

Određivanje toksičnosti i biorazgradivosti prioriternih onečišćivala

Puljiz, Marcela

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:881872>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marcela Puljiz

**ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI I BIORAZGRADIVOSTI
PRIORITETNIH ONEČIŠĆIVALA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

Članovi ispitnog povjerenstva: 1. prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
2. izv. prof. dr. sc. Šime Ukić
3. v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, srpanj 2018.

SAŽETAK

Usporedno s razvojem društva i tehnologije razvija se i kemijska industrija. Sjedilački način života, stres i loša prehrana rezultiraju povećanim brojem oboljelih, pa potreba za lijekovima i njihova konzumacija sve više raste. Svakodnevna uporaba farmaceutskih proizvoda dovodi do izlučivanja nemetaboliziranih aktivnih supstanci koje na kraju završavaju u vodenom okolišu. Uz farmaceutike raste i uporaba pesticida čije prekomjerno korištenje u poljoprivredi dovodi do njihove akumulacije u tlima, a time dospijevaju i u površinske te podzemne vode. Nekontrolirano ispuštanje farmaceutika i pesticida može rezultirati izrazito negativnim posljedicama na biosustav koji nas okružuje. Njihovo uklanjanje konvencionalnim metodama obrada otpadnih voda iznimno je male učinkovitosti, pa je nužno razviti adekvatne metode uklanjanja koje će biti sigurne i efikasne.

Cilj ovog rada bio je upoznati se s bioluminiscentnom metodom analize toksičnosti te metodama analize biorazgradivosti kroz ispitivanja otopina sedam pesticida (alaklor, atrazin, cibutrin, diuron, klorfenvinfos, izoproturon, simazin) i osam farmaceutika (azitromicin, eritromicin, deksametazon, diklofenak, karbamezapin, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, oksitetraciklin).

Ključne riječi: farmaceutici, pesticidi, *Vibrio fischeri* metoda analize toksičnosti, biorazgradivost.

SUMMARY

As society and technology advance, the chemical industry advances too. Modern way of living, stress, and bad nutritional habits lead to an ever increasing number of patients, which results in increasing pharmaceuticals demand and consumption. Daily use of pharmaceutical products results in excretion of non-metabolized active substances which end up in the water environment. The usage of pesticides is also growing, and their increased use in agriculture leads to bioaccumulation of pesticides in soils, which later shows in surface and underground waters. Unregulated discharge of pharmaceuticals and pesticides can result in extremely negative consequences for the environment which surrounds us. Conventional water treatment plants show low efficiency when it comes to removing the pollutants from water, so its necessary to develop methods which will be equally efficient and safe.

The aim of this paper is to get to know the bioluminescent method used for analyzing toxicity, and analytical methods for determination of biodegradability by analysis of seven pesticides (alachlor, atrazine, cybutrin, diuron, chlorpheninfos, isoproturon, simazine) and eight pharmaceuticals (azithromycin, erythromycin, dexamethasone, diclofenac, carbamazepine, 17- β estradiol, 17- α ethinylestradiol, oxytetracycline). Toxicity is determined using the bacteria *Vibrio fischeri*, to whom the presence of organic pollutants causes a reduction in their emission of light.

Key words: *pharmaceuticals, pesticides, Vibrio fischeri method of toxicity analysis, biodegradability*

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta „Modeliranje okolišnih aspekata napredne obrade voda za razgradnju prioriternih onečišćivala“ Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ONEČIŠĆENJE.....	2
2.1.1. PRIORITETNA ONEČIŠĆIVALA	2
2.2. FARMACEUTICI	4
2.2.1. FARMACEUTICI I ZAGAĐENJE OKOLIŠA	4
2.3. ISPITIVANI FARMACEUTICI	5
2.3.1. Azitromicin i eritromicin	5
2.3.2. Deksametazon.....	7
2.3.3. Diklofenak	7
2.3.4. Karbamezapin.....	8
2.3.5. 17 β -estradiol	9
2.3.6. 17 α -etinilestradiol.....	9
2.3.7. Oksitetraciklin	10
2.4. ISPITIVANI PESTICIDI.....	10
2.4.1. Alaklor	11
2.4.2. Atrazin	12
2.4.3. Cibutrin.....	12
2.4.4. Diuron.....	13
2.4.5. Klorfenvinfos.....	13
2.4.6. Izoproturon	14
2.4.7. Simazin	14
2.5. TOKSIČNOST	15
2.6. Bioluminencijska metoda	15

2.6.1. <i>Vibrio fischeri</i>	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. KEMIKALIJE	17
3.2. INSTRUMENTI	18
3.3. ANALITIČKE METODE	18
3.3.1. Toksičnost.....	18
3.3.2. Kemijska potrošnja kisika	18
3.3.3. Biokemijska potrošnja kisika.....	18
3.4. PROVEDBA EKSPERIMENTA	19
3.4.1. Priprema radnih otopina	19
3.4.2. Određivanje toksičnosti bakterijama <i>Vibrio fischeri</i>	19
3.4.3. Određivanje biorazgradivosti	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. TOKSIČNOST	21
4.2. BIORAZGRADIVOST	24
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Voda predstavlja neprocjenjivi resurs za održavanje života. Neophodna je za normalnu funkciju svakog živog organizma, ali također je od iznimne važnosti u kućanstvima, poljoprivrednim postrojenjima i gotovo svim granama industrijske proizvodnje i prerade. Kao posljedica razvoja društva i tehnologije ističe se povećana konzumacija vode što uzrokuje porast onečišćenja vode raznih podrijetla, kako organskim tako i anorganskim onečišćivalima. Upravo iz navedenih razloga važno je odrediti potrebu za vodom, te najbolje načine njenog iskorištavanja i očuvanja.

Važnost očuvanja vode prepoznata je na području Europske zajednice u okviru dokumenta Okvirne direktive o vodama. Okvirna direktiva o vodama je najznačajniji dokument na nivou Europske zajednice na području vodene politike, te među ostalim uspostavlja principe zaštite vode od onečišćenja. Strategija sprječavanja onečišćenja među ostalim uključuje i listu od 45 prioriternih tvari ili grupa tvari koje predstavljaju značajan rizik za vodeni okoliš. Posebno mjesto zauzimaju „nove onečišćujuće tvari“ gdje su svrstani i farmaceutici. [1]

U današnje doba sve veća pozornost pridaje se novim onečišćivalima poput pesticida i farmaceutika, koji u vode dospijevaju izravno, ili u obliku produkta njihove razgradnje. Posljedica uporabe farmaceutika i pesticida je njihova sve veća prisutnost u okolišu, gdje su s obzirom na njihova svojstva podložni raznim biotičkim i abiotičkim reakcijama. Kao produkti takvih reakcija javljaju se metaboliti koji s obzirom na svoja svojstva mogu biti topljiviji u vodi i toksičniji od samih početnih spojeva. Novija istraživanja povezuju ovakve spojeve s kancerogenim svojstvima, pa je zabrinjavajuća činjenica da su mnogi od njih pronađeni u malim koncentracijama u obrađenim otpadnim vodama, čak i u vodama za piće. [2]

S obzirom na navedene činjenice, javlja se sve veća potreba za praćenjem koncentracija farmaceutika, pesticida i njihovih metabolita, kao i razvitkom modernih i pristupačnih metoda koje bi omogućile sigurno i efikasno uklanjanje prioriternih onečišćivala iz vodenog okoliša. Napredni oksidacijski procesi (AOP) ističu se kao alternativa uobičajenim fizikalnim i kemijskim metodama obrade vode. Razvoj ovih procesa omogućio je učinkovito uklanjanje raznih organskih onečišćenja vode.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ONEČIŠĆENJE

Onečišćenje je izravno ili neizravno unošenje, izazvano ljudskom aktivnošću, tvari ili topline u zrak, vodu ili tlo, što može biti štetno za ljudsko zdravlje ili kvalitetu vodnih ekosustava ili kopnenih ekosustava izravno ovisnih o vodnim ekosustavima, koje dovodi do štete po materijalnu imovinu, šteti vrijednostima okoliša ili drugim legitimnim oblicima korištenja okoliša ili na njih utječe.[1] Izvori onečišćenja okoliša su mogu biti različitih podrijetla no ono što im je zajedničko je da ih većina proizlazi iz ljudskih aktivnosti. Mogu biti posljedica rada raznih industrija kao što su kemijska, petrokemijska i farmaceutska industrija, no također mogu dolaziti iz domaćinstava ili biti prouzročena poljoprivrednim aktivnostima. Razvojem industrije organske kemije povećala se svakodnevna primjena raznih organskih spojeva u kućanstvima u obliku lijekova, deterdženata i proizvoda za osobnu njegu. Kao posljedica toga povećava se koncentracija stabilnih organskih spojeva u vodama koji mogu dovesti do njenog onečišćenja, odnosno promjene fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava vode.

