

# Bioanalitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu

---

Papac, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:843226>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-07**



Repository / Repozitorij:

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



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

Josipa Papac

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Josipa Papac

**BIOANALITIČKE METODE PRAĆENJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU**

ZAVRŠNI RAD

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

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

Izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Izv. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju i Zavodu za industrijsku ekologiju, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda, te dijelom u Pliva istraživanje i razvoj d.d. akademske godine 2014./2015.

#### **ZAHVALA:**

*Žahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na ukazanom povjerenju i prilici za suradnju, na stručnom vodstvu, podršci, pomoći i trudu koji mi je pružila tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac i tehničkoj suradnici Marijani Vidaković sa Zavoda za industrijsku ekologiju na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se profesorici izv.prof.dr.sc. Tibeli Landeki Dragičević i asistentici dr. sc. Dijani Grgas s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Laboratorija za biološku obradu otpadnih voda na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se dr.sc. Sanji Radman na stručnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se tehničkim suradnicama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Žahvaljujem se obitelji i prijateljima koji su mi velika podrška.*

## SAŽETAK

### BIOANALITIČKE METODE PRAĆENJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

Farmaceutici se dugi niz godina koriste u medicinske terapijske svrhe i time se nekontrolirano unose u okoliš, bilo putem staničnih izlučevina, neodgovarajućim odlaganjem ili ispuštanjem u okoliš prilikom neadekvatne obrade otpadnih voda. Prepoznati su kao potencijalni onečišćivači i zato se nazivaju „novim zagađivalima“. O njima još uvijek ne postoji dovoljno podataka da bi se dobio uvid u njihovo ponašanje i utjecaj na okoliš. Zbog toga se sve više ulaže u razvoj instrumenata s dovoljno niskim granicama detekcije i kvantifikacije, kako bi se odredile vrijednosti maksimalno dozvoljenih koncentracija farmaceutika u okolišu. Mnoga istraživanja su ukazala na moguću biorazgradnju takvih spojeva što bi se moglo implementirati u sustave za obradu otpadnih voda.

Cilj ovog rada je optimiranje uvjeta biorazgradnje veterinarskog farmaceutika antihelmintika albendazola u šaržnom reaktoru praćenjem fizikalno-kemijskih pokazatelja u vodenom mediju. Učinkovitost biorazgradnje albendazola kao i identifikacija transformacijskih produkata nastalih tijekom procesa prati se analitičkim i bioanalitičkim metodama.

U ovom radu postignuta je biorazgradnja albendazola u vodi aktivnim muljem pri čemu se ne smije zanemariti utjecaj hidrolize. Prisutni transformacijski produkti su detektirani i identificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti, a ocjena toksičnosti procesa biorazgradnje provedena je metodom mjerenja zone inhibicije na mikroorganizmima karakterističnima za tlo i vodu.

**Ključne riječi:** *albendazol, biorazgradnja, tekućinska kromatografija, toksičnost*

## **ABSTRACT**

### **BIOANALYTICAL METHODS FOR TRACKING PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT**

For many years pharmaceuticals have been used for medical therapeutic purposes and therefore have been uncontrollably entered in the environment, through excretion, inappropriate disposal or because of inadequate waste water treatment plants. Recently they have been recognized as a potentially harmful pollutants, so accordingly that the term „emerging contaminants“ have been formed. There is still no sufficient data to predict their behavior and the impact on the environment. That is reason for increasingly investing in the development of instruments with sufficiently low limits of detection and quantification, to determine the threshold limit value of pharmaceuticals in the environment. Many studies have pointed to a possible biodegradation of these compounds, so that can be set in systems for waste water treatment.

The aim of this study was to optimize the conditions of biodegradation veterinary pharmaceutical anthelmintic albendazole in a batch reactor by monitoring the physical and chemical parameters in water media. The effectiveness of biodegradation of albendazole and identification of transformation products formed during the process is monitored by analytical and bioanalytical methods.

In this study the biodegradation of albendazole in the water with activated sludge have been achieved whereby it could not be ignored the impact of hydrolysis on that process. Transformation products have been detected and identified by high performance liquid chromatography and ultrahigh performance liquid chromatography, and assessment of toxicity of biodegradation process was made by measuring the zone of inhibition on microorganisms characteristic for soil and water.

**Key words:** *albendazole, biodegradation, liquid chromatography, toxicity*

## SADRŽAJ

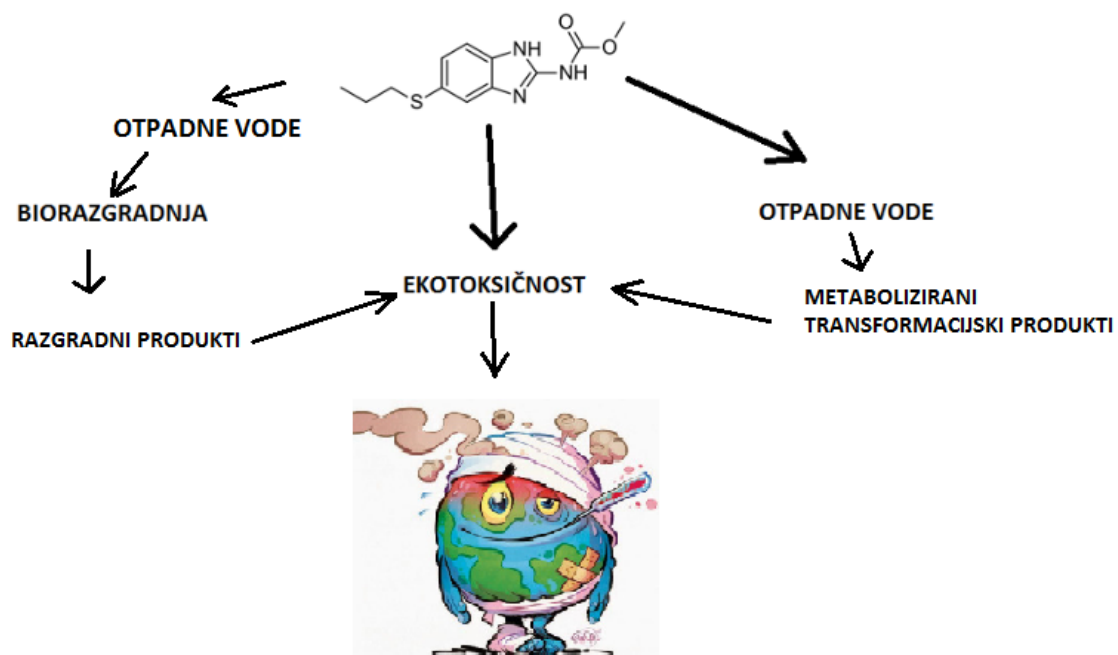
1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	4
2.1. Farmaceutici.....	4
2.1.1. Antihelmintici.....	4
2.1.2. Albendazol.....	5
2.2. Obrada otpadnih voda.....	6
2.2.1. Mehanička obrada.....	6
2.2.2. Biološka obrada.....	6
2.2.2.1. Uređaj za obradu otpadnih voda aktivnim muljem.....	7
2.2.3. Fizikalno-kemijska obrada.....	7
2.3. Biorazgradnja.....	7
2.3.1. Kemijska potrošnja kisika.....	8
2.4. Toksičnost.....	9
2.4.1. Zona inhibicije.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Aktivni mulj.....	11
3.1.2. Kemikalije.....	11
3.1.3. Farmaceutici.....	11
3.1.4. Djelatni mikroorganizmi.....	12
3.1.5. Hranjive podloge.....	12
3.1.5.1. Hranjivi bujon agar.....	12
3.1.5.2. Malt agar.....	12
3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR.....	13
3.2.1. Analitička vaga.....	13
3.2.2. Kisikova i pH elektroda.....	13
3.2.3. Termoreaktor.....	14
3.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	15
3.2.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti.....	16
3.2.6. Ultrazvučna kupelj.....	16
3.2.7. Autoklav.....	17
3.3. METODE RADA.....	18
3.3.1. Priprema standardne otopine farmaceutika.....	18
3.3.2. Biorazgradnja.....	18
3.3.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	20
3.3.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	20
3.3.3.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC).....	21
3.3.4. Ispitivanje toksičnosti farmaceutika praćenjem zone inhibicije.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	27
4.1. Biorazgradnja i fizikalno-kemijski pokazatelji.....	27
4.2. Kromatografska analiza farmaceutika i realnih uzoraka.....	30
4.2.1. HPLC.....	30
4.2.2. UPLC.....	36
4.3. Test toksičnosti mjerenjem zone inhibicije.....	40
5. ZAKLJUČAK.....	44
6. LITERATURA.....	45
7. DODATCI.....	47
7.1. Popis slika.....	47
7.2. Popis tablica.....	48
7.3. Kratice i simboli.....	50
7.4. Životopis.....	51



## **1. UVOD**

Problematika onečišćenja okoliša kao takvog je prisutna od čovjekovih početaka, a kada se stanovništvo počelo osvještavati o toj vrsti problema započela su i prva razmišljanja o mogućim rješenjima koja su uključivala rješavanje problema bioremedijacijom ili s druge strane razumno korištenje prirodnih resursa i sprječavanje nastanka onečišćenja uopće. Jedan od egzistencijalno najbitnijih okolišnih segmenata koji biva onečišćen jest voda i vodeni okoliš. Kako otpadna voda ne bi došla u direktan kontakt sa prirodnim vodotocima, potrebno ju je prethodno obraditi, tj. pročistiti, a načini obrade se biraju s obzirom na karakteristike te vode te stupanj onečišćenja. Nakon što prođe sustav postrojenja za obrađivanje otpadnih voda (Wastewater Treatment Plants- WWTPs), voda određene kvalitete se ispušta u prirodnu sredinu, a karakteristike kojima se odlikuje i uvjete koje mora zadovoljavati takva voda propisane su u Zakonu za zaštitu voda. Napredak u organskoj sintezi i intenzivna uporaba farmaceutika doveli su do konstantnog uvođenja brojnih takvih komponenti u okoliš. Prisutnost farmaceutika i njihovih fragmenata u okolišu se po prvi puta zabilježila 70-ih godina prošlog stoljeća. [1] Zbog toga se još nazivaju i nova zagađivala. Posljednjih nekoliko desetljeća zabilježene su povećane koncentracije humanih i veterinarskih farmaceutika koje su uzrokovane povećanom proizvodnjom, ali i potrošnjom istih, a problem je i njihovo uzastopno nakupljanje u okolišu, kako u tlu tako i u vodama, makar se pojavljuju u niskim koncentracijama. Ti spojevi mogu dospjeti u vodeni okoliš na različite načine: u izvornom obliku putem otpadne vode farmaceutske industrije te putem staničnih izlučevina u izvornom molekulskom obliku, ali i kao metabolizirane molekule i razgradni produkti. [2] Uz humane farmaceutike, jedna od skupina veterinarskih farmaceutika koja se najviše proizvodi i primjenjuje su antihelmintici ili antiparazitici. Antihelmintici imaju široku uporabu i spektar djelovanja, a djeluju protiv parazitskih crva, helminta [3], a jedan od karakterističnih antihelmintika je albendazol. Neka farmakokinetička istraživanja pokazala su da gotovo 50 % izvorne komponente može biti prisutno u staničnim izlučevinama i kao takvi spojevi mogu ugrožavati okoliš. [4] Svi ti molekulski oblici dopiru do postrojenja za obradu otpadne vode gdje se podvrgavaju najčešće postupcima biorazgradnje, abiotičke razgradnje ili sorpcije na aktivni mulj. Glavni problem je taj što su farmaceutici u otpadnoj vodi prijemnika, a onda i u vodi nakon obrade prisutni u vrlo niskim koncentracijama, u ng/L ili µg/L, pa se u postrojenjima za obradu otpadne vode uklone djelomično ili se uopće ne uspiju ukloniti. Međutim, bitno je ne samo pronalaziti nove postupke obrade voda kako bi se poboljšala efikasnost postrojenja za obradu otpadnih voda i uklonili prisutni farmaceutici, već i razvijati i validirati analitičke metode i odgovarajuće uređaje sa nižom granicom detekcije i identifikacije ne samo matičnih molekula, već i razgradnih odnosno transformacijskih

produkata. [5] Zadnjih godina znanstvenici se bave razvojem nekoliko novih postupaka obrade otpadne vode, kao što su npr. napredni oksidacijski procesi (Advanced Oxidation Processes-AOPs) u koje spadaju procesi kao što su: oksidacija vodikovim peroksidom katalizirana željezovim solima (Fentonov proces), ozonom (ozonoliza), UV fotoliza, fotokataliza uz titanov(IV) oksid, elektrokemijska oksidacija, "mokra" oksidacija, radioliza vode i visokonaponsko električno pražnjenje. [6] Takvi procesi su unatoč visokom stupnju djelovanja još uvijek preskupi za širu uporabu u klasičnim postrojenjima za obradu otpadnih voda. [7] Budući da se ovdje govori o vrlo niskim koncentracijama farmaceutika prisutnih u okolišu, upravo je to jedan od razloga zašto se nije zakonski regulirala njihova prisutnost u okolišu, odnosno vodama, a koja se izražava u obliku maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK). To je još jedan dodatni razlog zbog kojeg se provode analize i identifikacija prisutnosti tih molekula, te testovi toksičnosti koji najbolje pokazuju koje količine, odnosno koncentracije mogu imati nepovoljan utjecaj na živi svijet, te stvoriti otpornost bakterija na farmaceutike. Unatoč tome što su farmaceutici prvenstveno namijenjeni liječenju živih bića, metaboliti i razgradni produkti mogu pokazati znatnu toksičnost unatoč vrlo niskim koncentracijama. Postoje i slučajevi kada se u okolišu pojavljuje više farmaceutika u kombinaciji, a zbog sinergijskog efekta povećava štetno djelovanje takvih smjesa i opet se pri puno nižim koncentracijama javlja visoki stupanj toksičnosti. [1]. Sve to je znanstvenike navelo na razmišljanje i istraživanje o mogućim načinima kako detekcije i kvantifikacije, tako i na otkrivanje puteva razgradnje takvih spojeva u okolišu. Najčešći abiotički i biotički procesi kojima podliježu farmaceutici kada se nađu u prirodnom okolišu su hidroliza, fototransformacija i biorazgradnja. [8] Hidroliza najčešće ne igra veliku ulogu kod raznih skupina farmaceutika, upravo zato što se primjenjuju oralno. Fototransformacija može nastati direktno apsorpcijom sunčevog zračenja ili indirektno foto reaktivnošću, a rezultat je vrlo kompleksan proces sa nizom reakcija i transformacijskih produkata. [9] Biorazgradnja je proces kojim mikroorganizmi svojim metaboličkim i enzimskim procesima mijenjaju strukturu spojeva u okolišu, jer organske spojeve može, a i ne mora koristiti kao izvor hrane i energije (primarni i sekundarni izvor ugljika) i na taj način ih razgrađuju. [2] Može se odvijati pod utjecajem čiste kulture ili aktivnog mulja kao mikrobne zajednice. Dakle, kako bi slika bila potpuna, potrebno je i dalje istraživati utjecaj farmaceutika na živi svijet i okoliš, otkrivati njihov prirodni put razgradnje odgovarajućim kvantitativnim analitičkim metodama, te povezati toksikološka istraživanja matičnih molekula i transformiranih produkata, zato što se jedino takvim pristupom može ostvariti cjelokupni nadzor okoliša i osigurati promišljeno gospodarenje prirodnim resursima kako bi najbolje zaštitili okoliš i živi svijet (Slika 1).



Slika 1. Sudbina antihelmintika albendazola u okolišu

## 2.1. Farmaceutici

Farmaceutici se definiraju kao kemijske tvari namijenjene za uporabu u medicinskoj dijagnostici, liječenju ili sprječavanju bolesti. To su vrlo složene molekule s točno određenim ciljem djelovanja. Veterinarski farmaceutici su fiziološke visoko aktivne tvari koje se koriste za zaštitu životinja od parazita, sprječavanje bakterijskih infekcija i poboljšanje razvoja. Farmaceutici se generalno dijele na humane i veterinarske, a onda se još mogu i kategorizirati prema vrsti uporabe, načinu djelovanja, kemijskim svojstvima i još mnogo kategorija.

