



ZVEZA ZA TEHNIČNO KULTURO SLOVENIJE

54. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2020

TRIKLOSAN IN NJEGOV VPLIV NA OKOLJE

Raziskovalno področje: Ekologija z varstvom okolja

Raziskovalna naloga



Avtorici: Lili LI DOBNIK, Maja PODBOJEC

MENTORICA: Zdenka KEUC, prof.

Šola: II. gimnazija Maribor

Maribor, maj 2020

KAZALO VSEBINE

Povzetek.....	1
Abstract.....	1
Zahvala.....	2
1 UVOD.....	3
1.1 Raziskovalno vprašanje	5
1.2 Hipoteze in njihova razlaga.....	5
1.3 metodologija.....	5
2 PREGLED LITERATURE.....	6
2.1 Fizikalno kemijske lastnosti triklosana.....	6
2.2 Viri triklosana v okolju.....	6
2.3 Triklosan kot endogeni motilec.....	9
2.4 Izpostavljenost človeka.....	9
2.5 Učinek triklosana na vodne organizme.....	11
3 EKSPERIMENTALNI DEL.....	12
3.1 Vzorčenje.....	12
3.2 Fizikalna analiza vzorcev vode.....	13
3.2.1 Električna prevodnost	13
3.2.2 pH vrednost vzorcev.....	14
3.2.3 Določanje motnosti vzorcev vode.....	14
3.2.4 TEMPERATURA VZORCEV VODE.....	14
3.3 Kemijska analiza vzorcev vode.....	14
3.3.1 Določitev TOC (skupnega organskega ogljika).....	14
3.4 Koncentriranje vodnih vzorcev.....	15
3.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA.....	16
3.6 UV spektroskopija.....	16
4 REZULTATI.....	18
4.1 Fizikalna Analiza vzorcev vode.....	18
4.2 Kemijska analiza vzorcev vode.....	19
4.3 Celotni organski ogljik - TOC.....	19
4.4 TLC kromatogrami.....	20
4.5 Umeritvena premica za TCS.....	22
4.6 Vsebnost TCS v preiskovanih vzorcih vod.....	23
5 Razprava.....	24

5.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI VZORCEV VODE (MOTNOST, BARVA).....	24
5.2 pH vodnih vzorcev	24
5.3 Električna prevodnost in mineralizacija	24
5.4 Kemijska analiza vode (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , Fe^{2+}).....	25
5.5 Celotni organski ogljik - TOC	25
5.6 TLC analiza vzorcev vode	25
5.7 UV spektroskopija.....	25
6 Zaključki	26
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....	27
8 UPORABLJENA LITERATURA.....	29

Seznam preglednic

Preglednica 1. Koncentracije triklosana v različnih vodnih okoljih (SCCS, 2010).....	8
Preglednica 2. TCS v meritve v površinskih vodah in vodah čistilnih naprav.....	8
Preglednica 3. Izpostavljenost dojenčkov TCS (NICNAS, 2009)	9
Preglednica 4. TCS koncentracije izmerjenih pri človeku	10
Preglednica 5. Standardne raztopine TCS	17
Preglednica 6. Fizikalne lastnosti vzorcev vode in opis odvzemnih mest.....	18
Preglednica 7. Kemijska analiza vzorcev vode.....	19
Preglednica 8. Preostanek trdne snovi v vzorcih vod po oksidaciji s 30% H_2O_2	19
Preglednica 9. Skupna masa organskih snovi, ki so se oksidirale s 30% H_2O_2	20
Preglednica 10. Prisotnost tcs v vzorcih vode	21
Preglednica 11. Absorbance standardnih raztopin	22
Preglednica 12. Koncentracija TCS v vzorcih vod	23

Seznam grafov

Graf 1. Umeritvena premica za triklosan.....	23
-----------------------------------------------------	-----------

Seznam slik

Slika 1. Triklosan (CAS 3380-34-5).....	3
-----------------------------------------	---

Slika 2. Razgradne poti TCS v okolju (povzeto po Chen in sod., 2018).....	4
Slika 3. Kroženje triklosana v okolju (povzeto po Nemeč, 2013).....	7
Slika 4. Načrt praktičnega dela.....	12
Slika 5. prikaz mest odvzema vzorcev	13
Slika 6. Supel HLB kolone za ekstrakcijo TCS iz vodnih vzorcev.....	15
Slika 7. TLC kromatografija (potek)	20
Slika 8. Kromatogrami	21
Slika 9. UV spektroskopska določitev koncentracije TCS v vzorcih vode	22

Okrajšave uporabljene v tej nalogi:

TCStriklosan

EC₅₀.... je statistična ocena koncentracije strupene snovi v okolju, ki je potrebna za doseganje učinka pri 50% testnih organizmov

LC₅₀....mediana smrtne koncentracije

NICNAS....National industrial chemicals notification and assessment scheme

SCCP....Scientific Committee on Consumer Products

Program za risanje strukturnih formul: ChemSkech (<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/>)

POVZETEK

Triklosan je baktericid, ki je danes v široki uporabi, od prehrabnih do farmacevtskih izdelkov, kot aktivna učinkovina pa se porablja tudi v razkužilih, ki so namenjena bolnišnični uporabi. Raziskovalci poročajo, da je to spojina, ki ima negativen učinek na vodne organizme in okolje. V nalogi sva raziskali kolikšna je koncentracija triklosana v površinskih vodah in komunalnih čistilnih napravah v Mariboru in njegovi okolici. Ugotovili sva, da se triklosan pojavlja v vseh desetih vzorcih vod, ki smo jih preučili, vključno s pitno vodo. Izmerjene koncentracije so se gibale od 31 µg/L do 200 µg/L. Komunalne čistilne naprave so pri odstranjevanju triklosan neučinkovite.

Število besed: 101

Ključne besede: triklosan (TCS), koncentracija v površinskih vodah in vodah čistilnih naprav

ABSTRACT

Triclosan is a bactericide, that is widely used and can be found in a variety of products ranging from dietary to pharmaceutical products. Additionally, it is used as an active substance in disinfectants, that are used in hospitals. Some researchers state that it is a substance that negatively affects aquatic animals and the environment. In this research paper we have analysed the surface and communal waters in Maribor and its surrounding area. We have concluded that triclosan is present in all water samples and its concentration ranged from 31 µg/L to 200 µg/L. Wastewater treatment plants are ineffective at cleaning triclosan.

Word count: 101

Key-words: Triclosan, concentration in surface and communal waters

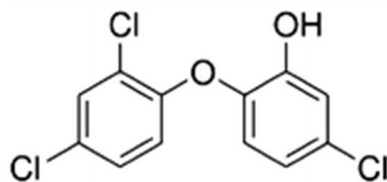
ZAHVALA

Zahvaljujema se mentorici, Zdenki Keuc, za vso pomoč in nasvete pri izdelavi te raziskovalne naloge. Prav tako se zahvaljujema najinim staršem, bratom in prijateljem za vse spodbudne besede med pisanjem te naloge.

1 UVOD

Triklosan (TCS) je večnamensko protimikrobno sredstvo, ki je zelo razširjeno v vsakdanjem življenju, saj je sestavni del številnih izdelkov za vsakdanjo osebno nego (npr. mila, šamponi, detergenti, kreme za britje, zobne paste, dezodoranti, kozmetični izdelki, krema proti aknam) kot tudi potrošniških izdelkov (npr. tekstil, obutev in otroške igrače) (Kirk–Othmer, 1993; MacIsaac s sod., 2014; Perencevich s sod., 2001; Schweizer, 2001; Brence, 2018). Trenutno ga najdemo v 140 izdelkih široke potrošnje (Chen in sod., 2018). Je eno najpogosteje uporabljenih antimikrobnih sredstev v bolnišnicah (dezinfekcija kirurških instrumentov, sestavni del sredstev za higieno rok) (Dhillon s sod., 2015; Brence, 2018). V Evropski uniji (EU) se 85% TCS uporabi za kozmetične namene, 5% v tekstilni industriji in 10% za plastične materiale in materiale, ki so v stiku z živili (SCCP, 2009). Svetovna poraba triklosana je bila leta 2013 ocenjena na okoli 110000 ton (Windler in sod., 2013). Zaščitni ukrepi v času pandemije s koronavirusom so se osredotočili predvsem na higieno rok in kašlja. V ta namen je redno umivanje rok in pogosto razkuževanje postalo vsakdanja praksa. Ljudje se praviloma ne sprašujejo katero dezinfekcijsko sredstvo se uporablja kot aktivna učinkovina v predmetih vsakdanje rabe, zato sva predvidevali, da se je njegova uporaba v času pandemije še povečala.