2.1.1. PRIORITETNA ONEČIŠĆIVALA

Kemijsko onečišćenje voda predstavlja veliku opasnost za okoliš u cjelini zbog niza negativnih efekata koje može izazvati, od bioakumulacije onečišćivala u biosustavima, kronične toksičnosti vodenih organizama i gubitka bioraznolikosti, pa sve do akutnih i kroničnih bolesti kod ljudi. U rujnu 2000. godine izglasana je Okvirna direktiva o vodama (eng. *Water Framework Directive*) od strane Europskog vijeća i Europskog parlamenta. Direktiva je stupila na snagu u prosincu 2000. godine, te je njen cilj uspostava okvira za zaštitu kvalitete voda unutar Europskih zemalja. Direktiva navodi listu od ukupno 45 prioriteta tvari koju čine 33 prioriteta onečišćivala (tablica 1., tvari 1-33) te 12 prioriteta toksičnih tvari (tablica 1., tvari 34-45). Lista je sastavljena od strane Europske komisije, Europske agencije za okoliš, te brojnih tvrtki i stručnjaka iz zemalja članica iz područja kemije i zagađenja okoliša. [1]

Tablica 1. Popis prioritetnih tvari u području vodne politike Europske unije, direktiva iz 2013. godine [1]

Broj	CAS broj	EU broj	Naziv prioritetne tvari
1	15972-60-8	240-110-8	Alaklor
2	120-12-7	204-371-1	Antracen
3	1912-24-9	217-617-8	Atrazin
4	71-43-2	200-753-7	Benzen
5	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Bromirani difenil-eteri
6	7440-43-9	231-152-8	Kadmij i njegovi spojevi
7	85535-84-8	287-476-5	Kloroalkani, C ₁₀₋₁₃
8	470-90-6	207-432-0	Klorofenvinfos
9	2921-88-2	220-864-4	Klorpirifos (klorpirifos-etil)
10	107-06-2	203-458-1	1,2-dikloroetan
11	75-09-2	200-838-9	Diklorometan
12	117-81-7	204-211-0	Di(2-etilheksil)ftalat (DEHP)
13	330-54-1	206-354-4	Diuron
14	115-29-7	204-079-4	Endosulfan
15	206-44-0	205-912-4	Fluoranten
16	118-74-1	204-273-9	Heksaklorobenzen
17	87-68-3	201-765-5	Heksaklorobutadien
18	608-73-1	210-168-9	Heksaklorocikloheksan
19	34123-59-6	251-835-4	Izoproturon
20	7439-92-1	231-100-4	Olovo i njegovi spojevi
21	7439-97-6	231-106-7	Živa i njezini spojevi
22	91-20-3	202-049-5	Naftalen
23	7440-02-0	231-111-4	Nikal i njegovi spojevi
24	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Nonilfenoli
25	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Oktilfenoli
26	608-93-5	210-172-0	Pentaklorobenzen
27	87-86-5	201-778-6	Pentaklorofenol
28	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Poliaromatski ugljikovodici (PAH)
29	122-34-9	204-535-2	Simazin
30	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Tributilkositreni spojevi
31	12002-48-1	234-413-4	Triklorobenzeni
32	67-66-3	200-663-8	Triklorometan (kloroform)
33	1582-09-8	216-428-8	Trifluralin
34	115-32-2	204-082-0	Dikofol
35	1763-23-1	217-179-8	Perfluorooktan sulfonička kiselina i njezini derivati (PFOS)
36	124495-18-7	ne primjenjuje se	Kinoksifen
37	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Dioksini i spojevi poput dioksina
38	74070-46-5	277-704-1	Aklonifen
39	42576-02-3	255-894-7	Bifenoks
40	28159-98-0	248-872-3	Cibutrin
41	52315-07-8	257-842-9	Cipermetrin
42	62-73-7	200-547-7	Diklorvos
43	ne primjenjuje se	ne primjenjuje se	Heksabromociklododekan (HBCDD)
44	76-44-8/1024-57-3	200-962-3/213-831-0	Heptaklor i heptaklor epoksid
45	886-50-0	212-950-5	Terbutrin

2.2. FARMACEUTICI

Farmaceutici su grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove te dodatke prehrani. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za dijagnosticiranje, liječenje i sprječavanje bolesti. [3] U farmaceutike ubrajamo i tvari za ubrzanje rasta mišića kod životinja.[4] Moderne farmaceutike karakterizira topljivost u vodi i liofilnost, kao i mala molarna masa ispod 500 Da. Upravo ta svojstva omogućavaju im biološku aktivnost i biorasploživost. Moderni farmaceutici dolaze u obliku tekućina i tableta. Čine ih farmaceutski aktivne tvari, aditivi, pomoćna sredstva, mirisi, boje i pigmenti. Neki lijekovi sadrže i aditive koji mogu utjecati na regulaciju hormona. [5,6]

Prema posljednjem Izvješću o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj za 2015. godinu, na lijekove je potrošeno ukupno 5.266.937.944 kuna, dok je 2014. godine ta brojka bila značajno manja, 4.005.884.342 kuna. Povećanje broja i starosti stanovništva, pojave novih bolesti, povećana potrošnja i porast tržišta su sve faktori koji utječu na povećanu konzumaciju proizvoda farmaceutske industrije te se tom trendu ne nazire skori kraj. [4]

2.2.1. FARMACEUTICI I ZAGAĐENJE OKOLIŠA

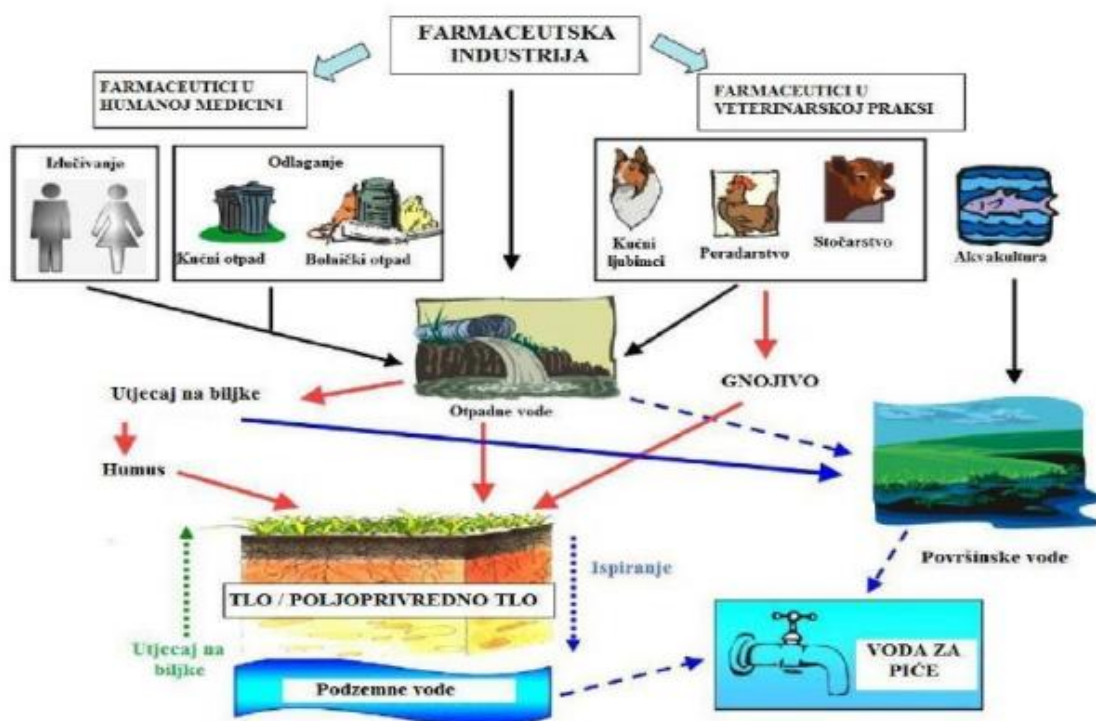
U novije doba, sve više pozornosti pridaje se kemijskom onečišćenju voda. Osobitu opasnost predstavljaju spojevi koji su toksični ili nisu razgradivi prirodnim putem a kao posebna skupina takvih spojeva izdvajaju se farmaceutici. Njihova stalna prisutnost u vodenim ekosustavima dovodi do rastuće zabrinutosti te potrebe za razvitkom novih pristupačnih tehnologija kojima bi se dovelo do njihovog učinkovitog uklanjanja.

Farmaceutici se svrstavaju u skupinu „novih onečišćivala“ upravo zato što njihov ekotoksikološki utjecaj, kao ni štetan utjecaj njihovih produkata još nisu dovoljno istraženi, niti su definirane njihove maksimalno dopuštene koncentracije u okolišu.[8] Općenito su prisutni u površinskim i podzemnim vodama, vodi za piće i kanalizacijskoj vodi u koje dospijevaju iz mnogih izvora kao što su otpadne vode iz kućanstava ili bolnica, postrojenja za obradu kanalizacija i voda, te nepropisnim otpuštanjima od strane proizvođača. [9]

Za primjenu u medicini koristi se preko 3000 farmaceutskih aktivnih spojeva koji na razne načine dospijevaju u okoliš, prema podacima Europske Unije. Širok raspon farmaceutika i proizvoda za osobnu njegu prijavljen je kao prioritetno onečišćivalo među kojima su antibiotici, antiseptici, analgetici, kontrasti mediji za X-zračenja i mnogi drugi.[10] Za neke od njih uključujući brojne antibiotike i estrogene smatra da opstaju u

okolišu kao posljedica stalnog otpuštanja ali se i uključuje mogućnost njihove nesposobnosti potpune biološke razgradnje.

U nastavku rada osvrnuti ću se na svojstva farmaceutika ispitivanih u ovom radu a to su: azitromicin, eritromicin, deksametazon, diklofenak, karbamezapin, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol i oksitetraciklin.



