



FKIT MCMXIX

Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije



S+M(L)=KI<sup>12</sup>

# ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI KSENOBIOTIKA U VODI

TEA BOROJEVIĆ



Vlada  
Republike  
Hrvatske

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

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

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



REPUBLIKA HRVATSKA  
MINISTARSTVO ZAŠTITE  
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti  
obrazovanja i sporta



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA I  
ENERGETSKU UČINKOVITOST

HRZZ  
Hrvatska zadržava  
za znanost

# Cilj rada

- Voda = izvor života
- ODV – 45 prioritetnih tvari ili grupe tvari – „nove onečišćujuće tvari“
- Tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodne politike u skladu s Direktivom 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća

## ReHOHMem projekt

- » Financiran od:
  - » Vlade Republike Hrvatske i partnerskih institucija:
  - » Ministarstva znanosti i obrazovanja
  - » Ministarstva zaštite i energetike
  - » Fonda za zaštitu okoliša i energetsku učinkovitost
  - » Hrvatske zaklade za znanost
  - » u iznosu od 1.492.908,72 HRK
- » Trajanje 01.04.2017. – 31.03.2019.



Vlada  
Republike  
Hrvatske



REPUBLIKA HRVATSKA  
MINISTARSTVO ZAŠTITE  
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti  
obrazovanja i sporta



FOND ZA ŽAŠTITU OKOLIŠA I  
ENERGETSKU UČINKOVITOST

HRZZ  
Hrvatska zaklada  
za znanost

## PRILOG

Popis praćenja za tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije kako je utvrđeno člankom 8.b Direktive 2008/105/EZ

| Naziv tvari/skupine tvari           | CAS broj (1)        | EU broj (2) | Indikativna metoda analize (3) (4) (5) | Najveća prihvatljiva granica detekcije metode (ng/l) |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|--|--|
| Etinilestradiol 17-alfa (EE2)       | 57-63-6             | 200-342-2   | SPE velikog volumena – LC-MS-MS        | 0,035  |
| Estradiol 17-beta (E2), estron (E1) | 50-28-2,<br>53-16-7 | 200-023-8   | SPE – LC-MS-MS                         | 0,4  |
| Diklofenak                          | 15307-86-5          | 239-348-5   | SPE – LC-MS-MS                         | 10   |
| 2,6-diterc-butil-4-metilfenol       | 128-37-0            | 204-881-4   | SPE – GC-MS                            | 3 160  |
| 2-etylheksil 4-metoksicinamat       | 5466-77-3           | 226-775-7   | SPE – LC-MS-MS ili GC-MS               | 6 000  |
| Makrolidni antibiotici (6)          |                     |             | SPE – LC-MS-MS                         | 90   |
| Metiokarb                           | 2032-65-7           | 217-991-2   | SPE – LC-MS-MS ili GC-MS               | 10   |
| Neonikotinoidi (7)                  |                     |             | SPE – LC-MS-MS                         | 9  |
| Oksadiazon                          | 19666-30-9          | 243-215-7   | LLE/SPE – GC-MS                        | 88   |
| Tri-alat                            | 2303-17-5           | 218-962-7   | LLE/SPE – GC-MS ili LC-MS-MS           | 670  |

(1) Chemical Abstracts Service.

(2) Broj Europske unije – nije dostupan za sve tvari.

(3) Kako bi se osigurala usporedivost rezultata iz različitih država članica, sve se tvari moraju pratiti u cijelovitim uzorcima vode.

(4) Metode ekstrakcije:

LLE – ekstrakcija tekućina – tekućina;

SPE – ekstrakcija krutina.

(5) Metode analize:

GC-MS – plinska kromatografija – masena spektrometrija;

LC-MS-MS – tekućinska kromatografija – (tandemska) trostroka četverostruka masena spektrometrija;

(6) Za praćenje 2-etylheksil 4-metoksicinamata u lebdećim česticama ili u talogu (veličine < 63 µm) određena je sljedeća metoda analize: SLE (ekstrakcija krutina – tekućina) – GC-MS, s najvišom granicom detekcije od 0,2 mg/kg.

(7) Eritromicin (CAS broj 114-07-8, EU broj 204-040-1), klaritromicin (CAS broj 81103-11-9), azitromicin (CAS broj 83905-01-5, EU broj 617-500-5).

(8) Imidakloprid (CAS broj 105827-78-9/138261-41-3, EU broj 428-040-8), tiakloprid (CAS broj 111988-49-9), tiametoksam (CAS broj 153719-23-4, EU broj 428-650-4), klotianidin (CAS broj 210880-92-5, EU broj 433-460-1), acetamiprid (CAS broj 135410-20-7/160430-64-8).