Farmaceutici su dugi niz godina korišteni u terapijske svrhe humane i veterinarske medicine diljem svijeta, no tek su unutar posljednjih 50-ak godina privukli pozornost znanstvenicima koji se bave zaštitom okoliša i ekotoksikologijom kao potencijalni zagađivači okoliša, poznatiji pod nazivom „nova zagađivala“. U „nova zagađivala“ još spadaju i proizvodi za osobnu higijenu, razni dodaci prehrani, sastojci kozmetičkih proizvoda, te pesticidi i njihovi razgradni produkti, te cijeli niz proizvoda tog tipa. U okoliš dospijevaju iz raznih izvora, a različite vrste molekula farmaceutika, bilo kao matične molekule ili razgradni produkti najprije su primijećeni u vodenom okolišu i to u vrlo niskim koncentracijama, kao što su ppm (mg/L), ppb (ng/L), ppt (µg/L) što je najčešće teško ili čak nemoguće kvalitativno odrediti klasičnim, ali i modernim metodama. Još nema dovoljno informacija i podataka o cjelokupnom životnom ciklusu farmaceutika od njegovog nastanka do razgradnje i u tijeku su brojna istraživanja tog tipa kako bi se upotpunila slika o farmaceuticima u okolišu. [10]

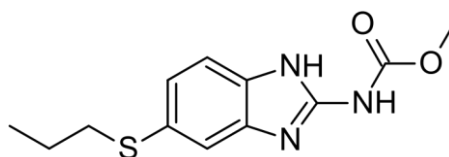
### 2.1.1. Antihelmintici

Antihelmintici ili antiparazitici su lijekovi koji djeluju protiv bolesti uzrokovanih parazitskim crvima helmintima. Kao jedna od najbitnijih skupina farmaceutika pronalazi veliku primjenu u veterinarskoj i humanoj medicini. Helminti se od drugih infektivnih organizama razlikuju po tome što imaju kompleksnu strukturu, višestanični su organizmi i imaju djelomično ili potpuno razvijene organe i organske sustave (npr. probavni, živčani sustav). Helminti se dalje dijele na nematode odnosno obličje (*Nematoda*), cestode odnosno trakavice (*Cestoda*), trematode odnosno metilje (*Trematoda*). S obzirom na to, jedna od podjela antihelmintika je na antihelmintike: koji djeluju na cestode (npr. albendazol), koji djeluju na nematode (npr. ivermektin, piperazin) i koji djeluju na trematode (npr. prazikvantel). Antihelmintici moraju biti selektivno toksični za parazite. To se postiže ili inhibicijom specifičnih metaboličkih

procesa parazita ili farmakokinetičkim osobinama lijeka, koje omogućavaju da paraziti budu izloženi višim koncentracijama lijeka nego stanice domaćina. [10]

## 2.1.2. Albendazol

Antihelmintik širokog spektra djelovanja iz grupe benzimidazola (Slika 2). Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u sva tri njegova razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u parazitima te smanjeno stvaranje ATP-a. Iz probavnog trakta asporbira se 5 % albendazola, a u jetri se metabolizira u albendazol-sulfoksid i veže se na serumske bjelancevine. Veže se na  $\beta$ -tubulin i time sprječava razvojni proces helminta. [12] Bitno je navesti neke najvažnije kemijsko-fizikalne karakteristike (Tablica 1), a osobito treba naglasiti tešku topljivost albendazola u vodi, zbog čega se u ovom radu prilikom pripremanja standardnih otopina koristilo organsko otapalo za pripremu temeljnih standardnih otopina visoke koncentracije. [13]



Slika 2. Molekulska struktura albendazola

Tablica 1. Fizikalno - kemijska svojstva albendazola

IUPAC ime	CAS broj	Molekulska formula	Molarna masa	Talište	$pK_a$	$\text{Log}K_{ow}$	$S_w$	Tlak pare
metil N-[6-(propilsulfanil)-1H-1,3-benzodiazol-2-il] karbamat	54965-21-8	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	265,33 1 g/mol	208-210 °C	6,9	1,27	$4,1 \times 10^{-1}$ mg/L pri 25 °C (u vodi)	$1,5 \times 10^{-9}$ mmHg pri 25 °C

## 2.2. Obrada otpadnih voda

Razvoj naselja i povećanje životnog standarda stanovništva rezultiralo je između ostalog onečišćenjem okoliša, a među najbitnije oblike onečišćenja ubraja se onečišćenje vode. Izbor postupaka pročišćavanja kojima će se podvrgnuti otpadna voda prije nego se ispusti u prirodnu sredinu prvenstveno ovisi o količini i sastavu otpadne vode, kao i zahtijevanoj kakvoći vode na mjestu ispuštanja. Obično je riječ o kombinaciji niza postupaka kako bi učinak svakog od pojedinih postupaka i njihova kombinacija dali što bolje rezultate obrade. Postupci kojima se podvrgava otpadna voda jesu fizikalni, kemijski i bioški, a dijele se na faze: mehanička ili primarna obrada, biološka ili sekundarna obrada, fiziklano-kemijski postupci ili tercijarna obrada. [15] Međutim unatoč razvijenim postupcima obrade otpadnih voda i dalje postoji problem kvalitete takve vode budući da se prolaskom kroz postrojenje za obradu otpadne vode ne mogu ukloniti sve čestice i kemijske tvari u matičnom obliku ili njeni transformirani produkti koji su potencijalno toksični, a onda ponovno završavaju u prirodnoj sredini. Sve to se uzima u obzir prilikom daljnjeg razvoja i pronalaska novih poboljšanih postupaka obrade otpadne vode.

### 2.2.1. Mehanička obrada

Pod tim se podrazumijeva nekoliko postupaka koji se još nazivaju i prethodni postupci. Tu se ubrajaju grubo i fino mehaničko pročišćavanje, uklanjanje predmeta koji plivaju te se zadržavaju na rešetkama ili u situ, zatim taloženje pijeska i odvajanje lakih tvari (flotacija), što se može odvijati istodobno u pjeskolovu-mastolovu ili odvojeno u taložnicama. [15]

### 2.2.2. Biološka obrada

Za ovu vrstu pročišćavanja vode koristi se aktivnost mikroorganizama, najčešće bakterija, tako da se stvara ekosustav sastavljen od više vrsta, odnosno grupa mikroorganizama koja se naziva aktivni mulj, u različitoj fazi razvoja, ovisno o sadržaju i koncentraciji hrane, te o koncentraciji i starosti mulja. Glavni cilj obrade otpadnih voda biološkim postupcima je pretvaranje biorazgradljivih organskih tvari u mikrobiološku biomasu, koja se zatim može odvojiti nekom od prikladnih separacijskih tehnika. Najčešće upotrebljavani biološki postupci

pročišćavanja svrstani su u tri skupine, a to su: uređaji s aktivnim muljem, biološki filtri ili prokapnici, te pročišćavanje otpadne vode u lagunama. [15]

#### 2.2.2.1. Uređaji za obradu aktivnim muljem

Dolaze u više mogućih varijanti, a zajednička osnovna značajka im je biološki bazen s aktivnim muljem u lebdećoj fazi te naknadni taložnik za odvajanje mulja iz vode prije ispuštanja u prirodnu sredinu. Mulj koji ostaje u uređajima nakon pročišćavanja potrebno je dodatno obraditi ovisno o količini, podrijetlu i njegovim značajkama, a to se postiže postupcima smanjivanja volumena, stabilizacijom i kondicioniranjem i konačno zbrinuti tako da ne predstavlja opasnost po okoliš. [15]

#### 2.2.3. Fizikalno-kemijski postupci obrade

Zovu se još i napredne tehnologije, a najčešće su dopuna drugim postupcima obrade otpadnih voda. Postoje dvije glavne kategorije. Prva kategorija su postupci bez kemijskih promjena sastojaka u koje spadaju postupci kao što su: filtriranje kroz poroznu sredinu, adsorpcija na čvrsti adsorbens, aeracija, destilacija. Druga kategorija su postupci s kemijskim promjenama sastojaka, a tu se ubrajaju postupci kao što su: neutralizacija, flokulacija, koagulacija, kemijska precipitacija, ionska izmjena, oksidacija. Mogući su i dosta česti kombinirani kemijsko-biološki postupci. [15]

### 2.3. Biorazgradnja

Upravo obrada vode aktivnim muljem jest reprezentativni primjer biološkog postupka obrade i uz mehaničke i fizikalno-kemijske postupke čini način rada klasičnog postrojenja za obradu otpadne vode (WWTP). S obzirom da farmaceutici zbog svojih specifičnih fizikalno-kemijskih karakteristika i niskih koncentracija prisutnih u vodi prolaskom kroz WWTP ne bivaju uklonjeni iz vode, potrebno je prilagoditi način rada klasičnog postrojenja za obradu otpadne vode. Budući da su novo razvijene metode kemijske obrade takvih spojeva vrlo skupe, veću pozornost sve više dobiva biorazgradnja. [17] S jedne strane prati se razgradnja



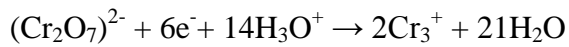
čistim izoliranim kulturama kao npr. razgradnja albendazola pomoću plijesni *Cunninghamella blakesleeana* pri čemu je detektiran put razgradnje na čak tri razgradna produkta [18], ali se sve više pažnje pridaje razgradnji farmaceutika aktivnim muljem. Vođenje i praćenje procesa biorazgradnje jest složeni proces za koji je potreban multidisciplinarni pristup problemu i uspješnost ovisi o vrsti farmaceutika, dakle postoji otpornost na pojedinu vrstu razgradnje, ovisno o kombinaciji više vrsta spojeva i odabranog mikroorganizma. [17] Ako se promatra aerobni proces biorazgradnje aktivnim muljem treba se znati o kojim se mikroorganizmima radi, te njihove osnovne karakteristike i uvjete u kojima djeluju, a bilo bi poželjno poznavati i kinetiku procesa. [19] Uvjeti trebaju biti povoljni za prilagodbu i rast mikroorganizama, tj. da organsko opterećenje odnosno u ovom slučaju molekule farmaceutika koriste kao primarni ili sekundarni izvor ugljika. Više je okolišnih parametara koje možemo prilagoditi kako bi pospješili fazu prilagodbe aktivnog mulja, a onda i sam proces biorazgradnje, a jedan od najvažnijih je pH-vrijednost otopine. [20] To je ujedno i jedan od indirektnih pokazatelja je li došlo do razgradnje istih, a npr. kemijska potrošnja kisika (KPK) je jedan od tih parametara. Međutim, mora se razlučiti radi li se o procesu biorazgradnje aktivnim muljem ili sorpcija na aktivnom mulju. [21]

### 2.3.1. Kemijska potrošnja kisika

Jedan od najbitnijih kemijskih parametara koji se prati tijekom eksperimenta biorazgradanje organske tvari, a najbolje ukazuje na to u kojoj fazi se proces nalazi jest kemijska potrošnja kisika. Kemijska potrošnja kisika (KPK) je pokazatelj ukupnog organskog opterećenja u uzorku otpadne vode. To je veličina koja označava količinu organskih otpadnih tvari u otpadnoj vodi koje se mogu oksidirati u vrućoj smjesi kromne i sulfatne kiseline. Postupak se temelji na principu oksidacije organskih tvari u uzorku s kalijevim bikromatom u sumporno kiselom mediju uz srebrov sulfat kao katalizator. Nakon završetka procesa oksidacije količina utrošenog bikromata se određuje titrimetrijski ili kolorimetrijski. Osnovni princip kolorimetrijskog određivanja je zagrijavanje uzorka u zatvorenim kivetama u bloku za digestiju pri temperaturi 150 °C dva sata, a količina utrošenog kalijevog bikromata mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 670$  nm. KPK vrijednost se izražava kao ekvivalent kisika koji je proporcionalan utrošku kalijevog bikromata. [22]

Kemizam reakcije: Organska tvar +  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Cr}_2\text{O}_4^{2-}$

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  je oksidans koji se u kiseloj otopini reducira do  $\text{Cr}^{3+}$ :



## 2.4. Toksičnost

Testovi toksičnosti neophodni su za ocjenu onečišćenosti vodenih medija, jer fizikalne i kemijske analize nisu dovoljne za procjenu i određivanje svih mogućih štetnih učinaka onečišćenja na žive organizme. Poznat je niz metoda koje služe za ispitivanje toksičnosti, a izbor test organizama ovisi ne samo o vrsti ispitivanog vodenog medija već i o svrsi samog testa, osjetljivosti vrste prema toksičnoj tvari i čimbenicima koji se prate, ekološkom značenju vrste (karakteristične za ispitivani ekosustav), poznavanju životnog ciklusa vrste, ali i mogućnostima laboratorija. Da bi se odredilo djelovanje onečišćivala na vodene organizme, koriste se akvatički testovi toksičnosti otpadnih voda, koji se mogu provoditi na različitim integracijskim razinama žive tvari od stanica do organizama, odnosno populacija i ekosustava.

Spoznaja značenja i potrebe za provedbom ekotoksikoloških ispitivanja temelji se na neposrednom utvrđivanju indikacija i posljedica djelovanja testirane otpadne vode na izabrani test organizam ili test biocenozu, te na kontinuitetu praćenja svih utjecajnih čimbenika u odabranom vremenskom razdoblju. [14]

### 2.4.1. Zona inhibicije

Pod pojmom zone inhibicije podrazumijeva se ispitivanje aktivnosti mikrobiocidnih sredstava. Ovisno o vrsti mikrobiocidnog sredstva potrebno je pažljivo odabrati mikroorganizam za provedbu odgovarajućih ispitivanja. Jedna od metoda ispitivanja je metoda difuzije, pri čemu se aktivna tvar može nanijeti na disk, u cilindar ili na pločicu. Kod ove metode određena količina aktivne tvari pohranjena je na maloj površini agar ploče koja je inokulirana ispitivanim mikroorganizmom, uz vrijeme inkubacije 16-18 sati. Nastala zona inhibicije povezana je s logaritmom koncentracije mikrobiocidnog sredstva. Cooper je razvio teoriju nastajanja zone inhibicije i prikazao je jednadžbom:

$$X_2 = 4DT \ln(m_0/m') \quad (1)$$

*D*-koeficijent difuzije aktivne tvari u vodi pri temperaturi inkubacije  
*T*<sub>0</sub>- vrijeme potrebno za stvaranje zone inhibicije  
*m*<sub>0</sub>-početna koncentracija na disku  
*m'*-kritična koncentracija aktivne tvari  
*X*-dužina difuzije

Kritično vrijeme *T*<sub>0</sub>, kritična koncentracija aktivne tvari *m'* i kritična koncentracija mikroorganizama značajni su za teoriju nastajanja zone difuzije. Shodno tome slijedi opća jednadžba koja objašnjava utjecaj temperature, sastava podloge i koncentraciju inokuluma na veličinu zone:

$$X_2 = (9,2D \log(m_0/m'))(L + 3,32G \log(N'/N_0)) \quad (2)$$

*G*-generacijsko doba  
*L*-vrijeme laganog rasta  
*N*<sub>0</sub>- početna koncentracija mikroorganizama  
*N'*-kritična koncentracija mikroorganizama

Također se odnos između koncentracije aktivne tvari i dužine difuzije može matematički opisati, a unutar malih raspona koncentracija jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$\log C = H + Bd \quad (3)$$

*d*-promjer zone inhibicije [23]

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Aktivni mulj

Za provedbu eksperimenata uzeti su uzorci aktivnog mulja iz postrojenja za pročišćavanje otpadne vode Velike Gorice. Po 5 mL aktivnog mulja je pod aeracijom uzeto je za svaki eksperiment iz boce Kultura, pod aeracijom, a određena vrijednost suhe tvari (TS) u prvom pokusu bila je  $1,16 \pm 0,06$  g/L, a u drugom pokusu (ponovljenom pokusu) 0,022 g/L (na 1,0 L) ili 4,34 g/L (u 5 mL).