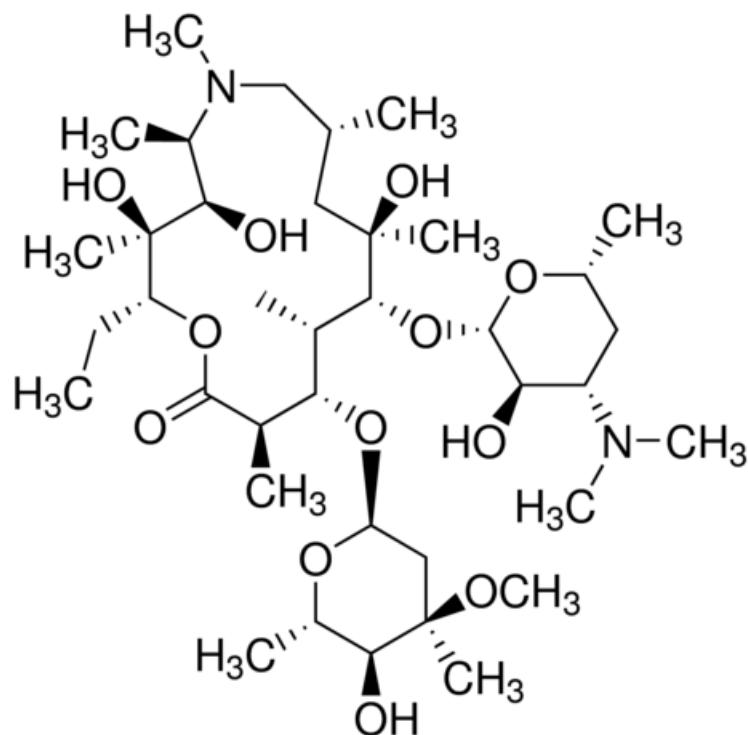
Slika 1. Putevi dospijevanja farmaceutika u okoliš [7]

2.3. ISPITIVANI FARMACEUTICI

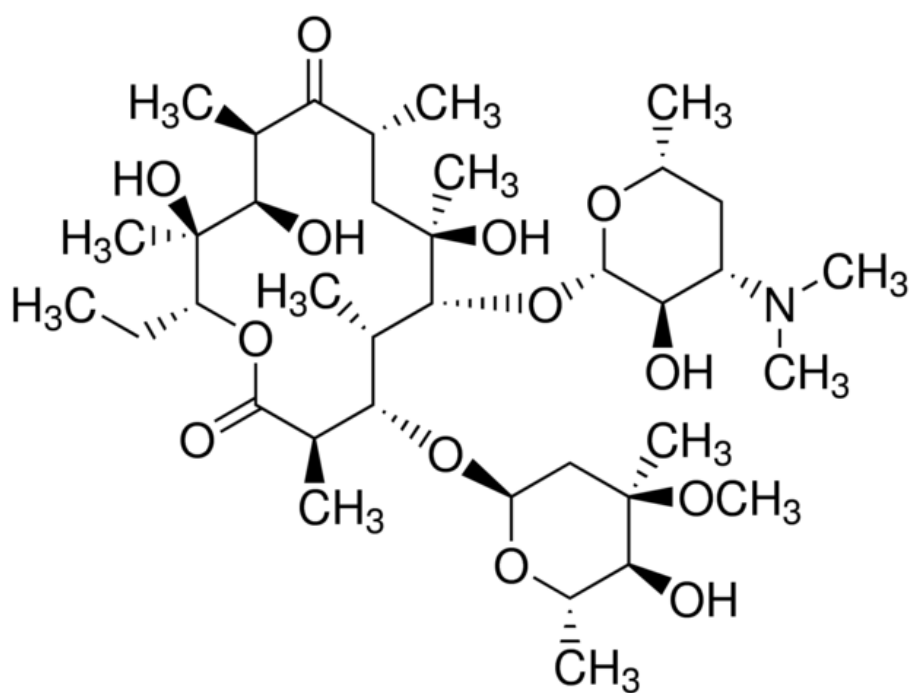
2.3.1. Azitromicin i eritromicin

Azitromicin (AZT) i eritromicin (ERM) su polusintetski makrolidni antibiotici iz klase azilida. Azitromicin je antibiotik koji uklanja mogućnost rasta i razmnožavanja bakterija sprječavajući translokacijski proces sinteze bakterijskih proteina. Koristi se za liječenje brojnih bakterijskih infekcija kao što su respiratorne infekcije, infekcije kože, infekcije ušiju, te za liječenje nekih spolno prenosivih bolesti. Do pojave antibiotika u okolišu, osobito u vodama, dolazi ukoliko aktivni sastojak lijeka nije u potpunosti metaboliziran u organizmu kojem je namijenjen.

Najveće koncentracije azitromicina i eritromicina pronađene su u otpadnim vodama, dok su prisutni i u površinskim vodama no u znatno manjim koncentracijama. [11]



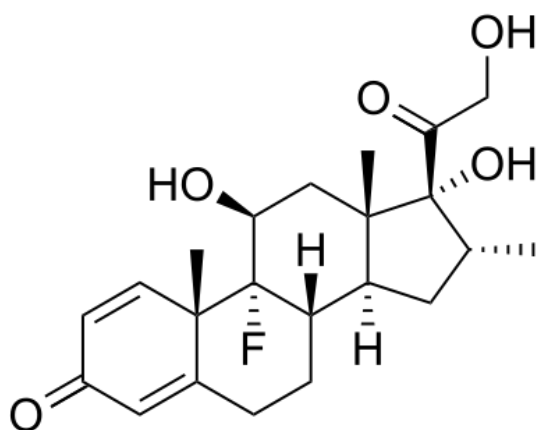
Slika 2. Molekulska struktura azitromicina



Slika 3. Molekulska struktura eritromicina

2.3.2. Deksametazon

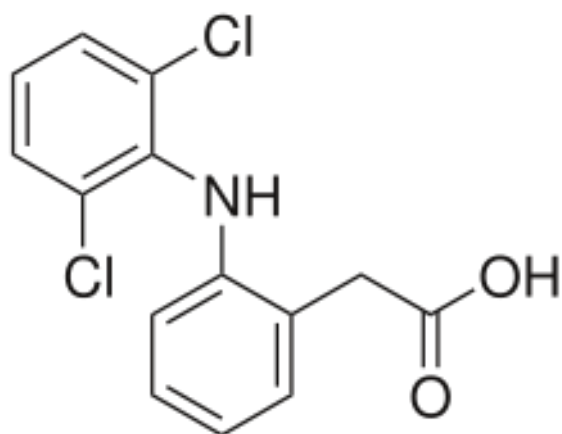
Deksametazon (DXT) je 9-flouro-glukokortikoid. Pripada klasi sintetskih adrenalnih kortikosteroida, a karakteriziraju ga jaka protuupalna svojstva.[12] Koristi se za liječenje alergija, astme, brojnih bolesti kože, reumatskih problema, te u kombinaciji s antibioticima pri liječenju tuberkuloze. Dugotrajno korištenje deksametazona može utjecati na gubitak koštane mase, slabost u mišićima, pojavu gljivičnih infekcija te pojavu mreine na oku. Zbog rastuće uporabe deksametazona kao i njegove proizvodnje, povećano je njegovo odlaganje u okolišu što dovodi do sve veće akumulacije u tlima, ali i otpadnim i površinskim vodama. Iz tih razloga važno je kontrolirati tok i razgradnju deksametazona u okolišu. [13]



Slika 4. Molekulska struktura deksametazona

2.3.3. Diklofenak

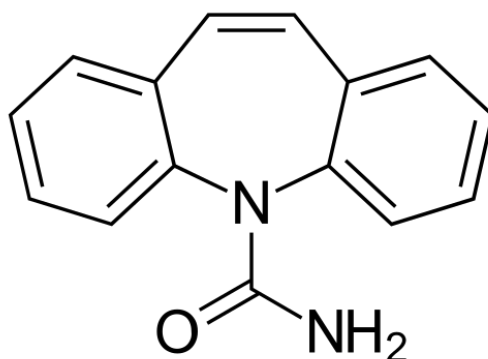
Diklofenak (DCF) je sintetički i nestereoidni protuupalni lijek. Većinom je dostupan u obliku natrijevih i kalijevih soli, a posjeduje jaka antiinflamatorna, analgetska i antipiretička svojstva. Koristi se kod liječenja osteoartritisa i reumatidnog artritisa, uganuća, iščašenja, sportskih ozljeda, prijeloma, upala tetiva i drugih zglobnih struktura. Njegova uporaba u veterinarskoj medicini je kontroverzna zbog dokazanih štetnih utjecaja na određene vodene organizme, kao i na ptice strvinare. Velika uporaba diklofenaka uzrokuje njegov kontinuirani dovod u okoliš gdje može doći do akumulacije i reakcija s drugim farmaceutskim spojevima, pa su nužna daljnja istraživanja kako bi se razvile optimalne metode njegova uklanjanja. [14]



Slika 5. Molekulska struktura diklofenaka

2.3.4. Karbamezapin

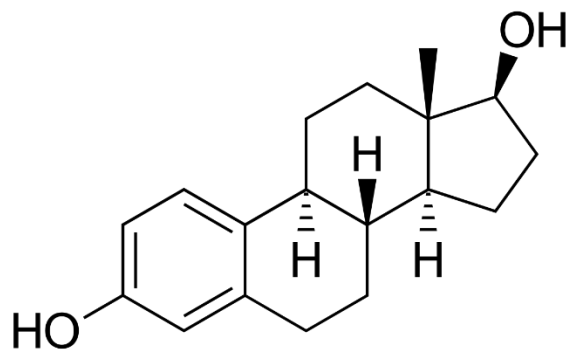
Karbamezapin (CBZ) je lijek široko korišten kod raznih psihijatrijskih bolesti. Strukturno pripada skupini tricikličkih antidepresiva, a djeluje na principu smanjenja živčanih signala koji uzrokuju napadaje i boli. Zbog svojih antiepileptičkih svojstava koristi se pri liječenju epilepsije, schizofrenije kao i kod bipolarnog poremećaja. Iako njegova analgetske karakteristike nisu mnogo istraživane, često se koristi za ublažavanje boli povezane s trigeminalnom neuropatijom. Dugotrajna uporaba karbamezapina može dovesti do promjena pri proizvodnji eritrocita i leukocita, aplastične anemije, smanjenja razine natrija u krvi, kao i do povećane suicidalnosti. [15]