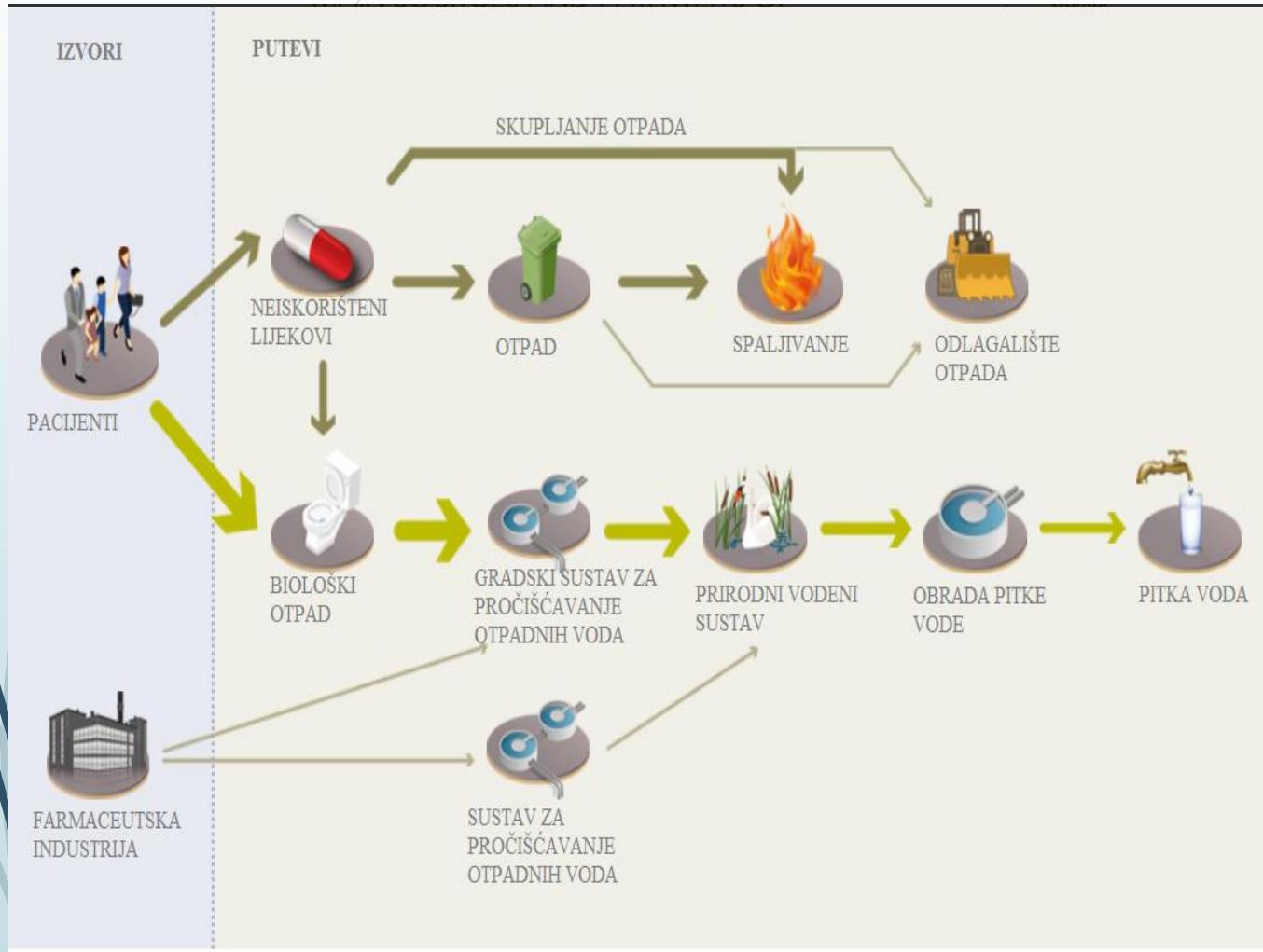
# Ksenobiotici

- ▶ tvari koje se pojavljuju u okolišu, a koje nisu nastale u njemu i nisu sastavni dio određenog biološkog sustava
- ▶ Farmaceutici - svi terapijski lijekovi namijenjeni ljudima, životinjama, dodaci prehrani te proizvodi za osobnu njegu
- ▶ API – aktivna komponenta