#### 3.1.2. Kemikalije

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Kalijev bikromat	$K_2Cr_2O_7$	p.a.	Merck, Njemačka
Srebrov sulfat	$Ag_2SO_4$	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
Sulfatna kiselina	$H_2SO_4$	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
Amonijev-željezo (II) sulfat	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Živin (II) sulfat	$Hg_2SO_4$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Feroin indikator	$C_{36}H_{24}FeN_6^{2+}$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Etanol	$C_2H_5OH$	96 %	Gram-mol d.o.o., Hrvatska
Metanol	$CH_3OH$	HPLC čistoća	J.T.Baker, Nizozemska
Acetonitril	$CH_3CN$	HPLC čistoća	Fischer Chemical, Velika Britanija

Za pripravu radnih otopina farmaceutika korištena je MiliQ voda.

#### 3.1.3. Ispitivani farmaceutik

Tablica 3. Podatci o korištenom farmaceutiku - albendazol

Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	Molekulska masa	Čistoća	Proizvođač
Albendazol	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	54965-21-8	265.333 g/mol	99 %	Veterina d.o.o.

### 3.1.4. Djelatni mikroorganizmi

U radu su korištene čiste kulture bakterija i plijesni iz Zbirke mikroorganizama Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Odabrane su bakterije i plijesni koje mogu biti prisutne u okolišu:

*Streptomyces rimosus* R7 - za uzgoj zrakaste bakterije koristio se hranjivi bujon uz inkubaciju 2-5 dana pri 28 °C.

*Bacillus* sp. 3045 - za uzgoj štapićaste bakterije koristio se hranjivi bujon uz inkubaciju od 48 sati pri 37 °C.

*Aspergillus niger* 405 - za uzgoj plijesni koristio se hranjivi malt uz dodatak oksitetraciklina (OTC) kao antibiotika radi sprječavanja bakterijske infekcije uz inkubaciju od 2-5 dana pri 28 °C.

### 3.1.5. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija i plijesni tijekom mikrobioloških ispitivanja upotrijebljene su dehidrirane hranjive podloge proizvođača "Biolife", Milano, Italija i pripremane su po uputstvu proizvođača. Prethodno izvagane i otopljene podloge sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C i 1 atmosferi pritiska u trajanju od 15 minuta.

#### 3.1.5.1. Hranjivi bujon agar

Hranjivi bujon:

Pepton-1 „Torlak“	15,0 g
Mesni ekstrakt „Torlak“	3,0 g
NaCl	5,0 g
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g

U Erlenmeyerovoj tikvici u destiliranoj vodi suspendirano je 23,3 g bujona dopunjeno do 1000 mL. Podloga se zatim pažljivo zagrijava do vrenja dok se nije potpuno otopila i sterilizirana je u autoklavu 15 min pri 121 °C.

### 3.1.5.2. Malt agar

Malt agar (kruti):

Malt ekstrakt                                30,0 g

Agar Bios LL                                 17,0 g

U hladnoj destiliranoj vodi suspendirano je 47,0 g malt agara u prahu dopunjeno do 1000 mL i ostavljeno stajati 15 min. Potom je zagrijavano do vrenja i sterilizirano u autoklavu 15 min pri 121 °C.

## 3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR

### 3.2.1. Analitička vaga

U radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na Slici 3.



Slika 3. Analitička vaga

### 3.2.2. Kisikova i pH elektroda

Mjerenje pH-vrijednosti vrši se kombiniranom staklenom elektrodom koja se sastoji od mjernog i referentnog sustava uklopljenih u zajedničko kućište. Elektroda se ispiru deioniziranom vodom, obriše staničevinom te se uroni u uzorak i lagano promiješa. pH-vrijednost se očitava nakon ustaljenja vrijednosti na pH-metru, odnosno otopljeni kisik izražen u mg/L na kisikovoj elektrodi i temperatura izražena u °C. Staklena pH elektroda se čuva u otopini kalijevog klorida (KCl) ili otopini za punjenje elektroda.

Za mjerenje pH korišten je pH-metar Boeco, Germany, PT-370 (Slika 4), a za mjerenje koncentracije otopljenog kisika kisikova elektroda Oximeter 320, WTW, Germany (Slika 5).



Slika 4. pH-metar



Slika 5. Kisikova elektroda

### 3.2.3. Termoreaktor

Termoreaktor Hach, Model 45600-18, SAD (Slika 6). služi za termičku pripremu uzoraka u kivetama. Može se koristiti pri određivanju kemijske potrošnje kisika bikromatnom metodom (KPK vrijednost) i pri određivanju ukupnog dušika, fosfora i dr. Temperaturno područje primjene je od 20 °C do 150 °C.



Slika 6. Termoreaktor

### 3.2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Uzorci su analizirani tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar 500, (Walnut Creek, California, Sjedinjene Američke Države) (Slika 7). Instrument se sastoji od: automatskog dodavača uzoraka ProStar 410, detektora s nizom dioda ProStar 330 (DAD), pumpe ProStar 230, termostatisane komore za kromatografsku kolonu, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala preko kojeg se računalnim programom STAR 5.2 upravlja radom cijelog sustava i gdje se nakon analize obrađuju dobiveni podatci. Nakon uzorkovanja uzorci su se profiltrirali kroz filtar za injekcije Ny Syringe Filter, FilterBio, Labex Ltd. Država, veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$ , kako bi se osiguralo da se nijedna mikrobna stanica ne pojavi u uzorku spremnom za kromatografsku analizu (Slika 8). Za obradu kromatograma koristio se računalni program za modularni kromatograf Varian ProStar 360 Star Chromatography WorkStation verzija 5.5.





Slika 7. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)



Slika 8. Filtar za injekcije (0,22  $\mu\text{m}$ )

### 3.2.5. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Uzorci su analizirani i tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti. Separacija kromatografskih krivulja provedena je na koloni BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) na tekućinskom kromatografu Waters Acquity UPLC I-Class i s binarnom pumpom ACQUITY<sup>®</sup> UPLC Binary Solvent Manager i automatskim dodavačem uzoraka ACQUITY<sup>®</sup> UPLC Sample Manager. Kao detektor koristio se spektrometar masa (MS) Waters Synapt G2-Si. Nakon uzorkovanja uzorci su se također profiltrirali kroz filtar za injekcije Ny Syringe Filter, FilterBio, Labex Ltd. Država, veličine pora 0,22  $\mu\text{m}$  (Slika 9). Volumen injektiranih standardnih otopina farmaceutika je 1  $\mu\text{L}$ .



Slika 9. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s MS detektorom [24]

### 3.2.6. Ultrazvučna kupelj

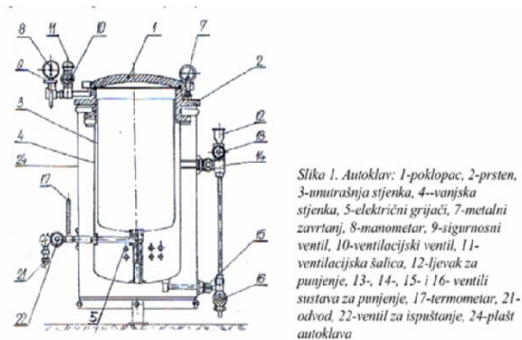
Nakon pripreme standardnih otopina farmaceutika u odmjernim tikvicama, svaka tikvica se uronila u ultrazvučnu kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (Slika 10), kako bi se poboljšao proces otapanja farmaceutika albendazola u smjesi otapala. Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji i snage ultrazvuka te pohranjivanja do 10 programa s različitim postavkama eksperimentalnih uvjeta. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1 do 99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W.



Slika 10. Ultrazvučna kupelj

### 3.2.7. Autoklav

Autoklav je uređaj za provedbu sterilizacije zasićenom vodenom parom pod pritiskom (Slika 11). Građen je od vrlo čvrstog materijala, najčešće u vidu cilindra. Ima dvostruke stjenke i poklopac koji se pomoću podesivih vijaka i gumenog obruča hermetički zatvara. Uložak s termometrom, manometar i sigurnosni ventil najčešće su postavljeni bočno, obično u gornjem dijelu. Postranično se nalazi i staklena cijev za kontrolu nivoa vode u autoklavu. U donjem dijelu nalazi se ventil za ispuštanje pare. U dnu je postavljen izvor topline (plinski ili električni grijač). Sterilizacija zasićenom vodenom parom pod pritiskom najčešće se provodi pri pritisku od 1 atmosfere pretlaka i 121 °C tijekom 15 do 30 min i smatra se najpouzdanijom metodom sterilizacije jer povećani pritisak povećava temperaturu, a time i prodor vodene pare u materijal koji se sterilizira. [14]



Slika 11. Shematski prikaz autoklava [16]

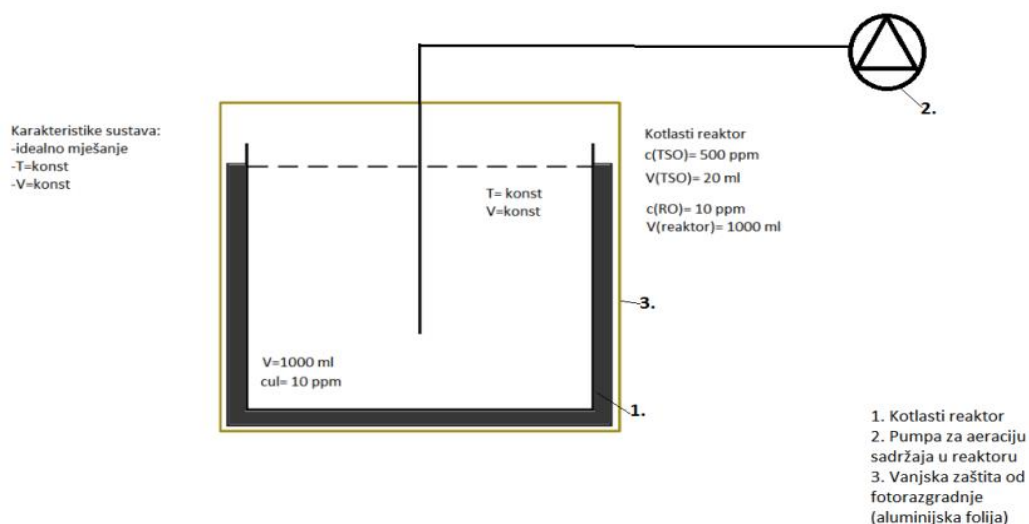
## 3.3 METODE RADA

### 3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Temeljna standardna otopina masene koncentracije 500 mg/L pripravljena je otapanjem točno izvagane mase albendazola u smjesi otapala metanol: acetonitril=1:1. Pripravljena je dodavanjem 0,05 g farmaceutika i nadopunjavanjem smjesom otapala u tikvicu od 100 mL te je tikvica dodatno uronjena u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzao i poboljšao proces otapanja albendazola. Iz te otopine pripravljena su razrjeđenja masenih koncentracija 200, 100, 50, 10 i 1 mg/L.

### 3.3.2. Biorazgradnja

Pokus biorazgradnje vodio se u volumno graduiranoj plastičnoj boci maksimalnog volumnog kapaciteta (zapremine) 3,2 L kao šaržni reaktor (Slika 13). Ukupan radni volumen koji se sastojao od 1,0 L radne otopine (RO) farmaceutika i 5 mL aktivnog mulja konstantno je aeriran pomoću pumpe koja je gumenim cijevima spojena s plastičnom sterilnom pipetom koja je uronjena u sadržaj reaktora (Slika 12). Reaktor je omotan aluminijskom folijom kako bi se spriječili mogući foto-razgradni procesi. Na taj se način spriječio utjecaj zračenja, te se prilikom analize moglo zaključiti koji produkti nastaju isključivo pod utjecajem biorazgradnje. Reaktor je bio smješten u digestoru. Parametri kojima je praćena prilagodba aktivnog mulja na otopinu te proces biorazgradnje farmaceutika su pH-vrijednost, koncentracija otopljenog kisika (mg/L), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), kemijska potrošnja kisika (mg  $\text{O}_2/\text{L}$ ) i preostali radni volumen sadržaja u reaktoru (L).



Slika 12. Shema šaržnog reaktora u kojem se vodio proces biorazgradnje

Uzorak za analizu se uzimao otprilike svakih 24 sata i to oko 5 mL. Zatim bi se profiltrirao kroz filtar. U suhoj i čistoj staklenoj kiveti se nalazi 1,2 mL ranije pripremljene 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. Kivete se stave u zagrijani termoreaktor na spaljivanje kroz 1 h na  $150^{\circ}\text{C}$ , a nakon toga se ostave hladiti na tamnom mjestu, ne pod mlaz hladne vode. Ohlađeni sadržaj se

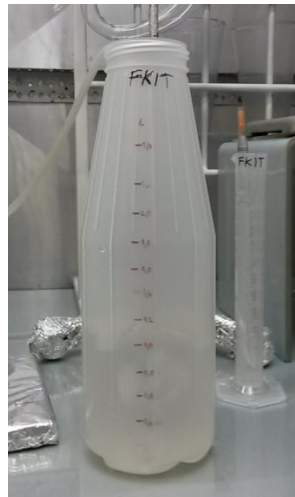
zatim prenese u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL i pritom se kiveta tri puta ispere s destiliranom vodom te se dodaju tri kapi redoks indikatora ferroina. Otopina je u tikvici crveno-narančaste boje, a dodavanjem reagensa amonij-željezo (II) sulfata prelazi u plavo-zelenu, obezboji se i konačno u točki pretitracije poprima crveno-smeđu boju. Konačno se volumen utrošenog alikvota koristi za računanje KPK pomoću formule:

$$KPK = \frac{(V_{slijepa\ proba} - V_{uzorak}) \times 0,1 \times 8000 \times f}{2} \quad (4)$$

$V_{slijepa\ proba}$  -volumen slijepe probe

$V_{uzorak}$  -volumen uzorka

$f$ - faktor korekcije



Slika 13. Reaktor u kojem se vodio proces biorazgradnje

### 3.3.3. Kromatografska analiza farmaceutika i realnih uzoraka nakon biorazgradnje

#### 3.3.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Pripremljene otopine farmaceutika prebačene su u HPLC viala koje su stavljene na kromatografsku analizu (Varian ProStar 500). Kromatografom se upravlja preko računala.

Volumen injektiranih standardnih otopina farmaceutika je 30  $\mu$ L. Svaki uzorak je injektiran tri puta, zatim se kolona pere 65 % acetonitrilom. Pokretna faza se sastojala od: A 0,01 % mravlja kiselina u vodi i B 0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 4. Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL/min.

Tablica 4. Gradijent pokretne faze korišten u analizi

Vrijeme/min	Volumen pokretne faze A/ %	Volumen pokretne faze B/%
0	100	0
2,30	92	8
6,00	90	10
11,00	70	30
15,00	40	60
18,00	5	95
28,00	5	95
28,10	100	0
30,00	100	0

Kao nepokretna faza korištena je obrnuta faza C18 odnosno kolona InertSustain<sup>TM</sup> dimenzija 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m, GL Sciences, Japan. Snimanje kromatograma provodilo se pri valnim duljinama 210, 254, 270 i 280 nm. Na temelju snimljenih kromatograma očitana su vremena zadržavanja pojedinog farmaceutika ( $t_R$ ) te površine ispod kromatografskih krivulja (A) pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije od 210 nm. Kod detektora s nizom dioda površina ispod kromatografske krivulje definirana je kao miliapsorbancijska jedinica pomnožena s vremenom u sekundama (mAU). Nakon snimanja standardnih otopina, snimljeni su kromatogrami realnih uzoraka farmaceutika uzorkovanih tijekom procesa biorazgradnje.

