

UDK/UDC: 547.583.2:551.444-049.34

Prejeto/Received: 11.02.2019

Izvirni znanstveni članek – *Original scientific paper*

Sprejeto/Accepted: 22.05.2019

BIORAZGRADNJA UMETNEGA SLADILA SAHARIN V POVRŠINSKIH IN PODZEMNIH VODAH

BIODEGRADATION OF THE ARTIFICIAL SWEETENER SACCHARIN IN SURFACE WATERS AND GROUNDWATERS

Anja Slavič¹, Gabriela Kalčíkova¹, Anita Jemec Kokalj², Andreja Žgajnar Gotvajn^{1,*}

¹ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Izvleček

Namen dela je bil ovrednotiti biorazgradljivost široko uporabljanega umetnega sladila saharin v površinskih in podzemnih vodah. Umetna sladila zaradi njihove stabilnosti v zadnjem času uvrščamo med problematična onesnaževala. Biorazgradnjo saharina smo spremljali v površinskih vodah – v rekah Ljubljanica, Pivka in Unica – ter v podzemni vodi – reki Pivka v Planinski jami –, da bi določili njegovo stabilnost v različnih pogojih v okolju. Saharin se je najbolje razgrajeval (98 % v 14 dneh) v hipertrofni rečni vodi z višjimi koncentracijami fosforja in dušika. V primerjavi z optimalnimi pogoji standardiziranega testa biorazgradnje se je pri običajnih pogojih v okolju podaljšal čas lag faze in čas razgradnje. Potrdili smo, da se saharin v okolju v vodah, ki vsebujejo dovolj aktivnih mikroorganizmov in potrebnih hranil za njihovo delovanje, razgrajuje.

Ključne besede: biorazgradnja, okolje, podzemna voda, površinske vode, saharin, umetno sladilo.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the biodegradability of the artificial sweetener saccharin in surface waters and groundwater. Artificial sweeteners are generally persistent under environmental conditions and have been recently classified as emerging pollutants. Biodegradability in three surface waters and one groundwater was tested: the rivers Ljubljanica, Pivka, and Unica, and the groundwater Planina Cave (river Pivka). Under environmentally relevant conditions, saccharin degraded well in hypertrophic water (98%, 14 days) due to high concentrations of phosphorus and nitrogen. There was a longer lag phase and biodegradation time compared to the optimum conditions achieved in the standardized laboratory test. It has been concluded that saccharin is biodegradable in natural waters if said waters contain enough microorganisms and nutrients.

Keywords: artificial sweetener, biodegradation, environment, groundwater, saccharin, surface waters.

* Stik / Correspondence: andreja.zgajnar@fkkt.uni-lj.si

© Slavič A. et al.; Vsebina tega članka se sme uporabljati v skladu s pogoji [licence Creative Commons Priznanje avtorstva – Nekomercialno – Deljenje pod enakimi pogoji 4.0.](#)

© Slavič A. et al.; This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution – Non Commercial – ShareAlike 4.0 Licence.](#)

<https://doi.org/10.15292/acta.hydro.2018.10>

1. Uvod

Saharin je prvo umetno sladilo z molekulske formule $C_7H_5NO_3S$. Njegovo poimenovanje IUPAC je 1,1-dioski-1,2-benzotiazol-3-on, kemijsko gre za sulfonil amid. V primerjavi s saharozo ima bistveno večjo sladilno moč, saj je 400- do 500-krat slajši. Proizvodnja in poraba umetnih sladil kot aditivov v živilski industriji narašča iz leta v leto, predvsem zaradi spremenjene potrošniške filozofije ter zaradi nizkih stroškov proizvodnje v primerjavi s sladkorjem iz sladkorne pese in drugih naravnih virov (Kobetičkova et al., 2016).

Saharin se uporablja kot dodatek v hrani in pijači. Ohranja kakovost in lastnosti hrane, prekriva neprijetne okuse in poudari okus. Razpad sladila lahko vpliva na rok uporabnosti in varno uporabo izdelka, zato sta njegova topnost in stabilnost ključnega pomena za uspešnost na trgu. Najdemo ga tudi v izdelkih za ustno higieno in oralnih medicinskih pripravkih. V farmaciji se uporablja za oblikovanje kristalov, ki izboljšujejo topnost zdravil (Kudo in Takiyama, 2014). Kislinska oblika saharina je slabo topna v vodi, komercialno pa je dostopen kot natrijeva in kalcijeve sol, ki sta dobro topni in stabilni v vodi (O'Donnell in Kearsley, 2012).