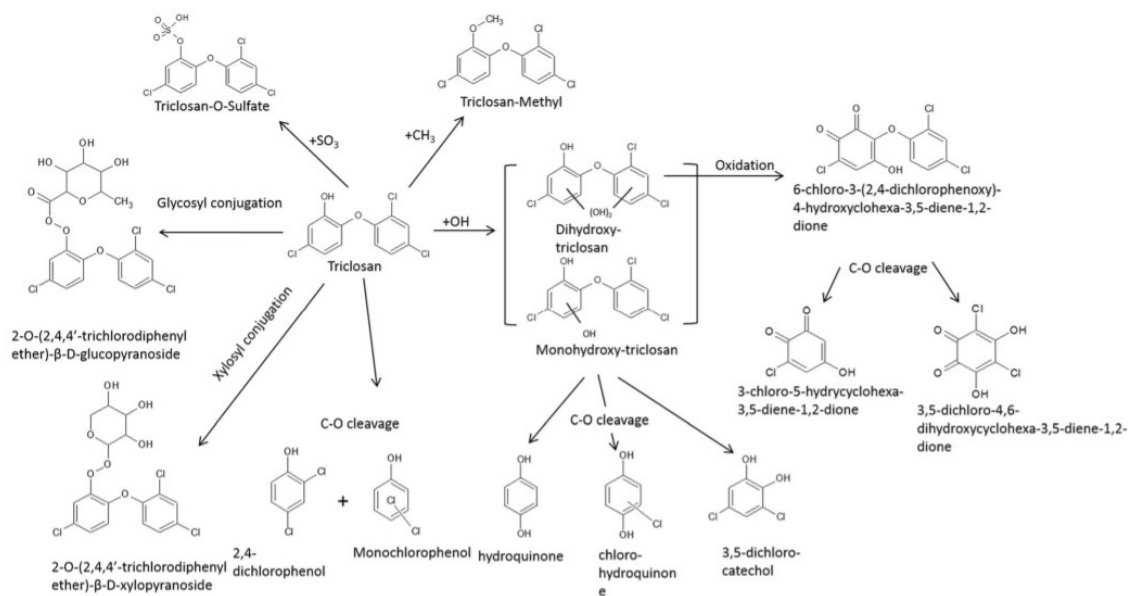
Široka uporaba triklosan uvršča med mikro vodna onesnaževala (Helbing in sod., 2011; Kolpin in sod., 2002; Li in sod., 2010; Loraine in Pettigrove, 2006; Park in Yeo, 2012; Reiss in sod., 2002; Brence, 2018), saj preko odtokov prehaja v odpadne komunalne vode in od tu dalje na komunalne čistilne naprave, v kolikor te seveda so. Ker je v široki uporabi že več kot 40 let, raziskave kažejo, da se njegove koncentracije v površinskih vodah in tudi vodah komunalnih čistilnih naprav višajo (Nemec, 2015; Wu in sod., 2007).



SLIKA 1. Triklosan

Kljub kemijski stabilnosti TCS (halogeniran bifenil ali IUPAC ime: (5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol) v vodnem okolju razpada v spojine, ki so lahko še bolj strupene za vodne organizme, kot je TCS sam (Hundt in sod., 2000; Kim in sod., 2011; Lee in Chu, 2013; Chen, 2015; Orhon in sod., 2017; Armstrong in sod., 2018) (slika 2). Trenutno je opredeljenih osem

različnih končnih spojin, nastalih zaradi delovanja svetlobe, vključno s kloriranimi fenoli, klorohidroksidifenil etri, 2,7- in 2,8-diklorodibenzo-p-dioksinom in diklorodibenzodioksin izomerom ali diklorohidroksidibenzofuranom. Vse našete spojine so na seznamu kancerogenih snovi (Chen in sod., 2018).



SLIKA 2. Razgradne poti TCS v okolju (povzeto po Chen in sod., 2018)

Evropska komisija za kemikalije (European Chemical agency –ECHA) triklosan uvršča med okoljsko zelo nevarne spojine, z dolgotrajnim delovanjem, toksične predvsem za vodne ekosisteme. O prisotnosti TCS in njegovih razgradnih produktov površinskih vodah, sedimentu (blatu) čistilnih naprav, v morski vodi, jezerih in rekah raziskovalci navajajo (Nemec, 2015; Wang in sod., 2015; Lu in sod., 2018), da je TCS za vodne organizme škodljiv že v zelo nizkih koncentracijah (ng/L).

Njegova lipofilnost omogoča bioakumulacijo v maščobnih tkivih, kar povzroča še eno skrb – možnost bioakumulacije po prehranjevalni verigi (ECHA, 2020). Ker je TCS tudi snov za katero številne raziskave kažejo, da je motilec endokrinih žlez, kar pomeni, da vpliva na raven hormonov, so vodni organizmi, kot tudi biota čistilnih komunalnih naprav še dodatno ogroženi (Foran in sod., 2000; Wu in sod., 2007; ECHA, 2020).

Ker je prisotnost TCS v okolju grožnja tako za zdravje ljudi kot vodnih organizmov, sva se vprašali ali obstajajo meritve TCS za vodno okolje v Sloveniji? Ker raziskav, v nama dostopnih bazah podatkov, nisva našli, sva se odločili, da bo prav to predmet te raziskave - Triklosan v površinskih vodah, pitni vodi in vodah komunalnih čistilnih naprav v Mariboru in bližnji

okolici. Pri pridobivanju vzorcev vod in analizi osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov sva združili moči še z drugo raziskovalno skupino na II. gimnaziji, ki je se je ukvarjala s prístnostjo EE2 (17 α -etinilestradiol).

1.1 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Kolikšna je koncentracija triklosana v površinskih vodotokih in odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav v Mariboru in okolici?

1.2 HIPOTEZE IN NJIHOVA RAZLAGA

Hipoteza 1. Triklosan se nahaja v vseh vodnih virih.

Hipoteza 2. Koncentracija triklosana bo v vodah čistilnih naprav pred in po izpustu v istem velikostnem razredu, kar pomeni, da se TCS ne odstrani iz vode.

1.3 METODOLOGIJA

Najprej bova preko ustreznih strokovnih člankov preučili katere meritve in v kakšnem obsegu so že bile narejene za določanje TCS v različnih vodnih virih. Sledil bo odvzem vzorcev in njihova karakterizacija s pomočjo fizikalno-kemijskih meritev.

Zatem bova vse vzorce koncentrirali (*solid phase extraction*) in preko tankoplastne kromatografije kvalitativno preverili njihovo prisotnost v odvzetih vzorcih. S pomočjo UV spektroskopije bova izračunali koncentracijo TCS v preiskovanih koncentriranih vzorcih. V ta namen si bova pripravili umeritveno premico s TCS in na koncu dobljene rezultate primerjali s podatki drugih raziskovalcev.

2 PREGLED LITERATURE

Triklosan so za čiščenje kirurških instrumentov v zdravstvu prvič uporabili leta 1972 (Nemec, 2013). Leta 1985 so ga v Evropi začeli množično uporabljati kot antibakterijsko sredstvo v zobnih pastah. Leta 1986 je Evropska skupnost v kozmetični direktivi dovolila uporabo triklosana kot konzervansa v kozmetičnih izdelkih v koncentracijah do 0,3 % (SCCP, 2009) in od takrat dalje je prisoten v široki potrošnji (Nemec, 2013).

2.1 FIZIKALNO KEMIJSKE LASTNOSTI TRIKLOSANA

Triklosan je kloriran fenoksifenol (slika 1). Pri standardnih pogojih je trden bel prah, ki je termično stabilen do temperature 200°C. Kemijsko ga uvrščamo med šibke kisline ($pK_a=8,14$), je hidrolitično stabilna spojina (pri pH 4 do 9), ki deluje tako proti gram negativnim kot tudi proti gram pozitivnim bakterijam; izkazuje protiglivične in protivirusne lastnosti (SCCS, 2010; Nemec, 2013). Antimikrobni učinek triklosana je povezan z njegovo sposobnostjo zaviranja delovanja encima, ki sodeluje pri bakterijski biološki sintezi lipidov (Wang in sod., 2004).

Pod anaerobnimi pogoji in pri odsotnosti svetlobe je triklosan dokaj stabilna spojina (Nemec, 2013). Pomembno vlogo v razgradnji triklosana ima aerobna bakterijska hidroliza, saj ob prisotnosti bakterij iz rodov *Pseudomonas*, *Burkholderia* in *Sphingomonas* pride do razgradnje TCS v CO₂ in klorirane spojine, kot so na primer klorokateholi (SCCS, 2010) (slika 2).

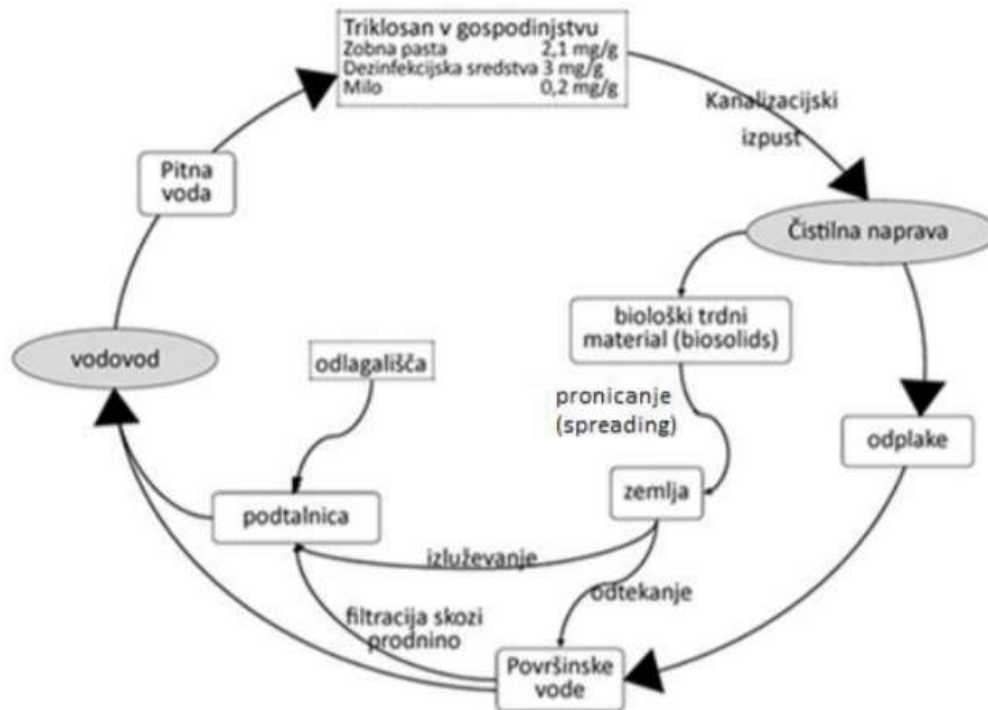
Zaradi nizke topnosti TCS v vodi (10 mg/L pri 20 °C) se hitro adsorbira na delce in se tako kopiči v sedimentih. Zato je vsebnost triklosana v blatu iz čistilnih naprav večja pri tistih vzorcih, kjer se uporabljajo anaerobni procesi, saj se v primeru aerobnih razmer, ob zgoraj omenjenih bakterijah, razgradi (SCCS, 2010).