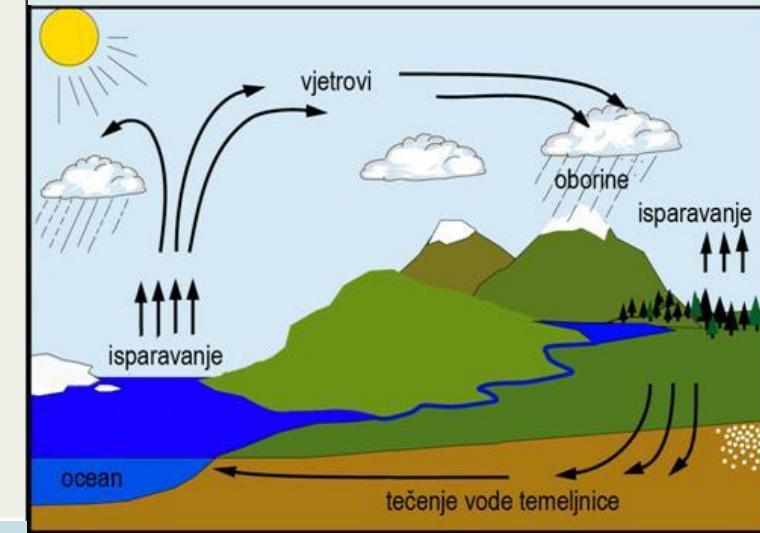




# Ksenobiotici u vodama



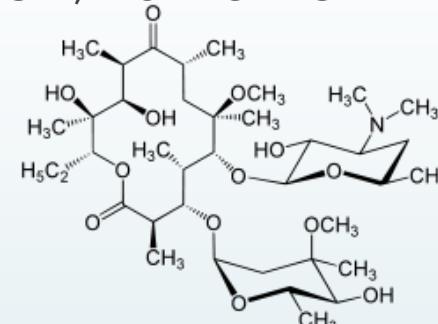
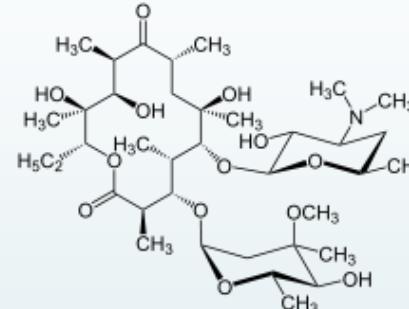
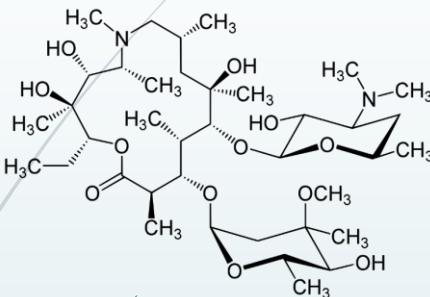
- ▶ Farmaceutska industrija, bolnice, farme, kućanstva
- ▶ Mikrozagađivala
- ▶ Bioakumulacija
- ▶ Produkti razgradnje ??????



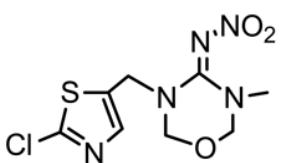
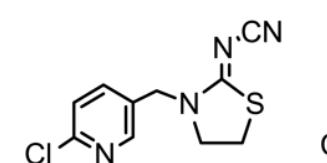
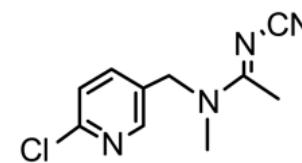
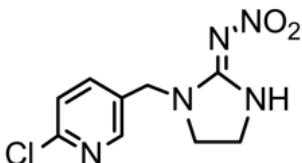
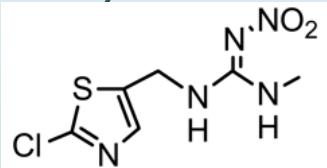


# Ispitivani spojevi

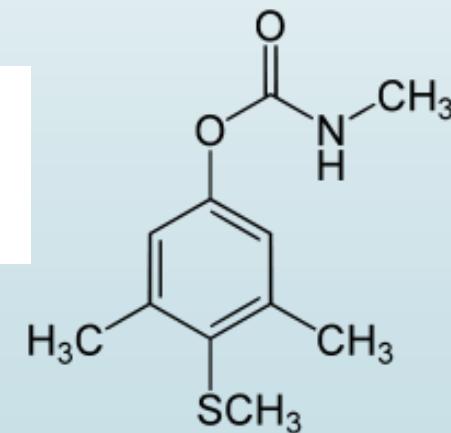
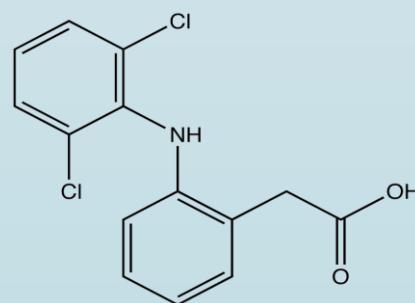
- MAKROLIDNI ANTIBIOTICI – azitromicin, eritromicin, klaritromicin



- INSEKTICIDI – neonikotinoidi (klotianidin, imidakloprid, acetamiprid, tiakloprid, tiametoksam) i karbamati (metiokarb)



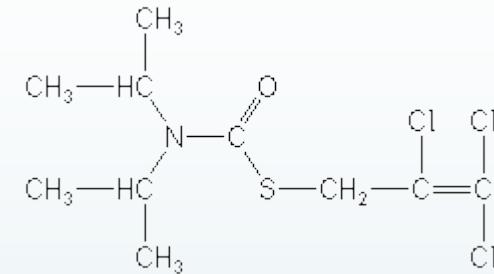
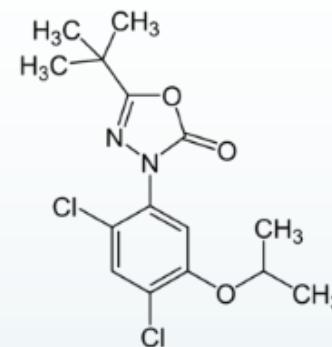
- NSAR – diklofenak