Za uporabo je dovoljen v 90 državah. Koristen je pri nadzoru telesne teže, pri preprečevanju diabetesa in zmanjševanju pojavnosti zobne gnilobe. FAO in WHO sta določili predlagani dnevni vnos saharina do 5 mg kg^{-1} telesne mase človeka (Los Weinert et al., 2004; Armenta et al., 2004). Po zaužitju se ne presnavlja, skoraj popolnoma se izloči preko ledvic s sečnino in ni klasificiran kot rakotvoren (O'Donnell in Kearsley, 2012; Renwick, 1985).

V zadnjih letih so v komunalnih odpadnih vodah ter v vodah v naravnem okolju zaznali umetna sladila v visokih koncentracijah (mg L^{-1}) (Lange et al., 2012; Kobetičkova, 2016). Načelno pa velja, da so običajne okoljske koncentracije bistveno nižje, npr. v rekah na Kitajskem je bila koncentracija do $0,21 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, na Finskem v reki Vantaa, v okolici mesta Helsinki $0,49 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, v Kanadi v reki Grand,

na območju mesta Cambridge $7,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Sang et al., 2014; Kobetičkova et al., 2016).

Na koncentracijo saharina v naravnih vodah vpliva predvsem kmetijska dejavnost ter urbana središča (Spoelstra et al., 2013). Čeprav je učinkovitost komunalnih čistilnih naprav za odstranjevanje saharina visoka (do 90 %), se zaradi velikih količin odpadne vode lahko pojavijo višje koncentracije saharina v rekah za čistilnimi napravami. Saharin se uporablja kot dodatek v živalsko krmo in nespremenjen prehaja preko prebavnega trakta živali, zato ga lahko najdemo tudi v bolj agrarnih okoljih. Pri prašičih so v iztrebkih določili do 12 mg L^{-1} saharina. Tam je bil stabilen do dva meseca, zato lahko prehaja v okolje tudi z živalskim gnojem (Buerge et al., 2011; Spoelstra et al., 2013; Kobetičkova et al., 2016).

Študije so pokazale, da umetna sladila niso povsem neškodljiva v okolju, ampak lahko vplivajo na fotosintezo in na prehransko vedenje zooplanktona (Sang et al., 2014). Njihove dolgoročne posledice pojavljanja v okolju ter morebitne posledice kemijskih pretvorb v okolju so v veliki meri še neraziskane (Sang et al., 2014). Zato so pomembni podatki o stabilnosti oz. razgradljivosti saharina v vodnem okolju.

Namen dela je bil določiti biorazgradljivost umetnega sladila saharin v površinskih in podzemnih vodah pri običajnih pogojih, ki jih najdemo v naravnem okolju.

2. Podatki in metode

2.1 Karakterizacija površinskih in podzemnih voda

Biorazgradljivost saharina smo določili v vzorcih površinskih voda: reka Pivka, približno 150 m JV od vhoda Postojnske jame (GK-koordinate: Y 5438520, X 5071085), reka Ljubljana, izvir Močilnik (GK-koordinate: Y 5445154, X 5090423), reka Ljubljana, za čistilno napravo na Vrhniki (GK-koordinate: Y 5446940, X 5092085), reka Unica, približno 850 m SZ od Jakovice (GK-koordinate: Y 5441634, X 5080797) in v podzemni vodi: reka Pivka v Planinski jami (GK-koordinate

vhoda Planinske jame: Y 5441755, X 5075350). Izbrane vode smo vzorčili kot enkratni zajem večkrat, samo z določenimi vodami pa smo izvedli poskuse določitve biorazgradljivosti saharina. Vode smo tako najprej analizirali, rezultati so zbrani v preglednici 1. Določili smo koncentracije amonijevega dušika (NH₄-N), nitritnega dušika (NO₂-N), nitratnega dušika (NO₃-N), ki so podani kot vsota (N), ter vsebnost klorida, ortofosfata v obliki fosforja (PO₄-P), vsebnost hidrogen karbonata (HCO₃⁻), vsebnost celotnega organskega ogljika (TOC) in prevodnost.

Vode smo razdelili v štiri trofična stanja na osnovi vsebnosti fosforja, kar prikazuje preglednica 2. Oligotrofne vode so vode z najmanjšo biološko produktivnostjo, katerih kakovost je označena kot dobra. V mezotrofnih vodah je biološka aktivnost zmerna, kakovost je zadostna. Evtrofne in hipertrofne vode imajo največjo biološko aktivnost, njihova kakovost je označena kot slaba. V teh vodah je pospešena rast alg in višje razvitih rastlin, saj so obogatene s hranili, zlasti dušikovimi in fosforjevimi spojinami (Lake County Water Authority, 1996).

Preglednica 1: Karakterizacija površinskih in podzemnih voda.

Table 1: Surface and groundwater characterisation.