Drugi produkti razgradnje lahko zajemajo vse spojine, ki so prikazane na sliki 2. Rule in sod. (2005) so dokazali, da kombinacija klorirane vodovodne vode in triklosana lahko tvori tudi znatne količine kloroforma (rakotvorna snov).

2.2 VIRI TRIKLOSANA V OKOLJU

Večina triklosana po uporabi vstopi v okolje preko kanalizacijskega sistema, po katerem nato potuje do čistilnih naprav (Wu in sod., 2007; Nemec, 2013). Slika 3 prikazuje kroženje triklosana v naravnem okolju.

Po kanalizacijskem izpustu TCS pride v odplake in preko blata čistilnih naprav tudi v zemljo. Tako odplake kot površinsko spiranje zemlje TCS izločijo v podtalnico in površinske vode, kar pa pomeni, da lahko TCS preide tudi v pitno vodo.



SLIKA 3. Kroženje triklosana v okolju (povzeto po Nemec, 2013)

Kumar in sod. (2008) so prvi raziskovali kaj se dogaja s TCS v čistilnih napravah in ugotovili, da je stopnja čiščenja zelo nizka. Predlagali so uporabo membranskega bioreaktorja, ki bi lahko odstranili do 80% triklosana v primerjavi s konvencionalno čistilno napravo.

Različni avtorji poročajo o različnih koncentracijah TCS v okolju. Nemčeva (2013) je predpostavila, da odrasla oseba porabi 2 L vode na dan in na tej osnovi ocenila vnos triklosa na 98 ng/oseba/dan.

SCCS (2010) je ocenil, da bi se koncentracije TCS v okolju morale gibati v razponih, ki so predstavljeni v Preglednici 1. V preglednici 2 sva zbrali podatke meritev, objavljenih v različnih študijah.

PREGLEDNICA 1. Koncentracije triklosana v različnih vodnih okoljih (SCCS, 2010)

Vodno okolje		Koncentracija triklosana
Površinska voda (jezera / reke / potoki)		0,0014–40 µg/L
Odpadna voda	Pritok na čistilno napravo	0,02–86,161 µg/L
	Iztok iz čistilne naprave	0,023–5,37 µg/L
Morska voda		< 0,000001–0,1 µg/L
Sediment	V jezeru / reki / potokih	< 100–53000 µg/kg suhe snovi
	V morski vodi	0,02–35 µg/kg suhe snovi
Blato iz čistilnih naprav		20–133000 µg/kg suhe snovi

PREGLEDNICA 2. TCS v meritve v površinskih vodah in vodah čistilnih naprav

Medij	Lokacija	Koncentracija (µg/L)	Vir podatkov
<i>Sediment</i>			
Sladke vode	Švica	83,8	Singer in sod., 2002
	Španija	nd–34,8	Morales in sod., 2005
Rečna ustja	ZDA	nd–810,7	Miller in sod., 2008
Pristanišča	Španija	0,027–130,3	Agüera in sod., 2003
<i>Odpadno blato</i>			
Aktivirano blato	ZDA	0,5–15,6	McAvoy in sod., 2002
	Španija	0,4–5,3	Morales in sod., 2005
	Nemčija	1,2	Bester, 2003

Legenda: nd... ni izmerjeno

Podatki za meritve TCS v pitni vodi so predstavljeni v Preglednici 3.

PREGLEDNICA 3. Koncentracija TCS v pitni vodi

Koncentracija (µg/L)	Vir podatkov
49	Yang in sod., 2014
18	
59	Padhye in sod., 2014
6–15	Li in sod., 2010; Perez in sod., 2013
102	Yang in sod., 2014
8	

2.3 TRIKLOSAN KOT ENDOGENI MOTILEC

Po definiciji so endokrini motilci vse snovi, ki so biološko aktivne in že v zelo majhnih koncentracijah povzročajo škodljive učinke pri organizmih tj. spremenijo delovanje endokrinega oz. hormonalnega sistema, na način, da motijo proizvodnjo, sproščanje, transport, presnovo (metabolizem), vezavo, delovanje in odstranjevanje naravnih hormonov v telesu, s tem pa vplivajo na ohranjanje notranjega ravnovesja (homeostaze) oz. normalno celično presnovo, plodnost, vedenje in razvoj človeka in drugih živalskih vrst . (Jung in sod., 2012). FDA sodeluje z ameriško agencijo za varstvo okolja (EPA), da bi preučila možne učinke spojine, ki motijo endokrini sistem. Raziskave so še v teku. (EPA Triclosan facts, 2010)

2.4 IZPOSTAVLJENOST ČLOVEKA

TCS je za humano uporabo dovoljen z največjo koncentracijo 0,3% in 0,03% v peroralnih zdravilih (MacIsaac in sod., 2014). V polimernih materialih je dovoljena koncentracija med 1% do 10% (m / m) (NICNAS, 2009). Triklosan se lahko absorbira skozi kožo; absorpcija skozi dihala je 100% (NICNAS, 2009), vendar toksikološki podatki za izpostavljenost pri človeku praktično niso znani. Ker so predvsem vodni organizmi tisti, ki so najbolj izpostavljeni TCS in ker se v njih zaradi svojega lipofilnega značaja lahko kopiči, so raziskovalci usmerili svojo pozornost na določanje TCS tako v sladkovodnih kot morskih organizmih. V žolčih rib (*Abramis brama*) (Houtman in sod., 2004) so poročali o koncentracijah TCS višjih od 276,3 µmol/kg. Rüdell in sod. (2013) so pri sladkovodnih ribah zabeležili do 11,7 nmol TCS/kg. TCS

se lahko pojavi tudi v zelenjavi, ki jo zalivamo z odpadnimi ali površinskimi vodami, ki so onesnažene z TCS. Pannu in sod. (2012) so poročali o triklosanu v redkvici (31,8 $\mu\text{mol/kg}$ suhe teže).

TCS so zaznali tudi v materinem mleku (preglednica 3), kar je bilo še bolj skrb vzbujajoče.

PREGLEDNICA 3. Izpostavljenost dojenčkov TCS (NICNAS, 2009)

Starost(meseci)	poprečni vnos mleka (g/dan)	teža (kg)	vnos TCS(nmol/kg /dan)
1	751	4.7	10
2	725	5.6	8.5
3	723	6.2	7.6
4	740	6.7	7.3

Triklosan lahko vpliva na endokrini sistem. Ameriški CDCP (Centers for Disease Control and Prevention) je izvedli študijo, v kateri so testirali 2517 ljudi starih od 6 let naprej. Testi urina so pokazali prisotnost triklosana v skoraj 75% testiranih ljudeh. Čeprav so bile najdene količine izjemno majhne, prisotnost triklosana kaže na vsakodnevno izpostavljenost. V preglednici 4 so zbrani podatki o koncentracijah TCS, izmerjenih pri človeku.

PREGLEDNICA 3. TCS koncentracije izmerjenih pri človeku

Vzorec	koncentracija (nM)	Država	Vir podatkov
Serum	4.1–41.4	Španija	Azzouz in sod., 2016
Plasma	0.035–1200	Avstralija, Švedska	Allmyr in sod., 2008)
Urin	8.3–13,090	ZDA	Calafat in sod., 2008, Allmyr in sod., 2008
	0.56 ± 1.8	Indija	Xue in sod., 2015
	0.16 ± 0.27	Indija	Xue in sod., 2015

Vzorec	koncentracija (nM)	Država	Vir podatkov
	1630	ZDA	US CDC, 2014
	1.1–7.3	Španija	Azzouz in sod., 2016
	0.51 ± 0.53	ZDA	MacIsaac in sod., 2014
Materino mleko	0.86–7.3	Španija	Azzouz in sod., 2016
	0.062–252	ZDA, Avstralija, Švedska	Allmyr in sod., 2008, Adolfsson-Erici in sod., 2002

Zaznavanje TCS v človeških tekočinah in tkivih morda ni pokazatelj dolgotrajne izpostavljenosti, saj razpoložljivi podatki ne zadostujejo za potrditev njegove bioakumulacije v tkivih.

Od leta 2013 se število raziskav, ki TCS povezujejo z nastankom rakavih obolenj povečuje. Trenutno najnižja koncentracija TCS, ki še ne kaže toksičnih učinkov za človeka ni določena in morda je to razlog zaradi česar je ameriška agencija za hrano in zdravila (USA FDA) leta 2016 prepovedala uporabo TCS v nekaterih milih, in leto kasneje še v zdravilih, za katera ne potrebujemo recepta (OTC zdravila).