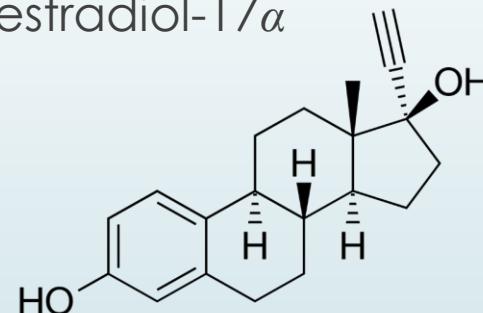
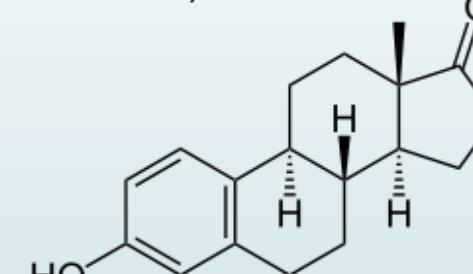
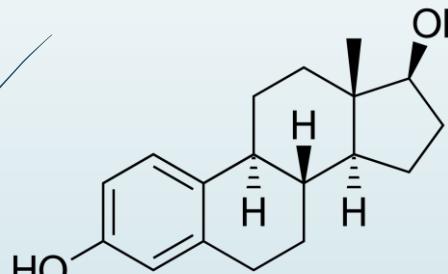


# Ispitivani spojevi

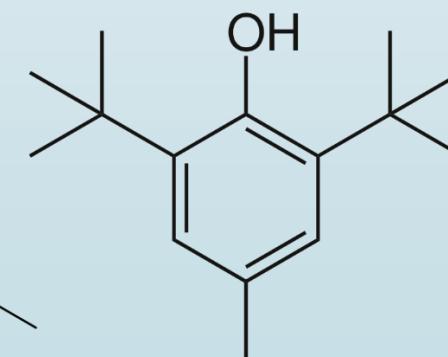
► HERBICIDI – oksadiazon, trialat



► ESTROGENSKI HORMONI – estradiol- $17\beta$ , estron, etinilestradiol- $17\alpha$

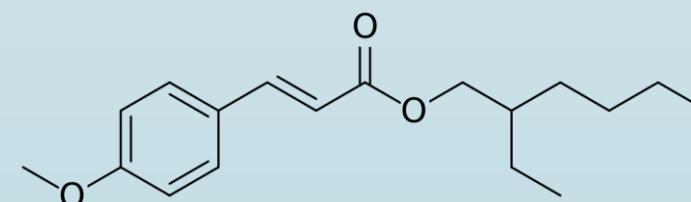


► ANTOOKSIDANSI – 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol



► SREDSTVA ZA ZAŠITU OD SUNCA

– 2-ethyl-heksil-4-metoksicinamat



# Toksičnost

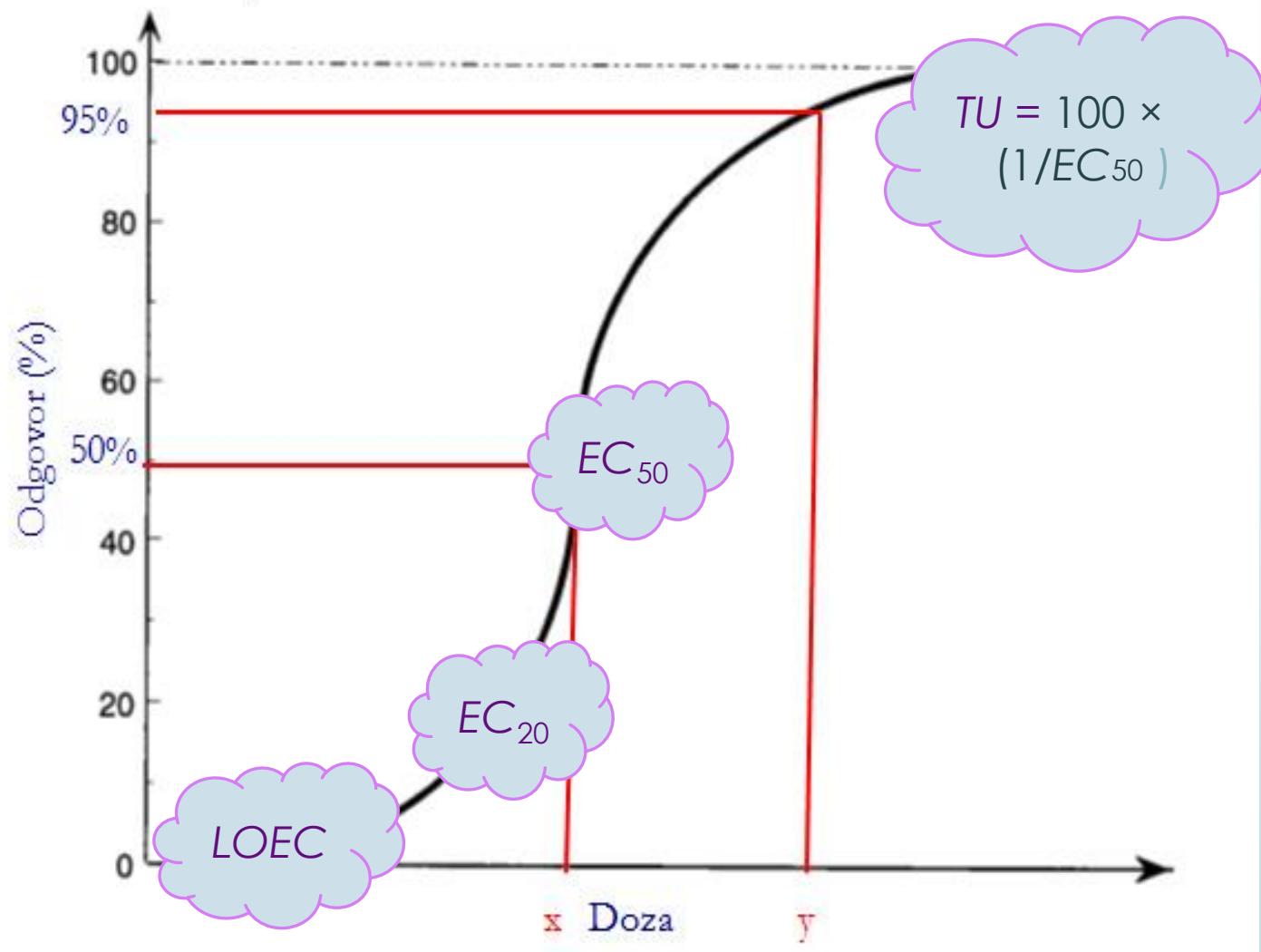
- Ekotoksičnost – istraživanje toksičnih učinaka nastalih kao posljedica prisutnosti prirodnih ili umjetno stvorenih štetnih tvari (zagadivala) na ljudе, životinje, biljke, mikroorganizme i sve ostale sastavne dijelove ekosustava