Slika 6. Molekulska struktura karbamezapina

2.3.5. 17 β -estradiol

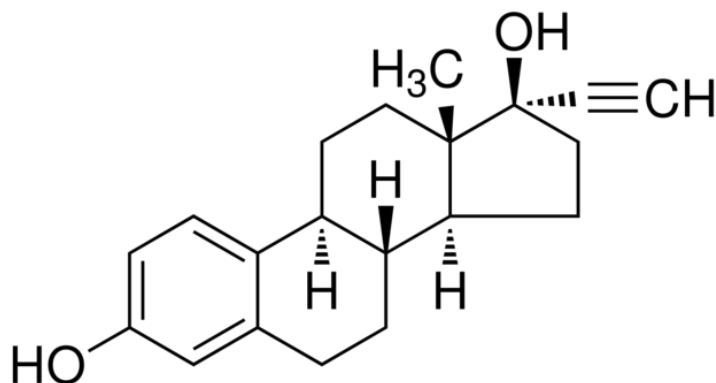
Estradiol (E2) je prirodni estrogenski steroidni hormon. Kao lijek, koristi se većinom u terapiji menopauze, te kod bolesti povezanih s manjkom ženskih spolnih hormona. [16] Također se upotrebljava kao kontracepcijsko sredstvo, i pri liječenju tumora osjetljivih na hormonalne promjene. Žene izlučuju i do 100 μ g po danu E2, dok se kod trudnica taj broj penje sve do 30 mg/dan. S obzirom na to, prisutnost estradiola u otpadnim vodama je iznimno velika. [17]



Slika 7. Molekulska struktura 17 β -estradiola

2.3.6. 17 α -etinilestradiol

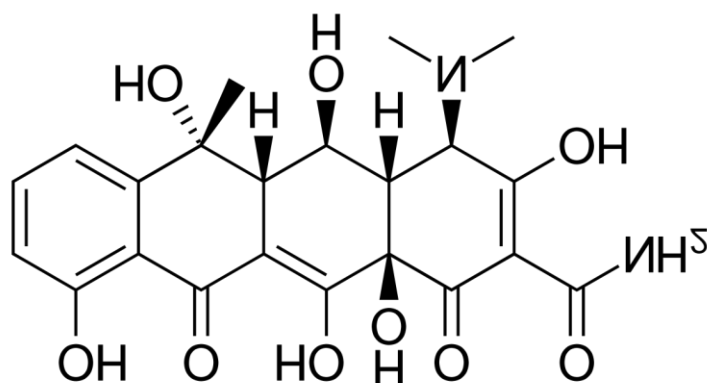
Etinilestradiol (EE2) je sintetski derivat estradiola. Poznat je kao iznimno jak estrogen, što je dokazano i u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima. Koristi se kao sastojak gotovo svih formulacija kombiniranih kontracepcijskih što ga čini poglavitim sintetskim lijekom korištenim u tu svrhu. Također se koristi pri liječenju simptoma menopauze, a u prošlosti se koristio i pri liječenju raka prostate. Glavna razlika u odnosu na estradiol je činjenica da etinilestradiol znatno dulje akumulira u okolišu. [17]



Slika 8. Molekulska struktura 17 α -etinilestradiola

2.3.7. Oksitetraciklin

Oksitetraciklin (OXY) je antibiotik širokog spektra iz klase tetraciklina. Zaustavlja sintezu esencijalnih proteina bakterija čime sprječava njihov rast i razmnožavanje. Usprkos tome, neke bakterije su razvile otpornost na njega, čime se smanjila njegova efikasnost pri liječenju nekih vrsta infekcija. Danas se koristi pri liječenju upale pluća, klamidije, infekcija oka i akni. Oksitetraciklin slabo metabolizira, te se većinom izlučuje u urinu nepromijenjen. Jako se adsorbira na tla bez obzira na njihovu vrstu, a pronađen je u koncentracijama i do 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, te u koncentracijama do 15 $\mu\text{g}/\text{l}$ u nekim podzemnim i površinskim vodama. Stoga, važno je osigurati efikasne i sigurne načine uklanjanja oksitetraciklina iz prirode. [18]



Slika 9. Molekulska struktura oksitetraciklina

2.4. ISPITIVANI PESTICIDI

Pesticidi predstavljaju tvar ili smjesu tvari koja je namijenjena za sprječavanje, uništavanje, odbijanje ili ublažavanje djelovanja štetnika, a mogu služiti i kao biljni regulatori, defolijanti ili sredstva za vezanje vode.[19] Usprkos svim prednostima koje donosi njihova uporaba u poljoprivredi, pesticidi mogu biti iznimno opasni za okoliš, ali i za zdravlje čovjeka. Naime, samo oko 1% upotrijebljenih pesticida vrši funkciju ubijanja štetnika, dok se ostatak gubi pri raspršivanju ili neopreznom odlaganju. Sudbina pesticida može biti njihova razgradnja, otapanje u površinskim vodama ili prijenos u podzemne vode, konzumacija od strane ciljanih organizama kao i konzumacija od strane organizama

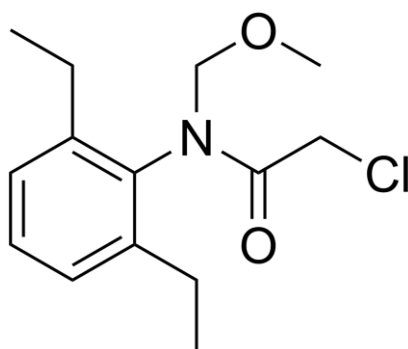
kojima nisu namijenjeni.[20] Posljedice toga su reakcije biotransformacije kao što su reakcije oksidacije i redukcije, čiji produkti ponekad mogu biti štetniji od samih pesticida.

Prema namjeni, razlikujemo više skupina pesticida. Herbicidi se koriste za ciljano uništavanje određenih vrsta biljaka i zauzimaju najveći dio svjetskog tržišta pesticida s 42%. Također imamo insekticide čija je namjena suzbijanje insekata, fungicide za gljivice, avicide za odbijanje ptica, rodenticide za odbijanje glodavaca itd. Većina korištenih kemikalija je iznimno stabilna te podložna bioakumulaciji koja može potrajati godinama. Pesticide sličnih kemijskih struktura odlikuju slična kemijska i fizikalna svojstva, topljivost u vodi, kao i slične razine toksičnosti i biorazgradivosti. S obzirom na kemijski sastav, pesticidi se dijele na karbamate, organofosfate, organoklorine, benzoidne kiseline, piretrine i piretroidi, triazine, derivate fenoksiacetata, ditiokarbamate, derivate glicina i derivate dipiridina. [21]

U nastavku osvrnuti ću se na svojstva pesticida ispitivanih u ovom radu: alaklor, atrazin, cibutrin, diuron, klorfenvinfos, izoproturon i simazin.

2.4.1. Alaklor

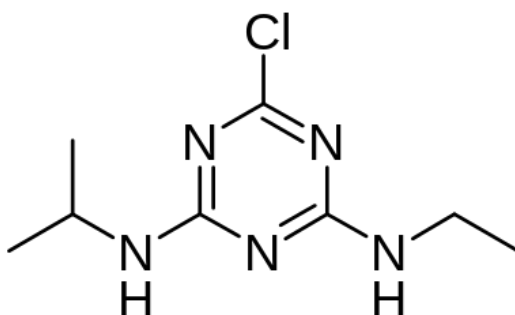
Alaklor (ALC) je široko uporabljeni pesticid iz skupine herbicida. Koristi se za kontroliranje mnogih vrsta korova, kao i jednogodišnjih trava. Vrijeme poluraspada u aerobnim uvjetima mu je između 6 i 15 dana, dok je u anaerobnim uvjetima znatno manje. Jednostavno dospijeva u podzemne vode, pa je nerijetko otkrivan i u površinskim vodama za piće. U skladu s tim naveden je kao prioritarno onečišćivalo u Okvirnoj direktivi o vodama Europske komisije. [1] Njegov utjecaj na ljudske organizme je iznimno štetan pa je njegova uporaba od 2006. godine zabranjena unutar Europske Unije. [22]



Slika 10. Molekulska struktura alaklora

2.4.2. Atrazin

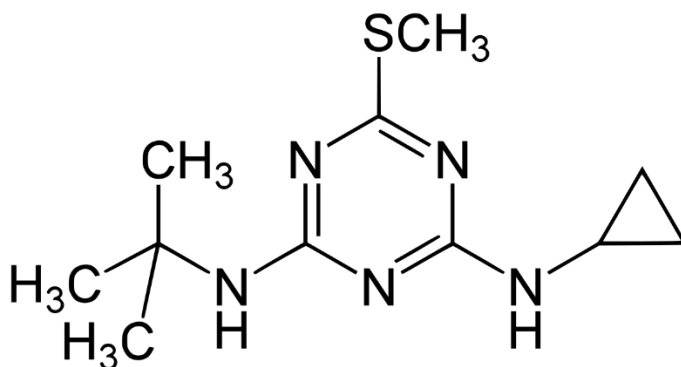
Atrazin (ATR) je herbicid iz skupine triazina korišten u svrhu prevencije i uklanjanja korova pri uzgoju šećerne repe i kukuruza, kao i u održavanju travnatih površina. Izrazita učinkovitost kao i niska cijene dovele su do dugogodišnjeg intenzivnog korištenja atrazina što je uzrokovalo njegovo nakupljanje u ekosustavu. Povišene koncentracije pronađene su u podzemnim, ali i pitkim vodama. Brojna istraživanja pokazala su da atrazin uzrokuje poremećaje endokrinog sustava, tumore i defekte na fetusima, te se s toga mora težiti njegovom uklanjanju iz ekosustava. [23]



