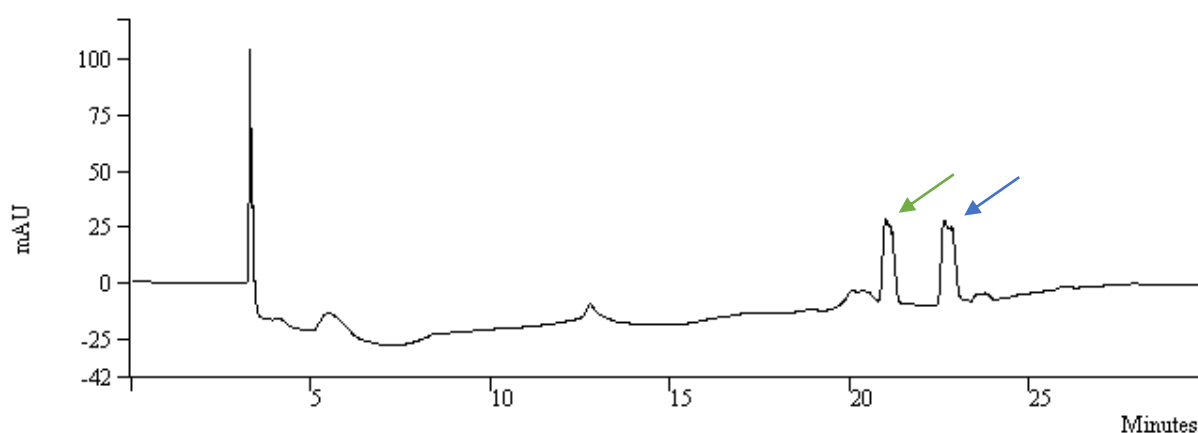
**Tablica 59.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina klotianidina nakon fotolize

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Otopina klotianidina iz 2. posudice (filtrirana otopina)	5	23,7675
Otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (slijepa proba)	5	99,3998
Otopina klotianidina iz 3. posudice (filtrirana otopina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	98,4290
Otopina klotianidina iz 4. posudice (filtrirana otopina + NaOCl)	5	0,5013

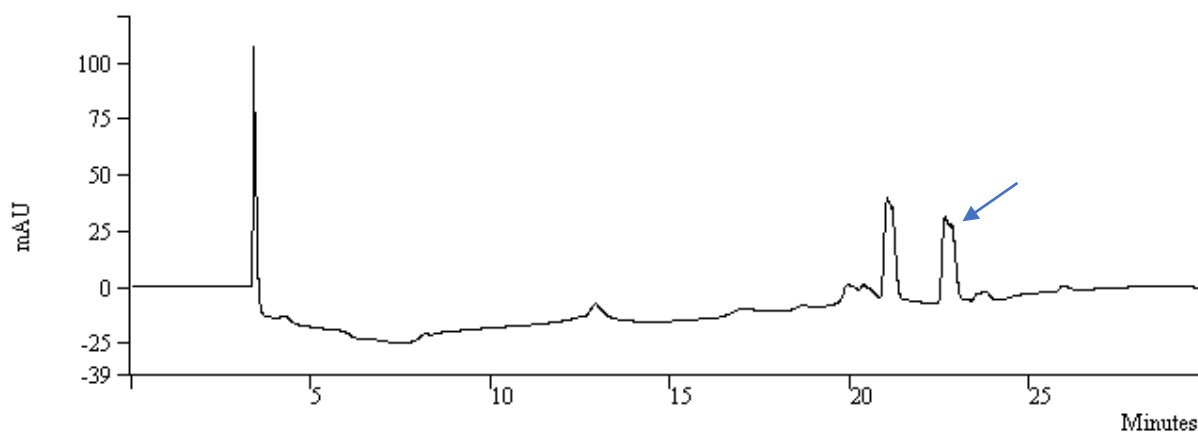
### 4.2.3. Fotoliza otopina tiakloprida

#### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. prve posudice fotolize u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 124** i **125**. U prvoj posudici se nalazila neprofiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje tiakloprida. Kromatografska krivulja koja pripada tiaklopridu je označena plavom strelicom, a zelenom strelicom je označen nastali razgradni produkt nakon 24 sata procesa šaržne biorazgradnje. Tijekom 5 sati osvjetljavanja otopine Sunčevim zračenjem ne dolazi do nikakve promijene tog razgradnog produkta, a ne dolazi ni do uklanjanja tiakloprida.



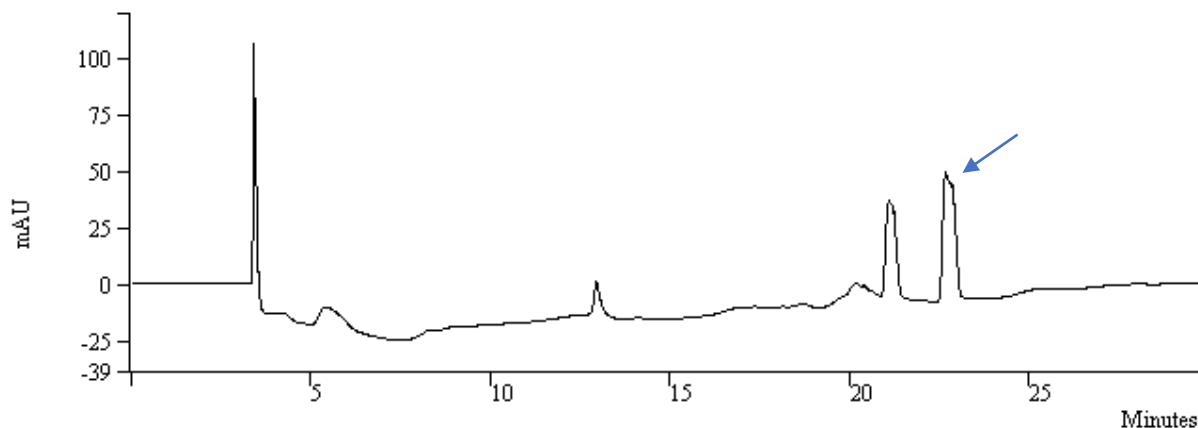
**Slika 124.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0$  h



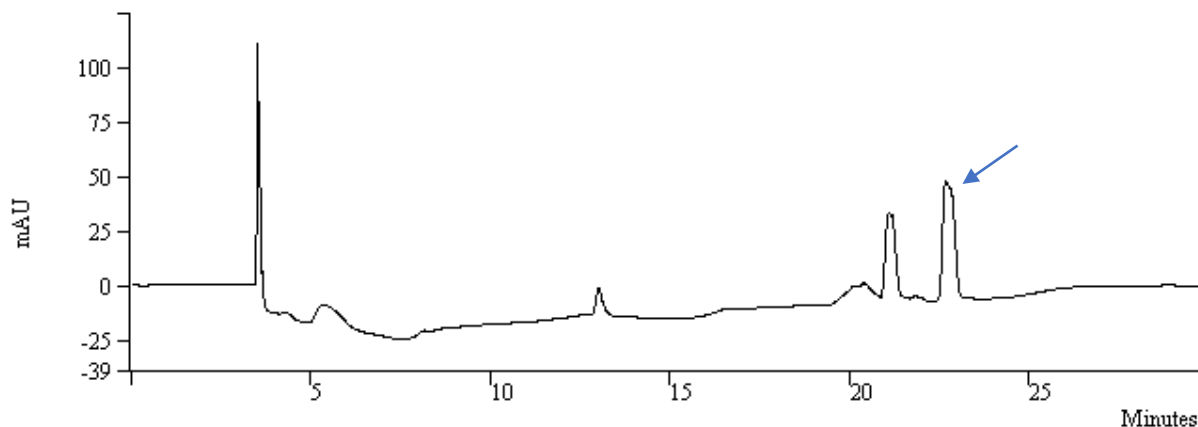
**Slika 125.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine tiakloprida iz 2. posudice, u kojoj se nalazila samo profiltrirana otopina iz 1. reaktora, u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 126** i **127**. Ponovno ne dolazi do uklanjanja tiakloprida iz otopine. Takvi rezultati su u skladu s

literaturnim podacima [61], Abramović i suradnici su utvrdili da tijekom samog izlaganja UV zračenju ne dolazi do fotokatalitičkog raspada tiakloprida.

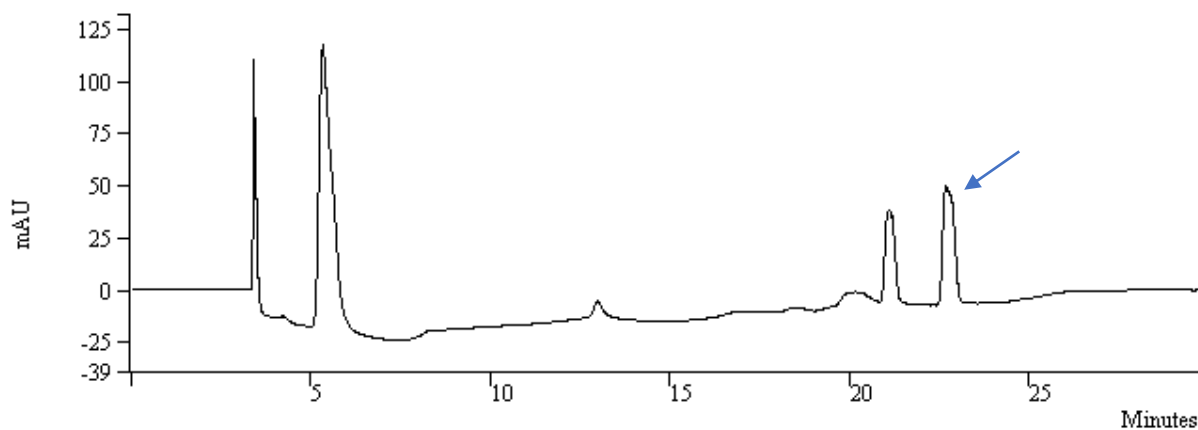


**Slika 126.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0$  h

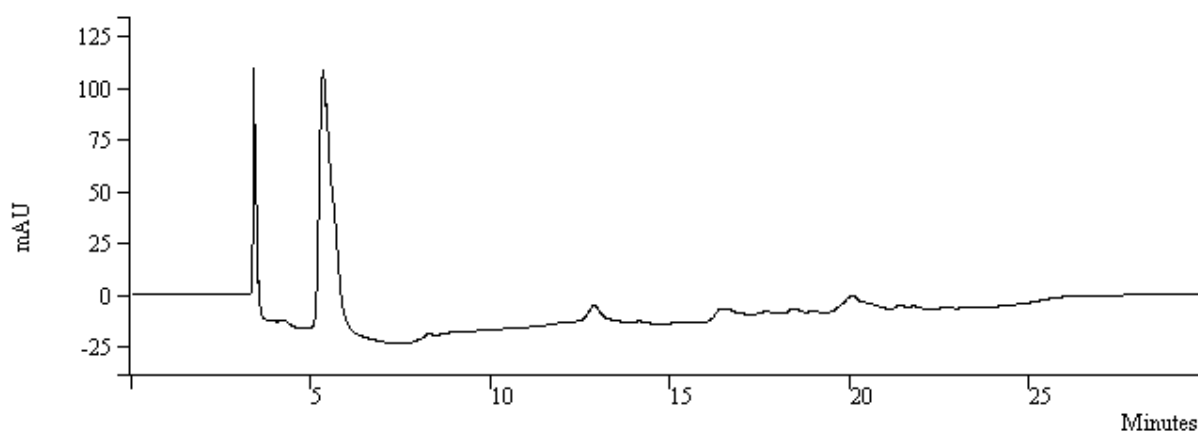


**Slika 127.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. posudice, u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora, i vodikov peroksid u koncentraciji od 20 mM u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 128 i 129**. Ne dolazi do nastanka novih razgradnih produkata, ali vodikov peroksid uspješno uklanja u potpunosti i tiakloprid i njegov ranije nastao razgradni produkt. Prema ranijim istraživanjima [61] kombinacija UV zračenja valne duljine oko 280 nm živinom lampom uz dodatak vodikovog peroksida u otopini uklanja 97 % tiakloprida u 2 sata. U ovom radu je provedeno izlaganje otopine Sunčevom zračenju koje ima širi spektar valnih duljina kojim se izlaže otopina te je zbog toga potrebno duže vrijeme izlaganja otopine zračenju.