| Test organizam   | Metoda   | Instrument   | Načelo  |
|--|--|--|---|
| <b>Daphnia magna</b><br><b>Straus (Crustacea)</b>                                | HRN EN ISO 6431: 2000<br>Test akutne toksičnosti | Oprema za uzgoj jedinki u laboratorijskim uvjetima, mikroskop i standardni laboratorijski pribor | Slatkovodni račić / inhibicija pokretljivosti - optička opservacija mortaliteta gravidnih jedinki |
| <b>Photobacterium phosphoreum (dr. Lange LUMISTOX luminous Bacteria, LCK480)</b> | DIN 38412-L34 (ISO/DIS 11384)                    | Luminometar - Monolight 2010   | Luminiscentna bakterija / inhibicija emitiranja svjetlosti  |
| <b>Skeletonema costatum ili Pheodactylum tricornutum</b>                         | ISO 10253  | Aparat za membransku filtraciju, autoklav, pHmetar, mikroskop                                    | Morske alge / inhibicija rasta  |
| <b>Scenedesmus subspicatus Selenastrum capricornutum</b>                         | ISO 8692   | Aparat za membransku filtraciju, autoklav, pHmetar, mikroskop                                    | Planktonske slatkovodne alge / inhibicija rasta   |
| <b>Saccharomyces cerevisiae ili Yeast Toxicity Test</b>                          | YTT (Dvoraček, Stilinović, 1997.)                | Serum boce vol. 125 cm <sup>3</sup> , igle sa štrcaljkom, pHmetar, magnetna miješalica           | Kvaščeve gljivice / inhibicija fermentacije i smanjenje količine nastalog CO <sub>2</sub>         |

| KSENOBIOTIK                    | METODA TOKSIČNOSTI                             | TOKSIČNOST                       |
|--------------------------------|--|----------------------------------|
| diklofenak                     | DIN 38412-L34                                  | hepatotoksičan                   |
| trialat                        |  | potencijalno kancerogen za ljude |
| oksidiazon                     | Pseudomonas fluorescens strain CG5 - bakterija | potencijalno kancerogen za ljude |
| azitromicin                    |  | hepatotoksičan                   |
| eritromicin                    |  | hepatotoksičan                   |
| klaritromicin                  | DIN EN ISO 15088 ; DIN EN ISO 6341             | hepatotoksičan                   |
| metiokarb                      |  | kancerogen, ne za ljude          |
| imidakloprid                   | razni vodeni beskralježnjaci                   | kancerogen, ne za ljude          |
| tiakloprid                     |  | kancerogen                       |
| tiametoksam                    | GB/T 15441-1995                                | nije kancerogen                  |
| klotianidin                    |  | kancerogen, ne za ljude          |
| acetamiprid                    | Pseudomonas aeruginosa -bakterija              | kancerogen, ne za ljude          |
| estron                         | ISO 10253                                      | kancerogen                       |
| estradiol-17β                  | Danio rerio - slatkovodna riba zebrica         | kancerogen                       |
| etinilestradiol-17a            | dagnje   | kancerogen                       |
| 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol | miševima i štakorima                           | kancerogen, za neke životinje    |
| 2-etyl-heksil-4-metoksicinamat | Daphnia magna – test akutne toksičnosti        | kancerogen, ne za ljude          |



# Iskazivanje toksičnosti





# Vibrio fischeri

- ▶ Štapičaste, gram – negativne bakterije
- ▶ Morska sredina – simbioza s lignjom *Euprymna scolopes*
- ▶ Proizvodi luminescenciju ekspresijom *lux operona*
- ▶ Vrlo osjetljive na organska oštećenja





# Eksperimentalni dio

- UREĐAJ – LUMISTox 300 s termostatom LUMItherm
- Bioluminiscenčna metoda DIN 38412 - L34 – pristupačna, jednostavna, brza