Slika 11. Molekulska struktura atrazina

2.4.3. Cibutrin

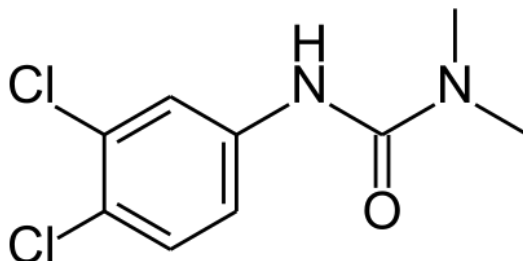
Cibutrin (CYB) je herbicid iznimne efektivnosti korišten u industriji boja i premaza. Takve boje pretežito se koriste za brodove i druge dijelove uronjene u vodu, gdje služi kako bi spriječio obrastanje površine, odnosno razvoj i rast algi, mahovina i bakterija. Sukladno s tim, najveće koncentracije cibutrina pronalaze se upravo u brodskim lukama. Sklon je fotokemijskim reakcijama, poglavito reakcijama degradacije čiji produkti inhibiraju rast morskog bilja. [24]



Slika 12. Molekulska struktura cibutrina

2.4.4. Diuron

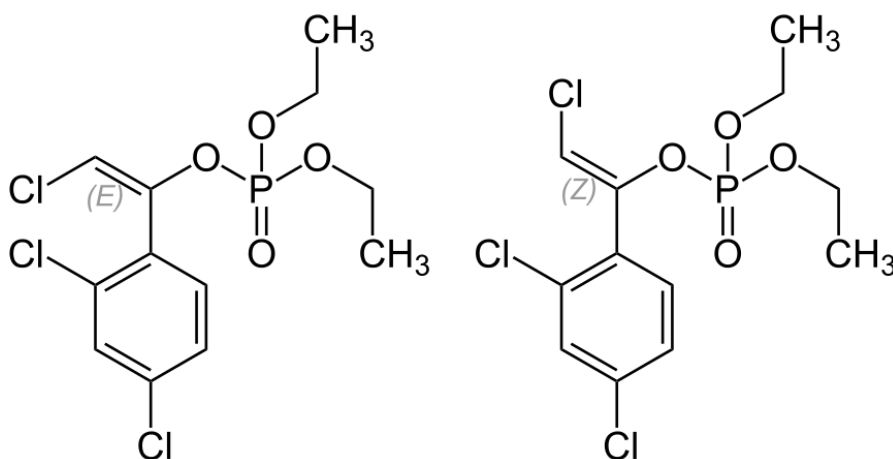
Diuron (DIU) je selektivni herbicid i algicid koji temelji svoje djelovanje na sprječavanju fotosinteze korova prije i nakon žetve. Odlikuje ga izrazita stabilnost što direktno uzrokuje njegovu akumulaciju u tlu. Pronalazimo ga u površinskim i podzemnim vodama u koje dopijeva pomoću kiše. Istraživanja provedena na životinjama upućuju na njegov štetni utjecaj u vidu poremećaja endokrinog sustava. [25]



Slika 13. Molekulska struktura diurona

2.4.5. Klorfenvinfos

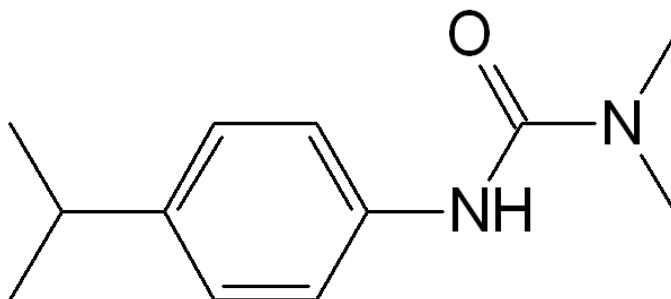
Klorfenvinfos (CFP) je insekticid iz skupine organofosfornih spojeva. Koristio se za uklanjanje muha i grinja u kućanstvima i na farmama, kao i za zaštitu životinja od buha. Danas je njegova uporaba zabranjena unutar Europske Unije i Sjedinjenih Američkih Država. Njegova prisutnost u ljudskom tijelu može uzrokovati anksioznost, depresiju a u težim slučajevima i komu. Prilikom uporabe, klorfenvinfos dolazi u okoliš na tla i površinske vode, a pomoću ispiranja kiše dolazi u podzemne vode.[26]



Slika 14. Molekulska struktura klorfenvinfos

2.4.6. Izoproturon

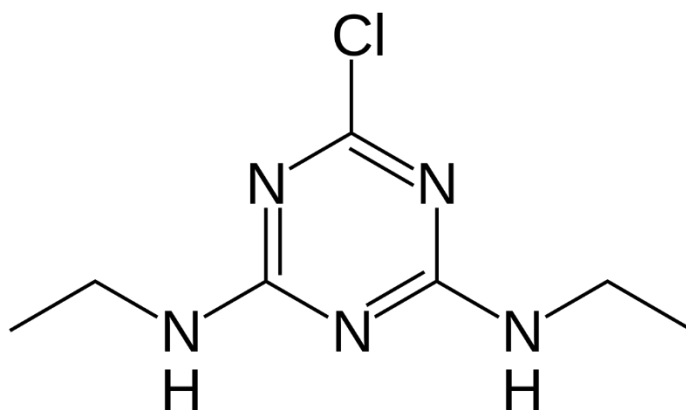
Izoproturon (IPT) je herbicid korišten za kontrolu godišnjih trava kao i mnogih širokolisnatih korova. Pripada skupini fenilurea. Očituje ga iznimna stabilnost pa ne podliježe adsorpciji u tlu već u njemu akumulira te je time sklon odlasku u površinske i podzemne vode. Vrijeme poluraspada u tlu mu je oko 40 dana dok u vodi oko 30. Predstavlja jedan od najkorištenijih herbicida na području Europe, no usprkos njegovim prednostima klasificiran je kancerogenim od strane Europske Komisije. [27]



Slika 15. Molekulska struktura izoproturona

2.4.7. Simazin

Simazin (SMZ) je neselektivni herbicid korišten za kontrolu godišnjih trava i korova, a može se koristiti i u kontroli algi i morskih trava. Pretežito se upotrebljava pri uzgoju bobičastog voća kao što su brusnica i borovnica. Pripada klasi triazina, odnosno njihovih derivata. Djelovanje simazina zasniva se na inhibiciji fotosinteze ciljane biljke, slično kao i atrazin, još jedan spoj također iz klase triazina. Štetno djelovanje na životinjske organizme u vidu poremećaja endokrinog sustava dovelo je do zabrane njegova korištenja na tlima Europe. [28]



Slika 16. Molekulska struktura simazina

2.5. TOKSIČNOST

Opasni čimbenici za okoliš kao što su štetne kemikalije iz industrija, otpadne vode iz kućanstava te gnojiva i pesticidi potekli s poljoprivrednih zemljišta, svi bivaju nošeni rijekama u mora i oceane čime izrazito zagađuju vodeni okoliš. Nakon dospijevanja u okoliš, ponašanje takvih spojeva ovisi o njihovim otpornostima na razne vrste razgradnje, primjerice fotokemijsku razgradnju, te ovisi o njihovom afinitetu za adsorpciju na krute čestice. Izrazita stabilnost pesticida i farmaceutika čini ih vrlo podložnima sorbiranju na krute matrice i akumulaciji u sedimentima i tlima. Nekontrolirano ispuštanje onečišćivala može imati izrazite negativne posljedice na biosustav koji nas okružuje, te prekomjerne koncentracije takvih spojeva mogu dovesti čak i do poremećaja hranidbenog lanca. Cilj zdravstvene ekologije svesti je koncentracije takvih onečišćivala na prihvatljive razine. Uklanjanje je često jako skupo, no nužno jer uništavanje okoliša ugrožava zdravlje ljudi, ali i ostalih bića zbog čega se ovaj problem posljednjih godina smatra prioritarnim. [3,5]

Fizikalne i kemijske analize nisu dovoljni pokazatelji štetnih učinaka zagađivala jer nam one daju informacije o prirodi ispitivanih tvari. Kako bismo mogli biti upoznati s biološkim utjecajem takvih onečišćivala na ljude i životinje, nužno je provesti testove toksičnosti. S obzirom na aktualnost problema, razvijeno je mnogo metoda određivanja toksičnosti među kojima su testovi na biljkama, algama, bakterijama pa čak i na ribama.

Najčešći oblik ispitivanja toksičnosti je mortalitet, a razlikujemo akutne i kronične testove toksičnosti. Akutnim testom ispituje se preživljavanje odabranih organizama u vremenskom periodu od 24 do 96 sati. Kronični test toksičnosti odvija se u trajanju od minimalno tjedan dana, a tim testom, osim samog preživljavanja organizma zagađenog ispitivanim uzorkom vode, ispituje se i utjecaj koji taj uzorak ima na organizme. Ti utjecaji najčešće se očituju kao poremećaji razmnožavanja i rasta. [29]

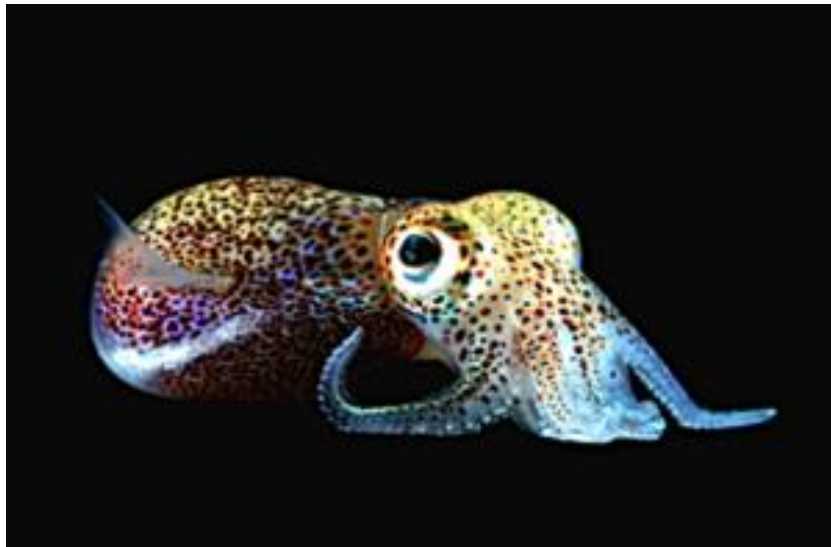
2.6. Bioluminiscencijska metoda

Bioluminiscencija je pojava do koje dolazi kada živi organizam ima sposobnost emisije vidljivog svjetla. Nastaje kao rezultat kemijske reakcije u kojoj dolazi do oksidacije molekule luciferina u oksiluciferin pri čemu dolazi do emisije svjetlosti. Brzinu takve reakcije određuje koncentracija enzima luciferaze. [30] U DIN-ovim standardima opisana su mjerenja biološke toksičnosti pomoću luminiscentnih bakterija, a mjeri se smanjenje intenziteta zračenja bakterija kao posljedica izlaganja zadanom toksičnom

uzorku vode. Ovakva mjerenja su u širokoj uporabi upravo zbog svoje jednostavnosti, niske cijene kao i kratkog vremena provođenja testa biološke toksičnosti.