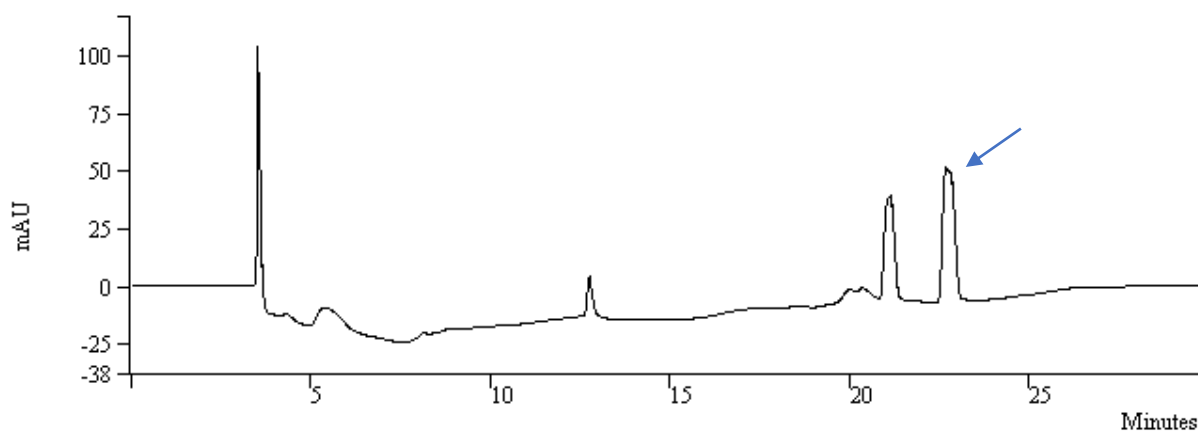


**Slika 128.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0$  h

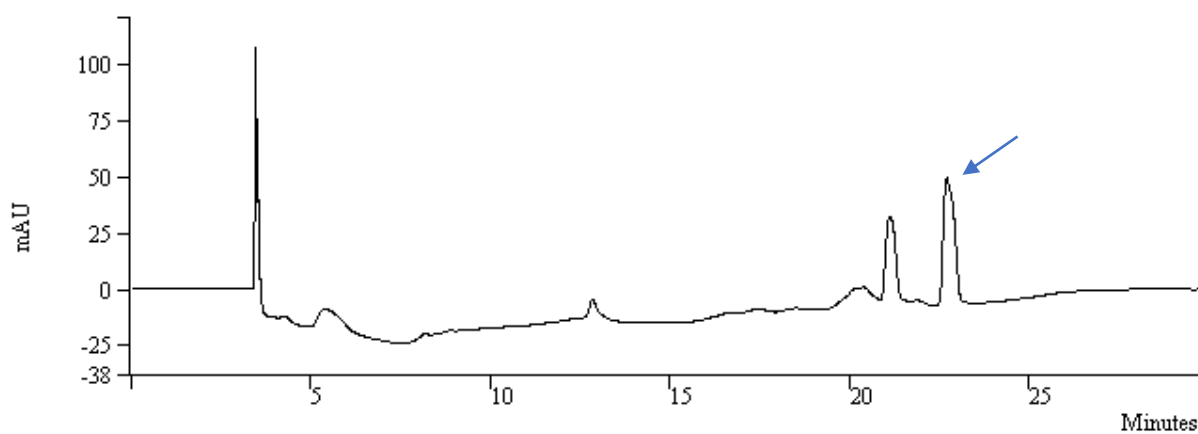


**Slika 129.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 4. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i natrijev hipoklorit u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 130 i 131**. Ne dolazi do nastanka razgradnih produkata, a promjene na krivulji su gotovo neuočljive. Točnije, površina ispod kromatografske krivulje tiakloprida se smanji za otprilike 100 mAU jedinica. Odnosno dolazi do slabog uklanjanja tiakloprida. Na uklanjanje ranije nastalog produkta natrijev hipoklorit nema nikakav utjecaj. Metoda dodatka natrijevog hipoklorita za uklanjanje tiakloprida se pokazala neučinkovitom, barem pri ovoj koncentraciji.

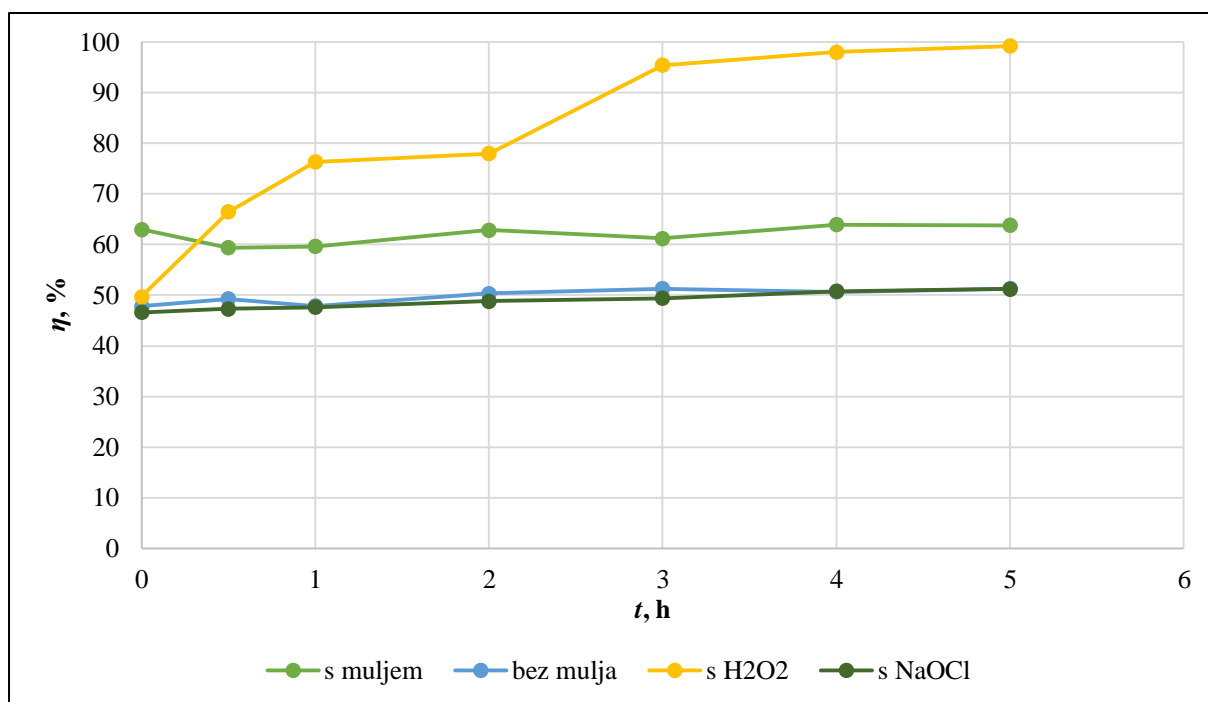


**Slika 130.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0$  h



**Slika 131.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5$  h

Na **Slici 132** prikazana je usporedno učinkovitost uklanjanja tiakloprida tijekom fotolize. Metoda uklanjanja tiakloprida izlaganjem otopine samom Sunčevom svjetlu pokazuje se neučinkovitom jer ne dolazi do uklanjanja tiakloprida iz otopine. Najučinkovitijom se ponovno pokazala metoda kombinacije fotolize uz dodatak vodikovog peroksida jer je uklonila gotovo svu količinu tiakloprida. Utjecaj natrijevog hipoklorita na uklanjanje tiakloprida iz otopine je neznatan.



**Slika 132.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

U ranijim istraživanjima [61] fotoliza je provedena pomoću živine lampe dok se u ovom radu koristila ksenonska lampa. Prednost živine lampe je svakako odabir određene valne duljine kojom se želi zračiti uzorak, dugotrajne su, nije ih potrebno često mijenjati, ali nedostatak im je taj što sadrže tragove žive što je potrebno propisno zbrinuti tijekom odlaganja otpada, skupe su i potrebno je duže vrijeme zagrijavanja lampe za rad. [62] Dok ksenonska lampa koja je korištena u ovom radu ima zračenje slično Sunčevom zračenju, jeftinija je i ekološki je prihvatljivija.

### Toksičnost

Podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim uzorcima iz kvarcnih posudica u kojima se provodila fotoliza otopina tiakloprida prikazani su u **Tablici 60**. Inhibicija uzorka otopine tiakloprida iz 2. posudice nakon 5 sati fotolize iznosi oko 39 %. Otopina iz 3. posudice, odnosno otopina tiakloprida kojoj je dodan vodikov peroksid, nakon 5 sati fotolize pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko 99 %, što je jednako referentnoj vrijednosti inhibicije otopine samog vodikovog peroksida. Iz 4. posudice otopina kojoj je dodan natrijev hipoklorit pokazuje inhibiciju oko 41 %. Pošto ne dolazi do uklanjanja tiakloprida ne očekuje se ni smanjenje inhibicije.



**Tablica 60.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina tiakloprida nakon fotolize

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Otopina tiakloprida iz 2. posudice (filtrirana otopina)	5	38,9981
Otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (slijepa proba)	5	99,3998
Otopina tiakloprida iz 3. posudice (filtrirana otopina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	99,0068
Otopina tiakloprida iz 4. posudice (filtrirana otopina + NaOCl)	5	40,7545

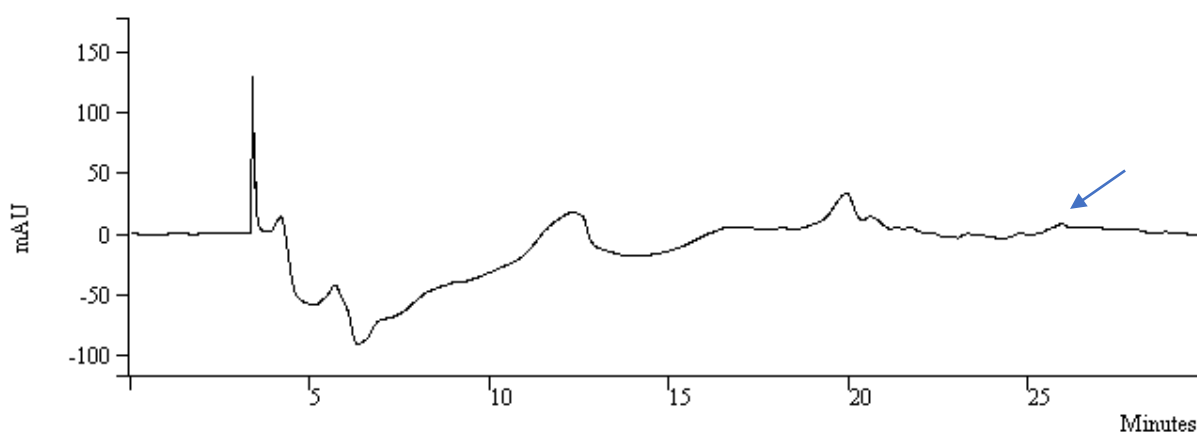
#### 4.2.4. Fotoliza otopina albendazola

Fotoliza otopina albendazola se nije provodila jer se u uzorcima iz otopine tijekom šaržne biorazgradnje nije moglo kvantitativno pratiti albendazol. Kromatografska krivulja albendazola se preklapa s kromatografskom krivuljom određene komponente iz mulja. Samim time ne bi bilo moguće kvantitativno pratiti albendazol tijekom procesa fotolitičke razgradnje. Stoga je nužno optimirati korištenu kromatografsku metodu za separaciju albendazola obzirom na interferencije te primijeniti adekvatnu metodu pripreme uzoraka.