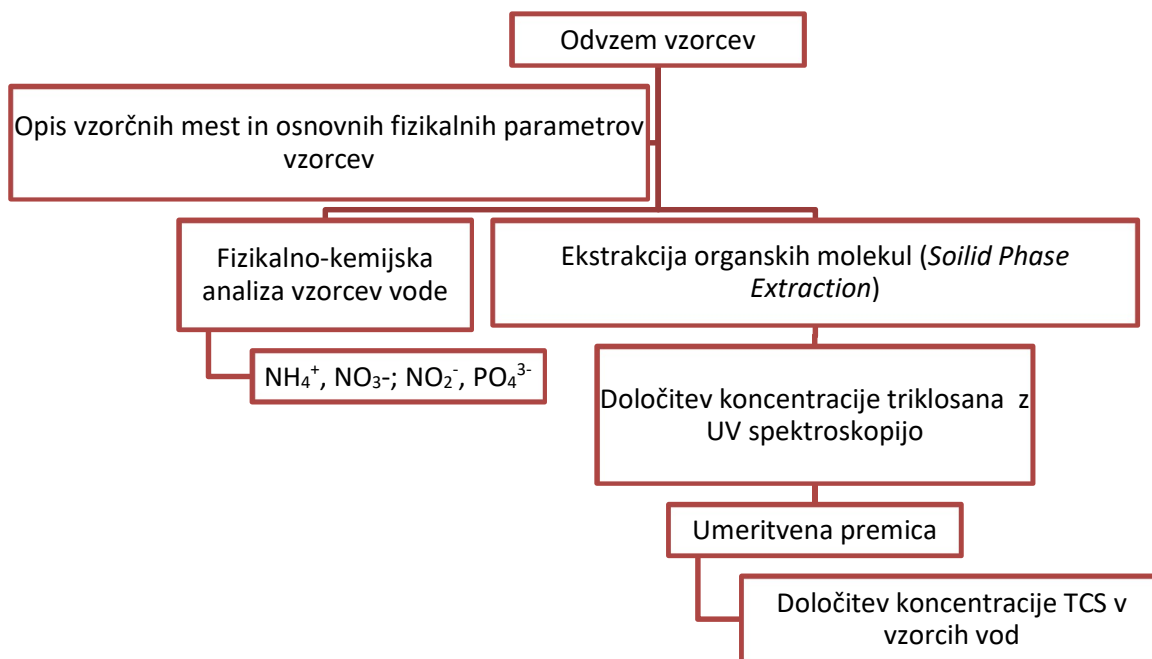
2.5 UČINEK TRIKLOSANA NA VODNE ORGANIZME

Nemec (2013) poroča, da je najnižja vrednost, kjer se pojavi učinek triklosana na fitoplankton, med 0,1 in 1,2 µg/L. Raziskave kažejo, da so kremenaste alge in vodna leča manj občutljive na triklosan kot zelene alge, pri čemer najvišjo občutljivost kaže enocelična zelena alga *Scenedesmus subspicatus* z EC₅₀ 0,7 µg/L.

Pri bakterijah je najnižja koncentracija, ki deluje toksično na bakterije, 0,21 µg/L. Vrednost LC₅₀ za 24 ur staro ličinko pisane riževe ribe (*Oryzias latipes*) je bila 399 µg/L (Ishibashi in sod., 2004). Veliko število študij poroča o tem, da so samčki bolj občutljivi na TCS kot samice in, da TCS lahko vpliva na razmerje med številom samic in samcev pri vodnih organizmih, kar potrjuje hipotezo, da je TCS endokrini motilec. Prav tako domnevajo, da lahko nizke

koncentracije triklosana sprožijo izražanje mehanizmov odpornosti pri bakterijah v naravnem okolju (SCCS, 2010; Brence, 2018).

3 EKSPERIMENTALNI DEL



SLIKA 4. Načrt praktičnega dela

Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC) je ena najučinkovitejših metod za ločevanje kompleksnih zmesi na posamezne komponente. Odlikujeta jo občutljivost in ponovljivost. Za ločevanje komponent zmesi v koncentriranih vzorcih, bi bila glede na literaturne vire bila najboljša izbira, vendar je v šolskem laboratoriju nimamo. Zato smo jo nadomestili s tankoplastno kromatografijo.

3.1 VZORČENJE

Datum vzorčenja: 18. – 21.10 2019. Vzorci so bili odvzeti na desetih točkah in sicer:

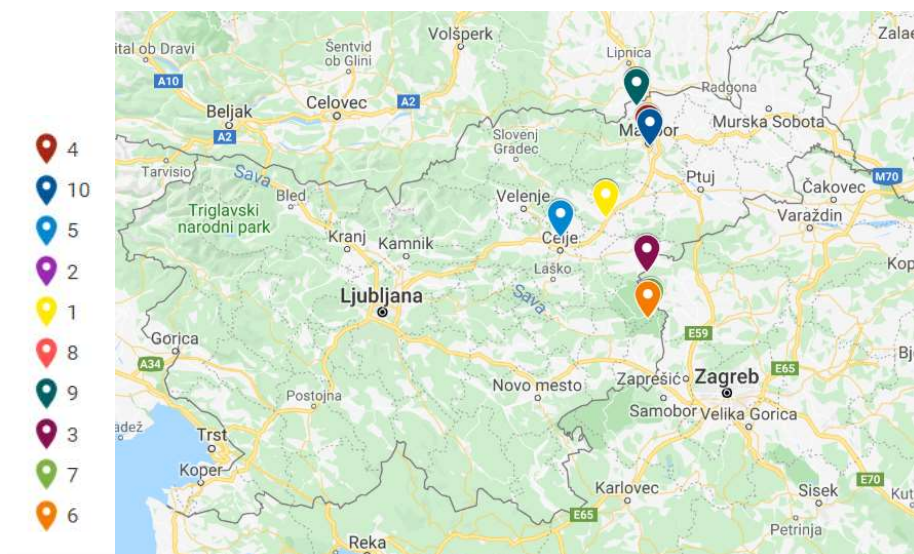
1. Prežigal pri Slovenskih Konjicah (pred čistilno napravo).
2. Prežigal pri Slovenskih Konjicah (po čistilni napravi).
3. Vonarje, Podčetrtek.
4. Maribor (Lent).
5. Loče, Celje.

6. Trebče, Bistrica ob Sotli (pred čistilno napravo).
7. Trebče, Bistrica ob Sotli (po čistilni napravi).
8. Svečina (pred čistilno napravo).
9. Svečina (po čistilni napravi).
10. Pitna voda iz pipe (vzorec je bil odvzet na mestu, kjer se avtorji naloge izobražujemo).

Ob odvzemu vzorcem so izmerili naslednje fizikalne parametre: temperatura vode, pH, prevodnost in ocena motnosti.

3.2 FIZIKALNA ANALIZA VZORCEV VODE

Opis mest¹ odvzema vzorcev vode je prikazan na zemljevidu 1 in opisan v Preglednici 5 (poglavje Rezultati). Vsi vzorci so bili odvzeti s sterilnimi temnimi steklenicami (1L). Po odvzemu smo vzorce shranili v hladilnik (4°C). Sledila je fizikalno-kemijska analiza vzorcev. Ta del raziskave smo opravili skupaj z raziskovalno ekipo, ki je preučevala vsebnost pol-sintetičnih estrogenov v vodnih vzorcih.



SLIKA 5. Prikaz mest odvzema vzorcev

3.2.1 ELEKTRIČNA PREVODNOST

¹ Zaradi merila velikosti zemljevida, se nekatera vzročna mesta prekrivajo (opomba avtorjev naloge).

Električna prevodnost je merilo koncentracije raztopljenih ionov v vodi. Odvisna je od stopnje disociacije in koncentracije elektrolita (baze, kisline, soli) v vodi. Električno prevodnost smo izmerili z Vernierjevim konduktometrom.

3.2.2 PH VREDNOST VZORCEV

pH vrednost je merilo za kislost oz. bazičnost vodnih raztopin. Definirana je kot: $pH = -\log[H_3O^+]$. Večina naravnih voda ima pH v območju od 6,5 in 9,5 .

3.2.3 DOLOČANJE MOTNOSTI VZORCEV VODE

Motnost vzorcev smo ocenjevali glede na štiri stopenjsko lestvico, kjer je ocena 1 predstavljal bistro tekočino, ocena 4 pa zelo motno. Ocena motnosti vzorcev je bila opravljena neposredno na mestu odvzema vzorcev.

3.2.4 TEMPERATURA VZORCEV VODE

Temperaturo vzorcev vode smo določili z elektronskim termometrom. Vodo smo zajeli v prozoren plastični lonček, vanj potopili termometer in temperaturo odčitali. Meritve so bile opravljene neposredno na mestu odvzema vzorcev.

3.3 KEMIJSKA ANALIZA VZORCEV VODE

Sledila je kemijska analiza vzorcev, ki je zajemala določitev skupnega organskega ogljika, amonijevih (NH_4^+), nitratnih (NO_3^-), nitritnih (NO_2^-) in fosfatnih ionov (PO_4^{3-}) ter določitev trdote vode. Določitev je potekala spektrofotometrično z ustreznimi reagenti iz kompleta Machery Nagel PF-11.

3.3.1 DOLOČITEV TOC (SKUPNEGA ORGANSKEGA OGLJIKA)

Celotni organski ogljik – TOC, je parameter, s katerim ugotavljamo prisotnost oz. koncentracijo organskih snovi v pitni vodi. TOC predstavlja koncentracijo celotnega organskega ogljika v vodi, vezanega na raztopljene ali suspendirane snovi. Vključene so najrazličnejše oblike ogljika. Za monitoring pitne vode v Sloveniji je najvišja dovoljena vrednost za TOC 4 mg/L. Ker ustreznih aparatov za natančno določitev skupnega organskega v šoli nimamo, smo se odločili za semi-kvantitativni pristop, za katerega se je izkazalo, da ima precej pomanjkljivosti,

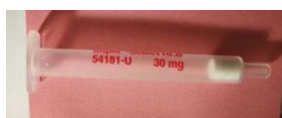
predvsem izgubo lahko hlapnih organskih spojin. Opis metode je povzet po Schumacher (2002).