# PRIPREMA HRANJIVE PODLOGE, OTOPINE ZA RESUSPENZIJU I OTOPINA FARMACEUTIKA



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

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

| Ksenobiotik                    | Odvagana masa/g |
|--------------------------------|-----------------|
| klaritromicin                  | 0,0020          |
| azitromicin                    | 0,0021          |
| eritromicin                    | 0,0020          |
| estron                         | 0,0020          |
| estradiol-17β                  | 0,0021          |
| diklofenak                     | 0,0019          |
| etinilestradiol-17α            | 0,0022          |
| 2-etil-heksil-4-metoksicinamat | 0,0202          |
| metiokarb                      | 0,0023          |
| oksadiazon                     | 0,0022          |
| tri-alat                       | 0,0021          |
| imidakloprid                   | 0,0021          |
| tiakloprid                     | 0,0023          |
| tiametoksam                    | 0,0020          |
| acetamiprid                    | 0,0021          |
| klotianidin                    | 0,0020          |
| 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol | 0,0020          |



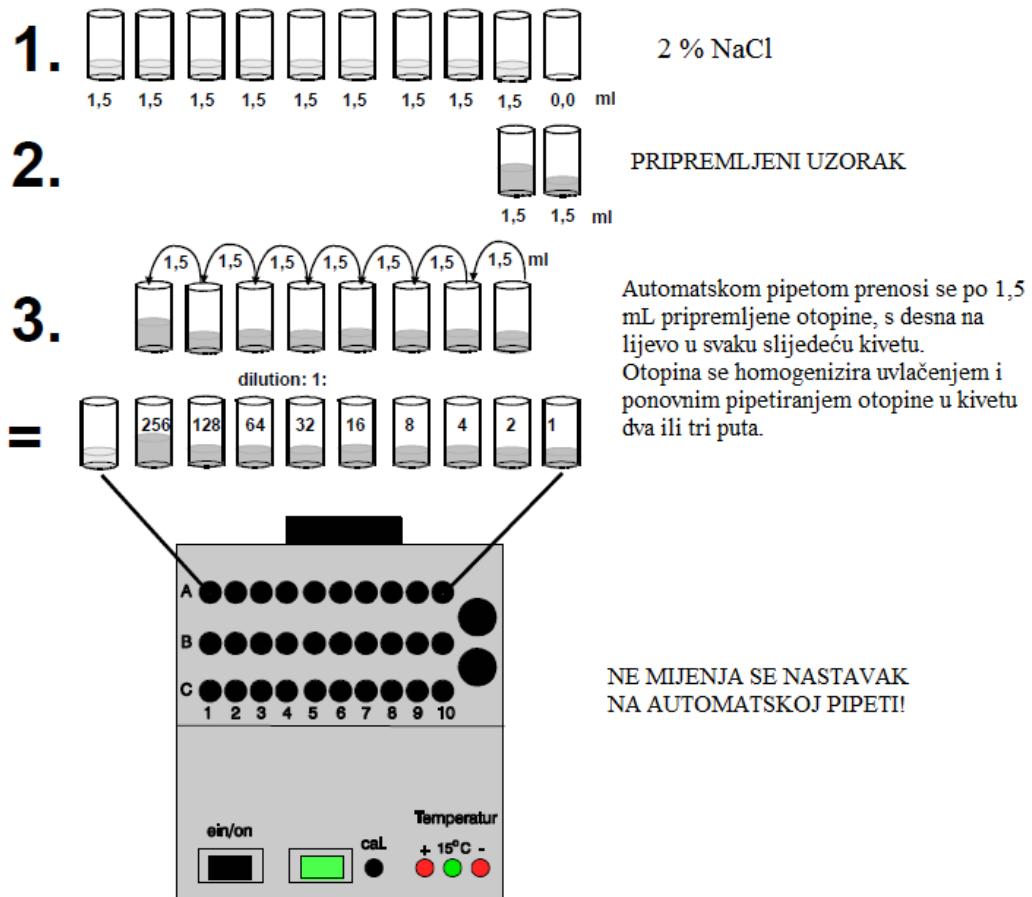
## ► STERILNA TEHNIKA RADA

- podrazumijeva rad uz plamenik upaljen na oksidacijskom plamenu na površini očišćenoj etanolom
- AKTIVACIJA LIOFILIZIRANIH BAKTERIJA I PRECJEPLJIVANJE BAKTERIJSKE KULTURE
- PRIPREMA BAKTERIJSKE SUSPENZIJE