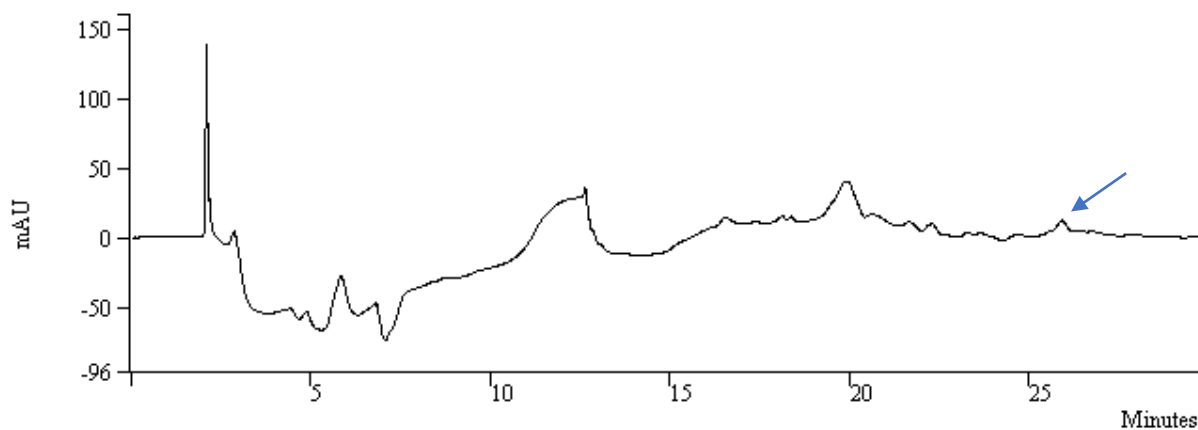
#### 4.2.5. Fotoliza otopina febantela

##### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine iz 1. posudice fotolize u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 133** i **134**. U prvoj posudici se nalazila neprofiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje febantela. Kromatografska krivulja koja pripada febantelu je označena plavom strelicom. Ne nastaju nikakvi razgradni ili transformacijski produkti tijekom fotolize u sve 4 posudice. Febantela je u otopini nakon 24 sata procesa šaržne biorazgradnje ostalo jako malo. Prilikom osvjetljavanja uzorka 1. posudice uočava se mali porast u koncentraciji febantela što upućuje na njegovu desorpciju s prisutnog mulja.

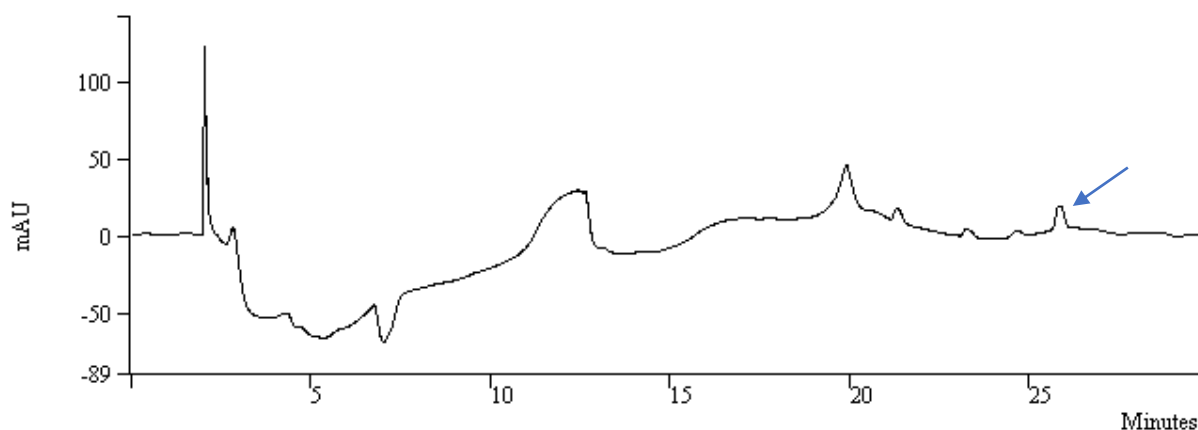


**Slika 133.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0$  h

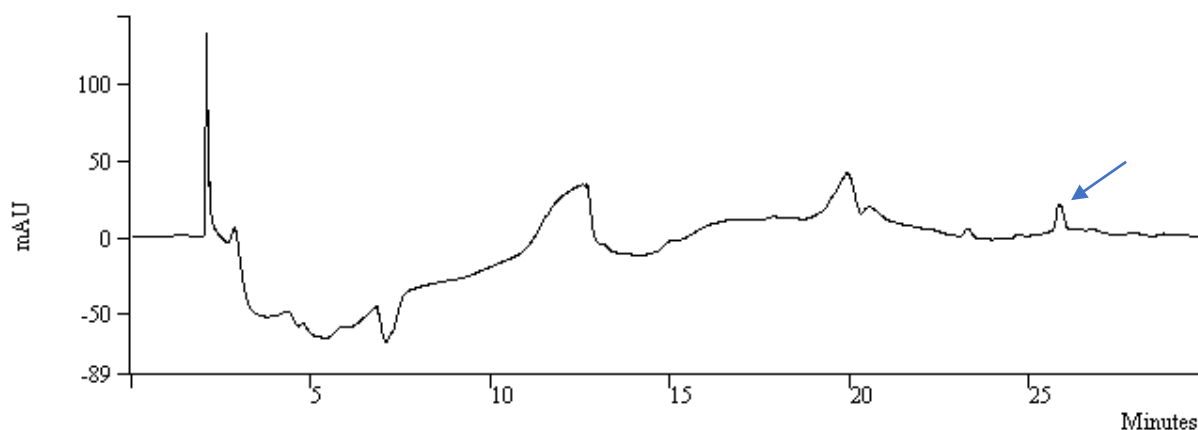


**Slika 134.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. posudice u kojoj se nalazila samo profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 135** i **136**. Ne uočava se nikakva promjena na krivuljama febantela tijekom 5 sati fotolize. Febantel je stabilan pod utjecajem simuliranog Sunčevog zračenja.

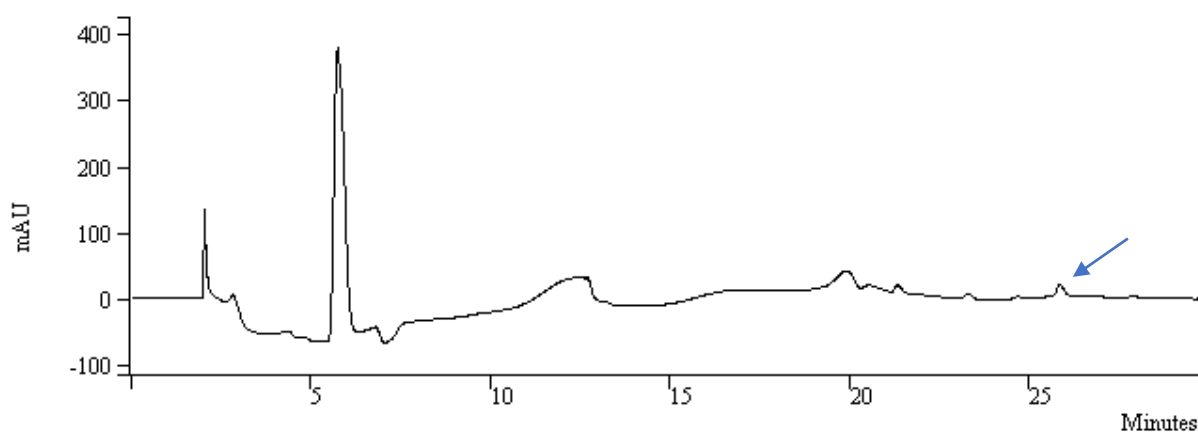


**Slika 135.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0$  h

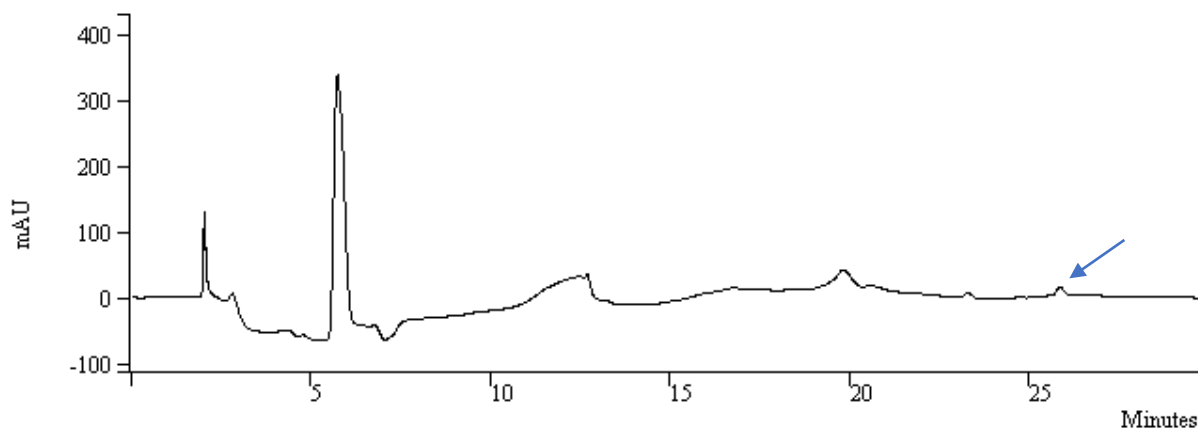


**Slika 136.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i vodikov peroksid u koncentraciji od  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 137 i 138**. U ovom slučaju pristunost vodikovog peroksida nema veliki utjecaj na uklanjanje febantela pošto se sama aktivna komponenta nalazi u jako maloj koncentraciji u otopini. Prema istraživanjima [31] febantel se uspješno uklanja uz pristunost vodikovog peroksida tijekom izlaganja otopine Sunčevom zračenju, ali ta ispitivanja su provedena pri većoj koncentraciji peroksida i febantela u otopini. Prilikom tih provedenih uklanjanja dolazi i do nastanka razgradnih produkata koji u ovom radu nisu detektirani.

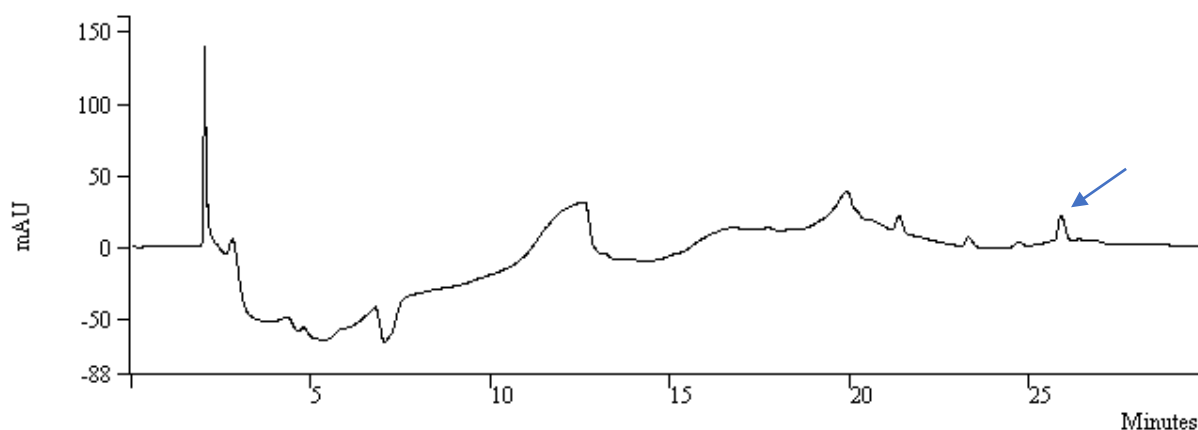


**Slika 137.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0$  h

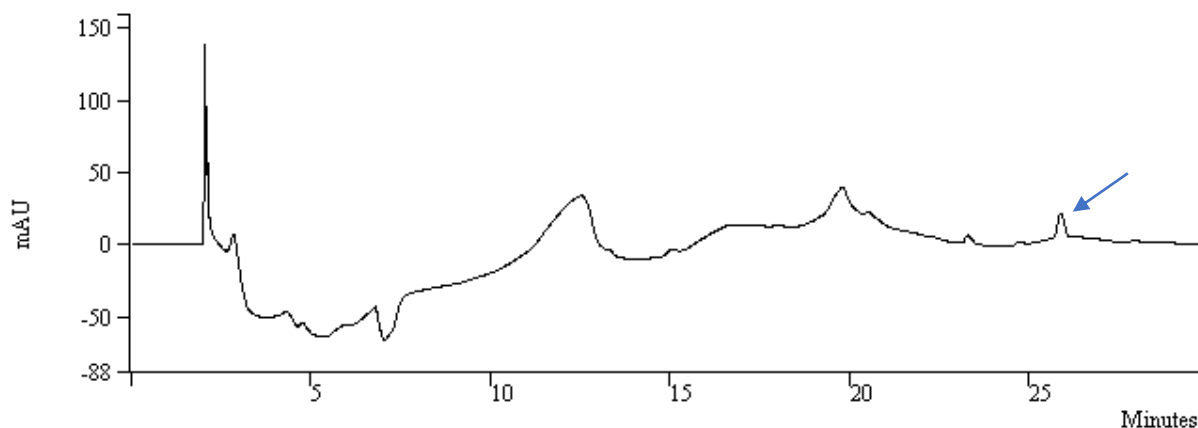


**Slika 138.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 4. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i natrijev hipoklorit u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 139** i **140**. Ponovno, ne dolazi do uklanjanja febantela iz otopine. Natrijev hipoklorit pri ovako niskoj koncentraciji nema utjecaja na uklanjanje febantela. Pri većim koncentracijama, poput  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , dolazi do potpunog uklanjanja febantela iz otopina, ali ta ispitavanja su provedena uz provođenje miješanja tijekom 5 sati. [31] Na poslijetku, natrijev hipoklorit ima utjecaj na uklanjanje febantela, ali ne u ovako malim koncentracijama od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  kao što je to provedeno u ovom radu.