Najprej smo stehali 250 mL čašo, nato vanjo s pomočjo merilne pipete prenesli 100 mL vzorca vode in previdno izparevali vodo do trdnega preostanka. Čašo smo ponovno stehali in določili maso trdnega preostanka. Nato smo s pomočjo koncentriranega vodikovega peroksida (30%) trdni preostanek oksidirali.

3.4 KONCENTRIRANJE VODNIH VZORCEV

Vsi vzorci vode so bili najprej filtrirani preko kvantitativnega filter papirja Whatman 42 (GE Healthcare Europe GmbH(Wha)), čemur je, z uporabo 1.0 mol/L HCl, sledila prilagoditev pH vseh vzorcev na 5.5. Izbrani pH se je izkazal kot najbolj optimalna rešitev v raziskavi, ki so jo opravili Madikizela s sod. (2014). Dhillon s sod. (2015) za triklosan navaja nižje pH vrednosti, vendar z nižanjem pH vrednosti narašča tudi možnost disociacije in s tem tudi verjetnost, da bomo ekstrahirali večje število snovi, ki so si strukturno podobne.

Pri zbiru ustreznih adsorpcijskih kolon smo upoštevali raziskave Madikizela s sod. (2014), kjer je bilo ugotovljeno, da je za ekstrakcijo TCS iz vod najbolj primerna Oasis HLB kolona. Zaradi visoke cene celotne aparature (z vakuumsko črpalko in ustreznim stojalom) smo se kasneje odločili za primerljivo alternativo Supelovih kolon.² Pri delu smo upoštevali navodila proizvajalca.



SLIKA 6. SUPEL HLB kolone za ekstrakcijo TCS iz vodnih vzorcev

Kolone smo najprej s pomočjo avtomatskih pipet (Winlab) prelili 4,00 mL metanola in 4,00 mL deionizirane vode in jih aktivirali za nadalje delo (ang. *conditioning*). Nato smo s pomočjo 1,00 mL avtomatske pipete (Winlab) dodajali vzorec vode (analit) in ga s pomočjo črpalke koncentrirali na trdnem nosilcu kolone. Hitrost pretoka je bila 10 mL/min. Po nanosu 100 mL vsakega vzorca smo kolono najprej sprali z 1,00 mL deionizirane vod (ang. *washing*) in analit

² Supel™-Select HLB SPE kolone so bile za faktor 8,3-krat cenejše kot Oasis HLB (opomba avtorjev), ki se v literaturi največkrat omenjajo kot najbolj učinkovite.

eluirali z 1,00 mL metanola (Sigma Aldrich) (ang. *elution*). Vzorce smo do prve analize shranili v hladilniku pri 4°C.

Tako pripravljene vzorce smo nato prenesli:

a) na TLC plošče → detekcija TCS v vzorcih s pomočjo standarda TCS (Sigma Aldrich, p.a.)

b) analizirali z UV spektrometrom (BioLambda, Perkin Elmer) → določitev koncentracije TCS v vzorcih vod.

Laboratorijsko delo od točke 3.2 do 3.4 je potekalo sinhrono z drugo raziskovalno ekipo, ki se ukvarjala z vsebnostjo estrogenov v preiskovanih vzorcih vod.

3.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Tankoplastna (tudi tenkoplastna) kromatografija (angl. *TLC ali Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika, ki se uporablja za čiščenje in ločevanje zmesi. Tankoplastno kromatografijo smo izvajali na plošči iz aluminijeve folije, ki je bila prekrita s tanko plastjo adsorpcijskega materiala, SiO₂. Poleg koncentriranih vzorcev smo na vsak kromatogram nanesli tudi standard TCS (1mg/mL).

Na ploščo smo s kapilaro nanesli 5 kapljic vsake raztopine, dober centimeter (cm) od baze (spodnjega roba plošče). Ploščo smo nato potopili v mobilno fazo (kromatografska komora), počakali, da se je kromatogram razvil in ga nato vizualizirali. Na koncu smo izračunali retencijski faktor.

Mobilna faza: diklorometan : aceton : NH₄OH (3:7:0,25 (v/v))

Stacionarna faza: Alugram® Xtra SIL G (Machery Nagel)

Vizualizacija razvitega kromatograma: I₂(s) → I₂(g)

Temperatura razvijanja kromatograma: 22 - 25°C

3.6 UV SPEKTROSKOPIJA

Po Yilmaz in Kadioglu (2013) ima TCS svoj absorpcijski maksimum v UV delu elektromagnetnega valovanja, pri cca. 280 nm. Glede na koncentracije TCS, ki so bile predstavljene v preglednici 1, 2 in 3 sva se odločili, da bova umeritveno premico naredili v

koncentracijskem območju med 0,018 g/L do 0,0009 g/L. V ta namen sva si pripravili izhodiščno raztopino s koncentracijo 0,0900 g /L.

Z analitsko tehtnico (Kern), sva stehtali natančno 0,0090g ($\pm 0,0001$) TCS ($C_{12}H_7Cl_3O_2$), ga prenesli v 100 mL merilno bučko in do oznake dolili metanol (Sigma Aldrich, p.a). Nato sva s pomočjo 50.0 mL birete ($\pm 0,05$) pripravili ustrezne standardne raztopine (preglednica 5), tako, da sva odmerili ustrezno prostornino 0,0900 g/L raztopine TCS.

PREGLEDNICA 4. Standardne raztopine TCS

V(0,0900 g/L), mL ($\pm 0,05$)	Koncentracija (g/L)
1,00	0,0009
5,00	0,0045
10,00	0,0090
15,00	0,0135
20,00	0,0180

Napaka priprave standardnih raztopin: $\frac{0,0001}{0,0090} \times 100 + \frac{0,1}{5,00} \times 100 = 1,1\% + 2,0\% = 3,1\%$

Sledil je izris umeritvene premice in določitev enačbe premice. Z njeno pomočjo sva izračunali koncentracijo TCS v vzorcih vode.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNA ANALIZA VZORCEV VODE

PREGLEDNICA 5. Fizikalne lastnosti vzorcev vode in opis odvzemnih mest

Številka vzorca	Kraj odvzema vzorca	Opis vzorčnega mesta	Temperatura vode (°C) ($\pm 0,1$)	pH vode ($\pm 0,5$)	Električna prevodnost vode ($\mu\text{S}/\text{cm}$) ($\pm 0,1$)	Ocena motnosti	Druga opažanja
1	Prežigal pri Slovenskih Konjicah (pred čistilno napravo)	obrežje	15,9	7,0	313,7	1	vonj po trohnohi
2	Prežigal pri Slovenskih Konjicah (po čistilni napravi)	obrežje	16,1	8,0	320,0	1	vonj po trohnohi
3	Sotla, Vonarje	obrežje	15,0	7,0		3	smrdeč vonj
4	Drava, Maribor (Lent)	obrežje	14,4	8,0	315,0	2	nedefiniran vonj
5	Šmartinsko jezero, Loče	obrežje	17,7	7,0	261,0	2	ni vonja
6	Trebče, Bistrica ob Sotli	obrežje	12,0	7,0	826,0	1	ni vonja
7	Trebče, Bistrica ob Sotli	obrežje	12,0	7,0	806,0	1	ni vonja
8	Svečina (pred čistilno napravo)	obrežje	18,5	7,0	310,0	2	vonj po trohnohi
9	Svečina (po čistilni napravi)	obrežje	19,1	7,0	315,0	1	ni vonja
10	pitna voda	pipa	18,6	7,0	632,0	1	ni vonja

4.2 KEMIJSKA ANALIZA VZORCEV VODE

PREGLEDNICA 6. Kemijska analiza vzorcev vode

	γ (NH ₄ ⁺), mg/L	γ (NO ₃ ⁻), mg/L	γ (NO ₂ ⁻), mg/L	γ (PO ₄ ³⁻), mg/L	γ (Fe ²⁺), mg/L	Trdota vode (°N)
Maksimalno dovoljena koncentracija za pitno vodo (MDK)	0,3	50,0	0,5	0,3	0,2	-
Vzorec št.						
1	0,05	8,3	0,1	0,0	0,1	10
2	0,05	6,1	0,1	0,0	0,1	15
3	0,05	9,0	0,1	0,0	0,5	25
4	0,05	6,2	0,1	0,0	0,1	15
5	0,05	15,9	0,1	0,0	0,1	15
6	0,05	9,2	0,1	0,1	0,1	25
7	0,05	10,2	0,3	0,0	0,1	25
8	0,15	29,4	0,3	0,0	0,1	15
9	0,15	19,1	0,1	0,2	0,1	20
10	0,00	1,0	0,1	0,2	0,1	15

4.3 CELOTNI ORGANSKI OGLJIK - TOC

PREGLEDNICA 7. Preostanek trdne snovi v vzorcih vod po oksidaciji s 30% H₂O₂

Vzorec št.	masa čaše, g (±0.0001 g)	masa čaše + trdnega preostanka, g (±0.0001 g)	masa trdnega preostanka, g (±0.0002 g)	masa čaše + oksidiranega preostanka, g (±0.0001 g)	razlika v masi, Δm, g (±0.0002 g)
1	48,0301	48,0337	0,0036	48,0328	0,0270
2	63,4012	63,4077	0,0065	63,4042	0,0003
3	64,6485	64,6561	0,0076	64,6500	0,0015
4	47,9425	47,9467	0,0039	47,9455	0,0003
5	63,3485	63,3528	0,0043	63,3538	0,0053
6	49,0045	49,0180	0,0135	49,0767	0,0722
7	47,6382	47,6448	0,0066	47,6382	0,0000
8	49,0868	49,1024	0,0156	49,1216	0,0348
9	47,8280	47,9288	0,1008	48,0063	0,1783
10	47,9325	47,9466	0,0141	47,9385	0,0006

Maso oksidiranih snovi sva izračunali kot:

$$m(\text{oksidirane organske snovi}) = \frac{\text{mase trdne začetne usledine} - \text{masa končne usledine}}{\text{mase trdne začetne usledine}} \times 100$$

PREGLEDNICA 8. Skupna masa organskih snovi, ki so se oksidirale s 30% H₂O₂

Vzorec št.	m(oksidirane organske snovi, g), (± 0.0001 g)
1	-6,500
2	0,9538
3	0,8026
4	0,9230
5	-0,2325
6	-4,3481
7	1,0000
8	-1,2308
9	-1,6688
10	0,9574

4.4 TLC KROMATOGRAMI

Čas razvijanja kromatograma: 15 - 20 min. Za vsak vzorec sva izvedli vsaj dve ponovitvi.