Vode	Odvzem vzorcev	N (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ -P (mg L ⁻¹)	HCO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	TOC (mg L ⁻¹)	Prevodnost (µS cm ⁻¹)	Klasifikacija vod
reka Pivka pred vhomom v Postojnsko jamo	18. 3. 2015	1,9662	0,0800	181,48	42,63	34,10	361,70	evtrofna
Reka Unica pri Jakovici	18. 3. 2015	0,9985	0,0153	158,60	10,13	75,01	230,20	mezotrofna
Reka Unica pri Jakovici	17. 7. 2015	0,0745	0,0929	125,05	8,00	3,54	174,30	evtrofna
Reka Unica pri Jakovici	17. 6. 2015	3,7258	0,5006	140,30	38,50	17,82	501,20	hipertrofna
reka Ljubljana, izvir Močilnik	1. 8. 2016	0,2573	0,0516	251,63	5,75	0,34	369,40	evtrofna
reka Ljubljana, za čistilno napravo v Vrhnikih	1. 8. 2016	0,2507	0,0749	259,25	6,75	1,30	399,50	evtrofna
reka Pivka v Planinski jami	18. 3. 2015	1,7825	0,0304	178,43	31,25	41,40	317,60	mezotrofna
reka Pivka v Planinski jami	17. 6. 2015	2,2645	0,0147	91,50	10,25	20,90	250,70	mezotrofna
reka Pivka v Planinski jami	12. 10.2015	6,7592	0,0732	189,10	25,25	2,08	251,70	evtrofna

Preglednica 2: Klasifikacija vod (ARSO, 2008).

Table 2: Water classifications (ARSO, 2008).

	Koncentracija fosforja (mg L ⁻¹)
Oligotrofna voda	pod 0,01
Mezotrofna voda	0,01–0,035
Evtrofna voda	0,035–0,1
Hipertrofna voda	nad 0,1

2.2 Biorazgradljivost

Biorazgradljivost saharina smo določili s standardiziranim testom (ISO 7827, 2010). Test temelji na večtedenskem spremljanju biorazgradnje organskih snovi z aerobnimi mikroorganizmi v mineralnem mediju na sobni temperaturi, v temi. Biorazgradnjo smo spremljali z merjenjem DOC (raztopljeni organski ogljik) v ustreznih časovnih intervalih. Na enak način smo določili tudi biorazgradljivost saharina v rečnih in podzemnih vodah. Pri testu biorazgradljivosti v površinskih in

podzemnih vodah so bile kot testni medij izbrane naravne vode. Nismo dodali hranil in cepiva, kot je to običajno pri standardiziranem laboratorijskem testu, saj smo želeli preučiti vpliv različnih vod na razgradljivost saharina in s tem njegovo stabilnost v različnih naravnih okoljih. Začetna koncentracija saharina je bila $100,2 \text{ mg L}^{-1}$, izražena kot začetni DOC s koncentracijo 40 mg L^{-1} , enako kot v standardnem testu.

Testni medij za standardizirani test smo pripravili iz demineralizirane vode, ki smo ji dodali raztopine soli. Za cepivo, ki smo ga dodali v testni medij, smo uporabili aktivno blato iz čistilne naprave za komunalne odpadne vode. Koncentracijo aktivnega blata smo določili tako, da smo 50 mL suspenzije aktivnega blata prefiltrirali čez filtrirni papir, MN 640 w, črni trak in ga sušili do konstantne mase. Koncentracija aktivnega blata se je gibala med 6 in 8 g L^{-1} . Nato smo izračunali potreben dodatek cepiva za sam test biorazgradljivosti (V , mL), tako da smo v testu dosegli željeno koncentracijo mikroorganizmov, aktivnega blata (30 mg L^{-1}).

Pred uporabo smo saharin sušili 24 ur na $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Raztopino saharina smo pripravili v testnem mediju, ki smo mu dodali primerno količino cepiva. Začetna koncentracija saharina je bila $100,2 \text{ mg L}^{-1}$, izražena kot začetni DOC s koncentracijo 40 mg L^{-1} . Vzoredno smo izvedli tudi slepi test (testni medij s cepivom) ter abiotski test brez dodatka cepiva z dodatkom HgCl_2 za kemijsko sterilizacijo sistema, da smo določili fizikalno-kemijsko razgradnjo vzorca. Ustrezno aktivnost mikroorganizmov smo potrdili z določanjem razgradljivosti referenčne spojine, natrijevega acetata (100 mg L^{-1}). Volumen pripravljenih raztopin je znašal od 150 do 200 mL , glede na količino zajete površinske vode, ki smo je imeli na voljo. Za vsako raztopino so bile pripravljene dve do štiri paralelke. Stekleničke smo inkubirali med mešanjem na magnetnih mešalnih ($200 \text{ obratov min}^{-1}$), v temnem prostoru, pri sobni temperaturi ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), najmanj 28 dni (slika 1). Če je razgradnja še potekala, smo test podaljšali, dokler meritve DOC niso bile konstantne.