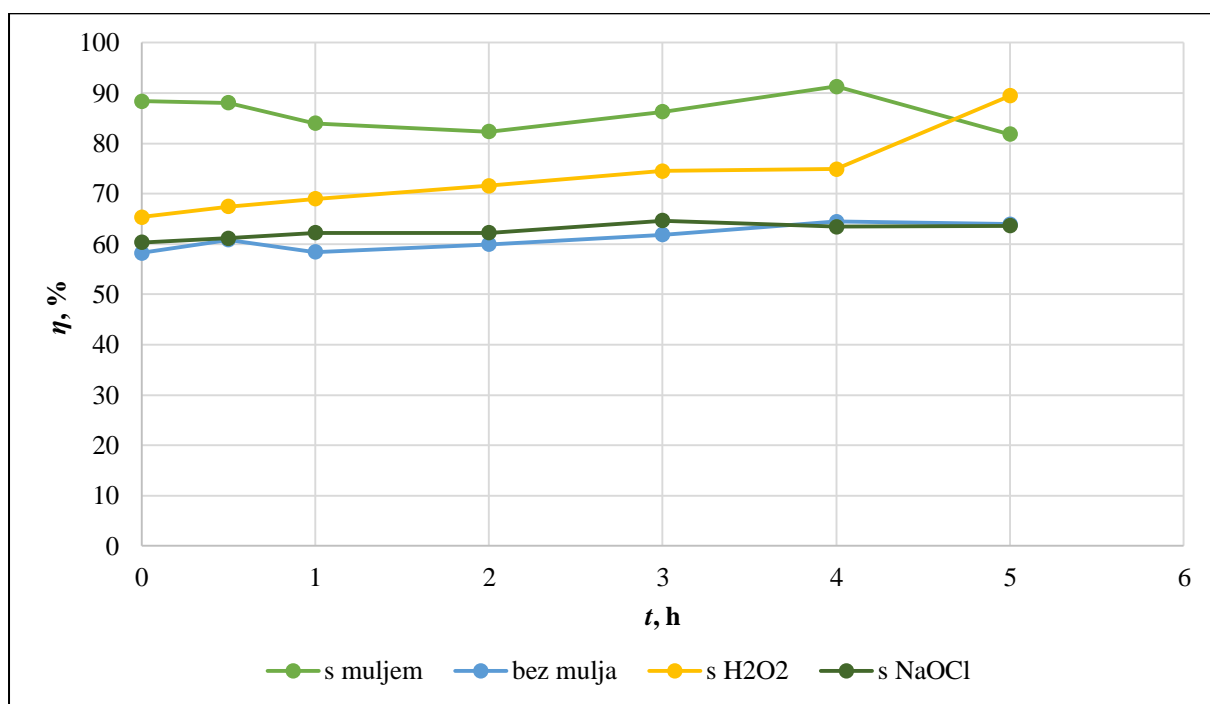


**Slika 139.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0$  h



**Slika 140.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5$  h

Na **Slici 141** je grafički prikaz usporedne učinkovitosti uklanjanja febantela tijekom fotolize. Ni u jednom slučaju ne dolazi do potpunog uklanjanja febantela. Metoda dodatka natrijevog hipoklorita u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  nije učinkovita za uklanjanje febantela iz otopine.



**Slika 141.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

### Toksičnost

U **Tablici 61** su prikazani podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima u kojima se provodila fotoliza otopina febantela. Inhibicije uzorka otopine iz 2.

posudice nakon 5 sati fotolize nema, ona je 0 %. Otopina iz 3. posudice, odnosno otopina febantela kojoj je dodan vodikov peroksid, nakon 5 sati fotolize pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko 99 %, poput čiste otopine vodikovog peroksida. Iz 4. posudice, otopina kojoj je dodan natrijev hipoklorit, pokazuje inhibiciju oko 0 %. Jedinu inhibiciju pokazuje otopina s dodanim vodikovim peroksidom, ali to proizlazi iz toksičnosti samog vodikovog peroksida.

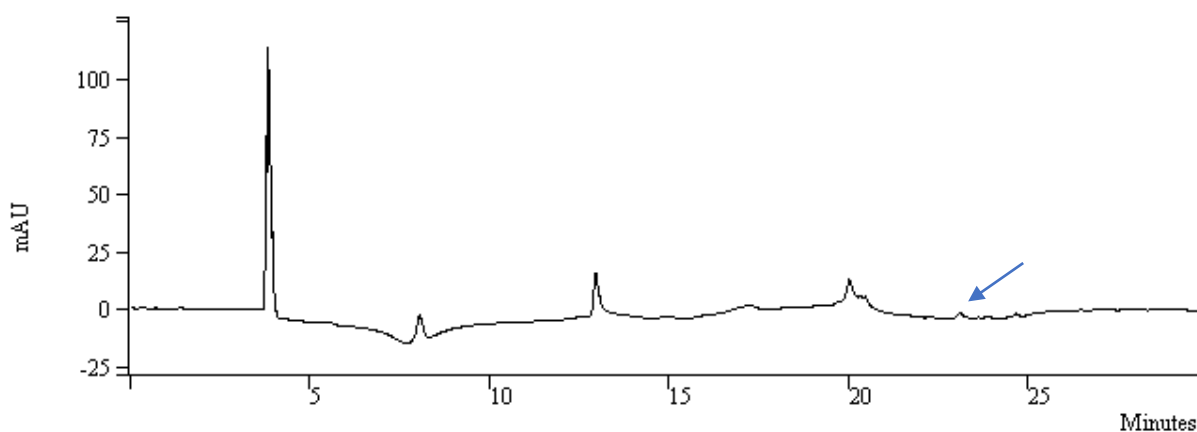
**Tablica 61.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina febantela nakon fotolize

Uzorak	t, h	%INHIB (orig. uzorka)
Otopina febantela iz 2. posudice (filtrirana otopina)	5	0,0373
Otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (slijepa proba)	5	99,3998
Otopina febantela iz 3. posudice (filtrirana otopina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	98,6443
Otopina febantela iz 4. posudice (filtrirana otopina + NaOCl)	5	0,3209

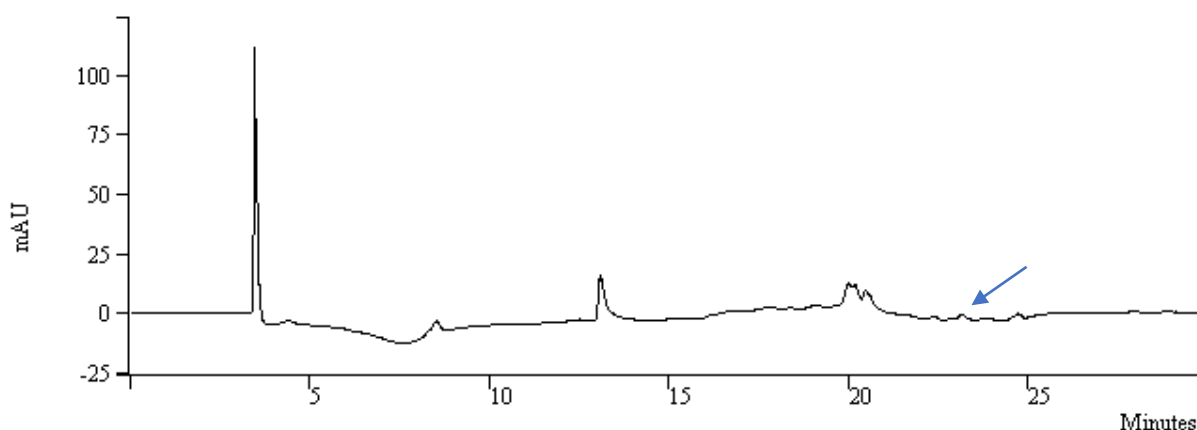
#### 4.2.6. Fotoliza otopina mebendazola

##### Kromatografska detekcija i analiza

Kromatogrami uzoraka otopine mebendazola iz 1. posudice fotolize u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 142** i **143**. U prvoj posudici se nalazila neprofiltrirana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje mebendazola. Kromatografska krivulja koja pripada mebendazolu je označena plavom strelicom, a transformacijski i razgradni produkti mebendazola tijekom procesa šaržne biorazgradnje su zaokruženi crveno. U sve 4 posudice je dodana otopina iz 1. reaktora biorazgradnje mebendazola, a mebendazol je gotovo sav potpuno adsorbirao na mulj, prema tome nije ga puno ostalo u otopini. Prilikom kromatografske analize krivulja mebendazola se jedva detektira. U prvoj posudici uslijed fotolize ne nastaju razgradni produkti.



**Slika 142.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0$  h

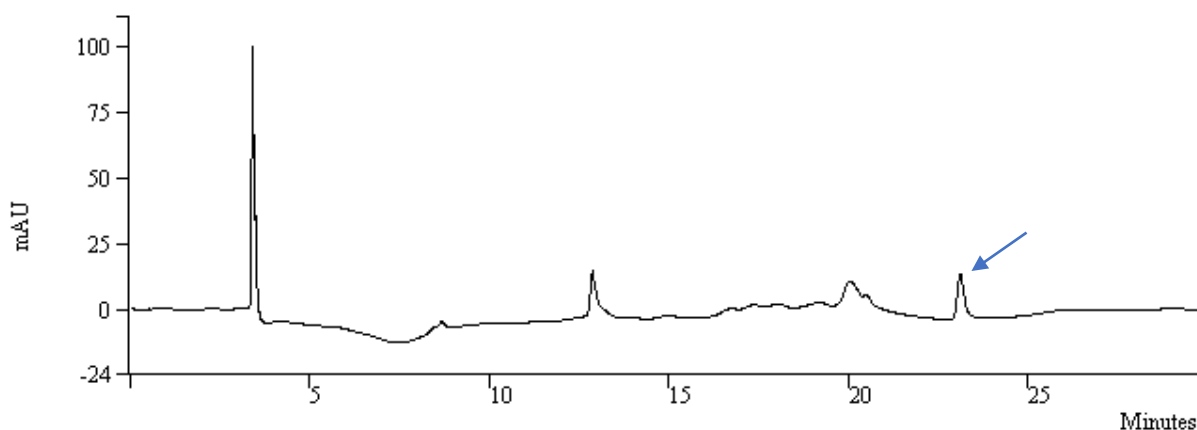


**Slika 143.** Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5$  h

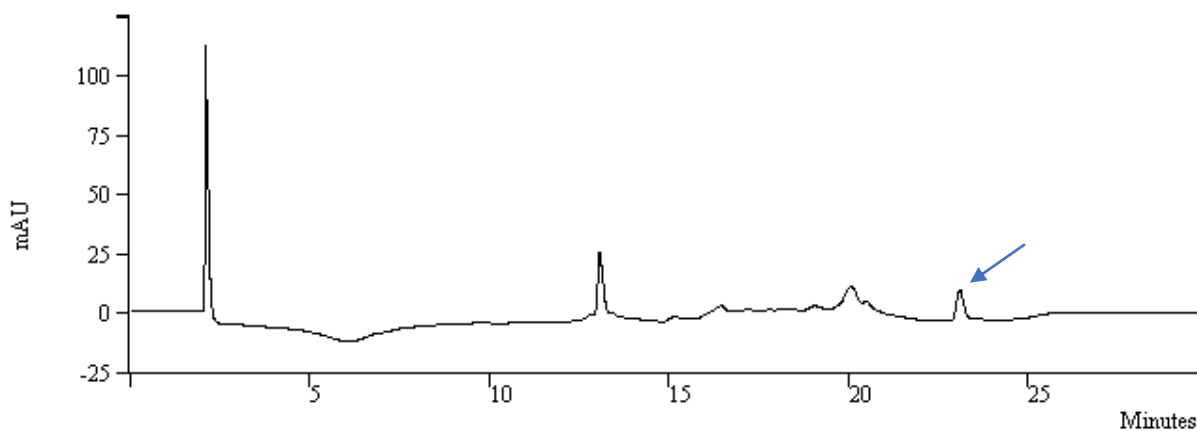
Kromatogrami uzoraka otopine iz 2. posudice u kojoj se nalazila samo profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje u vremenu 0 h, 2 h i 5 h prikazani su na **Slikama 144**, **145** i