SLIKA 7. TLC kromatografija (potek)

Razviti kromatogrami so prikazani na sliki 8.



SLIKA 8. Kromatogrami

Iz kromatogramov vidimo, da sva mobilno fazo sicer dobro izbrali, vendar obstaja možnost, da je organskih komponent v zmesi bistveno več. Retencijskih faktorjev nismo računali, saj je bilo iz položaja (višine in oblike) ločenih komponent povsem jasno ali TCS je prisoten v vzorcu ali ne. Na osnovi kromatogramov sva zaključili, da je TCS prisoten v 9 vzorcih vode (preglednica 10).

PREGLEDNICA 9. Prisotnost TCS v vzorcih vode

Oznaka vzorca	TCS prisoten (DA/NE)
1	DA
2	DA
3	DA
4	DA
5	DA
6	DA
7	DA
8	DA
9	DA
10	NE

Rezultati so bili presenečenje, saj samo v primeru pitne vode TLC kromatogram ni pokazal ujemanja s standardom. Žal podatka, kako občutljiva je izbrana TLC analiza in katere so najnižje koncentracije, ki jih še lahko določimo, nisva nikjer zasledili.

4.5 UMERITVENA PREMICA ZA TCS

V ta namen sva uporabili UV spektrometer PerkinElmer Bio Lambda, za katerega je značilno, da omogoča določanje nizkih koncentracij preiskovanih snovi. Po umerjanju aparature z metanolom, sva v kvarčno kiveto dali standardno raztopino TCS in posneli celoten spekter. Najprej sva določili valovno dolžino maksimalne absorpcije (λ_{\max}), ki je bila pri 282 nm (slika 9).

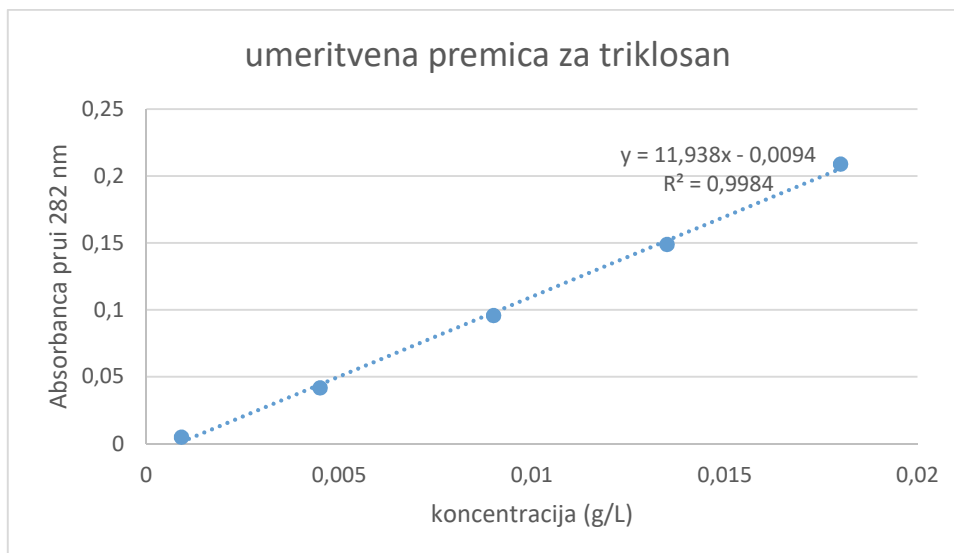


SLIKA 9. UV spektroskopska določitev koncentracije TCS v vzorcih vode

PREGLEDNICA 10. Absorbance standardnih raztopin TCS

Koncentracija (g/L)	Absorbanca pri 282 nm
$9,0 \times 10^{-4}$	0,005
$4,5 \times 10^{-3}$	0,042
$9,0 \times 10^{-3}$	0,096
$1,35 \times 10^{-2}$	0,149
$1,8 \times 10^{-2}$	0,209

Na tej osnovi je bila izrisana umeritvena premica.



GRAF 1. Umeritvena premica za triklosan

Enačba premice je: $y=11,938x - 0,0094$

4.6 VSEBNOST TCS V PREISKOVANIH VZORCIH VOD

Primer izračuna koncentracije TCS v vzorcih vod je:

Vzorec 1. $1,080 = 11,938x - 0,0094 \rightarrow x = 0,0913 \text{ g/L}$. Izračunana koncentracija velja za 100 x koncentriran vzorec, zato sva vse vrednosti delili s 100 in je zato končni rezultat $9,13 \times 10^{-4} \text{ g/L}$.

PREGLEDNICA 11. Koncentracija TCS v vzorcih vod

Vzorec št.	Abs pri 282 nm	koncentracija TCS g/L (g/L)
1	1,080	$9,13 \times 10^{-4}$
2	1,113	$9,40 \times 10^{-4}$
3	1,025	$8,66 \times 10^{-4}$
4	0,708	$6,01 \times 10^{-4}$
5	1,665	$1,40 \times 10^{-3}$
6	0,740	$6,30 \times 10^{-4}$
7	0,516	$4,40 \times 10^{-4}$
8	2,387	$2,01 \times 10^{-3}$
9	2,392	$2,01 \times 10^{-3}$
10	0,363	$3,12 \times 10^{-4}$

5 RAZPRAVA

5.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI VZORCEV VODE (MOTNOST, BARVA)

Motnost, ki jo v vodi povzročajo neraztopljene ali koloidne snovi, ki ovirajo transmisijo svetlobe skozi vodo (prisotnost sedimenta, biofilma in drugi vzroki), sva ocenili le z očesno zaznavo. Vsi vzorci so imeli motnost ocenjeno med 1 in 3, torej pod 4 enotami NTU, ki predstavljajo mejo med očesno in instrumentalno zaznavo (Pravilnik o pitni vodi, 2017). Sobne analitske tehnike v ta namen uporabljajo nefelometrične turbidimetrične metode (enota NTU).

Barva je indikatorski parameter in bolj nakazuje na določene spremembe v vodi (npr. prisotnost železovih oksidov). Vsi vzorci vode, razen vzorca 8, so bili brezbarvni.

5.2 pH VODNIH VZORCEV

pH vseh odvzetih vodnih vzorcev se je gibal v razponu od 7,0 do 8,0, torej vrednosti, ki so značilne za večino površinskih vod Slovenije.

5.3 ELEKTRIČNA PREVODNOST IN MINERALIZACIJA

Električna prevodnost je dober skupinski pokazatelj za koncentracijo topnih, disociiranih snovi (elektrolitov) v vodi (merilo mineralizacije vode). Izmerjene vrednosti so se gibale med 315 $\mu\text{S}/\text{cm}$ do 816,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, kar pomeni, da mejna vrednost, ki je določena za pitno vodo (2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$) ni bila nikjer presežena. Širok interval rezultatov meritev električne prevodnosti kaže na raznoliko mineraloško sestavo vzorcev³. Temu primerno so bile različne meritve trdote vode, ki so se gibale med 10 do 25 nemških trdotnih stopinj ($^{\circ}\text{N}$), kar pomeni, da so naši vzorci predstavljali srednje trde vode (vzorci 1, 2, 4, 5, 8 in 10) oz. trde vode. Meritve trdote vode in specifične električne prevodnosti sovpadajo.

³ Področje mineralizacije oz. trdote vode pitne vode ni regulirano, znane so le splošne ugotovitve, na primer mineralizacija pod 75 mg/l lahko negativno vpliva na mineraloško ravnotežje v telesu (opomba avtorjev).

5.4 KEMIJSKA ANALIZA VODE (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , Fe^{2+})

Amonij je indikator za mikrobiološko in fekalno onesnaženje. Vsi odvzeti vzorci so imeli vsebnost amonijevih ionov pod 0,15 mg/L, koncentracijo nitrata(V) (NO_3^-) pod 30 mg/L in koncentracijo nitrita (NO_2^-) pod 0,3 mg/L. Koncentracija železovih ionov se je gibala med 0,1 – 0,5 mg/L, kar pomeni, da izmerjene vrednosti niso vplivale na obarvanje vode in njene organoleptične lastnosti.

5.5 CELOTNI ORGANSKI OGLJIK - TOC

Celotni organski ogljik - TOC je parameter s katerim ugotavljamo prisotnost oz. koncentracijo organskih snovi v pitni vodi. Meritev še ne omogoča zaključkov, saj je potrebna interpretacija v povezavi z vrednostmi ostalih parametrov. Pri vzorcih 1, 5, 6, 8 in 9 se je masa oksidiranih snovi povečala, iz česar sklepava, da usedlino predstavljajo delno oksidirane anorganske in organske snovi. V primerih znižanja mase, sva zaključili, da je znižanje posledica popolne oksidacije (nastanek CO_2 in vodne pare), in razlika v masi predstavlja okvirno vrednost skupnih organskih snovi v usedlini. Za boljšo interpretacijo teh podatkov bi potrebovali vsaj še en pramateri meritev organskih snovi, ki bi se lahko delno ali popolno oksidirale.