### 3.3.3.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti

Pripremljene otopine farmaceutika i realnih uzoraka su snimane i na kromatografu ultravisoke djelotvornosti (UPLC) kojim je omogućena identifikacija razgradnih produkata biorazgradnje čija je koncentracija u realnim uzorcima vrlo niska. Separacija kromatografskih krivulja provedena je na koloni BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu$ m) na tekućinskom kromatografu Waters Acquity UPLC I-Class i s binarnom pumpom i automatskim dodavačem uzoraka. Kao detektor koristio se spektrometar masa (MS) Waters Synapt G2-Si. Volumen injektiranih standardnih otopina farmaceutika je 1  $\mu$ L. Pokretna faza se sastojala od: A 0,1 % mravlja

kiselina u vodi i B acetonitril uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 5. Brzina protoka pokretne faze je 0,6 mL/min.

Tablica 5. Gradijent pokretne faze korišten u analizi

Vrijeme/min	Volumen pokretne faze A/ %	Volumen pokretne faze B/%
0,0	95	5
1,0	95	5
3,0	79	21
7,0	30	70
8,0	30	70

MS analize provedene su pod uvjetima prikazanima u Tablici 6. Instrument je podešen za uzimanje masenih spektara ovisno o molekularnoj masi komponente, najčešće u rasponu od  $m/z$  60–1000 Da. Snimljeni su  $M_s^e$  podaci što znači da je uzorak snimljen pri niskoj kolizijskoj energiji tj. 0 V i pri uvjetima kolizijske energije 10-40V (MS/MS).

Tablica 6. Parametri MS analize (TOF)

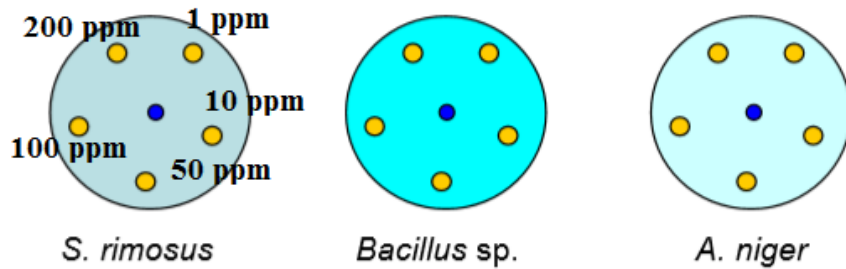
Parametri	TOF
Napon na kapilari ( <i>eng. capillary voltage</i> )	3,8 kV
Temperatura ionskog izvora ( <i>eng. source temperature</i> )	150°C
Temperatura uparavanja ( <i>eng. desolvation temperature</i> )	600°C
Protok plina s konusa ( <i>eng. cone gas flow</i> )	10 L/h
Protok plina za uparavanje ( <i>eng. desolvation gas flow</i> )	1200 L/h
Protok magličastog/rashladnog plina ( <i>eng. nebuliser gas flow</i> )	3,0 bar

### 3.3.4. Ispitivanje toksičnosti farmaceutika praćenjem zone inhibicije

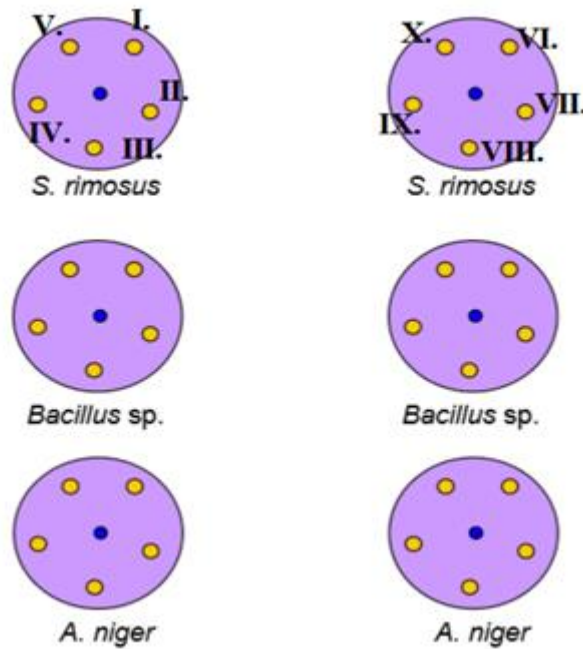
Za provođenje testa toksičnosti pripravljena je temeljna standardna otopina albendazola masene koncentracije 500 mg/L otapanjem točno izvagane mase farmaceutika (0,0125 g) u smjesi otapala metanol:acetonitril= 1:1 u odmjernoj tikvici od 25 mL. Iz te otopine pripravljena su razrjeđenja masenih koncentracija 200, 100, 50, 10 i 1 mg/L u vodenom mediju (MiliQ voda). Za pripremu razrjeđenja koristila se automatska mikropipeta Thermo Scientific, Finnpiquette F3, radnog volumena 10-1000  $\mu$ L kojom su ujedno otopine nanešene na diskove (Slika 14).

Test toksičnosti provodio se i na slijepim probama (Slika 16).

Test toksičnosti provodio se i na realnim uzorcima koji su sakupljeni od postavljanja eksperimenta biorazgradnje, tijekom procesa te zadnji dan razgradnje (Tablica 7), kako bi se ustanovilo postoji li inhibicija mikrobnog rasta pod utjecajem mogućih transformacijskih produkata albendazola (Slika 15).



Slika 14. Prikaz Petrijevih zdjelica s hranjivim podlogama i diskovima sa standardnim otopinama farmaceutika. Plavo označeni diskovi su namočeni MiliQ vodom, žuti kružići prikazuju diskove namočene radnim otopinama farmaceutika različitih masenih koncentracija



Slika 15. Realni uzorci uzorkovani tijekom procesa biorazgradnje albendazola. Žuto označeni kružići su diskovi uronjeni u realne uzorke tijekom biorazgradnje albendazola, a plavo označeni kružići su diskovi uronjeni u MiliQ vodu – slijepa proba (Tablica 7)



Tablica 7. Realni uzorci za koje se određivala zona inhibicije, pri čemu su se radila dva niza eksperimenata tj. po pet diskova natopljenih realnih uzorcima u svaku Petrijevu zdjelicu, označenih od I. do X.

Oznaka diska	Naziv uzorka	Radni dan
I.	8.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	0.
II.	10.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	2.
III.	12.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	4.
IV.	17.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	9.
V.	19.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	11.
VI.	23.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	15.
VII.	26.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	18.
VIII.	29.6. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	21.
IX.	2.7. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	24.
X.	6.7. FKIT 2 (8:30 h, 2 mL)	28.

Slijepa probe koje su također pripravane za test toksičnosti su:

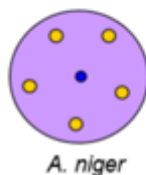
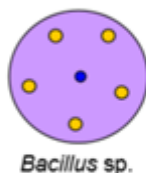
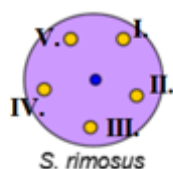
**I.** Čista smjesa otapala acetonitril/metanol=1:1 u kojima je pripravana temeljna standardna otopina albendazola masene koncentracije od 500 mg/L.

**II.** 20 mL smjese acetonitrila/metanola=1:1 stavljeno je u 1 L MiliQ vode.

**III.** Smjesa otapala u aktivnom mulju – prvi radni dan (biorazgradnja).

**IV.** Smjesa otapala u aktivnom mulju – zadnji radni dan (biorazgradnja).

**V.** Farmaceutik albendazol masene koncentracije od 10 mg/L (20 mL TSO 500 mg/L pipetirano u odmjernu tikvicu od 1,0 L i nadopunjeno Mili-Q vodom).



Slika 16. Slijepa probe farmaceutika i otapala. Žuto označeni kružići su diskovi uronjeni u slijepa probe te u standardnu otopinu albendazola od 10 mg/L (diskovi označeni od I. do X.), a plavo označeni kružići su diskovi uronjeni u MiliQ vodu – slijepa proba

Bakterijske kulture i plijesni su prethodno sterilnom tehnikom rada precijepljene u propisno označenu epruvetu s kosom hranjivom podlogom te uzgajane u termostatu pri temperaturi 37 °C (*Bacillus* sp) i 28 °C (*Streptomyces rimosus*, *Aspergillus niger*) kako bi kulture bile svježije za pripremu suspenzija. Nakon 96-satnog uzgoja, čiste bakterijske kulture *Streptomyces rimosus* (Slika 17) i *Bacillus* sp. (Slika 18) i plijesni *Aspergillus niger* (Slika 19) uporabljene su za pripremu suspenzije bakterija, odnosno plijesni. U ovako priređenim suspenzijama prethodno je određivan ukupan broj stanica bakterija optičkom gustoćom. Ukupan broj plijesni, odnosno broj spora plijesni utvrđen je metodom izravnog određivanja ukupnog broj mikroorganizama brojenjem u Thominoj komorici. Kapljica priređene suspenzije je nanesena na predmetnicu, prekrivena pokrovnim stakalcem i mikroskopirana. Time se omogućuje izračunavanje ukupnog broja stanica na 1 cm<sup>3</sup> (1 mL) pomoću formule:

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} \quad (5)$$

*N*- ukupan broj stanica u 1 mL

*m*- ukupan broj izbrojenih stanica

*n*- razrjeđenje

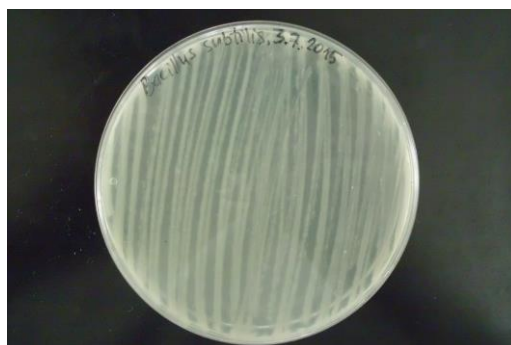
16- ukupan broj velikih kvadrata

104 – korekcija volumena

*K*- broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje



Slika 17. Bakterijska kultura *Streptomyces rimosus* izrasla na hranjivom bujon agaru



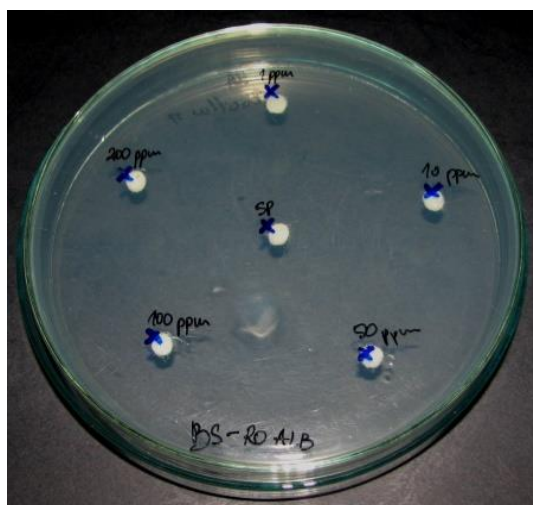
Slika 18. Bakterijska kultura *Bacillus* sp izrasla na hranjivom bujon agaru



Slika 19. Plijesan *Aspergillus niger* izrasla na malt agaru

Sterilizacija je uništavanje ili uklanjanje vegetativnih stanica i endospora. Za vlažnu sterilizaciju bakteriološki onečišćenog posuđa i hranjivih podloga upotrijebljen je autoklav. Sterilizacija čistog posuđa provedena je u suhom sterilizatoru, "Instrumentaria", Zagreb, Hrvatska pri temperaturi 160-180 °C tijekom 2 sata.

Nakon što se odredio broj stanica bakterija i plijesni u priređenim suspenzijama, po 3 mL suspenzije je sterilnom tehnikom rada dodano u epruvetu koja sadržava 27 mL hranjivog bujona agara, odnosno malt agara. Bakterije, odnosno plijesni su dobro homogenizirane u podlozi i izlivene u sterilne Petrijeve zdjelice. Prethodno pripremljeni suhi i čisti diskovi natopljeni su otopinama farmaceutika, realnih uzoraka te otopina slijepih proba, svaki po 50  $\mu$ L, što je maksimalni volumen koji disk može primiti bez prelijevanja i to automatskom pipetom. Tako pripremljeni diskovi čuvani su na suhim i čistim označenim jažicama a potom su preneseni na pripremljene očvrslje hranjive podloge (Slika 20). Na svaku Petrijevu zdjelicu se u sredinu stavlja jedan kontrolni disk natopljen MiliQ vodom. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 28 °C i 37 °C, a rezultati su očitavani nakon 24 sata i tako kroz vremenski period od 7 dana.



Slika 20. Prikaz propisno označene Petrijeve zdjelice sa očvrslom hranjivom podlogom i nanesenim diskovima natopljenim standardnim otopinama na početku eksperimenta (nulti radni dan)

#### 4.1. Biorazgradnja i fizikalno-kemijski pokazatelji

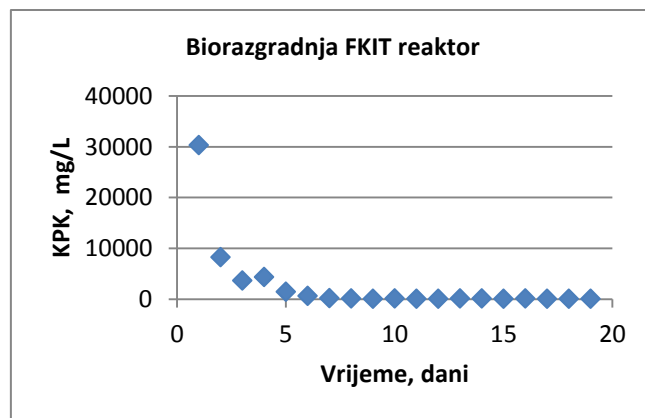
Albendazol je antihelmintik koji se najviše koristi u veterinarskoj medicini i lako dospijeva u okoliš jer ga se klasičnim metodama obrade otpadne vode ne može ukloniti. Danas se usavršavaju razne metode obrade otpadnih voda s ciljem da se uklone ovako male molekule poput albendazola, ali i njihovi razgradni odnosno transformacijski produkti koji nastaju procesima obrade voda. Stoga je kao zadatak ovog rada prvenstveno bilo ispitati mogućnost uklanjanja albendazola iz otpadnih voda biorazgradnjom pri čemu se za početak radi u vodovodnoj vodi uz dodatak aktivnog mulja kako bi se lakše kontrolirao sam proces. Proces biorazgradnje prati se kromatografskim metodama, ali i testom toksičnosti mjerenjem zone inhibicije. Analitičkim metodama kromatografije želi se definirati učinkovitost procesa biorazgradnje te odrediti eventualno novonastali spojevi, a testom toksičnost odrediti da li nastaju nakon takvog procesa toksičniji produkti od samog početnog spoja.