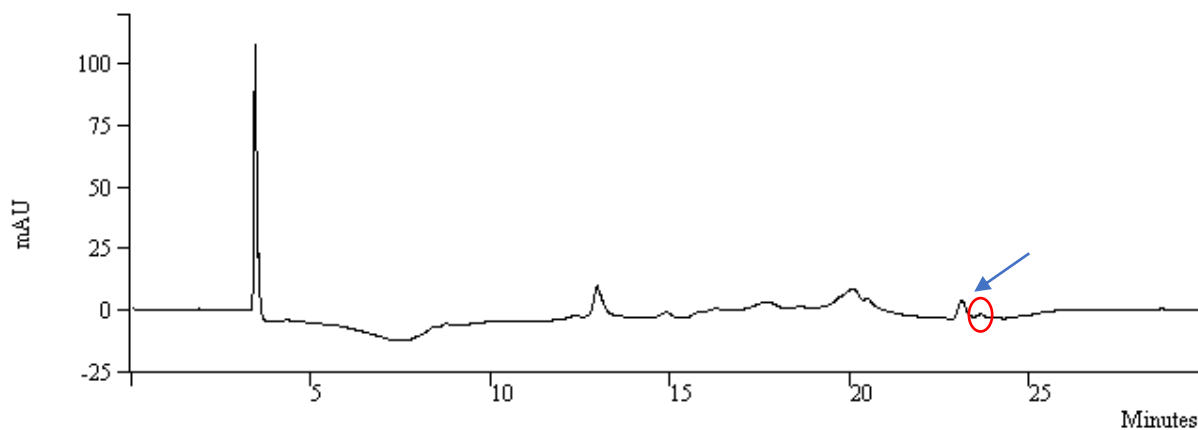
**146.** Nakon 2 sata fotolize pojavljuje se razgradni produkt kojemu je vrijeme zadržavanja 23,629 min, njegov apsorpcijski spektar prikazan je na **Slici 147**. Taj razgradni produkt se ne uočava u prvoj posudici vjerojatno zbog prisutnosti mulja i ako i nastaje vjerojatno se odmah adsorbira i tako nije prisutan u otopini prve posudice. Očekivana je pojava razgradnog produkta pošto je on dobiven kod prethodnih eksperimenata fotolize otopine mebendazola. [31]



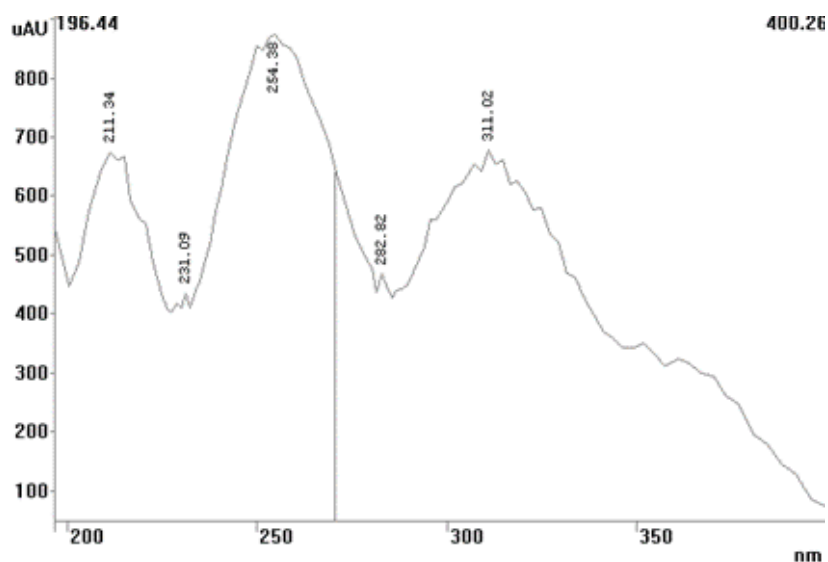
**Slika 144.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0$  h



**Slika 145.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=2$  h



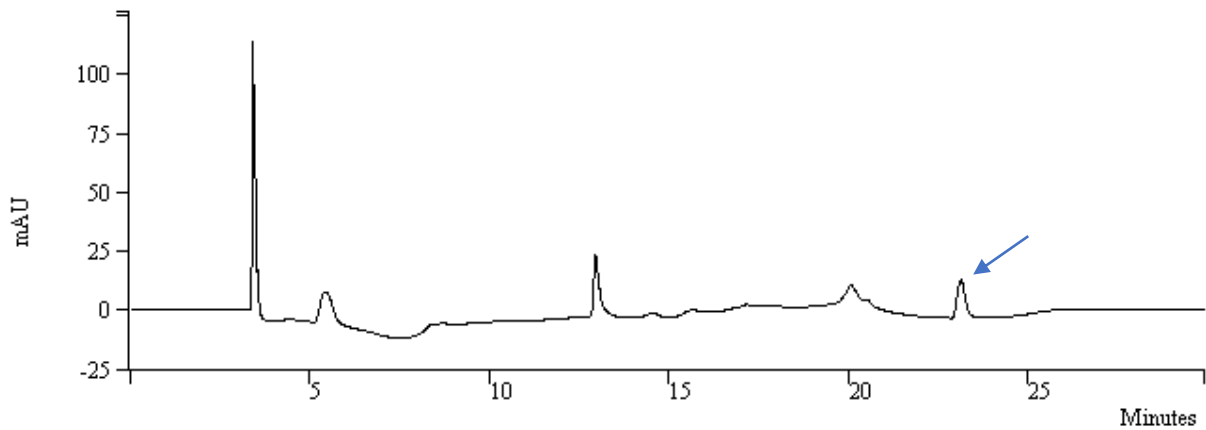
**Slika 146.** Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5$  h



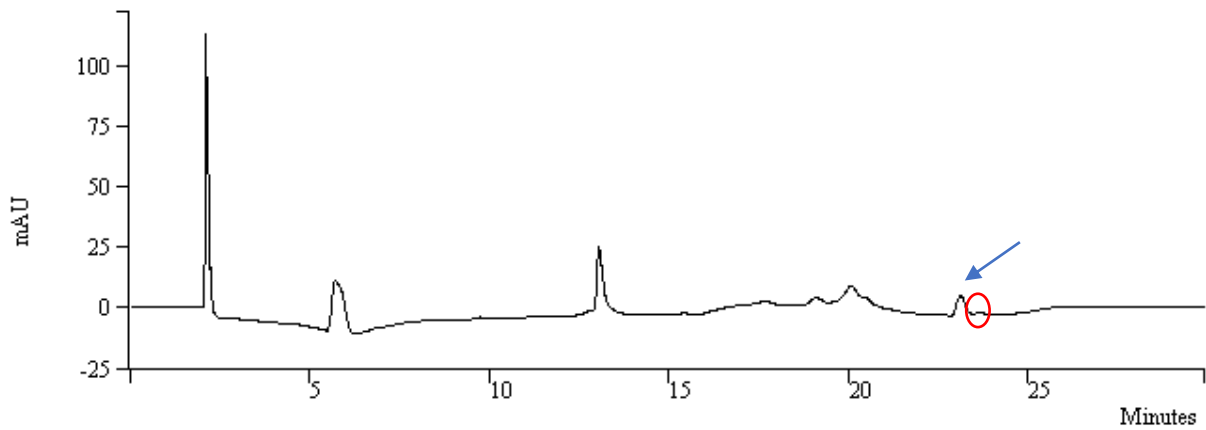
**Slika 147.** Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=23,629$  min) mebendazola koji je nastao tijekom fotolize filtrirane otopine mebendazola

Kromatogrami uzoraka otopine iz 3. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i vodikov peroksid u koncentraciji od 20 mM u vremenu 0 h, 2 h i 5 h prikazani su na **Slikama 148, 149 i 150**. Nakon 2 sata sunčanja uzorka nastaje razgradni produkt jednak kao i u 2. posudici, s vremenom zadržavanja 23,629 min, ali do kraja analize on nestaje. Učinkovitost razgradnje mebendazola povoljnija je pri višim pH-vrijednostima [31] dok je pH-vrijednost ove ispitivane otopine iznosila oko 7. Također, tijekom ranijih ispitivanja uspješno je uklonjeno otprilike 80 % mebendazola uz koncentraciju vodikovog peroksida od 50 mM, što je veća koncentracija nego u ovom radu. Mebendazol se

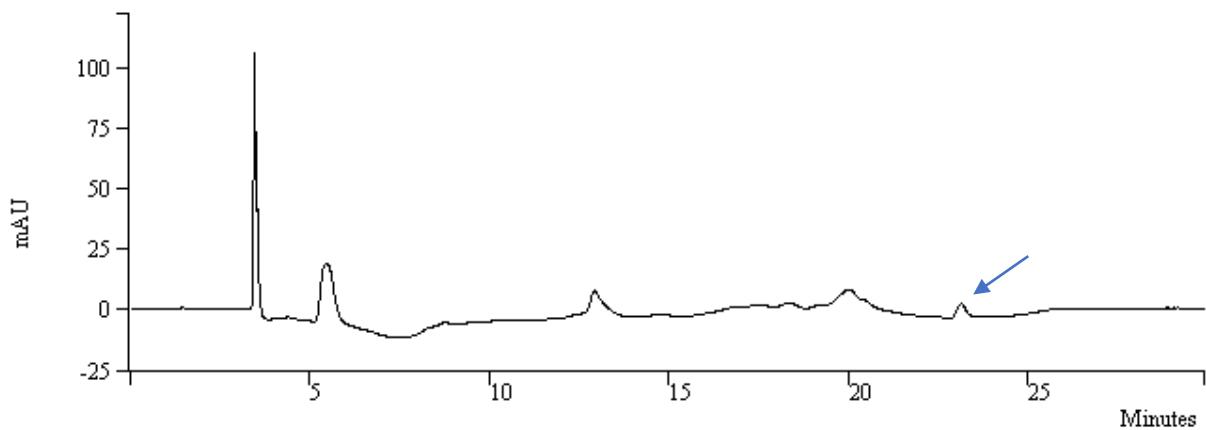
dijelom uklanja pomoću vodikovog peroksida, ali dijelom pokazuje i određenu stabilnost prilikom provođenja fotolize u ovim uvjetima, ne dolazi do njegovog potpunog uklanjanja.