5.6 TLC ANALIZA VZORCEV VODE

S TLC analizo sva dobili v pogled v prisotnost ali odsotnost TCS v koncentriranih vzorcih preiskovanih vod (kvalitativen podatek). Ugotovili sva, da je v vzorcih z oznako od 1-9 TCS zagotovo prisoten, nismo pa tega potrdili za vzorec 10 (pitno vodo).

5.7 UV SPEKTROSKOPIJA

Ti rezultati so potrdili rezultate, ki sva jih dobili z TLC analizo. V vzorcih vod 1 do 9 je TCS bil zdaj tudi kvantificiran. Absorbanca pri 292 nm pa je pokazala, da je verjetno prisoten tudi v pitni vodi (vzorec 10). Najvišje koncentracije smo izmerili na vtoku in iztoku iz komunalne čistilne naprave v Svečini, kjer je bilo izmerjeno 2,01 mg TCS/L ali 201 $\mu\text{g/L}$. Opazili sva, da ni razlik v koncentraciji na vtoku ali iztoku v čistilno napravo, praktično. Sledi vzorec 5 – Šmartinsko jezero z 140 $\mu\text{g/L}$ TCS. Vsi ostali vzorci vod so bili koncentracijskem območju 10^{-4} g/L, pri čemer zopet izstopajo meritve na komunalni čistilni napravi Prežigal pri Slovenskih Konjicah. Tudi v tem primeru vidiva, da so razlike na vtoku ali iztoku minimalne in se gibljejo med 91 $\mu\text{g/L}$ do 94 $\mu\text{g/L}$. Sledijo Sotla (Vonarje) z 87 $\mu\text{g/L}$, Drava (Lent, Maribor) z 60 $\mu\text{g/L}$,

Trebče (Bistrica ob Sotli), kjer sta bila odvzeta dva vzorca v katerih smo izmerili koncentracijo TCS med 44 µg/L in 63 µg/L, ter najnižji koncentracijo v pitni vodi, ki je bila odvzeta iz šolske pipe - 31 µg/L. Iz tega podatka smo zaključili, da TLC analiza omogoča spodnjo mejo detekcije nad 31 µg/L.

Če primerjamo podatke z meritvami, ki sva jih zbrali v preglednicah 2 in 3, vidimo, da ti podatki sovpadajo s podatki, ki so jih za sladke vode izmerili v Španiji (Singer in sod., 2003; Aguera in sod. (2003). Žal je vrednost, ki sva jo izmerili v pitni vodi, v rangu kitajskih mest (Yang in sod., 2014), ki navajajo koncentracijo TCS 49 µg/L.

6 ZAKLJUČKI

Razpoložljivi podatki o pojavu TCS v različnih vodnih virih so trenutno razpršeni, pomanjkljive so tudi toksikološke informacije. Kljub indicem, da TCS lahko razpada na okoljsko zelo škodljive snovi (slika 2), med katerim so tudi mnoge dokazano kancerogene snovi, in da je TCS tudi na seznamu spojin, ki so endokrini motilci, skrbno zasnovanih epidemioloških študij zaenkrat ni. Tudi podatkov o meritvah TCS v Evropi je malo, pretežno se nanašajo na komunalne čistilne naprave in blato teh čistilnih naprav.

Čeprav sva bili v začetku zelo skeptični ali bodo načrtovane metode dela res omogočale pridobitev relevantnih podatkov, ob zaključku naloge ugotavljava, da so rezultati, ki sva jih dobili, v območju meritev, o katerih poročajo tudi drugi raziskovalci. Še vedno obstaja utemeljen dvom, da se pridobljeni podatki nanašajo le na TCS, saj je mogoče, da smo s koncentriranjem vzorcev vod, ekstrahirali tudi druge organske spojine, ki so imele podoben recenzijski faktor in valovno dolžino, kjer je njihova največja absorbcija v UV spektru.

Molska masa TCS je 289,54 g/mo in v tem velikostnem razredu so lahko tudi sintetični estrogeni, ki so primerljivi po topnosti ter polarnosti. Ker smo si vzorce koncentratov delili z drugo raziskovalno skupino, za dodatne analize žal ni bilo na voljo dovolj vzorca. Vendar, če privzameva, da je glavnino tarčnih molekul, ki sva jih določali predstavljal triklosan, lahko podava odgovor na raziskovalno vprašanje »Kolikšna je koncentracija triklosana v površinskih vodotokih in odpadnih vodah komunalnih čistilnih naprav v Mariboru in njegovi okolici?«. Ta je:

- Reka Drava in reka Sotla vsebujeta od 60 µg/L do 87 µg/L TCS.
- Šmartinsko jezero – vsebuje 140 µg/L.

- Komunalne čistilne naprave niso učinkovite pri odstranjevanju TCS, saj razlik v koncentraciji med vtokom in iztokom vod praktično nismo izmerili. Najvišje vrednosti so bile izmerjene v Komunalni čistilni napravi v Svečini 201 µg/L, sledi komunalna čistilna naprava Prežigal pri Slovenskih Konjicah z 91 µg/L do 94 µg/L.
- Pitna voda, odvzeta iz šolske pipe je vsebovala 31 µg/L TCS.

S tem sva potrdili prvo hipotezo - triklosan se nahaja v vseh vodnih virih in prav tako drugo hipotezo, da čistilne naprave niso učinkovite pri odstranjevanju TCS.

Kako naprej?

Zagotovo bi bilo smiselno vse meritve ponoviti v različnih letnih časih in vzpostaviti neke vrste monitoring za TCS. Slednje se zdi po pandemiji koronavirusa še toliko bolj smiselno, saj se je uporaba razkužilnih enormno povečala. Triklosan, s kože odstrani tudi človeku koristnih bakterij, ki naše telo ščitijo pred vdorom drugih mikroorganizmov (tudi virusov) in s tem zmanjšajo našo imunske varnosti. Fizikalno-kemijske lastnosti TCS kažejo možnost bioakumulacije te snovi in njeno kopičenje po prehranjevalni verigi. TCS je obstojen v okolju (aerobni pogoji). Zato je zaskrbljenost zaradi prisotnosti TCS v okolju in njegovih možnih negativnih vplivih na zdravje ljudi, živali in rastlin, upravičena. Podatkov o tem, kaj izmerjene koncentracije pomenijo za človeka in vodne živali, nimava. Če sklepava po navedbah avtorjev, ki smo jih omenili v teoretičnem delu naloge, so vse izmerjene koncentracije nevarne za razvoj zelenih alg, fitoplanktona ter tudi rib (Drava, Sotla, Šmartinsko jezero). Zato b bilo nujno, da bi z referenčno metodo najine rezultate preverili, saj je napaka meritev relativno nizka (3%), vendar je mogoče, da meritve niso zajele samo TCS, ampak vse njemu sorodne spojine. Na tej osnovi obstaja upravičen dvom o veljavnosti pridobljenih podatkov; saj predvidevava, da so rezultati višji, kot so dejansko. Če niso, so izjemno zaskrbljujoči. Ker sva z eksperimentalnim delom zaključili v februarju, ponovitev meritev od marca do danes, zaradi korona virusa ni bila več mogoča.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Živimo v času izrazitega lova za profitom. Zaradi slednjega se je v 20. stoletju začela diskusija o družbeni odgovornosti. Primer vprašanja družbene odgovornosti je podjetje Colgate. FDA in EPA (Environmental Protection Agency) sta se 2010 odločila, da študije o TCS ne morejo povsem jasno dokazati, da TCS nima negativnega učinka na zdravje uporabnikov, zato so

triklosan odstranili iz seznama dovoljenih sestavin. Temu je sledil tudi Colgate®, vendar ga ni odstranil iz vseh svojih izdelkov; najbolj prodajani izdelki ga še vedno vsebujejo. Tukaj je veliko etnično vprašanje, če je zavoljo profita pravilno da podjetje ignorira družbeno odgovornost? Profit bo večini podjetij vedno prioriteta, ampak ali smo pripravljeni žrtvovati naše zdravje in dobro počutje zaradi tega? Nismo. Z nalogo sva želeli osvetliti področje, ki je trenutno še siva lisa v Sloveniji. Ob tem naj dodava, da so številne nacionalne agencije za javno zdravje, ki so v času pandemije koronavirusa opozarjale na higieno rok in uporabo ustreznih razkužil navajale, naj potrošniki ne izberejo razkužil, ki vsebujejo triklosan.

8 UPORABLJENA LITERATURA

Adolfsson-Erici, M., Petterson, M., Parkkonen, J., Sturve J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46:1485–1489

Agüera, A., Fernández-Alba, A. R., Piedra, L., Mézcua, M., Gómez, M. J. (2003). Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 480:193–205

Allmyr, M., Harden, F., Toms, L. M., Mueller, J. F., McLachlan, M. S., Adolfsson-Erici, M., Sandborgh-Englund, G. (2008). The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. *Sci Total Environ* 393:162–167

Armstrong, D. L., Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M., Torrents, A. (2018). Degradation of triclosan and triclocarban and formation of transformation products in activated sludge using benchtop bioreactors. *Environ Res* 161:17–25

Aufiero, M., Butler, C., Jaser, J. (2012). An Analysis of Methods for Detecting Triclosan and Removal of Triclosan from Water Using Activated Carbon and Zeolites. Dostopno na: An Analysis of Methods for Detecting Triclosan and Removal of Triclosan from Water Using Activated Carbon and Zeolites (citirab21.10. 2019)

Avisar, D., Lester, Y., Hamane, H. (2010). pH induced polychromatic UV treatment for the removal of a mixture of SMX, OTC and CIP from water. *J. Hazard. Mat.* 175, 1068–1074.