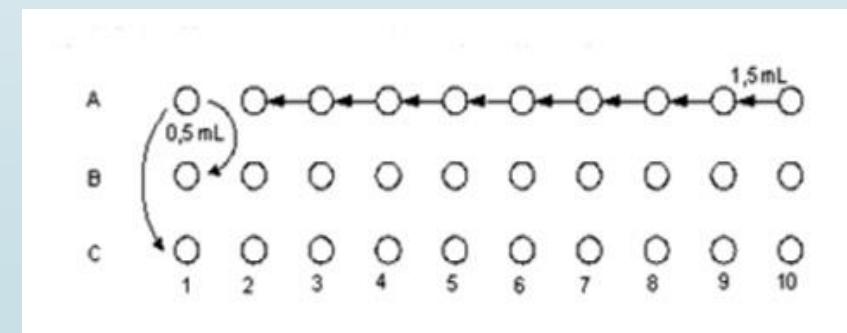


# Mjerenje toksičnosti



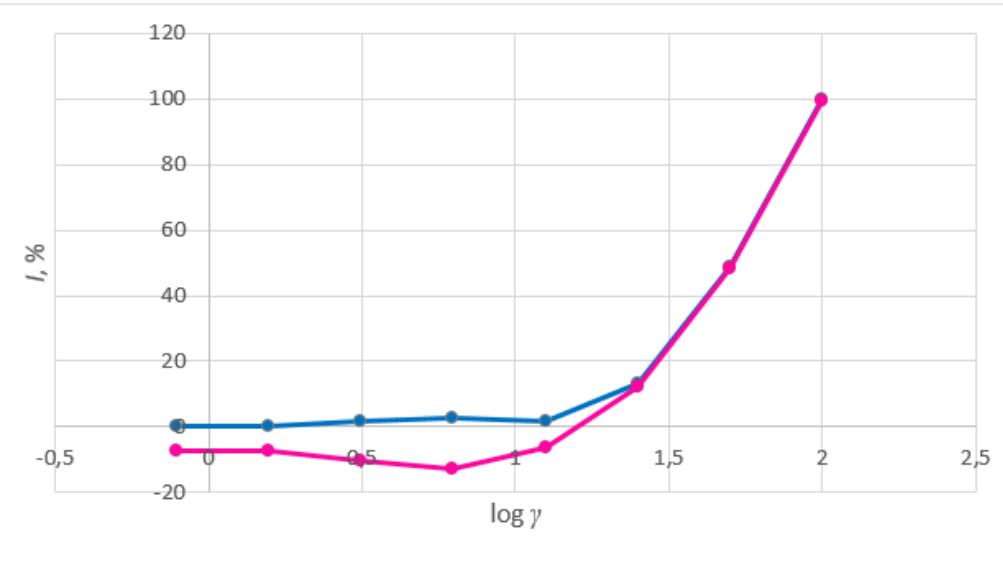
Radna otopina za resuspenziju, 2 % NaCl uvijek se nalazi u A1. Uzorak najviše koncentracije, u ovom slučaju nerazrijeđene otopine, nalazi se krajnje desno, A10.

| Eksperimentalni uvjeti EC programa na uređaju LUMISTOX 300 |                       |
|--|-----------------------|
| dilution steps   | 8                     |
| type of dilution   | 2                     |
| unit   | %                     |
| inic. conc.  | 100%                  |
| time of inc.   | 1. 30 min<br>2. 0 min |





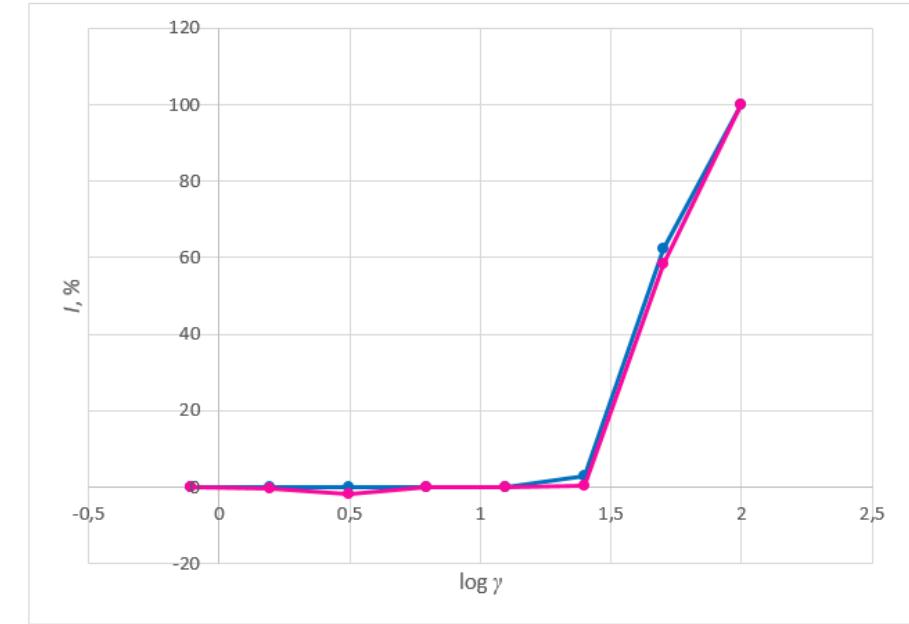
# Rezultati



Graf usporedbe toksičnosti otopine tiakloprida

Očitane vrijednosti  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ ,  $LOEC$  s pripadajućom  $I$ , te izračunate  $TU$  za otopinu tiakloprida

| Farmaceutik  | Tiakloprid       |                  |      |               |         |
|--------------|------------------|------------------|------|---------------|---------|
|              | $EC_{20}$ , mg/L | $EC_{50}$ , mg/L | $TU$ | $LOEC$ , mg/L | $I$ , % |
| 1. mjerjenje | 28,184           | 51,286           | 1,95 | 0,781         | 0,04    |
| 2. mjerjenje | 28,184           | 51,286           | 1,95 | 25            | 48,12   |
| RSD, %       | 0                | 0                | -    |               |         |