**Slika 148.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0$  h

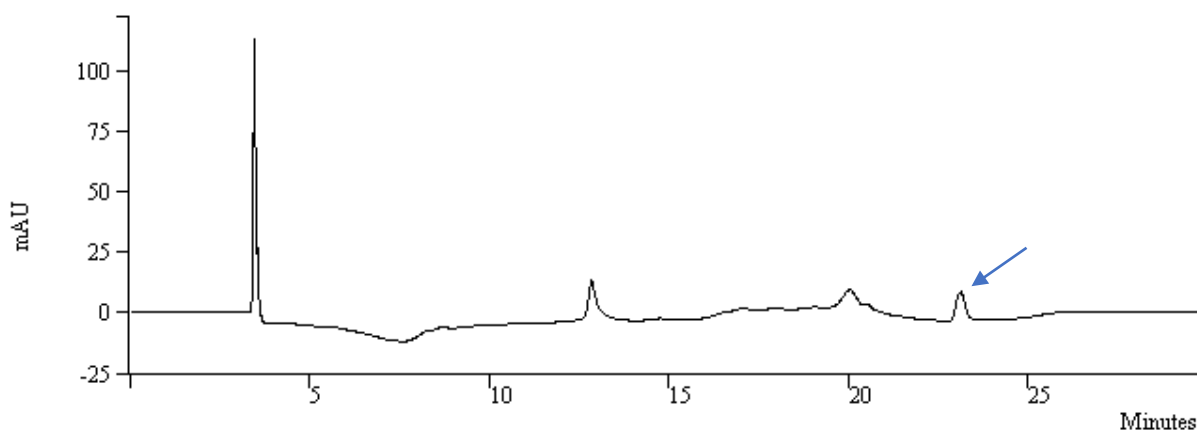


**Slika 149.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=2$  h

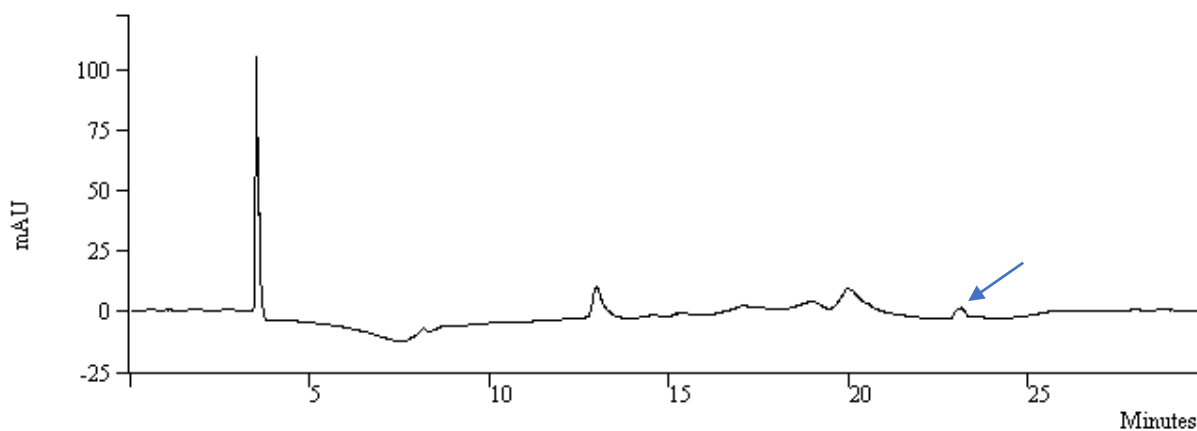


**Slika 150.** Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5$  h

Kromatogrami uzoraka otopine iz 4. posudice u kojoj se nalazila profiltrirana otopina iz 1. reaktora nakon biorazgradnje i natrijev hipoklorit u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  u vremenu 0 h i 5 h prikazani su na **Slikama 151** i **152**. Dolazi do blagog uklanjanja mebendazola pri koncentraciji natrijevog hipoklorita od  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Takva koncentracija nema znatan utjecaj na uklanjanje mebendazola, dok koncentracija natrijevog hipoklorita od  $10 \text{ mg L}^{-1}$  [31] dovodi do potpunog uklanjanja mebendazola i nastanka razgradnog ili transformacijskog produkta.



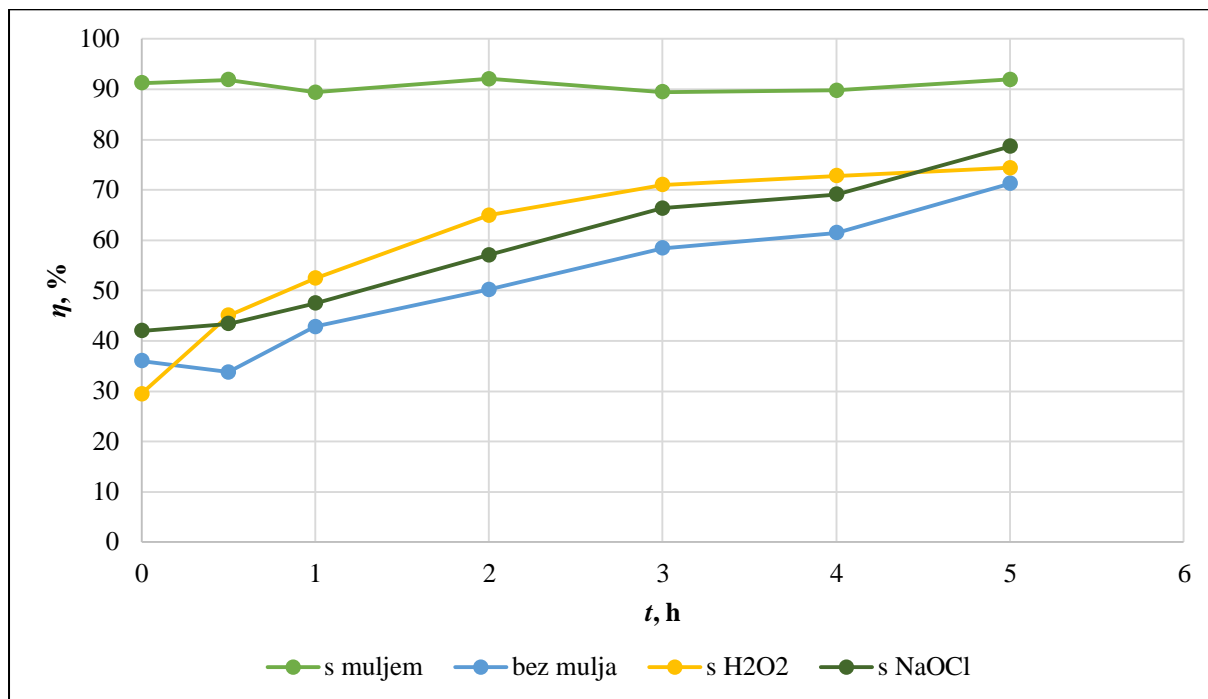
**Slika 151.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0 \text{ h}$



**Slika 152.** Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Na **Slici 153** prikazana je usporedba učinkovitosti uklanjanja mebendazola tijekom fotolize. Ni u jednom slučaju ne dolazi do potpunog uklanjanja mebendazola. Do 90 %-tnog uklanjanja dolazi u posudici s muljem, ali to je vjerojatno uslijed adsorpcije na mulj. U sve ostale 3 posudice dolazi do podjednagog uklanjanja mebendazola. Metoda dodatka vodikovog peroksida u ovom slučaju se nije pokazala izrazito učinkovita pošto je mebendazol relativno stabilan pri navedenim uvjetima. Metoda dodatka natrijevog hipoklorita u koncentraciji od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  nije učinkovita za uklanjanje mebendazola iz otopine. Prema ranijim

istraživanjima[31] veće koncentracije navedenih dodataka imale bi bolji utjecaj na uklanjanje mebendazola.



**Slika 153.** Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

### Toksičnost

U **Tablici 62** su prikazani podaci inhibicije bakterijske kulture u originalnim, nerazrijeđenim, uzorcima u kojima se provodila fotoliza otopina mebendazola. Inhibicija uzorka otopine iz 2. posudice nakon 5 sati fotolize iznosi oko 10 %. Otopina iz 3. posudice, odnosno otopina mebendazola kojoj je dodan vodikov peroksid, nakon 5 sati fotolize pokazuje inhibiciju bakterijske kulture od oko 98 %, što je skoro jednako referentnoj vrijednosti inhibicije otopine samog vodikovog peroksida od oko 99 %. U 4. posudici otopina pokazuje inhibiciju oko 13 %. Inhibicija otopine iz druge posudice je manja pošto je ponovno dio mebendazola adsorbiran na mulj i time uklonjen iz otopine.

**Tablica 62.** Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka otopina mebendazola nakon fotolize

<b>Uzorak</b>	<b>t, h</b>	<b>%INHIB (orig. uzorka)</b>
Otopina mebendazola iz 2. posudice (filtrirana otopina)	5	9,8493
Otopina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (slijepa proba)	5	99,3998
Otopina mebendazola iz 3. posudice (filtrirana otopina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	5	97,6644
Otopina mebendazola iz 4. posudice (filtrirana otopina + NaOCl)	5	12,7304

## 5. ZAKLJUČAK

Svi ispitivani ksenobiotici prema BOWIN vrijednostima su biorazgradivi, te do njihove biorazgradnje dolazi u periodima kroz tjedne ili mjesece. Na temelju provedenih laboratorijskih istraživanja razgradnje antiparazitika albendazola, febantela i mebendazola te pesticida acetamiprida, klotianidina i tiakloprida može se zaključiti sljedeće:

- Biorazgradnja aktivnim muljem kroz 24 sata se pokazala učinkovitijom za antiparazitike što se tiče uklanjanja aktivne komponente iz otopine. Kromatografska analiza pokazala je da dolazi do slabog uklanjanja pesticida u reaktoru s muljem, malim dijelom dolazi do njihove biorazgradnje i malim dijelom se adsorbiraju na mulj. Dok se antiparazitici u velikoj mjeri adsorbiraju na mulj. Takvi rezultati potvrđeni su i rezultatima mikrovalne ekstrakcije uzoraka mulja. Prema njima najbolje se uklonio albendazol i mebendazol, odnosno mulj iz prvog reaktora je adsorbirao gotovo svu količinu dodanih tvari. U budućim istraživanjima bilo bi dobro ispitati dolazi li do značajne desorpcije antiparazitika u većem vremenskom periodu. Što se tiče same biorazgradnje tvari mikroorganizmima aktivnog mulja, ona se nije pokazala značajnom u navedenim procesnim uvjetima.
- Osvijetljavanje uzoraka Sunčevim zračenjem kroz 5 sati nije pokazalo značajno uklanjanje ksenobiotika osim kod klotianidina. Jedino kod klotianidina dolazi do gotovo potpunog uklanjanja fotolizom unutar 5 sati. Što se tiče ostalih spojeva ne može se na temelju ove analize tvrditi da nisu fotokatalitički razgradivi te bi u budućim istraživanjima trebalo produžiti vrijeme provođenja fotolize.
- Vodikov peroksid tijekom fotolize je doveo do gotovo potpune razgradnje kod svih ksenobiotika. Kromatografskom analizom su kod svih spojeva uočeni i razgradni produkti, ali i oni su do završetka ispitivanja uspješno uklonjeni iz otopina. Dodatak vodikovog peroksida je kao napredna oksidacijska metoda pokazao svoju visoku učinkovitost.
- Dodavanjem natrijevog hipoklorita otopinama ksenobiotika tijekom fotolize nije postignuto uklanjanje ispitivanih tvari. Dolazi do jako slabog uklanjanja ispitivanih spojeva te razgradni ili transformacijski produkti nastaju tek u zadnjem satu i u većem slučaju su ispod granica detekcije. Iako dosadašnja istraživanja pokazuju uklanjanje ovih spojeva dodatkom natrijevog hipoklorita u koncentracijama od  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , u ovom slučaju koncentracija natrijevog hipoklorita od  $1 \text{ mg L}^{-1}$  nije dovoljna kako bi ovaj dezinficijens učinkovito uklonio ispitivane ksenobiotike.

- Konačno, provedeno je ispitivanje toksičnosti svih otopina tijekom provođenja ispitivanja razgradnje ksenobiotika. Otopina 2. reaktora, odnosno vodena otopina u kojoj se nalazio samo aktivni mulj ni u jednom slučaju nije toksična, čak suprotno, pokazuje porast luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri*. Otopine svih ksenobiotika pokazuju određeni postotak inhibicije bakterijske kulture, odnosno otopine su toksične. Otopine ispitivanih pesticida uzrokuju veću inhibiciju od otopina antiparazitika. Valja uzeti u obzir slabu topljivost antiparazitika u vodi i time manju koncentraciju njihovih uzoraka u odnosu na uzorke otopina pesticida. Otopine ksenobiotika s dodanim vodikovim peroksidom pokazuju u svim slučajevima gotovo 100 %-tnu inhibiciju bakterijske kulture. Otopine ksenobiotika s dodanim natrijevim hipokloritom pokazuju tek malo veću inhibiciju bakterijske kulture u odnosu na iste otopine bez natrijevog hipoklorita.

U ovom eksperimentu su različitim procesima razgradnje ksenobiotika nastali razgradni ili transformacijski produkti čija struktura i priroda tih spojeva nisu poznati. U budućnosti su potrebna dodatna istraživanja koja bi odredila strukture novonastalih spojeva, a također i ispitala toksičnost samih kako bi se bolje predvidjelo njihovo ponašanje tijekom obrade otpadnih voda.