Kako bi se mogao pratiti proces biorazgradnje i ustanoviti što se s farmaceutikom u reaktoru zbiva, pratilo se nekoliko najvažnijih parametara, kao što su: pH-vrijednost otopine, koncentracija otopljenog kisika, temperatura sadržaja u reaktoru, preostali radni volumen reaktora i kemijska potrošnja kisika (Tablica 8). U reaktoru **FKIT** se pratio proces biorazgradnje antihelmintika albendazola i to pri masenoj koncentraciji od 10 mg/L (ppm), pod utjecajem aktivnog mulja TS 0,022 g/L (5 mL) u vremenskom razdoblju od 28 dana. Vrijednost KPK parametra se od početnih 30312,3 mg/L znatno smanjuje kroz prvih 10 dana, a nakon toga se ustaljuje oko vrijednosti 100 mg O<sub>2</sub>/L uz manje oscilacije u vrijednosti (Slika 21). To ukazuje na prilagodbu aktivnog mulja na susprtat, te prisutnost razgradnje albendazola, ali iz ovih podataka se ne može direktno zaključiti radi li se o biorazgradnji ili hidrolizi molekula, ali nam u razmatranju pomažu i rezultati kromatografije. Osim reaktora u kojima se pratio proces biorazgradnje tijekom eksperimenta postavljeno je još nekoliko reaktora. Reaktor **S.P. ALB** u kojem se nalazila otopina albendazola koncentracije 10 mg/L, radna otopina (RO) je pripremljena tako što se 20 mL temeljne standardne otopine (TSO) albendazola koncentracije 500 mg/L pipetiralo u 1 L vodovodne vode i u istim uvjetima temperature, bez dodatka aktivnog mulja, aerirana istim protokom zraka. Time se zaključilo da postoji znatan utjecaj hidrolize na albendazol u vodenom mediju i to se mora uzeti u obzir kada se analiziraju podaci biorazgradnje. S druge strane obzirom da se uočilo znatno smanjenje radnog volumena u reaktoru, od početnog 1,0 L do 0,30 L u 28. radnom danu, postavljen je i reaktor **S.P.FKIT**. U njega se pipetiralo 20 mL smjese otapala u kojoj se

priređivala TSO albendazola, dakle MeOH:ACN=1:1 u 1 L vodovodne vode, također bez dodatka aktivnog mulja. S druge strane postavljen je i reaktor **Č.O.+A.M.** u kojem je istim postupkom pripremljena 1 L RO albendazola koncentracije 10 mg/L uz dodatak aktivnog mulja TS 0,022 g/L, kako bi se ustanovio utjecaj aktivnog mulja na samu smjesu otapala. Da bi se ustvrdila ponovljivost pokusa biorazgradnje albendazola aktivnim muljem, ponovno se postavio reaktor pod nazivom **FKIT 2** kod istih eksperimentalnih uvjeta kao i za prvi eksperiment, uz praćenje istih parametara, što je prikazano u Tablici 9, uz praćenje promjene vrijednosti KPK parametra u vremenskom razdoblju od 28 dana (Slika 22).

Tablica 8. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor FKIT

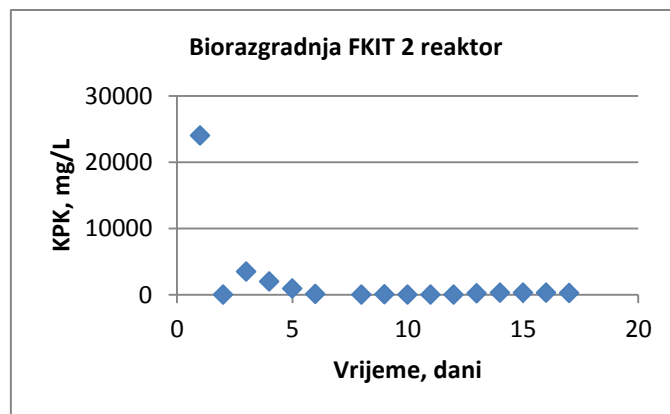
Datum	<i>t</i> (h)	Radni dan	<i>pH</i>	O <sub>2</sub> (mg/L)	<i>T</i> (°C)	<i>V</i> (L)	KPK (mg O <sub>2</sub> /L)
5.5.2015.	12:00	0.	8,48	5,6	21,1	1,0	30312,3
6.5.2015.	8:30	1.	8,53	5,7	21,4	1,0	8278,4
7.5.2015.	8:30	2.	8,36	5,6	21,3	1,0	3646,4
8.5.2015.	8:30	3.	8,52	5,8	19,9	0,95	4392,4
11.5.2015.	8:20	6.	8,35	5,7	20,9	0,85	1450,7
12.5.2015.	13:30	7.	8,58	5,9	20,6	0,80	627,9
13.5.2015.	8:30	8.	8,38	5,7	20,5	0,78	227,0
14.5.2015.	8:50	9.	8,44	5,5	22,2	0,72	117,2
15.5.2015.	8:30	10.	8,53	6,0	19,8	0,68	106,4
18.5.2015.	8:30	13.	8,63	5,8	18,3	0,62	117,6
19.5.2015.	8:30	14.	8,44	5,5	20,6	0,60	104,2
20.5.2015.	8:30	15.	8,46	5,4	21,4	0,58	101,3
21.5.2015.	8:30	16.	8,48	5,7	18,2	0,56	112,8
25.5.2015.	8:30	20.	8,54	5,7	18,5	0,50	110,1
26.5.2015.	8:50	21.	8,47	5,6	18,2	0,48	99,5
27.5.2015.	8:50	22.	8,62	7,2	16,2	0,46	114,7
28.5.2015.	8:50	23.	8,73	8,1	15,8	0,42	103,2
1.6.2015.	8:30	27.	8,48	7,9	19,7	0,35	73,9
2.6.2015.	8:30	28.	8,38	5,6	23,6	0,30	86,7



Slika 21. Prikaz promjene parametra KPK kroz 28 dana u reaktoru FKIT

Tablica 9. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor FKIT 2

Datum	$t$ (h)	Radni dan	$pH$	$O_2$ (mg/L)	$T$ ( $^{\circ}C$ )	$V$ (L)	$KPK$ (mg $O_2/L$ )
8.6.2015.	11:30	0.	8,32	5,5	25,3	1,0	24037,9
9.6.2015.	8:30	1.	8,43	6,4	23,9	0,99	9493,8
10.6.2015.	8:30	2.	8,29	6,0	24,1	0,94	3519,5
11.6.2015.	8:30	3.	8,23	5,6	24,0	0,92	2027,2
12.6.2015.	8:30	4.	8,24	6,1	24,0	0,90	943,2
17.6.2015.	13:00	9.	8,62	7,2	19,8	0,70	108,8
18.6.2015.	8:30	10.	8,60	7,3	20,1	0,68	-
19.6.2015.	8:30	11.	8,55	6,3	21,5	0,64	13,57
23.6.2015.	8:30	15.	-	-	-	0,58	72,4
24.6.2015.	8:30	16.	-	-	-	0,56	-
26.6.2015.	8:30	18.	-	-	-	0,55	-
29.6.2015.	8:30	21.	-	-	-	0,50	-
30.6.2015.	8:30	22.	8,52	5,6	22,6	0,48	230,7
1.7.2015.	8:30	23.	8,60	5,8	22,1	0,46	324,5
2.7.2015.	8:30	24.	8,53	6,2	22,6	0,44	294,1
3.7.2015.	8:30	25.	8,63	5,7	23,9	0,42	304,3
6.7.2015.	8:30	28.	8,68	5,4	24,7	0,34	258,2



Slika 22. Prikaz promjene parametra KPK kroz 28 dana u reaktoru FKIT 2

## 4.2. Rezultati kromatografskog praćenja biorazgradnje albendazola

Da bi bilo moguće pratiti učinkovitost biorazgradnje albendazola u vodovodnoj vodi pod utjecajem aktivnog mulja svi uzorci kao i standardne otopine snimane su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) i na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti (UPLC) s detektorom spektrometrom masa (MS). HPLC-DAD sustav nam omogućava praćenje glavne komponente albendazola, te eventualni nastanak novih spojeva koje se ne može identificirati ali ih se može detektirati određivanjem vremena zadržavanja i snimanjem apsorpcijskog spektra, a svi kromatogrami su snimani na 210 nm. Pomoću kromatografa UPLC omogućena je i identifikacija novonastalih spojeva odnosno može se predvidjeti koji su to novonastali spojevi, te koji su eventualni putevi razgradnje ispitivanog farmaceutika.

### 4.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

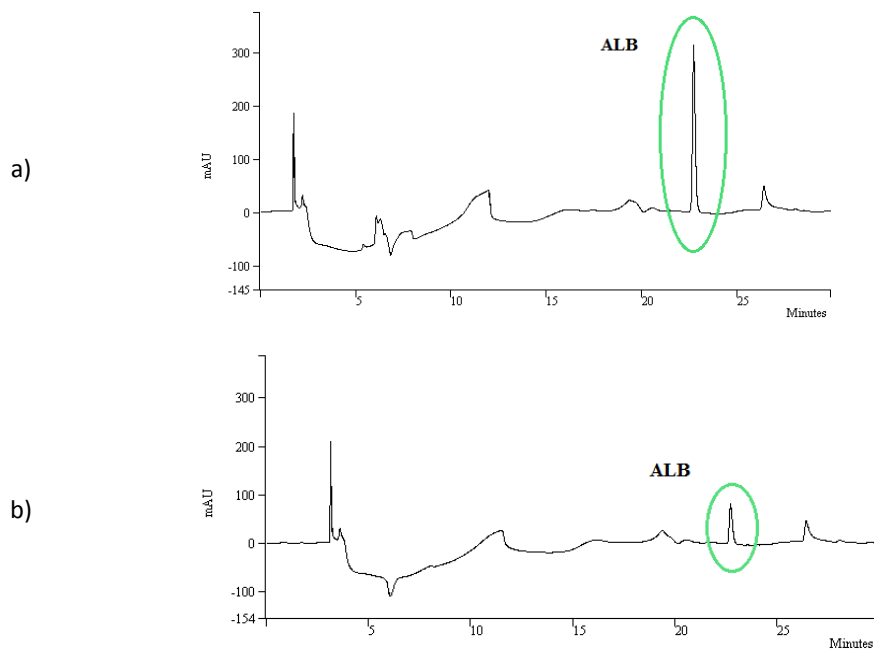
Realni uzorci uzimani su redovito svakih 24 sata kroz promatrani period biorazgradnje od 28 dana te su snimani na HPLC-DAD uređaju pod kromatografskim uvjetima kako je navedeno u Eksperimentalnom dijelu u poglavlju 3.3.3.1. Temperatura kolone je bila 26,5 °C. Standard albendazola od 10 mg/L pripremljen je u 1 L MiliQ vode i injektiran tri puta, a apsorpcijski spektar je snimljen na valnoj duljini od 210 nm. Srednja vrijednost površina jest 807,67 mAU, a služi za izračun koncentracija albendazola pomoću očitanih integriranih površina ispod kromatografskih krivulja u realnim uzorcima i to pomoću formule:

$$\chi = \frac{A(x)mAUs \times 10ppm}{807,67mAUs} \quad (6)$$

$\gamma$ - masena koncentracija (mg/L)

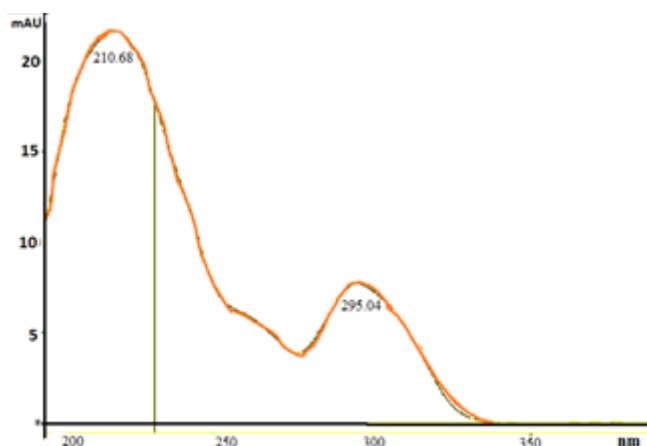
A(x)- površina ispod kromatografske krivulje (mAU)

Postavivši reaktor **S.P.ALB** ustanovilo se da postoji znatan utjecaj hidrolize na razgradnju albendazola u vodenom mediju, što dokazuje razlika u površinama ispod kromatografskih krivulja za albendazol (ALB) (Slika 23). Detekcija i identifikacija albendazola provedena je pomoću apsorpcijskog spektra (Slika 24) i vremena zadržavanja  $t_R$  koje iznosi 22,653 minuta.



Slika 23. a) Kromatogram standardne otopine albendazola masene koncentracije 10 mg/L u smjesi otapala MeOH:ACN=1:1 b) Kromatogram standardne otopine albendazola masene koncentracije 10 mg/L u 1 L MiliQ vode





Slika 24. Apсорpcijski spektar albendazola na 210 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

Kromatografske krivulje koje se pojavljuju kod nekih realnih uzoraka pripadaju novonastalim nepoznatim spojevima a za svaki realni uzorak prikazani su odgovarajućim kromatogramom odnosno kromatografskom krivuljom te okarakterizirani vremenom zadržavanja i apсорpcijskim spektrom (Tablica 10 i Tablica 10 [nastavak I]). Novonastali spojevi nastaju u vrlo niskim koncentracijama i to su koncentracije ispod granice kvantifikacije za HPLC-DAD, pa se te kromatografske krivulje nisu mogle integrirati (Tablica 11).

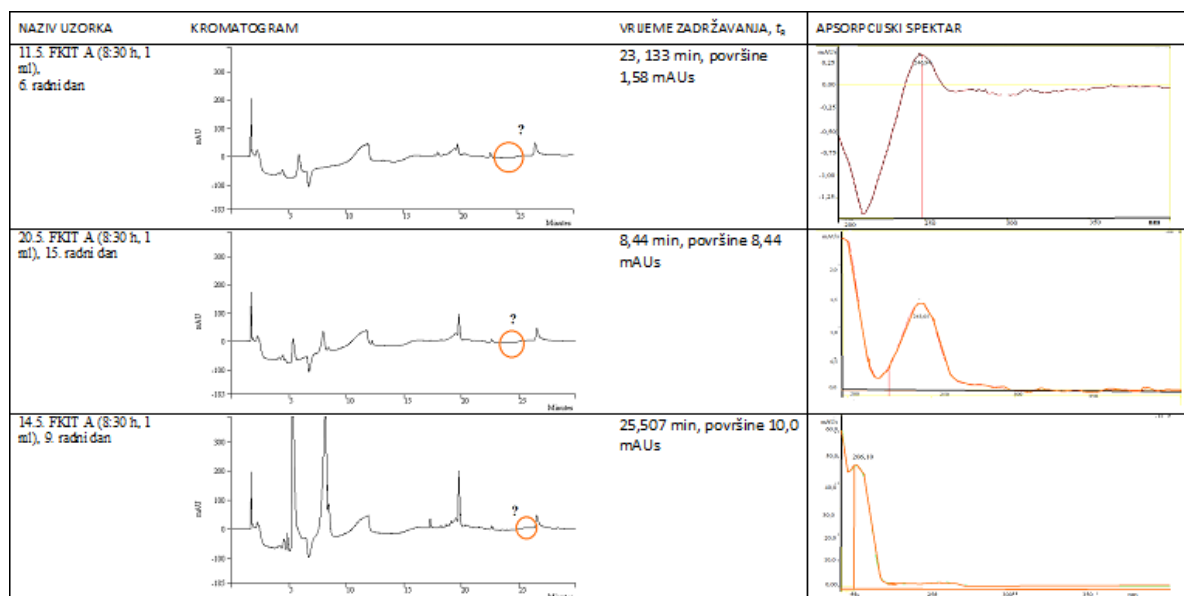
Tablica 10. Prikaz vremena zadržavanja  $t_R$  i površina ispod kromatografskih krivulja ( $A$ ) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT iz prvog eksperimenta

Naziv	Radni dan	$A$ (površina), mAU	$t_R$ , min	$\gamma$ , mg/L	Pojava nepoznate kromatografske krivulje  ( $t_R, A$ )
11.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	6.	167	22,653	2,0676	Na 23,133 min, površina 1,58 mAU
12.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	7.	131	22,653	1,6219	-
13.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	8.	9,77	22,653	0,1209	Na 23,133 min, površina 2,51 mAU
13.5. FKIT B (11:30 h, 1 mL)	8.	9,01	22,653	0,1115	Na 23,133 min, površina 2,21 mAU
14.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	9.	106	22,627	1,3124	Na 25,507 min, površina 10,0 mAU
14.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	9.	22,2	22,627	0,2748	-
15.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	10.	28,7	22,653	0,3553	-
15.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	10.	63,0	22,627	0,7800	Na 23,560 min, površina 15,9 mAU
18.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	13.	8,0	22,627	0,0990	Na 23,560 min, površina 10,2 mAU
18.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	13.	44,1	22,627	0,5460	Na 23,560 min, površina 9,05 mAU
19.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	14.	56,0	22,627	0,6934	Na 23,560 min, površina 13,5 mAU