2.6.1. *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri, poznate i kao *fotobakterije fisheri*, su Gram-negativne, nepatogene bakterije u obliku štapića, rasprostranjene u subtropskim i umjerenim morskim sustavima. Ime su dobile po njemačkom mikrobiologu Bernhardu Fisheru. Luminiscenciju proizvode ekspresijom lux operona kojeg čini mala skupina gena koje pronalazimo i kod bakterija iz skupine *Vibrionaceae*. Mogu se pronaći kao slobodni(planktonski) organizmi, ili češće u simbiozi s određenim vrstama lignji i riba (slika 16.) kojima luminiscencija bakterija služi pri privlačenju plijena ili pri kamuflaži. [31]



Slika 17. Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijama *Vibrio fischeri* [32]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

Kemikalije korištene pri pripremi otopina farmaceutika i pesticida su:

- ultra čista voda
- alaklor, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- atrazin, 99,1 %, Sigma-Aldrich
- klorfenvinfos, 97,1 %, Sigma-Aldrich
- cibutrin, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- diuron, 99,6 %, Sigma-Aldrich
- izoproturon, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- simazin, 99,9 %, Sigma-Aldrich
- azitromicin, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- eritromicin, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- deksametazon, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- diklofenak, 99,6 %, Sigma-Aldrich
- karbamazepin 99,6 %, Sigma-Aldrich
- 17 β -estradiol, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- 17 α -etinilestradiol, 99,8%, Sigma-Aldrich
- oksitetraciklin, 99,8 %, Sigma-Aldrich

Za podešavanje uvjeta u ispitivanim sustavima koristili su se:

- Natrijev hidroksid, NaOH, Kemika , 98%
- Sumporna kiselina, H₂SO₄, Kemika, 96%
- Natrijev klorid, NaCl, Kemika, pa.a.

Kemikalije korištene za određivanje toksičnosti i biorazgradivosti:

- Bio Fix Lumi Reconstituion sol
- Bio Fix Lumi Medium for freeze-dried luminous bacteria

3.2. INSTRUMENTI

- BioFix Lumi-10, Luminometar, Macherey-Nagel
- UV/VIS spektrofotometar, Perkin Elmer Lambda EZ 201
- DR 2800 spectrophotometer, Hach Lange
- Prenosivi pH metar, Handylab pH/LF, Schott Instruments GmbH

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Toksičnost

Toksičnost vodenih otopina farmaceutika i pesticida određena je mjerenjem pomoću luminiscentnih bakterija *Vibrio fischeri* u skladu s međunarodnim standardom (ISO11348-3) koristeći luminometar BioFix Lumi-10, Macherey-Nagel. Mjeri se smanjenje luminiscencije bakterija, odnosno inhibirajući učinak vodenih otopina na emisiju svjetla bakterija *Vibrio fischeri*. Kriterij testa je smanjenje luminiscencije bakterija nakon 15 minuta izlaganja. Dobivena inhibicija izražava se pomoću EC_{50} koja se lako može preračunati u jedinice toksičnosti, TU, prema izrazu $TU=(100 / EC_{50}\%)$.

3.3.2. Kemijska potrošnja kisika

Kemijska potrošnja kisika ili KPK je potrebna količina kisika za potpuno oksidaciju organskih i anorganskih tvari u zadanom uzorku vode. U ovom radu KPK mjerena je kolorimetrijski, uz uporabu seta reagensa. Koristio se spektrofotometar DR 2800 spectrophotometer, Hach Lange.

3.3.3. Biokemijska potrošnja kisika

Biokemijska potrošnja kisika ili BPK₅ predstavlja otopljenu količinu kisika potrebnu aerobnim organizmima u vodama za razgradnju organskih tvari prisutnih u danom uzorku. Stupanj organskog zagađenja vode najčešće se izražava pomoću BPK₅ vrijednosti izraženoj u miligramima kisika iskorištenog po litri uzorka vode. U ovom radu mjerena je koristeći spektrofotometar DR 2800 spectrophotometer, Hach Lange.

3.4. PROVEDBA EKSPERIMENTA

3.4.1. Priprema radnih otopina

Eksperimenti su provedeni pripremom sintetskih otopina preciznim vaganjem i otapanjem točno određenih masa ispitivanih farmaceutika i pesticida. Pripremaju se temeljne standardne otopine molarni koncentracija specifičnih za svaki ispitivani spoj. Korišteno otapalo je ultra čista voda a tijekom priprave korištene su odmjerne tikvice od 1000 ml. U tablici 2. prikazane su odvagane mase zadanih farmaceutika i pesticida na preciznoj analitičkoj vagi, kao i koncentracije prioritetnih onečišćivala u pripremljenim otopinama.

Tablica 2. Odvage i koncentracije otopina zadanih prioritetnih onečišćivala

Prioritetno onečišćivalo	Odvagana masa / g	<i>c</i> (PO) / mM
Alaklor	27,00	0,10
Atrazin	5,40	0,03
Klorfenvinfos	35,90	0,10
Cibutrin	7,59	0,03
Diuron	11,65	0,05
Izoproturon	20,60	0,10
Simazin	6,06	0,03
Azitromicin	74,90	0,10
Eritromicin	73,40	0,10
Deksametazon	38,10	0,10
Diklofenak	29,60	0,10
Karbamezapin	12,80	0,05
17 β -estradiol	2,70	0,01
17 α -etinilestradiol	2,90	0,01
Oksitetraciklin	46,00	0,10

3.4.2. Određivanje toksičnosti bakterijama *Vibrio fischeri*

Toksičnost uzoraka prioritetnih onečišćivala određena je korištenjem bakterija *Vibrio fischeri* kao testnog organizma prema međunarodnom standardu ISO 11348-3. Bakterije *Vibrio fischeri* odabrane su upravo zbog svoje iznimne osjetljivosti unutar vrlo širokog raspona toksičnih tvari. Bakterije su isto tako osjetljive i na okolišne uvjete, pa je

iz tog razloga prije početka mjerenja nužno podesiti pH otopina na vrijednosti u rasponu od 6,8 do 7,2 i u njih dodati 2% NaCl. Također je potrebno termostatirati otopine na 15°C.

Priprema bakterija zahtijeva 1 mL otopine „Bio Fix Lumi Reconstituion sol“ koja se dodaje u bočicu *Vibrio fischeri*. Zatim se dodaje 50 mL „Bio Fix Lumi Medium for freeze-dried luminous bacteria“ te se sve zajedno prenese u čašu od 100 mL te pusti da odstoji 15 minuta. Nužno je i pripremiti referentnu kivetu slijepe probe koja se sastoji od bakterijske suspenzije i 2% NaCl.

Metoda određivanja toksičnosti zasniva se na smanjenju luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri*. Mjerenje se provodi tako da se u kivetu za ispitivanje stave različita razrijeđenja ispitivanog uzorka te se mjeri smanjenje luminiscencije bakterija u periodu od 15 minuta inkubacije. Dobivena inhibicija izražava se pomoću EC_{50} koja se lako može preračunati u jedinice toksičnosti, TU, prema izrazu $TU=(100 / EC_{50}\%)$.

3.4.3. Određivanje biorazgradivosti

Općenito, biorazgradivost kao pokazatelj kvalitete vode se može se kroz omjer biokemijske potrošnje kisika (BPK₅) i kemijske potrošnje kisika (KPK). Smatra se da kad je $BPK_5/KPK \geq 0.4$, voda je biorazgradiva odnosno podložna biološkoj razgradnji. [33]

Biokemijska potrošnja kisika eksperimentalno se određuje koristeći setove reagensa LCK554 BOD, Hach Lange. Prema normi HRN EN 1899-1:2004 biokemijska potrošnja kisika određena je nakon 5 dana. Kemijska potrošnja kisika određena je prema normi HRN ISO 15705:2003 uz pomoć setova reagensa LCK 414 COD, Hach Lange.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je i prije navedeno, cilj ovog rada bio je upoznati se s metodama određivanja toksičnosti i biorazgradivosti. Za potrebe istog rađeni su eksperimenti na otopinama sedam pesticida (alaklor, atrazin, cibutrin, diuron, klorfenvinfos, izoproturon, simazin) i osam farmaceutika (azitromicin, eritromicin, deksametazon, diklofenak, karbamezapin, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, oksitetraciklin). Ispitivanja toksičnosti i biorazgradivosti čistih aktivnih spojeva nužna su kako bi se mogle pratiti kretnje spojeva i njihovih metabolita nakon što dospiju u vodeni okoliš, i time odrediti da li se toksičnost metabolita smanjila ili povećala u odnosu na početni spoj. U provedi eksperimenta toksičnost se odredila pomoću bioluminiscentnih bakterija *Vibrio fischeri*, a biorazgradivost se računala kao omjer biokemijske potrošnje kisika i kemijske potrošnje kisika koje su određene spektrofotometrijski pomoću setova reagensa.