## 6. LITERATURA

- [1] **Charuaud, L.; Jarde, E.; Jaffrezic, A.; Thomas, M.-F.; Le Bot, B.** (2019), Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 361, str. 169–186
- [2] **Wilkinson, J.; Hooda, P. S.** (2019) Special Issue on the Environmental Fate of Emerging Organic Micro-Contaminants, *Applied Sciences*, 9(15), 2997.
- [3] **Antimikrobna rezistentnost**, <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (preuzeto: lipanj 2023.)
- [4] **Fetzner, S.** (2002), Biodegradation of Xenobiotics, *Biotechnology*, vol. 10, str. 1-8
- [5] **Jurković, D.** (2021), *Određivanje toksičnosti pesticida nakon fotolize*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [6] **Acetamiprid**, [https://en.wikipedia.org/wiki/Acetamiprid#/media/File:Acetamiprid\\_Structural\\_Formulae\\_V.1.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Acetamiprid#/media/File:Acetamiprid_Structural_Formulae_V.1.svg) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [7] **Acetamiprid**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetamiprid> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [8] **Scheringer, M.**, Procedure for estimating chemical properties and chemical concentrations in different media of an environmental fate model, ETH Zürich, Switzerland
- [9] **Klotianidin**, <https://www.chemservice.com/media/product/structures/n-11493.jpg> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [10] **Klotianidin**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clothianidin> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [11] **Tiakloprid**, [https://en.wikipedia.org/wiki/Thiacloprid#/media/File:Thiacloprid\\_structure.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Thiacloprid#/media/File:Thiacloprid_structure.svg) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [12] **Tiakloprid**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiacloprid> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [13] **Kumar Maurya, P.; Malik, D.S.** (2016), Bioaccumulation of Xenobiotics Compound of Pesticides in Riverine System and Its Control Technique: A Critical Review, *Journal of Industrial Pollution Control*, vol. 32, str. 580-594
- [14] **Mahmood, I.; Imadi, S.R.; Shazadi, K. Gul; A., Hakeem, K.R.** (2016) Effects of Pesticides on Environment, u: Hakeem, K.R.; Akhtar, M.S.; Akmar Abdullah, S.N.; *Plant, Soil and Microbes*, Springer: International Publishing, str. 253-269
- [15] **Kleczkowski, A.; Ellis, C.; Hanley, N.; Goulson, D.** (2017), Pesticides and bees: Ecological-economic modelling of bee populations on farmland, *Ecological Modelling*, vol. 360, str. 53-62
- [16] **De Oliveira, R. C.; Do Nascimento Queiroz, S. C.; Fernandes Pinto de Luz, C.; Porto, R. S.; Rath S.** (2016), Bee Pollen a bioindicator of environmental pesticide contamination, *Chemosphere*, vol. 163, str. 525-534

- [17] **Čavarović, N.** (2020) *Biorazgradnja antihelmintika aktivnim muljem*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [18] **Antimikrobna rezistentnost**, <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> (preuzeto: lipanj 2023.)
- [19] **Albendazol**, [https://www.google.com/search?client=opera&hs=pwe&sca\\_esv=560664892&sxsrf=AB5stBhf2ppHcfTvbNrLuftOCyrDuqJ9Nw:1693223055394&q=albendazol+struktura&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwjM1\\_e1o\\_AAxUAhf0HHQBmBMQQ0pQJegQIChAB&biw=1476&bih=708&dpr=1.25#imgcr=hixbZo-FMdhiFM](https://www.google.com/search?client=opera&hs=pwe&sca_esv=560664892&sxsrf=AB5stBhf2ppHcfTvbNrLuftOCyrDuqJ9Nw:1693223055394&q=albendazol+struktura&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwjM1_e1o_AAxUAhf0HHQBmBMQQ0pQJegQIChAB&biw=1476&bih=708&dpr=1.25#imgcr=hixbZo-FMdhiFM) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [20] **Albendazol**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Albendazole> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [21] **Denžić M.; Bilandžić N.** (2013), Benzimidazolni lijekovi u hrani životinjskog podrijetla, *Veterinarska stanica*, vol. 44 (5), str. 371-382
- [22] **Febantel**, [https://www.google.com/search?client=opera&hs=kZ2&sca\\_esv=566330112&sxsrf=AM9HkKnUeZEIzcTQ5\\_G4huB6eJuvkT5AQ:1695061559190&q=febantel+molekul+structure&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiOjO6w5LSBAxV8hP0HHUk\\_DhMQ0pQJegQIDRAB&biw=1866&bih=932&dpr=1#imgcr=hHGlo0vEYMLM1M](https://www.google.com/search?client=opera&hs=kZ2&sca_esv=566330112&sxsrf=AM9HkKnUeZEIzcTQ5_G4huB6eJuvkT5AQ:1695061559190&q=febantel+molekul+structure&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiOjO6w5LSBAxV8hP0HHUk_DhMQ0pQJegQIDRAB&biw=1866&bih=932&dpr=1#imgcr=hHGlo0vEYMLM1M) (preuzeto: rujan 2023.)
- [23] **Febantel**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Febantel> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [24] **Mebendazol**, [https://www.google.com/search?client=opera&hs=Ibf&sca\\_esv=560664892&sxsrf=AB5stBgbCmK\\_3otRJr\\_ayq4GGJrm01auSw:1693225564925&q=mebendazol+struktura&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiUqsnirP-AAxWNhv0HHalyBPUQ0pQJegQIDBAB&biw=1476&bih=708&dpr=1.25#imgcr=LDoi-2k1Lm9ImM](https://www.google.com/search?client=opera&hs=Ibf&sca_esv=560664892&sxsrf=AB5stBgbCmK_3otRJr_ayq4GGJrm01auSw:1693225564925&q=mebendazol+struktura&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=2ahUKEwiUqsnirP-AAxWNhv0HHalyBPUQ0pQJegQIDBAB&biw=1476&bih=708&dpr=1.25#imgcr=LDoi-2k1Lm9ImM) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [25] **Mebendazol**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mebendazole> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [26] **Kenchappa, R.; Bodke, Y.D.; Telkar, S.; Aruna Sindhe, M.** (2016) Antifungal and anthelmintic activity of novel benzofuran derivatives containing thiazolo benzimidazole nucleus: an in vitro evaluation, *Journal of Chemical Biology*, vol. 10 (1), str. 11–23
- [27] **Ceconet, D.; Molognoni, D.; Callegari, A.; Capodaglio, A. G.** (2017) Biological combination processes for efficient removal of pharmaceutically active compounds from wastewater: A review and future perspectives, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 5 (4), str. 3590–3603
- [28] **Zrnčević S.** (2016), Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, vol. 24 (96), str. 119-136
- [29] **Tomić, H.** (2019), *Obrada otpadnih voda*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Rudarsko-geološko-naftni fakultet, Zagreb
- [30] **Tedeschi S.** (1997), *Zaštita voda*, Sveučilište u Zagrebu, Građevinski fakultet

- [31] **Jambrošić, K.** (2021), *Utjecaj natrijevog hipoklorita i vodikovog peroksida na razgradnju antiparazitika u otpadnim vodama*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [32] **Rajasulochana P.; Preethy V.** (2016), Comparison on efficiency of various techniques in treatment of waste and sewage water – A comprehensive review, *Resource-Efficient Technologies*, vol. 2 (3), str. 75–84
- [33] **Bairagi S.; Ali SW.** (2020), Conventional and Advanced Technologies for Wastewater Treatment, *Environmental Nanotechnology for Water Purification*, str. 33–56
- [34] **Yates, M.V.** (2011), On-Site Wastewater Treatment, *Encyclopedia of Environmental Health*, str. 256-263
- [35] **Hammer, M. J.; Hammer, M. J. Jr.** (2004), *Water Quality, Water and wastewater technology* 5th ed., Prentice Hall, New Jersey, str. 139-159
- [36] **Prevarić, V.** (2019.), *Optimiranje postupka dezinfekcije pitke vode u opskrbnom sustavu*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [37] **Natrijev hipoklorit**, [https://www.tpomag.com/editorial/2013/12/understanding\\_sodium\\_hypochlorite\\_wso](https://www.tpomag.com/editorial/2013/12/understanding_sodium_hypochlorite_wso) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [38] **Natrijev hipoklorit**, <https://hr.puntomariner.com/sodium-hypochlorite-formula-application-water/> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [39] **Fukuzaki, S.** (2006), Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Clening and Disinfection Processes, *Biocontrol Science*, vol. 11 (4), str. 147-157
- [40] **Díaz-Reinoso B.** (2020), Concentration and Purification of Seaweed Extracts Using Membrane Technologies, *Sustainable Seaweed Technologies*, str. 371-390
- [41] **Deng Y.; Zhao, R.** (2015), Advanced Oxidation Processes ( AOPs ) in Wastewater Treatment, *Curr Pollution Rep*, vol. 1, str. 167-176
- [42] **Bajpai, P.** (2015), The Control of Microbiological Problems: Biotechnology for Pulp and Paper Processing, *Pulp and Paper Industry*, str. 103-195
- [43] **Ašperger D.** (2020./2021.) Karakterizacija materijala-3. predavanje, Zavod za analitičku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [44] **Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.** (1999), *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, str 645-646, 692-697
- [45] **Andrić D.** (2020), *Određivanje toksičnosti ksenobiotika u realnim uzorcima bakterijom Vibrio fischeri*, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
- [46] **Vibrio fischeri**, [https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/c/cd/Image\\_of\\_Hawaiian\\_Bobtail\\_Squid.png/300px-Image\\_of\\_Hawaiian\\_Bobtail\\_Squid.png](https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/c/cd/Image_of_Hawaiian_Bobtail_Squid.png/300px-Image_of_Hawaiian_Bobtail_Squid.png) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [47] **Šprica**, <https://www.labunlimited.com/s/ALL/4AJ-7619784/Becton-Dickinson-BD-Discardit-Disposable-Syringes-5ml-309050> (preuzeto: kolovoz 2023.)

- [48] **Filteri**, <https://www.filter-bio.com/syringe-filter/disposable-syringe-filter/syringe-filter-nylon.html> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [49] **Shema HPLC kromatografskog sustava**, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative\\_HPLC.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative_HPLC.svg) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [50] **Boce po Winkler-u**, [https://www.google.com/search?client=opera&hs=Czc&sxsrf=APwXEde8Ci6qD8jC-ST9TsMUySFG2YW-ZQ:1687019194162&q=vinkler+boca&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiD-a-e3Mr\\_AhVM\\_rsIHc\\_uCvwQ0pQJegQIChAB&biw=1496&bih=731&dpr=1.25#imgrc=nHqGphiTnY-ewM&imgdii=sFczzEF6fvy9HM](https://www.google.com/search?client=opera&hs=Czc&sxsrf=APwXEde8Ci6qD8jC-ST9TsMUySFG2YW-ZQ:1687019194162&q=vinkler+boca&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiD-a-e3Mr_AhVM_rsIHc_uCvwQ0pQJegQIChAB&biw=1496&bih=731&dpr=1.25#imgrc=nHqGphiTnY-ewM&imgdii=sFczzEF6fvy9HM) (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [51] **Dr. Bruno Lange GmbH** (1999), LUMISTox 300 Operating Manual, Germany, <https://manualmachine.com/hachlange/lumistox300lpv321usermanual/1587750-user-manual/> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [52] **Gavranić, M.** (2015), *Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz koštice grožđa*, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [53] **Mufolna peć**, <http://www.kefo.hr/muffelofen-1-511b180> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [54] **Boyles, W.** (1997), The science of chemical oxygen demand, Technical information series, Hach Company, Booklet No. 9, U.S.A.
- [55] **Bucić, P.** (2016), *Fotokatalitička razgradnja diklofenaka pod UV-A i umjetnim sunčevim zračenjem*, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [56] **BPK**, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 17<sup>th</sup> Edition (1989), APHA-AWWA-WPCF, New York
- [57] **Optimalan pH u aeraciji otpadnih voda**, <https://blog.hannainst.com/ph-and-do-in-a-wastewater-aeration-tank/> (preuzeto: kolovoz 2023.)
- [58] **Papac, J.** (2017), *Biorazgradnja antiparazitika u vodi*, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
- [59] **Min, X.; Li, W.; Wei, Z.; Spinney, R.; Dionysiou, D. D.; Seo, Y.; Tang, C.J.; Xiao, R.** (2018), Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study, *Chemical Engineering Journal*, vol. 342, str. 211–219
- [60] **Chen, L.; Cai, T.; Cheng, C.; Xiong, Z.; Ding, D.** (2018), Degradation of acetamiprid in UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV/persulfate systems: a comparative study, *Chemical Engineering Journal*, vol. 351, str. 1137-1146
- [61] **Abramović, B.F.; Banić, N.D.; Šojić, D.V.** (2010), Degradation of thiacloprid in aqueous solution by UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments, *Chemosphere*, vol. 81, str. 114-119
- [62] **Merkurijeva lampa prednosti i mane**, <https://edisontechcenter.org/MercuryVaporLamps.html> (preuzeto: kolovoz 2023.)