Tablica 10 [nastavak I]. Prikaz vremena zadržavanja  $t_R$  i površina ispod kromatografskih krivulja (A) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT iz prvog eksperimenta

Naziv	Radni dan	A (površina), mAU	$t_R$ min	$\gamma$ , mg/L	Pojava nepoznate kromatografske krivulje ( $t_R$ , A)
19.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	14.	18,8	22,627	0,2328	Na 23,560 min, površina 8,93 mAU
20.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	15.	94,1	22,627	1,1651	Na 23,560 min, površina 8,44 mAU
20.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	15.	62,6	22,640	0,7750	-
21.5. FKIT A (8:30 h, 1 mL)	16.	8,09	22,627	0,1002	-
21.5. FKIT B (12:00 h, 1 mL)	16.	38,3	22,627	0,4742	Na 23,560 min, površina 15,9 mAU
25.5. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	20.	60,3	22,760	0,7466	-
26.5. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	21.	-	-	-	-
27.5. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	22.	-	-	-	-
28.5. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	23.	34,8	22,7467	0,4308	-
1.6. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	27.	-	-	-	-
2.6. FKIT (8:30 h; 0,5 mL)	28.	-	-	-	-

Tablica 11. Prikaz nepoznatih kromatografskih krivulja na kromatogramu i pripadajućih apsorpcijskih spektara u uzorcima iz reaktora FKIT, iz prvog eksperimenta

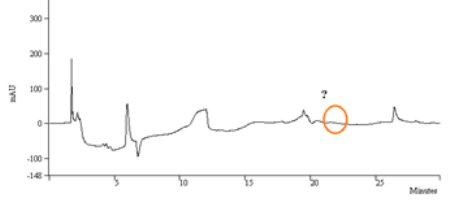
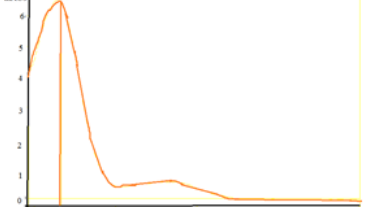
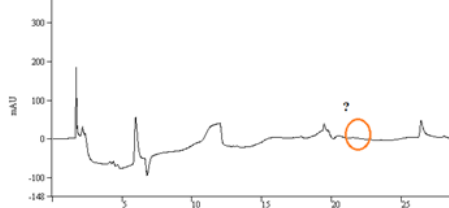
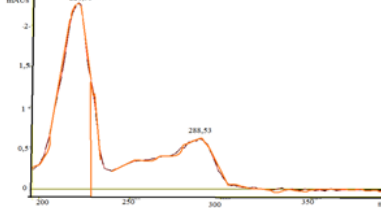
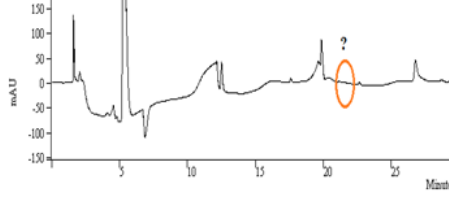
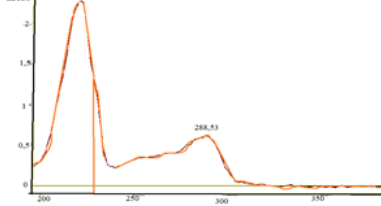


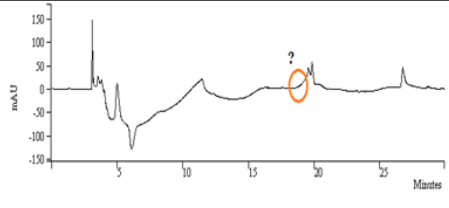

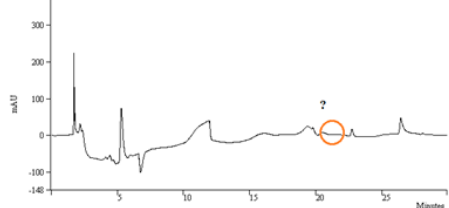
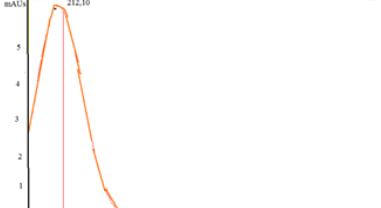
Da bi se ustvrdila ponovljivost pokusa biorazgradnje albendazola aktivnim muljem, ponovno se postavio reaktor pod nazivom FKIT 2 kod istih eksperimentalnih uvjeta kao i prvi eksperiment, uz praćenje istih parametara (Tablica 12). Primjećeno je da se pojavljuju iste nepoznate kromatografske krivulje kao i kod prvog eksperimenta (Tablica 13).

Tablica 12. Prikaz vremena zadržavanja  $t_R$  i površina ispod kromatografskih krivulja ( $A$ ) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT 2 iz drugog eksperimenta

Naziv	Radni dan	$A$ (površina), mAU	$t_R$ , min	$\gamma$ , mg/L	Pojava nepoznate kromatografske krivulje ( $t_R$ , $A$ )
8.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	0.	246	22,7333	3,0458	-
9.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	1.	60,7	22,7333	0,7515	-
10.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	2.	208	22,7333	2,5753	21,5067 min, površina 13,6 mAU
11.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	3.	100	22,7067	1,2381	21,8267 min, površina 21,2 mAU
12.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	4.	-	-	-	21,5333 min, površina 18,4 mAU
17.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	9.	-	-	-	-
18.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	10.	-	-	-	18, 593 min, površine 10,2 mAU
19.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	11.	-	-	-	-
23.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	15.	-	-	-	-
24.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	16.	-	-	-	-
26.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	18.	4,390	22,6533	0,0544	21,7867 min, površina 2,39mAU
29.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	21.	0,233	22,6533	0,0028	Na 21,7867 min
30.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	22.	4,800	22,6533	0,0594	Na 21,7867 min
1.7. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	23.	0,582	22,6533	0,0072	Na 21,7867 min
2.7. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	24.	0,678	22,6533	0,0084	Na 21,7867 min
3.7. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	25.	-	-	-	Na 21,7867 min
6.7. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 mL)	28.	-	-	-	Na 21,7867 min

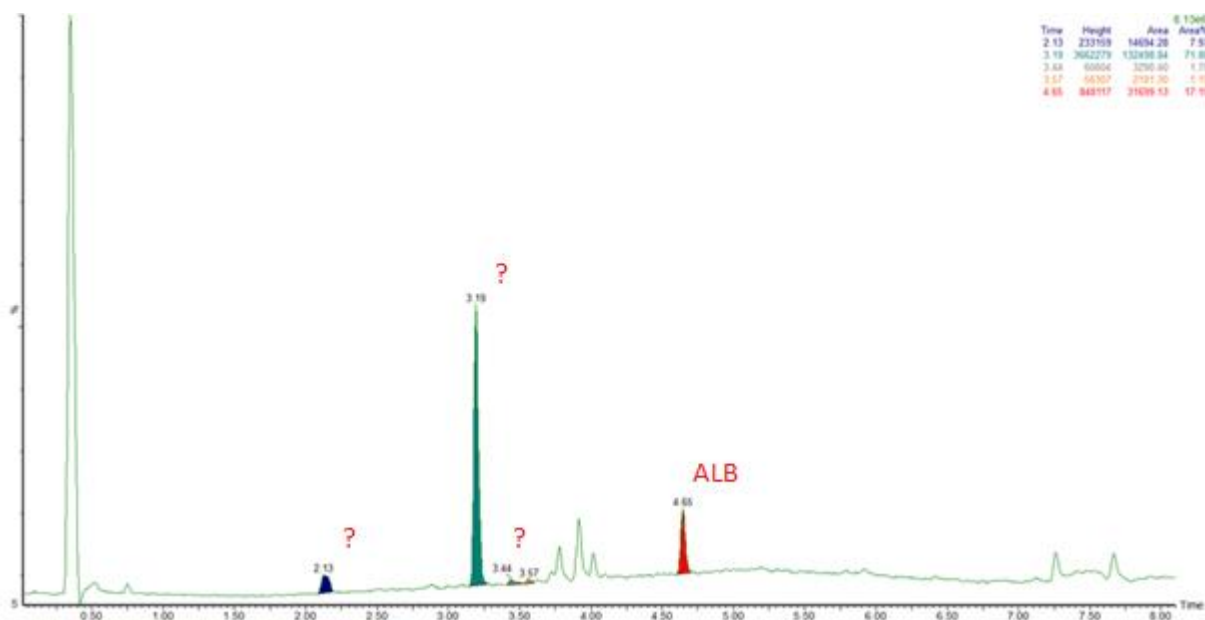
Tablica 13. Prikaz nepoznatih kromatografskih krivulja na kromatogramu i pripadajućih apsorpcijskih spektara u uzorcima iz reaktora FKIT 2, iz drugog eksperimenta

11.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 ml), 3. radni dan		21,8267 min, površina 21,2 mAU <sub>s</sub>	
12.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 ml), 4. radni dan		21,5333 min, površina 18,4 mAU <sub>s</sub>	
26.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 ml), 18. radni dan		21,7867 min, površina 2,39mAU <sub>s</sub>	

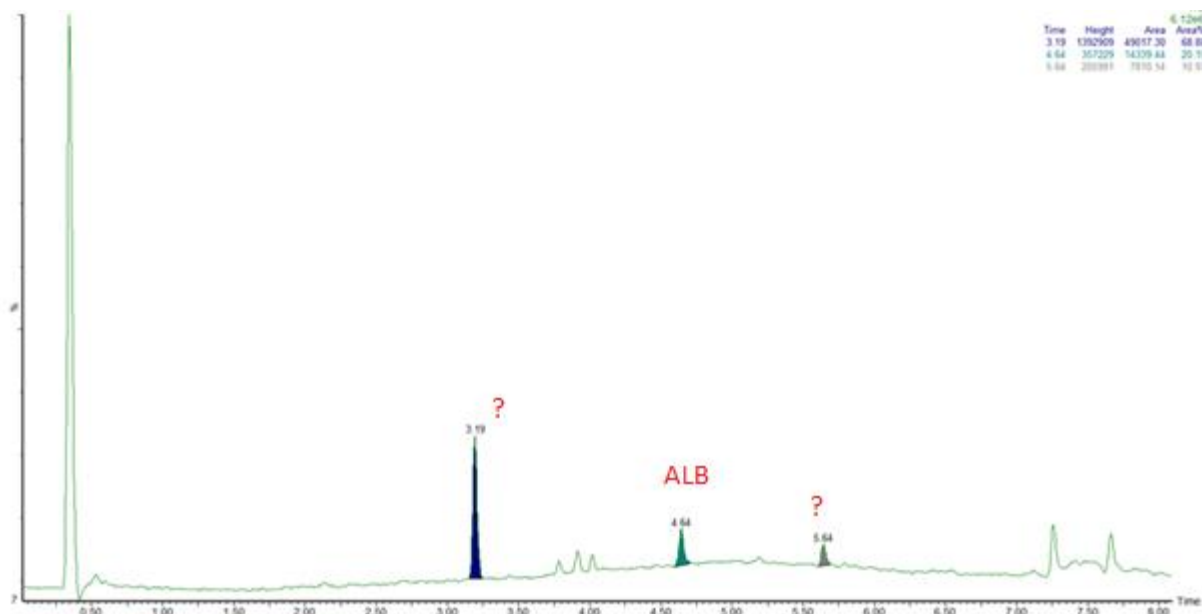
NAZIV UZORKA	KROMATOGRAM	VRIJEME ZADRŽAVANJA, t <sub>R</sub>	APSORPCUSKI SPEKTAR
18.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 ml), 10. radni dan		18,593 min, površine 10,2 mAU <sub>s</sub>	
10.6. FKIT 2 (8:30 h; 0,5 ml), 2. radni dan		21,5067 min, površina 13,6 mAU <sub>s</sub>	

#### 4.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Kromatografske krivulje koje se pojavljuju kod nekih realnih uzoraka pripadaju novonastalim nepoznatim spojevima koji nastaju u vrlo niskim koncentracijama i to su koncentracije ispod granice kvantifikacije za HPLC-DAD, pa se te kromatografske krivulje nisu mogle integrirati, zato se pristupilo analizi pomoću UPLC-MS-a. Realni uzorci uzimani su redovito svakih 24 sata kroz promatrani period biorazgradnje od 28 dana te su snimani na UPLC-MS uređaju pod kromatografskim uvjetima kako je navedeno u Eksperimentalnom dijelu u poglavlju 3.3.3.2. Dobiveni su kromatogrami na kojima se vidi kromatografska krivulja albendazola ( $t_R=4,65$  min) i nepoznate kromatografske krivulje (Slika 25, Slika 26) koji odgovaraju ili novonastalim transformacijskim produktima ili nečistoćama, a identifikacija njihove molekulske strukture provodi se pomoću MS-a. Temperatura kolone je bila 32 °C, a temperatura autosampler-a 25 °C. Standard albendazola od 0,01 mg/mL pripremljen je u 1 L MilliQ vode (temeljna standardna otopina u MeOH, razrijeđenje u visokopročišćenju H<sub>2</sub>O-Milli-Q) i injektiran tri puta. MS raščlanjuje svaku pojedinu molekulu u ionizirane fragmente i potom ih detektira koristeći omjer masa i naboja ( $m/z$ ). Analize su provedene pomoću UPLC/ESI- TOF-MS-a. Provedena je kvalitativna analiza TIC (Total Ion Chromatogram) metodom, a instrument je podešen za uzimanje masenih spektara ovisno o molekulskoj masi komponente, najčešće u rasponu  $m/z$  60–1000 Da.