4.1. TOKSIČNOST

U tablici 3. navedeni su ispitivani farmaceutici, njihove molekulske formule, pripadajuće molarne mase i dobiveni rezultati toksičnosti izraženi kao vrijednosti EC₅₀ koja predstavlja koncentraciju onečišćivala pri kojoj je luminiscencija inhibirana za 50%

Tablica 3. Ispitivani farmaceutici, njihove molekulske formule i molarne mase te dobivene EC₅₀ vrijednosti

Farmaceutik	Molekulska formula	M / g/mol	EC ₅₀ / mg/L
Azitromicin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748,52	41,68
Eritromicin	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,94	26,00
Deksametazon	C ₂₂ H ₁₈ FO ₅	381,38	13,85
Diklofenak	C ₁₄ H ₁₁ C ₁₂ NO ₂	296,15	8,98
Karbamezapin	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,27	12,18
17 β -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,39	1,36
17 α -etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,41	1,70
Oksitetraciklin	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,66	29,17

Uspoređujući toksičnosti ispitivanih farmaceutika izražene pomoću EC₅₀ vrijednosti odmah je uočljivo da estrogini hormoni pokazuju najvišu toksičnost. 17 β -estradiol ima najnižu vrijednost od 1,36 mg/L što znači da već pri izrazito niskim koncentracijama dolazi do smanjenja luminiscencije bakterija za 50%. 17 α -etinilestradiol

je sintetski derivat 17 β -estradiola i njegova primarna karakteristika zbog koje je proizveden je da bude manje toksičan od estradiola, s obzirom da su estrogini hormoni jedna od skupina farmaceutika koja najviše dopijeva u vodeni okoliš. Upravo to je i vidljivo iz prikazanih rezultata toksičnosti.

Diklofenak, karbamazepin i deksametazon predstavljaju različite skupine farmaceutika, a zajednička im je srednja vrijednost toksičnosti u rasponu farmaceutika ispitivanih u ovom radu. Diklofenak se pokazao najtoksičnijim od tri navedena farmaceutika. Najčešće je korišten nestereoidni reumatik i jako često se ispušta u okoliš pa je bitno biti upoznat s njegovom toksičnošću, te kontrolirati njegove koncentracije u vodenom okolišu. Nešto veće koncentracije karbamazepina potrebne su kako bi se inhibiralo 50% luminiscencije. On je triciklički antidepresiv i jedan od najkorištenijih lijekova za psihijatrijske bolesti. Deksametazon, 9-fluoro-glukokortikoid iz klase sintetskih adrenalnih kortikosteroida, pokazuje sličnu no nešto nižu toksičnost u odnosu na karbamazepin. Oksitetraciklin je antibiotik širokog spektra iz klase tetraciklina. Znatno je manje toksičan u odnosu na prethodno navedene farmaceutike, s koncentracijom od 29,17 mg/L potrebnom kako bi se luminiscencija *Vibrio fischeri* smanjila na polovicu početne vrijednosti.

Najnižu toksičnost od ispitivanih farmaceutika pokazali su makrolidni antibiotici iz klase azilida: azitromicin i eritromicin. Toksičnost eritromicina slična je onoj oksitetraciklina s vrijednošću EC₅₀ od 26,00 mg/L. Rezultati analize toksičnosti pokazali su kako je azitromicina najmanje toksičan od svih ispitanih farmaceutika.

U tablici 4. prikazani su ispitivani pesticidi, njihove molekulske formule i molarne mase te eksperimentalno dobiveni rezultati toksičnosti izraženi pomoću EC₅₀ vrijednosti koja govori o koncentraciji pesticida potrebnoj za inhibiciju bioluminiscencije za 50%

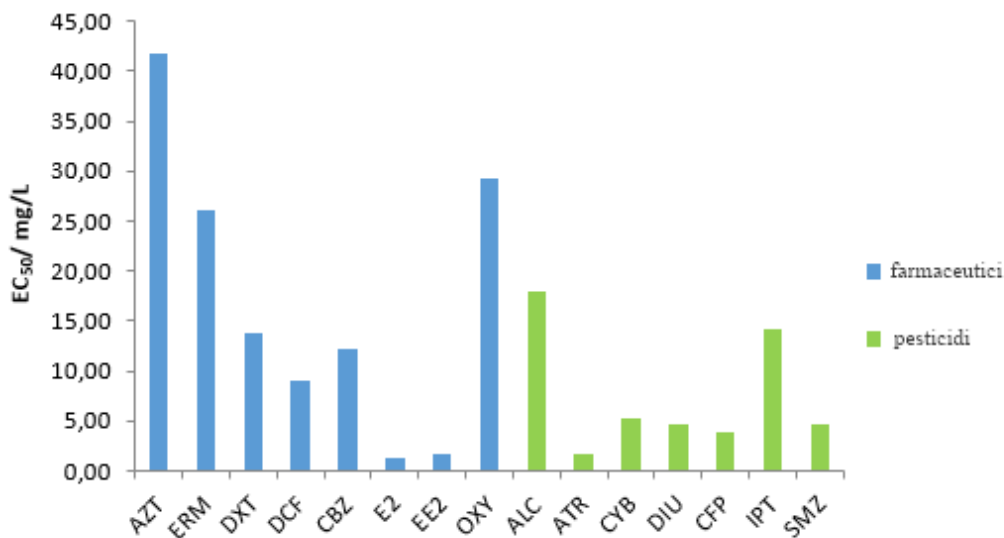
Tablica 4. Ispitivani pesticidi, njihove molekulske formule i molarne mase te dobivene EC₅₀ vrijednosti

Pesticid	Molekulska formula	M / g/mol	EC ₅₀ / mg/L
Alaklor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,77	17,98
Atrazin	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,68	1,69
Cibutrin	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	253,37	5,30
Diuron	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,09	4,62
Klorfenvinfos	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	359,54	3,81
Izoproturon	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206,29	14,26
Simazin	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,66	4,61

Većina ispitivanih pesticida su herbicidi koji pripadaju različitim klasama spojeva, dok je jedino klorfenvinfos insekticid. Atrazin je herbicid iz klase triazina. Pokazao se kao najtoksičniji pesticid od svih ispitivanih u ovom radu, s koncentracijom od samo 1,69 mg/L potrebnom za inhibiciju 50% luminiscencije bakterija. To je u skladu s očekivanjima, s obzirom da je uporaba atrazina povezana s brojnim štetnim posljedicama za ljudsko zdravlje, no atrazin i dalje ostaje najkorišteniji herbicid na svijetu. Iz klase triazina ispitvana je i toksičnost simazina koji je također iznimno toksičan s EC_{50} vrijednosti od 4.61 mg/L.

Po toksičnosti ga slijedi insekticid klorfenvinfos iz skupine organofosfata. Njegova je uporaba, zbog izrazite toksičnosti i iznimno negativnih utjecaja na ljudsko i životinjsko zdravlje, zabranjena diljem Europe i Sjedinjenih Američkih Država. Slične vrijednosti toksičnosti pokazuju herbicidi cibutrin i diuron, od kojih je diuron ipak nešto toksičniji. Znanтно više koncentracije izoproturona od 14,26 mg/L potrebne su za prepolavljanje luminiscencije, čime je izoproturon znatno manje toksičan od prethodnih spojeva.

Kao najmanje toksičan od ispitivanih pesticida ističe se alaklor, čija koncentracija od 17,98 mg/L uzrokuje inhibiciju bioluminiscencije *Vibrio fisheri* za 50%.



Slika 17. Grafički prikaz toksičnosti EC_{50} za ispitivane farmaceutike i pesticide

Uspoređujući vrijednosti toksičnosti EC_{50} pesticida i farmaceutika (slika 17) vidljivo je su općenito pesticidi pokazani toksičnijima od farmaceutika. Najtoksičnijim prioriternim onečišćivalima pokazali su se estrogini hormoni 17β -estradiol i 17α -etinilestradiol. Slijede ih herbicidi iz klase triazina, atrazin i simazin. Najmanju

vrijednost toksičnosti pokazuje makrolidni antibiotik azitromicin, a najmanje toksičan pesticid je herbicid alaklor.

4.2. BIORAZGRADIVOST

U tablici 5. prikazane su izmjerene vrijednosti biokemijske potrošnje kisika, kemijske potrošnje kisika, te izračunate vrijednosti biorazgradivosti dobivene omjerom BPK₅ i KPK za farmaceutike ispitane u ovom radu. Vrijednosti dobivene za osam ispitivanih farmaceutika znatno su manje od referentne vrijednosti 0,4, što znači da niti jedan od ispitivanih uzoraka nije biorazgradiv.