Graf usporedbe toksičnosti otopine trialata

Očitane vrijednosti  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ ,  $LOEC$  s pripadajućom  $I$ , te izračunate  $TU$  za otopinu trialata

| Farmaceutik  | Trialat          |                  |       |               |         |
|--------------|------------------|------------------|-------|---------------|---------|
|              | $EC_{20}$ , mg/L | $EC_{50}$ , mg/L | $TU$  | $LOEC$ , mg/L | $I$ , % |
| 1. mjerjenje | 31,261           | 40,738           | 2,455 | 0,781         | 0,032   |
| 2. mjerjenje | 31,623           | 42,17            | 2,371 | 0,781         | 0,025   |
| RSD, %       | 0,81             | 2,44             | -     |               |         |



| Ksenobiotik                                  | EC <sub>20</sub> , mg/L | EC <sub>50</sub> , mg/L | TU    | LOEC, mg/L | I, %  |
|--|-------------------------|-------------------------|-------|------------|-------|
| <b>azitromicin</b>                           | 47,361                  | 58,580                  | 1,85  | 75,000     | 79,51 |
| <b>eritromicin</b>                           | 28,880                  | 44,710                  | 2,52  | 31,250     | 22,75 |
| <b>klaritromicin</b>                         | 13,221                  | 23,040                  | 4,37  | 9,375      | 2,00  |
| <b>klotianidin</b>                           | 21,451                  | 30,052                  | 3,38  | 25,000     | 32,64 |
| <b>tiakloprid</b>                            | 28,184                  | 51,286                  | 1,95  | 12,890     | 24,08 |
| <b>imidakloprid</b>                          | 18,868                  | 31,623                  | 3,16  | 18,750     | 19,38 |
| <b>acetamiprid</b>                           | 4,230                   | 25,640                  | 4,30  | 0,781      | 6,78  |
| <b>tiametoksam</b>                           | 24,378                  | 34,489                  | 2,90  | 12,890     | 13,10 |
| <b>meliokarb</b>                             | 0,928                   | 2,147                   | 48,03 | 0,781      | 23,94 |
| <b>oksadiazon</b>                            | 32,668                  | 39,280                  | 2,55  | 37,500     | 35,87 |
| <b>trialat</b>                               | 31,442                  | 41,454                  | 4,83  | 0,781      | 0,03  |
| <b>diklofenak</b>                            | 9,503                   | 25,640                  | 4,30  | 0,781      | 3,62  |
| <b>2,6-di-tert-butil-4-metilfenol</b>        | 14,969                  | 21,761                  | 4,60  | 12,500     | 7,22  |
| <b>estradiol-17<math>\beta</math></b>        | 15,637                  | 23,753                  | 4,23  | 12,500     | 1,083 |
| <b>estron</b>                                | 15,405                  | 23,753                  | 4,23  | 12,890     | 28,58 |
| <b>etinilestradiol-17<math>\alpha</math></b> | 28,184                  | 35,481                  | 2,82  | 25,000     | 3,74  |
| <b>2-etyl-heksil-4-metoksicinamat</b>        | -                       | -                       | -     | -          | -     |





# Zaključak

- Primijećeno je da do manjih odstupanja između mjerenja dolazi kada je test valjanosti bakterijske kulture nekoliko postotaka ispod ili iznad zadanih granica od 20 do 80 %.
- MAKROLIDI – Najveću toksičnost pokazuje klaritromicin, a najmanju azitromicin, što je pozitivno jer je azitromicin jedna od najkorištenijih aktivnih tvari u proizvodnji lijekova u svijetu.
- NEONIKOTINOIDI – Najveću toksičnost ima acetamiprid, najmanju toksičnost pokazao je tiakloprid, a slijede ga tiometoksam, imidakloprid i klotianidin.
- NAJTOKSIČNIJI KSENOBIOTIK – metiokarb
- Diklofenak, trialat i 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol su približno iste toksičnosti.



- ESTROGENSKI HORMONI – Najmanju toksičnost pokazuje polusintetski derivat estradiola- $17\beta$ , etinilestradiol- $17\alpha$ , što potvrđuje i razloge primarne sinteze tog hormona, smanjenje toksičnosti estrogenih supstancija koje su jedna od skupina farmaceutika koja se najviše ispušta u okoliš.
- SREDSTVA ZA ZAŠTITU OD SUNCA – 2,6-etil-heksil-4-metoksicinamat jedini je ispitivani spoj koji nije pokazao toksičnost, što je pozitivno jer je on aktivni sastojak krema za sunčanje koje su jedan od najkorištenijih proizvoda za osobnu njegu.
- Metabolički putevi mnogih ksenobiotika još nisu istraženi, nema ni regulacije maksimalno dopuštenih koncentracija navedenih ksenobiotika u okolišu, stoga je ključno nastaviti s ovakim i mnogim drugim mjerjenjima, kako bi sprječili onečišćenje i štetan utjecaj za živi svijet.

# HVALA!



  Vlada  
Republike  
Hrvatske

Izravna oporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje membranskim tehnologijama  
(ReHOHMem)

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

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

 REPUBLIKA HRVATSKA  
MINISTARSTVO ZAŠTITE  
OKOLIŠA I ENERGETIKE

 ministarstvo znanosti  
obrazovanja i sporta

 FOND ZA ŽAŠTITU OKOLIŠA I  
ENERGETSKU UČINKOVITOST

 **HRZZ**  
Hrvatska zadržava  
za znanost