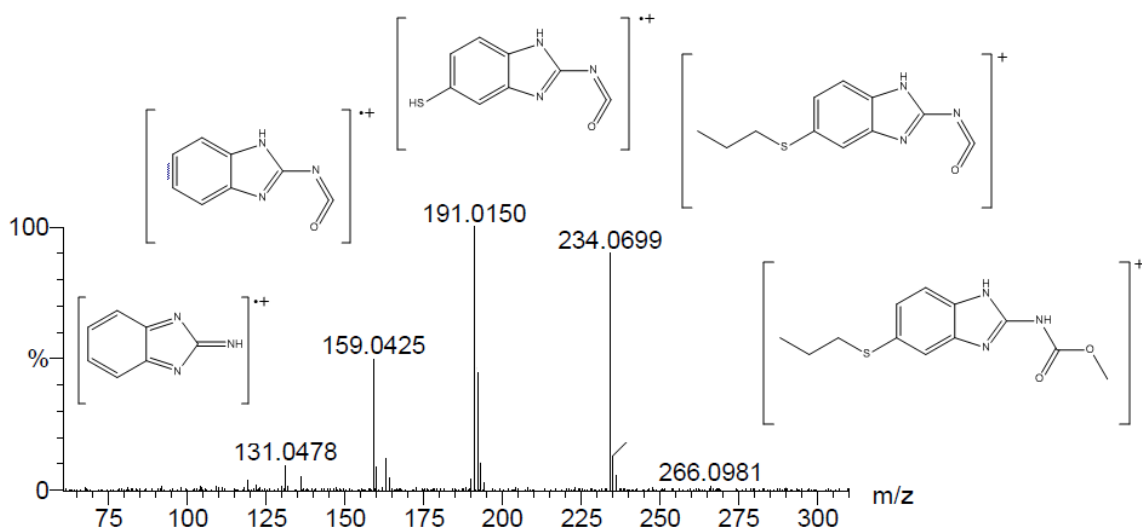


Slika 25. Kromatografska krivulja albendazola i kromatografske krivulje nepoznatih spojeva u realnom uzorku (14.05.2015. 8:30 h) na kromatogramu



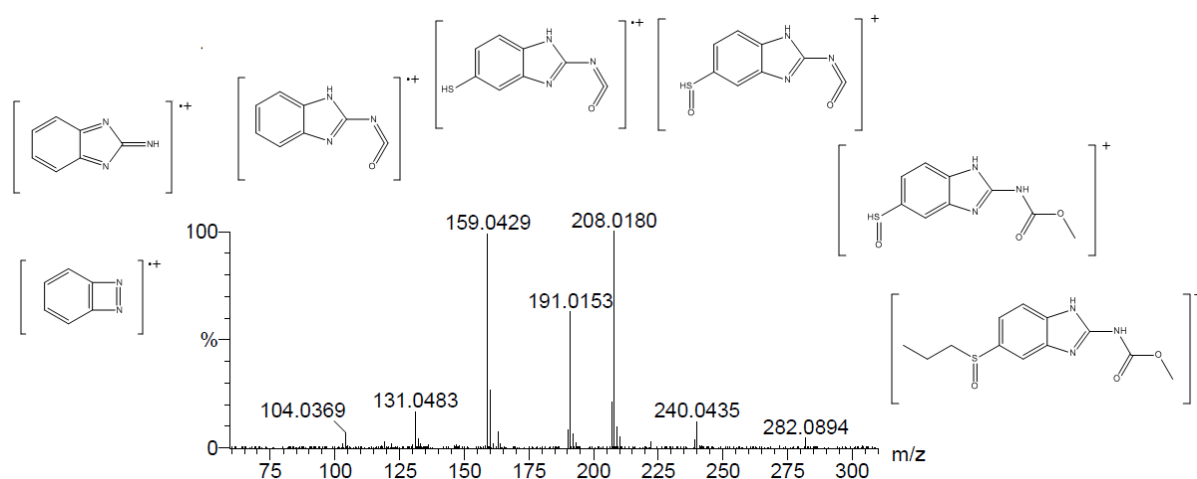
Slika 26. Kromatografska krivulja albendazola i kromatografske krivulje nepoznatih spojeva u realnom uzorku (18.5.2015. 12:00 h) na kromatogramu

Prema stupnju nezasićenosti, izračunatim i eksperimentalnim  $m/z$  vrijednostima te greškom izračunatom iz tih vrijednosti ponuđene su molekulske formule dobivenih transformacijskih produkata (TP) i njihovih fragmenata. Fragmentiranjem matične molekule ALB dobivena su 4 glavna fragmenta s eksperimentalnim  $m/z$  vrijednostima: 234,0699, 192,0150, 159,0425 i 131,0487 (Slika 27).

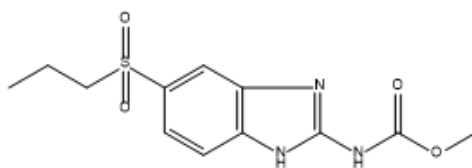


Slika 27. Spektar masa produktnog iona albendazola ALB  $m/z$  266 i njegovih fragmenata

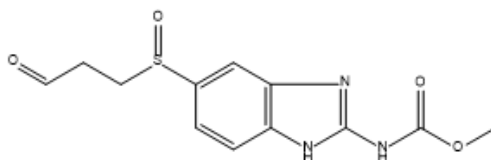
Fragmentiranjem matične molekule, a potom i transformacijskih produkata pretpostavljene su njihove strukture. Struktura metaboličkih produkata u nekim slučajevima odgovara i transformacijskim produktima dobivenim u provedenim eksperimentima. Eksperimentima biorazgradnje ALB dobivena su 3 produkta: ALB TP1 ( $M = 281$  g/mol), ALB TP2 ( $M = 297$  g/mol) i ALB TP3 ( $M = 295$  g/mol). Struktura ALB TP1 odgovara metaboličkom produktu ALB-sulfoksidu (ALB-oksidi ili rikobendazol) formule  $C_{12}H_{15}N_3O_3S$ . Uslijedila je fragmentacija dobivenih transformacijskih produkata, a na Slici 28 prikazana je fragmentacija TP1  $m/z$  282 (albendazol sulfoksida). TP2  $m/z$  298 odgovara molekularnoj formuli  $C_{12}H_{13}N_3O_4S$ , odnosno ALB-sulfonu (Slika 29). U ovim eksperimentima detektiran je i još jedan transformacijski produkt TP3  $m/z$  295 kojem odgovara molekulska formula  $C_{12}H_{15}N_3O_4S$  (Slika 30).



Slika 28. Spektar masa transformacijskog produkta TP  $m/z$  282 (albendazol sulfoksid) i njegovih fragmenata

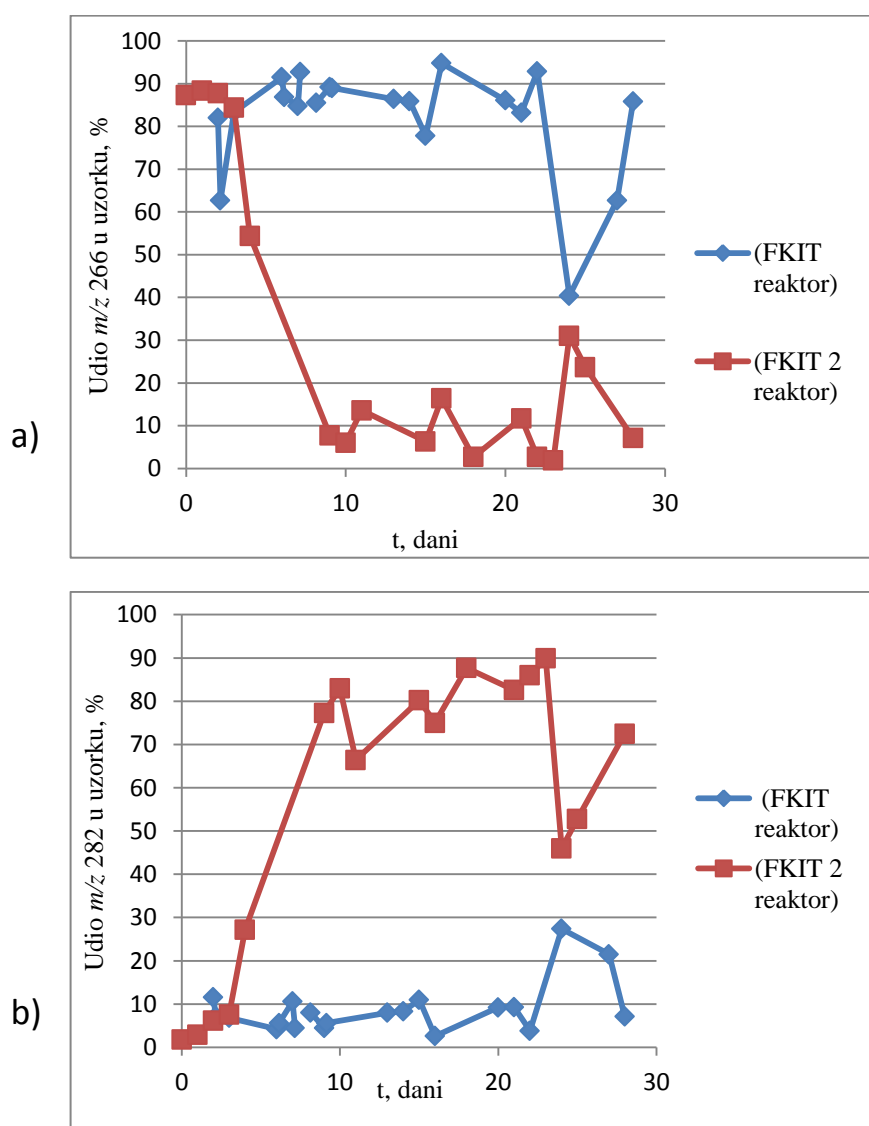


Slika 29. TP2  $m/z$  298 (albendazol sulfon)



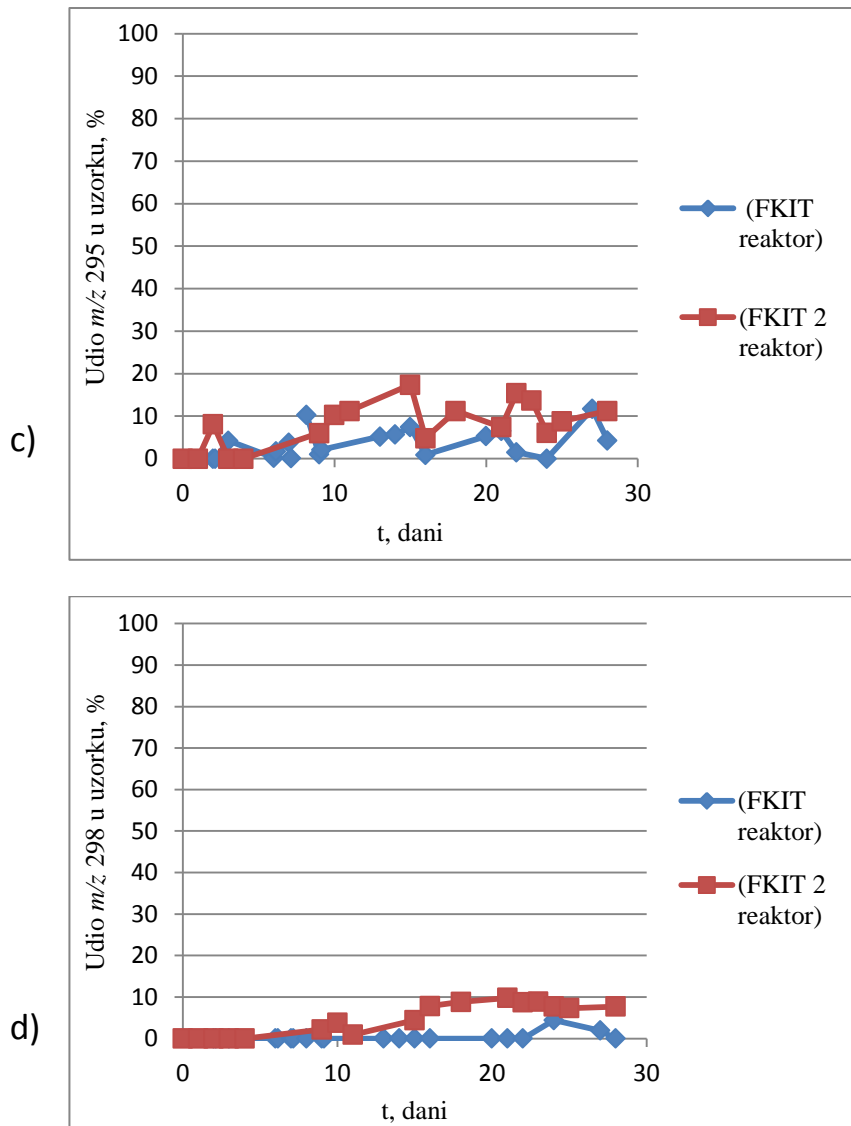
Slika 30. TP3  $m/z$  295 (nepoznati produkt)

Raspad molekule albendazola znatan je u vodovodnoj vodi pod utjecajem aktivnog mulja pa je zamijećeno naglo smanjenje koncentracije već nakon prvog dana biorazgradnje koje se može pripisati samoj biorazgradnji, ali se u obzir treba uzeti i znatna mogućnost utjecaja hidrolize. Uspoređujući kromatogram realnog uzorka antihelmintika nakon 28 dana izlaganja biorazgradnji pod utjecajem aktivnog mulja s kromatogramom prije biorazgradnje uočeno je smanjenje površina ispod kromatografskih krivulja albendazola i pojavljivanje kromatografskih krivulja kojih nije bilo na kromatogramu realnih uzoraka na samom početku eksperimenta biorazgradnje. To su kromatografske krivulje TP albendazola, a profili stvaranja TP i raspadanja albendazola prikazani su na Slici 31.



Slika 31. Profil stvaranja transformacijskih produkata albendazola u vodovodnoj vodi tijekom procesa biorazgradnje pod utjecajem aktivnog mulja: a)  $m/z$  266 (produktni ion albendazola) b)  $m/z$  282 (albendazol sulfon) c)  $m/z$  298 (albendazol sulfon) d)  $m/z$  295 (nepoznati TP3)





Slika 31.[nastavak I] Profil stvaranja transformacijskih produkata albendazola u vodovodnoj vodi tijekom procesa biorazgradnje pod utjecajem aktivnog mulja: a)  $m/z$  266 (produktni ion albendazola) b)  $m/z$  282 (albendazol sulfoksid) c)  $m/z$  298 (albendazol sulfon) d)  $m/z$  295 (nepoznati TP3)

### 4.3. Test toksičnosti mjerenjem zone inhibicije

U priređenim suspenzijama mikroorganizama prethodno je određivan ukupan broj stanica bakterija optičkom gustoćom koji je iznosio  $5,8 \times 10^7$  stanica/mL suspenzije. Sterilnom tehnikom rada je pripremljeno 10 puta manje razrjeđenje, tako da je suspenzija koja je dodana u epruvete s hranjivim agarom sadržavala oko  $6 \times 10^6$  stanica/mL suspenzije. Ukupan broj plijesni, odnosno broj spora plijesni utvrđen je metodom izravnog određivanja ukupnog broj mikroorganizama brojenjem u Thominoj komorici i iznosio je oko  $5 \times 10^6$  stanica/mL suspenzije.

Nakon 24 sata inkubacije uočilo se da se u Petrijevoj zdjelici na kojoj se nalazi malt agar na koji je nacijepljena plijesan *Aspergillus niger* oko zona inhibicije na diskovima koji su bili natopljeni realnim uzorcima nisu pojavile vidljive zone inhibicije nakon 24 sata, a ni nakon 7 dana.

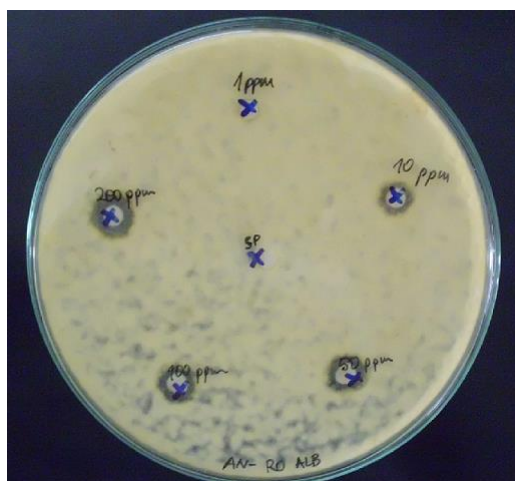
Zone inhibicije su se nakon 24 sata inkubacije hranjivih podloga pojavile oko diskova natopljenih radnim otopinama (Slika 32) i slijepim probama (Slika 33) koji su postavljeni na malt agar nacijepljen plijesni *Aspergillus niger*, a kroz 7 dana se nisu povećavale, već su se pomalo smanjivale i sužavale zbog prilagodbe plijesni na farmaceutik i zbog pojave sušenja hranjive podloge malt agara (Tablica 14 i 15).

Tablica 14. Zone inhibicije nastale djelovanjem slijepih proba kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni *Aspergillus niger* od 7 dana

Oznaka diska	1.dan (7.7.2015.)	2.dan (8.7.2015.)	3.dan (9.7.2015.)	4.dan (10.7.2015.)	7.dan (13.7.2015. )
I	6,5 mm	6,5 mm	6,5 mm	6 mm	5,5 mm
II	6,5 mm	6,5 mm	6,5 mm	6 mm	5,5 mm
III	-	-	-	-	-
IV	-	-	-	-	-
V	12 mm	11 mm	11 mm	11 mm	10 mm

Tablica 15. Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina albendazola kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni *Aspergillus niger* od 7 dana

Oznaka diska	1.dan (7.7.2015.)	2.dan (8.7.2015.)	3. dan (9.7.2015.)	4.dan (10.7.2015.)	7.dan (13.7.2015.)
1 mg/L	7 mm	6,5 mm	6,5 mm	6,0 mm	5,5 mm
10 mg/L	10 mm	10 mm	10 mm	8 mm	7 mm
50 mg/L	13 mm	12 mm	12 mm	11 mm	10 mm
100 mg/L	14 mm	13 mm	13 mm	12 mm	10 mm
200 mg/L	15 mm	13 mm	13 mm	13 mm	11 mm



Slika 32. Prikaz utjecaja radnih otopina albendazola različitih koncentracija na *Aspergillus niger* nakon 24 h inkubacije hranjivih podloga



Slika 33. Prikaz utjecaja slijepih proba na *Aspergillus niger* nakon 24 sata inkubacije hranjivih podloga

Na Petrijevim zdjelicama koje su nacijepljene bakterijskom kulturom *Streptomyces rimosus* oko diskova natopljenih radnim otopinama albendazola različitih koncentracija, slijepim probama i realnim uzorcima nisu se pojavile vidljive zone inhibicije nakon 24 sata, a niti nakon 7 dana.