Azzouz, A., Rascón, A. J., Ballesteros, E. (2016). Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 119:16–26. doi:10.1016/j.jpba.2015.11.024. Accessed 2 Dec 2015

Bester, K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. *Water. Res* 37(16):3891–3896

Brence, A. (2019). Primerjava antimikrobne učinkovitosti evgenola, indol-3-karabinola in karvona s triklosanom. Raziskovalna naloga, Mladi za napredek Maribora, 36. srečanje, II. gimnazija Maribor.

- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., Needham, L. L. (2008). Urinary concentrations of triclosan in the U.S. Population: 2003–2004. *Environ Health Perspect* 116:303–307
- Chen, X. J., Casas, M. E., Nielsen, J. L., Wimmer, R., Bester, K. (2015). Identification of triclosan-O-sulfate and other transformation products of triclosan formed by activated sludge. *Sci Total Environ.* 505: 39–46
- Chu, S., Metcalfe, C. D. (2007). Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1164:212–218
- Dhillon, G., P., Kaur, S., Pulicharla R., Kaur Brar S., Cledón M., Verma, M., Surampalli R., (2015). Triclosan: Current Status, Occurrence, Environmental Risks and Bioaccumulation Potential. *Int J Environ Res Public Health*, let.,12, št. 5, str. 5657–5684.
- EPA. (2010). Triclosan FactsWashington, DCU.S. Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/triclosan_fs.htm, accessed 13 May 2010
- Foran, C. M., Bennett, E. R., Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar Environ Res* 50:153–156
- Helbing, C. C., van Aggelen, G., Veldhoen, N. (2011). Triclosan affects thyroid hormone dependent metamorphosis in anurans. *Toxicol Sci* 119:417–418
- Houtman, C. J., Van Oostveen, A. M., Brouwer, A., Lamoree, M. H., Legler, J. (2004). Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay directed fractionation. *Environ Sci Technol.* 38(23):6415–6423
- Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M. K., Schauer, F. (2000). Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microb.* 66:4157–4160
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and introduction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology.* 67: 167–179.
- Jung, E. M., An, B. S., Choi, K. C., Jeung, E. B. (2012). Potential estrogenic activity of triclosan in the uterus of immature rats and rat pituitary GH3 cells. *Toxicol Lett* 208:142–148

Kim, Y. M., Murugesan, K., Schmidt, S., Bokare, V., Jeon, J. R., Kim, E. J., Chang, Y. S. (2011). Triclosan susceptibility and co-metabolism—a comparison for three aerobic pollutant-degrading bacteria. *Bioresour Technol* 102:2206–2212

Kirk–Othmer Encyclopedia of Chemical Technology (1993) 4th ed. vol 1. Wiley, New York, V7, 1026

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211

Kumar, A., Peck, A.M., Palefsky, W., Sajwan, K.S. (2008). Clearing rate and mass loadings of triclosan and triclocarban in four wastewater treatment plants in Savannah, Georgia, USA. *Organohalogen Compound* 2008; 70: 233-236.

Lee, D. G., Chu, K. H. (2013). Effects of growth substrate on triclosan biodegradation potential of oxygenase-expressing bacteria. *Chemosphere* 93:1904–1911

Li, X., Ying, G. G., Su, H. C., Yang, X. B., Wang, L. (2010). Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int* 36:557–562

Loraine, G. A., Pettigrove, M. E. (2006). Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ Sci Technol* 40:687–695

Lu, S. Y., Yu, Y. L., Ren, L., Zhang, X. L., Liu, G. H., Yu, Y. X. (2018). Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact. *Environ Sci Technol* 621:1389–1396

MacIsaac, J. K., Gerona, R. R., Blanc, P. D., Apatira, L., Friesen, M. W., Cop-polino, M., Janssen, S. (2014). Health care worker exposures to the antibacterial agent triclosan. *J Occup Environ Med* 56:834–839

Madikizela, L. M., Chimuka, L., Muthwa, S.F. (2014). Determination of Triclosan and Ketoprofen in River Water and Wastewater by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *South African journal of chemistry. Suid-Afrikaanse tydskrif vir chemie* 67: str. 143-150

- McAvoy, D. C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W. S. (2002). Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environ Toxicol Chem* 21(7):1323–1329
- Miller, T. R., Heidler, J., Chillrud, S. N., Delaquil, A., Ritchie, J. C., Mihalic, J. N., Bopp, R., Halden, R. U. (2008). Fate of triclosan and evidence for reductive dechlorination of triclocarban in estuarine sediments. *Environ Sci Technol* 42(12):4570–4576
- Morales, S., Canosa, P., Rodriguez, I., Rubi, E., Cela, R. (2005). Microwave assisted extraction followed by gas chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and two related chlorophenols in sludge and sediments. *J Chromatogr A* 1082(2):128–135
- Nemec, N. (2013). Vezava triklosana na vlakna iz polietilen tereftalata (Diplomsko delo, Univerza v Novi Gorici).
- NICNAS. (2009). National industrial chemicals notification and assessment scheme. Triclosan. Priority Existing Chemical Assessment Report No. 30 Australian Government Department of Health and Aging. <http://www.nicnas.gov.au/communications/publications/chemical-assessments> and www.nicnas.gov.au/chemical-information/pec-assessments, January 2009.
- Orhon, A. K., Orhon, K. B., Yetis, U., Dilek, F. B. (2017). Fate of triclosan in laboratory-scale activated sludge reactors—effect of culture acclimation. *J Environ Manag* XX:1–8
- Pannu, M. W., Toor, G. S., O'Connor, G. A., Wilson, P. C. (2012). Toxicity and bioaccumulation of biosolids-borne triclosan in food crops. *Environ Toxicol Chem* 31:2130–2137
- Padhye, L. P., Yao, H., Francis, T., Kung'u, F. T., Huang, C. H. (2014). Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Res* 51(15):266–276
- Park, H. G., Yeo, M. K. (2012). The toxicity of triclosan, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether to the regeneration of cnidarian, *Hydra magnipapillata*. *Mol Cell Toxicol* 8:209–216
- Perencevich, E. N., Wong, M. T., Harris, A. D. (2001). National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *Am J Infect Control* 29:281–283

Perez, A. L., De Saylor, M. A., Slocombe, A. J., Lew, M. G., Unice, K. M., Donovan, E. P. (2013). Triclosan occurrence in freshwater systems in the United States (1999–2012): a meta-analysis. *Environ Toxicol Chem* 32(7):1479–1487

Pravilnik o pitni vodi. Uradni list RS, št. 51/17 z dne 19. 9. 2017. Dostopno na: <http://pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV3713#>

Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., Griffin, J. (2002). An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environ Toxicol Chem* 21(11):2483–2492

Rule, K. L., Ebbett, V. R., Vikesland, P. J. (2005). Formation of Chloroform and Chlorinated Organics by Free-Chlorine-Mediated Oxidation of Triclosan. *Environmental Science and Technology*, 39: 3176–3185. Sanchez-Prado L., Barro R., Garcia-Jares

Rüdel, H., Böhmer, W., Müller, M., Fliedner, A., Ricking, M., Teubner, D., Schröter-Kermani, C. (2013). Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: results from the German Environmental Specimen Bank. *Chemosphere* 91(11):1517–1524

SCCP-Scientific Committee on Consumer Products. (2009). Opinion on triclosan. SCCP/1192/08SCCP. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_166.pdf

SCCP - Scientific Committee on Consumer Safety – SCCS. (2010). Opinion on triclosan: Antimicrobial Resistance. European Commission: str. 6, 14 -15 in 18 -21.

Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 202:1–7

Schumacher, B.A. (2002). Methods for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) In Soils and Sediments. Ecological Risk Assessment Support Center, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.

Singer, H., Muller, S., Tixier, C., Pillonel, L. (2002). Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ Sci Technol* 36(23):4998–5004

US CDC. (2014). Fourth national report on human exposure to environmental chemicals updated tables, July 2014. US Department of Health and Human Services Centres for Disease Control. http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_UpdatedTables_Jul2014.pdf. Accessed 22 May 2016

Wang, L. O., Falany, C. N., James, M. O. (2004). Triclosan as a substrate and inhibitor of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and UDP-glucuronosyl transferase in human liver fractions. *Drug Metabolism and Disposition*, 32: 1162–1169.

Windler, L., Height, M., Nowack, B. (2013). Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications. *Environment International*, 53: 62-73. Wu J.-L., Lam N. G., Martens D., Kettrup A., Cai Z. 2007.

Wu, J. L., Lam, N. G., Martens, D., Kettrup, A., Cai, Z. (2007). Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta*, 72: 1650–1654

Xue, J., Wu, Q., Sakthivel, S., Pavithran, P. V., Vasukutty, J. R., Kannan, K. (2015). Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children. *Environ Res* 137:120–128. doi:10.1016/j.envres.2014.12.007

Yang, G. C. C., Yena, C. H., Wang, C. L. (2014). Monitoring and removal of residual phthalate esters and pharmaceuticals in the drinking water of Kaohsiung City, Taiwan. *J Hazard Mater* 277:53–61

Yilmaz, B., Kadioglu, Y. (2013). Quantitation of 17 β -estradiol in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36(8) ·