## 7. DODACI

### 7.1. Popis slika

- Slika 1. Kemijska struktura acetamiprida [6]  
Slika 2. Kemijska struktura klotianidina [9]  
Slika 3. Kemijska struktura tiakloprida [11]  
Slika 4. Kemijska struktura albendazola [19]  
Slika 5. Kemijska struktura febantela [22]  
Slika 6. Kemijska struktura mebendazola [24]  
Slika 7. Koraci konvencionalnog pročišćavanja otpadnih voda: predobrada, primarni tretman, sekundarni tretman i tercijski tretman [31]  
Slika 8. Bakterija *Vibrio fischeri* u simbiozi s lignjom *Euprymna scolopes* [46]  
Slika 9. Analitička vaga XA105 DualRange, Švicarska  
Slika 10. pH metar Seven Easy, Švicarska  
Slika 11. Kisikova elektroda Orion RDO Thermo Scientific, SAD  
Slika 12. Šprica i filteri korišteni za filtriranje uzoraka [47,48]  
Slika 13. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Varian ProStar, SAD  
Slika 14. Shematski prikaz rada kromatografa [49]  
Slika 15. UV/VIS spektrofotometar DR 2400 HACH, SAD  
Slika 16. Termostatski blok, HACH, SAD  
Slika 17. Različite boce po Winkler-u [50]  
Slika 18. Inkubator Inko Laboratorijska oprema, Hrvatska  
Slika 19. Instrument Suntest CPS+, Njemačka  
Slika 20. Instrument LUMIStox 300 s inkubacijskim blokom LUMIStherm, Njemačka  
Slika 21. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju s teflonskim posudama za uzorke prije pokretanja ekstrakcije  
Slika 22. Teflonske "GreenChem" posude  
Slika 23. Rotavapor, Büchi Rotavapor R-114  
Slika 24. Sušionik Instrumentarija Zagreb, Hrvatska (Jugoslavija)  
Slika 25. Mufolna peć, proizvođača Nabertherm GmbH, Njemačka [53]  
Slika 26. Shema aparature za biorazgradnju [17]  
Slika 27. Reaktori u kojima se provodio proces šaržne biorazgradnje  
Slika 28. Odvage uzoraka aktivnog mulja  
Slika 29. Aparatura za filtraciju uzoraka nakon mikrovalne ekstrakcije  
Slika 30. Kvarcne posudice s pripremljenim otopinama za fotolizu  
Slika 31. Filter lijevak s vakuum sisaljkom  
Slika 32. Osušeni uzorci za određivanje suspendiranih čestica u bioreктору  
Slika 33. Uzorci za žarenje prije (lijevo) i nakon (desno) žarenja  
Slika 34. Staklene kivete s uzorcima za određivanje KPK  
Slika 35. Staklene kivete s različito koncentriranim uzorcima za određivanje KPK  
Slika 36. Priprema geometrijskog niza razrjeđenja [51]  
Slika 37. Shematski prikaz mjerenja toksičnosti uz pripremljeni geometrijski niz [51]  
Slika 38. Prikaz kromatograma ksenobiotika u  $t=0$  i  $t=t$  uz jednadžbu za izračun učinkovitosti razgradnje [31]  
Slika 39. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 40. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 41. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=18,281$  min) acetamiprida koji je nastao tijekom šaržne biorazgradnje acetamiprida  
Slika 42. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida iz 1. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 43. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 44. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 45. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 46. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 47. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida iz 3. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 48. Graf toksičnosti otopine acetamiprida u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$   
Slika 49. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h  
Slika 50. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h

Slika 51. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina iz 1. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 52. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h  
Slika 53. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h  
Slika 54. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=0$  h  
Slika 55. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje klotianidina u vremenu  $t=24$  h  
Slika 56. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina iz 3. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 57. Graf toksičnosti otopine klotianidina u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$   
Slika 58. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 59. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=1$  h  
Slika 60. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 61. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=21,000$  min) tiakloprida koji je nastao tijekom šaržne biorazgradnje tiakloprida  
Slika 62. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida iz 1. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 63. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 64. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 65. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=0$  h  
Slika 66. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida u vremenu  $t=24$  h  
Slika 67. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida iz 3. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 68. Graf toksičnosti otopine tiakloprida u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$   
Slika 69. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 70. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 71. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=20,451$  min) albendazola koji je nastao tijekom šaržne biorazgradnje albendazola  
Slika 72. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 73. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 74. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 75. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje albendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 76. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja albendazola iz 3. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 77. Graf toksičnosti otopine albendazola u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$   
Slika 78. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$  h  
Slika 79. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$  h  
Slika 80. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela iz 1. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 81. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$ h  
Slika 82. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$ h  
Slika 83. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=0$  h  
Slika 84. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje febantela u vremenu  $t=24$  h  
Slika 85. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela iz 3. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 86. Graf toksičnosti otopine febantela u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$   
Slika 87. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 88. Kromatogram uzorka iz 1. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 89. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola iz 1. reaktora tijekom 24 sata  
Slika 90. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 91. Kromatogram uzorka iz 2. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 92. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 93. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=12$  h  
Slika 94. Kromatogram uzorka iz 3. reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje mebendazola u vremenu  $t=24$  h  
Slika 95. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=25,869$  min) mebendazola koji je nastao tijekom hidrolize mebendazola

Slika 96. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola iz 3. reaktora tijekom 24 sata

Slika 97. Graf toksičnosti otopine mebendazola u deioniziranoj vodi koncentracije  $10 \text{ mg L}^{-1}$

Slika 98. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 99. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 100. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 101. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 102. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 103. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=1 \text{ h}$

Slika 104. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 105. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=13,699 \text{ min}$ ) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida

Slika 106. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=16,459 \text{ min}$ ) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida

Slika 107. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=21,229 \text{ min}$ ) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost vodikovog peroksida

Slika 108. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 109. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize acetamiprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 110. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=21,227 \text{ min}$ ) acetamiprida koji je nastao tijekom fotolize otopine acetamiprida uz prisutnost natrijevog hipoklorita

Slika 111. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja acetamiprida u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

Slika 112. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 113. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 114. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 115. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 116. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 117. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=30 \text{ min}$

Slika 118. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=3 \text{ h}$

Slika 119. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 120. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=13,541 \text{ min}$ ) klotianidina koji je nastao tijekom fotolize otopine klotianidina uz prisutnost vodikovog peroksida

Slika 121. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 122. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize klotianidina u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 123. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja klotianidina u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

Slika 124. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 125. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 126. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 127. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 128. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 129. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 130. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 131. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize tiakloprida u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 132. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja tiakloprida u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

Slika 133. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 134. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 135. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 136. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 137. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 138. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 139. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 140. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize febantela u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 141. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja febantela u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize

Slika 142. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 143. Kromatogram uzorka iz 1. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 144. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 145. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=2 \text{ h}$

Slika 146. Kromatogram uzorka iz 2. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5 \text{ h}$

Slika 147. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta ( $t_R=23,629 \text{ min}$ ) mebendazola koji je nastao tijekom fotolize filtrirane otopine mebendazola

Slika 148. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0 \text{ h}$

Slika 149. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=2 \text{ h}$

Slika 150. Kromatogram uzorka iz 3. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5$  h  
Slika 151. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=0$  h  
Slika 152. Kromatogram uzorka iz 4. posudice tijekom procesa fotolize mebendazola u vremenu  $t=5$  h  
Slika 153. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja mebendazola u sve 4 posudice tijekom 5 sati fotolize



## 7.2. Popis tablica

- Tablica 1. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva acetamiprida [7]  
Tablica 2. BIOWIN vrijednosti acetamiprida [8]  
Tablica 3. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva klotianidina [10]  
Tablica 4. BIOWIN vrijednosti klotianidina [8]  
Tablica 5. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva tiakloprida [12]  
Tablica 6. BIOWIN vrijednosti tiakloprida [8]  
Tablica 7. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva albendazola [20]  
Tablica 8. BIOWIN vrijednosti albendazola [8]  
Tablica 9. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva febantela [23]  
Tablica 10. BIOWIN vrijednosti febantela [8]  
Tablica 11. Osnovna fizikalno-kemijska svojstva mebendazola [25]  
Tablica 12. BIOWIN vrijednosti mebendazola [8]  
Tablica 13. Abecedni popis korištenih kemikalija  
Tablica 14. Abecedni popis ispitivanih ksenobiotika  
Tablica 15. Sadržaj pojedinih reaktora tijekom procesa šaržne biorazgradnje  
Tablica 16. Sadržaj posudica u svakom ciklusu ispitivanja fotokatalitičke razgradnje  
Tablica 17. Abecedni popis sastojaka hranjive podloge  
Tablica 18. Abecedni popis sastojaka otopine za resuspenziju  
Tablica 19. Eksperimentalni uvjeti EC programa na instrumentu LUMISTox 300  
Tablica 20. Apsorpcijski spektri, maksimumi adsorpcije i vrijeme zadržavanja istraživanih čistih antiparazitika u standardnoj otopini masene koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup>  
Tablica 21. Apsorpcijski spektri, maksimumi adsorpcije i vrijeme zadržavanja istraživanih čistih pesticida u standardnoj otopini masene koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup>  
Tablica 22. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje acetamiprida  
Tablica 23. Dobivene vrijednosti ukupne suhe tvari prilikom biorazgradnje acetamiprida  
Tablica 24. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje acetamiprida  
Tablica 25. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje acetamiprida  
Tablica 26. Dobivene vrijednosti koncentracije acetamiprida prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 27. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka acetamiprida  
Tablica 28. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje klotianidina  
Tablica 29. Dobivene vrijednosti ukupne suhe tvari prilikom biorazgradnje klotianidina  
Tablica 30. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje klotianidina  
Tablica 31. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje klotianidina  
Tablica 32. Dobivene vrijednosti koncentracije klotianidina prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 33. Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka klotianidina  
Tablica 34. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje tiakloprida  
Tablica 35. Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje tiakloprida  
Tablica 36. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje tiakloprida  
Tablica 37. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje tiakloprida  
Tablica 38. Dobivene vrijednosti koncentracije tiakloprida prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 39. Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka tiakloprida  
Tablica 40. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje albendazola  
Tablica 41. Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje albendazola  
Tablica 42. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje albendazola  
Tablica 43. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje albendazola  
Tablica 44. Dobivene vrijednosti koncentracije albendazola prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 45. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka albendazola  
Tablica 46. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje febantela

Tablica 47. Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje febantela  
Tablica 48. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje febantela  
Tablica 49. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje febantela  
Tablica 50. Dobivene vrijednosti koncentracije febantela prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 51. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka febantela  
Tablica 52. Izmjerene vrijednosti pH, temperature i koncentracije kisika za sva tri reaktora prilikom provođenja procesa šaržne biorazgradnje mebendazola  
Tablica 53. Dobivene vrijednosti ukupne suspendirane tvari prilikom biorazgradnje mebendazola  
Tablica 54. Dobivene vrijednosti mase ostatka i gubitka žarenjem prilikom biorazgradnje mebendazola  
Tablica 55. Dobivene vrijednosti kemijske i biokemijske potrošnje kisika za uzorke tijekom biorazgradnje mebendazola  
Tablica 56. Dobivene vrijednosti koncentracije mebendazola prilikom analize uzoraka mikrovalnom ekstrakcijom  
Tablica 57. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka mebendazol  
Tablica 58. Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka otopina acetamiprida nakon fotolize  
Tablica 59. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina klotianidina nakon fotolize  
Tablica 60. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina tiakloprida nakon fotolize  
Tablica 61. Inhibicije bakterijske kulture originalnih (nerazrijeđenih) uzoraka otopina febantela nakon fotolize  
Tablica 62. Inhibicije bakterijske kulture originalnih(nerazrijeđenih) uzoraka otopina mebendazola nakon fotolize

### 7.3. Životopis

**Doris Stanić** [REDACTED] Odrasla je u Požegi gdje je završila Osnovnu školu Julija Kempfa te Prirodoslovno- matematičku gimanziju. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisala je 2015. godine kao redovita studentica sveučilišnog preddiplomskog studija Kemijskog inženjerstva. 2017. godine je promijenila studij i upisala sveučilišni preddiplomski studij Kemije i inženjerstva materijala. Stručnu praksu je odradila u Xelliji, na odjelu Analitike. U rujnu 2021. godine je obranila završni rad pod nazivom „Određivanje toksičnosti pesticida nakon fotolize“ te stekla kvalifikaciju *bacc. ing. cheming.* Trenutačno je student druge godine diplomskog studija Kemije i inženjerstva materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.