Na Petrijevim zdjelicama koje su nacijepljene bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. oko diskova natopljenih radnim otopinama albendazola različitih koncentracija, slijepim probama i realnim uzorcima nisu se pojavile vidljive zone inhibicije nakon 24 sata, a niti nakon 7 dana.

Budući da su antihelmintici veterinarski farmaceutici koji djeluju protiv bolesti uzrokovanih parazitskim crvima helmintima, a i prema njihovoj kemijskoj strukturi malo je vjerojatno akutno ekotoksično djelovanje. Mnogo je vjerojatnije ekotoksično djelovanje niskih koncentracija kao posljedica dugotrajnog djelovanja na organizme u okolišu koja može dovesti do kroničnih učinaka. U literaturi ima vrlo malo podataka o ekotoksičnosti za skupinu benzimidazola i ostale skupine antihelmintika.

Na temelju provedenih eksperimenata zaključuje se:

1 Biorazgradnja albendazola u vodovodnoj vodi aktivnim muljem praćena je parametrima kao što su pH-vrijednost, temperatura u reaktoru, vrijednost otopljenog kisika, te ukupni radni volumen u reaktoru. Te vrijednosti, kao i niska vrijednost KPK parametra nam ukazuju na prilagodbu aktivnog mulja na takve okolišne uvjete i na takvu vrstu organskog opterećenja. Vrijednost KPK parametra je svedena je na minimum što ukazuje na mineralizaciju molekula albendazola, točnije prisutnost razgradnje.

2. Učinkovitost biorazgradnje praćena je tekućinskom kromatografijom. Tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) praćena je glavna komponenta i uviđa se da je došlo do biorazgradnje albendazola, no eksperimenti ukazuju i na značajan utjecaj hidrolize na razgradnju albendazola. Primjećeno je da nastaju i neki novi spojevi koje HPLC-DAD metodom nije moguće identificirati. U tu svrhu je korišten tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s detektorom spektrometrom masa (UPLC-MS) pomoću kojeg je predviđen put razgradnje albendazola.

3. Testovima toksičnosti pri čemu je izabrana metoda zone inhibicije na mikroorganizmima karakterističnim za tlo i vodu utvrđeno je da novonastali spojevi kao niti radne otopine masene koncentracije od 1 do 200 mg/L ne pokazuju opasnost po mikroorganizme. Nedostatak ove metode je što se ne može pratiti utjecaj dugotrajnijeg izlaganja realnih uzoraka i radnih otopina albendazola na mikroorganizme, što bi moglo dati i drugačije rezultate.

- [1] Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N., Human pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35 (2005) 401-427.
- [2] Gauthier H., Biodegradation of pharmaceuticals by microorganisms, Doktorska disertacija, Department of Chemical Engineering, McGill University, Montreal, (2008) 12-15.
- [3] Antihelmintici na: <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> pristupljeno 21. ožujka 2015.
- [4] Ternes T. A., Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, 32 (1998) 3245-3260.
- [5] Ribeiro R. A., Goncales M.F. V., Maia S. A., Carvalho F. M., Castro M.L.P., Tiritan E. M., Microbial degradation of pharmaceuticals followed by a simple HPLC-DAD method, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47 (2012) 2151-2158.
- [6] Vujević D., Uklanjanje organskih tvari iz obojenih otpadnih voda primjenom naprednih oksidacijski procesa, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2007) 44-45.
- [7] Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N., The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment, *Environmental Pollution* 145 (2007) 738-744.
- [8] Uvod u kemiju okoliša, Tomašić V., Kaštelan-Macan M. u: *Analitika okoliša*, Kaštelan-Macan M., Petrović M., HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2013), 18-19.
- [9] Radman S., Praćenje pretvorbe antihelmintika u vodenom okolišu i procjena ekotoksikološkog djelovanja, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb, (2013) 1-4.
- [10] Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N., Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment, *Critical Reviews in Toxicology*, 34 (2004) 335-350.
- [11] Antihelmintici na: <http://www.britannica.com/science/anthelmintic> pristupljeno 13. ožujka 2015.
- [12] Albendazol na: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~SO2XxK:3> pristupljeno 22. svibnja 2015.
- [13] Torrado S., Torrado S., Cardoniga R., Torrado J. J., Formulation parameters of albendazole solution, *International Journal of Pharmaceutics*, 140 (1996.) 45-50.
- [14] Korunić-Košćina S., Mioč M., Bobić V., Ekotoksičnost kao biološki pokazatelj onečišćenja rafinerijskih otpadnih voda, *GOMABN* 42 (2003) 153-176.
- [15] Tušar B., Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, *CROATIANKJIGA*, Zagreb, 2004., 62-66.
- [16] Interna skripta: Laboratorijske vježbe Mikrobiologija, FKIT, 2012., 1-9.
- [17] Cetecioglu Z., Ince B., Azman S., Gokcek N., Coskun N., Ince O., Determination of Anaerobic and Anoxic Bioderadation Capacity of Sulfamethoxazole and the Effect on Mixed Microbial Culture u: Chamy R., Rosenkranz F., *Biodegradation- Engineering and Technology*, InTech (2013) 224-249.

[18] Prasad G. S., Girisham S., Reddy S. M., Srisailam K., Biotransformation of albendazole by soil fungi, *World J Microbiology Biotechnology* 24 (2008) 1565-1571.

[19] Cracciolo A. B., Topp E., Grenni P., Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities, *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis* 106 (2015) 25-36.

[20] Chua S. M. A., Takabatake H., Satoha H., Mino T., Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent, *Water Research* 37 (2003) 3602–3611.

[21] Fan H., Li J., Zhang L., Feng L., Contribution of sludge adsorption and biodegradation to the removal of five pharmaceuticals in a submerged membrane bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 88 (2014) 101-107.

[22] Interna skripta: Laboratorijske vježbe Zaštita okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2014., 15-16.

[23] Ferenčak M., Određivanje utjecaja veterinarskih farmaceutika na mikroorganizme, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2014) 11-12.

[24] UPLC na: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/UPLC-UHPLC-inlet-to-MS-with-the-best-dispersion/nav.htm?cid=134613317&locale=en\\_US](http://www.waters.com/waters/en_US/UPLC-UHPLC-inlet-to-MS-with-the-best-dispersion/nav.htm?cid=134613317&locale=en_US) pristupljeno 18. kolovoza 2015.

## 7.1. Popis slika

Slika 1. Sudbina antihelmintika albendazola u okolišu	str. 3
Slika 2. Molekulska struktura albendazola	str. 5
Slika 3. Analitička vaga	str. 13
Slika 4. pH-metar	str. 14
Slika 5. Kisikova elektroda	str. 14
Slika 6. Termoreaktor	str. 15
Slika 7. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)	str. 16
Slika 8. Filtar za injekcije (0,22 µm)	str. 16
Slika 9. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti sa MS detektorom	str. 17
Slika 10. Ultrazvučna kupelj	str. 18
Slika 11. Shematski prikaz autoklava	str. 18
Slika 12. Shema šaržnog reaktora u kojem se vodio proces biorazgradnje	str. 19
Slika 13. Reaktor u kojem se vodio proces biorazgradnje	str. 20
Slika 14. Prikaz Petrijevih zdjelica s hranjivim podlogama i diskovima sa standardnim otopinama farmaceutika. Plavo označeni diskovi su namočeni MiliQ vodom, žuti kružići prikazuju diskove namočene standardnim otopinama farmaceutika različitih masenih koncentracija	str. 23
Slika 15. Realni uzorci uzorkovani tijekom procesa biorazgradnje albendazola. Žuto označeni kružići su diskovi uronjeni u realne uzorke tijekom biorazgradnje albendazola, a plavo označeni kružići su diskovi uronjeni u MiliQ vodu – slijepa proba (Tablica 7)	str. 23
Slika 16. Slijepa probe farmaceutika i otapala. Žuto označeni kružići su diskovi uronjeni u slijepu probe te u standardnu otopinu albendazola od 10 mg/L. Plavo označeni kružići su diskovi uronjeni u MiliQ vodu – slijepa proba	str. 24
Slika 17. Bakterijska kultura <i>Streptomyces rimosus</i> izrasla na hranjivom bujon agaru	str. 25
Slika 18. Bakterijska kultura <i>Bacillus</i> sp izrasla na hranjivom bujon agaru	str. 25
Slika 19. Plijesan <i>Aspergillus niger</i> izrasla na malt agaru	str. 26
Slika 20. Prikaz propisno označene Petrijeve zdjelice sa očvrslom hranjivom podlogom i nanesenim diskovima natopljenim standardnim otopinama na početku eksperimenta (nulti radni dan)	str. 26
Slika 21. Prikaz promjene parametra KPK kroz 28 dana u reaktoru FKIT	str. 29
Slika 22. Prikaz promjene parametra KPK kroz 28 dana u reaktoru FKIT 2	str. 30
Slika 23. a) Kromatogram standardne otopine albendazola masene koncentracije 10 mg/L u smjesi otapala MeOH:ACN=1:1 b) Kromatogram standardne otopine albendazola masene koncentracije 10 mg/L u 1 L MiliQ vode	str. 31
Slika 24. Apsorpcijski spektar albendazola na 210 nm u standardnoj otopini	str. 32



Slika 25. Kromatografska krivulja albendazola i kromatografske krivulje nepoznatih spojeva u realnom uzorku (14.05.2015. 8:30 h) na kromatogramu	str. 36
Slika 26. Kromatografska krivulja albendazola i kromatografske krivulje nepoznatih spojeva u realnom uzorku (18.5.2015. 12:00 h) na kromatogramu	str. 37
Slika 27. Spektar masa produktnog iona albendazola ABZ $m/z$ 266 i njegovih fragmenata	str. 37
Slika 28. Spektar masa transformacijskog produkta TP $m/z$ 282 (albendazol sulfoksid) i njegovih fragmenata	str. 38
Slika 29. TP2 $m/z$ 298 (albendazol sulfon)	str. 38
Slika 30. TP3 $m/z$ 295 (nepoznati produkt)	str. 38
Slika 31. Profil stvaranja transformacijskih produkata albendazola u vodovodnoj vodi tijekom procesa biorazgradnje pod utjecajem aktivnog mulja: a) $m/z$ 266 (produktni ion albendazola) b) $m/z$ 282 (albendazol sulfoksid) c) $m/z$ 298 (albendazol sulfon) d) $m/z$ 295 (nepoznati TP3)	str. 39
Slika 31.[nastavak I] Profil stvaranja transformacijskih produkata albendazola u vodovodnoj vodi tijekom procesa biorazgradnje pod utjecajem aktivnog mulja:a) $m/z$ 266 (produktni ion albendazola) b) $m/z$ 282 (albendazol sulfoksid) c) $m/z$ 298 (albendazol sulfon) d) $m/z$ 295 (nepoznati TP3)	str. 40
Slika 32. Prikaz utjecaja radnih otopina albendazola različitih koncentracija na <i>Aspergillus niger</i> nakon 24 h inkubacije hranjivih podloga	str. 42
Slika 33. Prikaz utjecaja slijepih proba na <i>Aspergillus niger</i> nakon 24 sata inkubacije hranjivih podlog	str. 42

## 7.2. Popis tablica

Tablica 1. Fizikalno - kemijska svojstva albendazola	str. 5
Tablica 2. Popis korištenih kemikalija	str. 11
Tablica 3. Korišteni farmaceutik albendazol	str. 11
Tablica 4. Gradijent pokretne faze korišten u analizi	str. 21
Tablica 5. Gradijent pokretne faze korišten u analizi	str. 22
Tablica 6. Parametri MS analize (TOF)	str. 22
Tablica 7. Realni uzorci za koje se određivala zona inhibicije, pri čemu su se radila dva niza eksperimenata tj. po pet diskova natopljenih realnih uzorcima u svaku Petrijevu zdjelicu	str. 24
Tablica 8. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor FKIT	str. 28
Tablica 9. Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor FKIT 2	str. 29
Tablica 10. Prikaz vremena zadržavanja $t_R$ i površina ispod kromatografskih krivulja ( $A$ ) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT iz prvog eksperimenta	str. 32
Tablica 10 [nastavak I]. Prikaz vremena zadržavanja $t_R$ i površina ispod kromatografskih krivulja ( $A$ ) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT iz prvog eksperimenta	str. 33
Tablica 11. Prikaz nepoznatih kromatografskih krivulja na kromatogramu i pripadajućih apsorpcijskih spektara u uzorcima iz reaktora FKIT, iz prvog eksperimenta	str. 33
Tablica 12. Prikaz vremena zadržavanja $t_R$ i površina ispod kromatografskih krivulja ( $A$ ) očitanih iz kromatograma za realne uzorke iz reaktora FKIT 2 iz drugog eksperimenta	str. 34
Tablica 13. Prikaz nepoznatih kromatografskih krivulja na kromatogramu i pripadajućih apsorpcijskih spektara u uzorcima iz reaktora FKIT 2, iz drugog eksperimenta	str. 35
Tablica 14. Zone inhibicije nastale djelovanjem slijepih proba kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni <i>Aspergillus niger</i> od 7 dana	str. 41
Tablica 15. Zone inhibicije nastale djelovanjem radnih otopina albendazola kroz vremenski period inkubacije malt agara inokuliranog sporama plijesni <i>Aspergillus niger</i> od 7 dana	str. 42

### 7.3. Kratice i simboli

WWTPs- Wastewater Treatment Plant - postrojenje za obradu otpadnih voda

$K_{ow}$  – koeficijent raspodjele n-oktanol/voda

$S_w$  – topljivost u vodi (mg/L) kod 25 °C

TSO- temeljna standardna otopina

RO- radna otopina

TS- suha tvar

HPLC- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

UPLC- Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti

KPK-kemijska potrošnja kisika

MS- masena spektrometrija, maseni spektrometar

TP-transformacijski produkt

TIC-Total Ion Chromatogram-analiza MS-a kada se prate svi m/z

TOF- Time of flight-analizator

ESI-Electrospray Ionization-detektor

Formule:

- |   |         |
|---|---------|
| (1) – jednačba za određivanje zone inhibicije (Cooper)                                  | str. 10 |
| (2) –utjecaj temperature, sastava podloge i koncentraciju inokuluma                     | str. 10 |
| (3) - odnos između koncentracije aktivne tvari i dužine difuzije (unutar malih raspona) | str. 10 |
| (4) – Kemijska potrošnja kisika   | str. 20 |
| (5) –Ukupni broj stanica na 1cm <sup>3</sup> (1 mL)                                     | str. 25 |
| (6) –određivanje koncentracije pomoću površine ispod kromatografske krivulje            | str. 31 |

#### 7.4. Životopis

Rođena sam 23. listopada 1992. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Stjepana Radića u Božjakovini nakon koje sam se upisala u VII. Gimnaziju u Zagrebu, opći smjer. Gimnaziju sam završila 2011. Godine i te iste godine sam upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu sam odradila na Zavodu za javno zdravstvo Andrija Štampar, na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe u Laboratoriju za predmete koji dolaze u neposredni dodir s hranom. Od stranih jezika koristim engleski i njemački jezik u govoru i pismu. Računalno sam pismena.