Tablica 5. Ispitivani farmaceutici i dobivene vrijednosti BPK₅, KPK i BPK₅/KPK

Farmaceutik	BPK ₅ / mg/L O ₂	KPK/ mg/L O ₂	BPK ₅ /KPK
Azitromicin	1,70	147,08	0,01
Eritromicin	1,61	146,86	0,01
Deksametazon	1,76	72,99	0,02
Diklofenak	0,83	64,09	0,01
Karbamezapin	1,38	42,11	0,03
17β-estradiol	2,28	15,96	0,14
17α-etinilestradiol	2,20	13,21	0,17
Oksitetraciklin	0,50	58,92	0,01

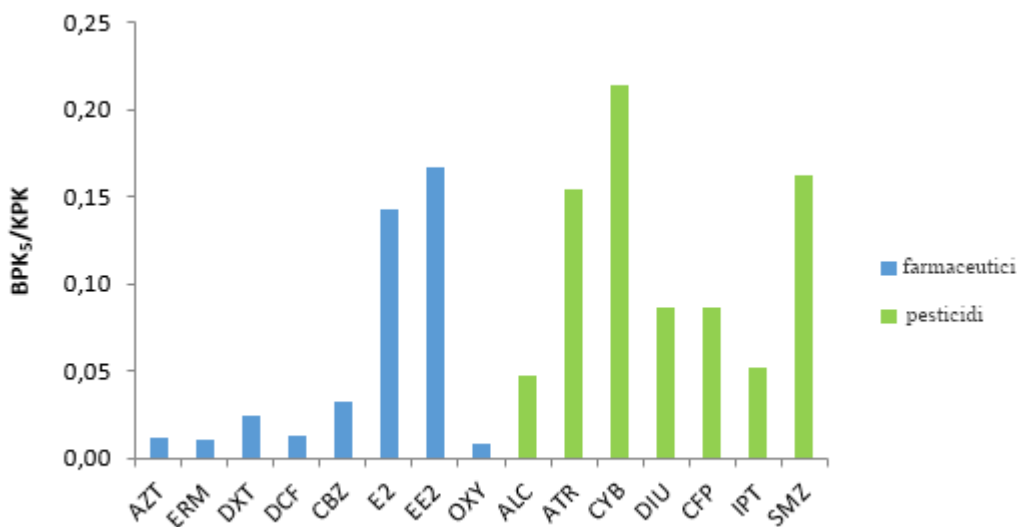
Najmanju biorazgradivost pokazuju uzorci azitromicina, eritromicina, diklofenka i oksitetraciklina s BPK₅/KPK od 0,01. Slijede deksametazon i karbamazepin. Estrogeni hormoni 17β-estradiol i 17α-etinilestradiol pokazuju nešto višu vrijednost omjera BPK₅ i KPK, 0,14 i 0,17, no i dalje nedovoljno veliku kako bi se smatrali biorazgradivima.

Koristeći tablicu 6. možemo sagledati i usporediti biorazgradivosti pesticida ispitivanih u ovom radu.

Tablica 6. Ispitivani pesticidi i dobivene vrijednosti BPK₅, KPK i BPK₅/KPK

Pesticid	BPK ₅ / mg/L O ₂	KPK/ mg/L O ₂	BPK ₅ /KPK
Alaklor	2,74	57,38	0,05
Atrazin	2,76	17,93	0,15
Cibutrin	2,53	11,80	0,21
Diuron	2,85	32,99	0,09
Klorfenvinfos	3,80	43,98	0,09
Izoproturon	2,20	42,00	0,05
Simazin	2,31	14,20	0,16

Vidljivo je kako ni jedna otopina pesticida ne zadovoljava uvjet biorazgradivosti ($BPK_5/KPK \geq 0,4$). Najniže omjere pokazali su izoproturon i alaklor i time su najmanje biorazgradivi od odabranih pesticida, a slijede ih diuron i klorfenvinfos. Atrazin, simazin i ciburtrin imaju nešto više vrijednosti biorazgradivosti od kojih ciburtrin ima najvišu koja iznosi 0,21.



Slika 18. Grafički prikaz biorazgradivosti BPK_5/KPK za ispitivane farmaceutike i pesticide

Sva ispitivana prioriteta onečišćivala pokazala su jako niske vrijednosti omjera BPK_5/KPK , što nam govori da mjereni uzorci nisu podložni biološkoj razgradnji. Iz slike 18. vidljivo je da, kao skupina, pesticidi pokazuju znatno veće vrijednosti omjera BPK_5/KPK od farmaceutika. BPK_5/KPK vrijednosti općenito su najviše kod herbicida ciburtrina, dok su estrogini hormoni E2 i EE2 jedini farmaceutici koji pokazuju više vrijednosti omjera. Spojeve koji su najmanje podložni biološkoj razgradnji čine farmaceutici i to azitromicin, eritromicin, diklofenak i oksiteraciklin koji svi imaju omjer BPK_5/KPK od 0,01.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je upoznati se s bioluminiscentnom metodom analize toksičnosti i metodama analize biorazgradivosti kroz ispitivanja 15 prioriternih onečišćivala, od kojih je 8 farmaceutika (azitromicin, eritromicin, deksametazon, diklofenak, karbamezapin, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, oksitetraciklin) i 7 pesticida (alaklor, atrazin, ciburtrin, diuron, klorfenvinfos, izoproturon, simazin). Za mjerenje toksičnosti navedenih prioriternih onečišćivala koristile su se bakterije *Vibrio fisheri* koje prirodno luminisciraju te se mjerila inhibicija luminiscenije uzrokovana dodavanjem otopina ispitivanih onečišćivala. Biorazgradivost računata je omjerom biokemijske i kemijske potrošnje kisika, koje su određene pomoću setova reagensa prema normama HRN EN 1899-1:2004 za BPK₅, te HRN ISO 15705:2003 za KPK.

Na temelju provedenih eksperimenata uočeno je:

- 1) od ispitivanih farmaceutika i pesticida, pesticidi su kao skupina toksičniji od farmaceutika, iako su najveću toksičnost pokazali estrogini hormoni 17 β -estradiol i 17 α -etinilestradiol.
- 2) najtoksičnijim pesticidom pokazao se atrazin iz klase triazina, dok je najmanje toksičan herbicid alaklor
- 3) niti jedan od istraživanih spojeva nije se pokazao podložnim biološkoj razgradnji, iako su načelno pesticidi pokazali nešto veće vrijednosti omjera BPK₅/KPK

6. LITERATURA

1. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/hr/txt/html/?uri=celex:32013l0039&from=en> (pristupila lipanj 2018.)
2. B. Roig, Pharmaceuticals in the Environment: Current knowledge and need assessment to reduce presence and impact, IWA Publishing, London, New York, 2010.
3. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
4. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji* **65** (2016) 471-482.
5. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode* **24** (2016) 119-134.
6. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the Environment, *The Annual Review of Environment and Resources* **35** (2010) 57-69.
7. V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment, *Trends in Analytical Chemistry* **26** (2007) 534-540.
8. M. Petrovic, S. Perez, D. Barcelo, Comprehensive analytical chemistry: analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle, Vol. 62, Elsevier, Amsterdam, 2013
9. Y. Yang, Y. Sik Ok, K.-H. Kim, E.E. Kwon, Y.F. Tsang, Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review, *Science of the Total Environment* **596-597** (2017) 303-320.
10. S.A. Snyder, P. Westerhoff, Y. Yoon, and D. L. Sedlak, Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in Water: Implications for the Water Industry, *Environmental Engineering Science* **20** (2003) 449-469.
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043> (pristupila lipanj 2018.)
12. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743> (pristupila lipanj 2018.)
13. <https://www.drugs.com/dexamethasone.html> (pristupila lipanj 2018.)
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3033> (pristupila lipanj 2018.)
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554> (pristupila lipanj 2018.)
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757> (pristupila lipanj 2018.)

17. J. de Rudder, T. Van de Wiele, W. Dhooghe, F. Comhaire, W. Verstraete, Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2), *Water Research* **38** (2004) 184-192.
18. M. Harja, G. Ciobanu, Studies on adsorption of oxytetracycline from aqueous solutions onto hydroxyapatite, *Science of the Total Environment* **628-629** (2018) 36-43.
19. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients> (pristupila lipanj 2018.)
20. C. Lourencetti, M.R.R. Marchi, M.L. Ribeiro, Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV, *Talanta* **77** (2008) 701-709.
21. A.C. Andreazza, G. Scola, Toxicology Studies: Cells, Drugs and Environment, IntechOpen, Rijeka, 2015.
22. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alachlor> (pristupila lipanj 2018.)
23. Y.C. Lu, F. Luo, Z. Pu, S. Zhang, M. T. Huang, H. Yang, Enhanced detoxification and degradation of herbicide atrazine by a group of O-methyltransferases in rice, *Chemosphere* **165** (2016) 487-496.
24. F. Gallucci, I.B. de Castro, F.C. Perina, D.M. de Souza Abessa, A. de Paula Teixeira, Ecological effects of Irgarol 1051 and Diuron on a coastal meiobenthic community: A laboratory microcosm experiment, *Ecological Indicators* **58** (2015) 21-31.
25. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diuron> (pristupila lipanj 2018.)
26. J.A. Timbrell, Principles of Biochemical Toxicology, 4. izd., CRC Press, New York, 2009.
27. <http://www.marbef.org/wiki/Isoproturon> (pristupila lipanj 2018.)
28. K. Banyiova, A. Necasova, J. Kohoutek, I. Justan, P. Cupr, New experimental data on the human dermal absorption of Simazine and Carbendazim help to refine the assessment of human exposure, *Chemosphere* **145** (2016) 148-156.
29. S. Parvez, S. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-268.
30. <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8363> (pristupila lipanj 2018.)
31. A.K. Dunn, *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond, *Advances in Microbial Physiology* **61** (2012) 37-68.

32. <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2013/07/let-there-be-light.html> (pristupila lipanj 2018.)
33. M.J. Farré, M.I. Franch, J.A. Ayllón, J. Peral, X. Domènech, Biodegradability of treated aqueous solutions of biorecalcitrant pesticides by means of photocatalytic ozonation, *Desalination* **211** (2007) 22-33.

ŽIVOTOPIS

Marcela Puljiz [REDACTED] S odličnim uspjehom završila je Osnovnu školu Lučac u Splitu, te dvojezični program na engleskom jeziku XVI. Gimnazije u Zagrebu. Maturirala je s ocjenom odličan. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2015. godine kao redovna studentica sveučilišnog preddiplomskog studija Primijenjene kemije. Stručnu praksu odradila je u laboratoriju Doma zdravlja Zagreb centar. Tijekom studiranja aktivno je pomagala u izvođenju nastave u vidu demonstratora na laboratorijskim vježbama na Zavodu za opću i anorgansku kemiju i Zavodu za analitičku kemiju. Sudjelovala je na jednom domaćem kongresu gdje je svoja istraživanja prezentirala u vidu posterskog priopćenja Tečno govori engleski i talijanski jezik, a poznaje osnove francuskog i španjolskog jezika.