Prvo meritev smo izvedli pred začetkom poskusa, drugo po treh urah in nato v ustreznih časovnih intervalih, dva- do trikrat tedensko. Drugo meritev je treba izvesti po treh urah, saj se lahko testna snov

adsorbira na aktivno blato ali steklovino. Pred določitvijo koncentracije DOC smo vzorce (5 mL) filtrirali čez filtrirni papir MN 640 w, črni trak, da smo odstranili biomaso. DOC smo določili z instrumentom TOC-5000A (Total Organic Carbon Analyzer, Shimadzu) v skladu s standardom ISO 8245 (1987). Ker smo vzorec pred analizo filtrirali, smo dejansko določali vsebnost raztopljenega organskega ogljika (DOC) in ne vsebnosti celotnega organskega ogljika (TOC). Natančnost meritve je v območju $\pm 2 \%$.



Slika 1: Inkubacija vzorcev med testiranjem biorazgradljivosti.

Figure 1: Incubation of the samples during biodegradability testing.

Delež biorazgradnje smo izračunali po enačbi (1) in narisali krivuljo biorazgradljivosti, delež biorazgradnje D_t (%) v odvisnosti od časa t (dan):

$$D_t = \left[1 - \frac{(DOC_t - DOC_{t,s})}{(DOC_x - DOC_{x,s})} \right] \times 100, \quad (1)$$

kjer je D_t delež biorazgradnje testne snovi ob času t v %, DOC_t koncentracija DOC ob času t v vzorcu v mg L^{-1} , $DOC_{t,s}$ koncentracija DOC ob času t v

slepem vzorcu v mg L^{-1} , DOC_x koncentracija DOC pri času $t = 0$ h v vzorcu v mg L^{-1} in $DOC_{x,s}$ koncentracija DOC pri času $t = 0$ h v slepem vzorcu v mg L^{-1} . Ker so bile vrednosti DOC v vzorcu po treh urah enake tistim na začetku, smo ocenili, da se saharin ne adsorbira na kosme aktivnega blata in smo zato v izračunu upoštevali začetne vrednosti DOC v vzorcu. Izračunane vrednosti temeljijo na povprečju dveh do štirih meritev ($\pm 3\%$).

Iz krivulje smo odčitali lag fazo, t_L (dan), čas razgradnje t_w (dan), razpolovni čas DT50 (dan), maksimalno stopnjo razgradnje D_m (%) in čas za doseg 90 % maksimalne stopnje razgradnje. Lag faza je čas med cepljenjem in časom, ko biorazgradnja doseže 10 %. Čas razgradnje je čas med koncem lag faze in tistim, ko biorazgradnja doseže 90 % maksimalne stopnje biorazgradnje (Žgajnar Gotvajn, 1998; Echa, 2017).

Konstanto hitrosti psevdo 1. reda k_1 v dan^{-1} smo določili z metodo linearne regresije od konca lag faze in do 90 % maksimalne stopnje biorazgradnje. Graf, logaritem v odvisnosti od časa, smo izračunali po enačbi (2):

$$\ln\left(1 - \left(\frac{D_t}{D_m}\right)\right) = -k_1 \times t. \quad (2)$$

Da je snov lahko razgradljiva, morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji: po doseženi 10-% razgradnji biorazgradnja poteče v nadaljnjih desetih dneh (angl. 10-day window), razgraditi se mora več kot 70 % snovi, lag faza in čas razgradnje pa skupaj ne presežeta 28 dni. Vendar velikokrat velja, da snov, ki se v laboratorijskem testu dobro razgrajuje, v običajnih pogojih v okolju ni biorazgradljiva, saj mikroorganizmi lahko prednostno presnavljajo druge spojine. Tudi evropska zakonodaja REACH navaja, da se testi biorazgradljivosti izvajajo z višjimi koncentracijami testnih snovi, kot bi jih običajno našli v okolju. Tako je v laboratorijskem testu mikroorganizmom zagotovljeno več ogljika kot vira energije, kar posledično vpliva na njihovo hitrejšo rast. Možno je seveda tudi obratno, ko se v laboratoriju slabo razgradljiva snov v okolju v prisotnosti drugega vira energije razgradi. Zakonodaja REACH tudi navaja, da se trajanje testa lahko prilagodi, če se je biorazgradnja začela kasneje ter se v predvidenem času testa še ni

ustalila. Priporoča pa se izvedba različnih standardiziranih testov, saj način testiranja lahko tudi vpliva na končni rezultat (Žgajnar Gotvajn, 1998; Echa, 2017).

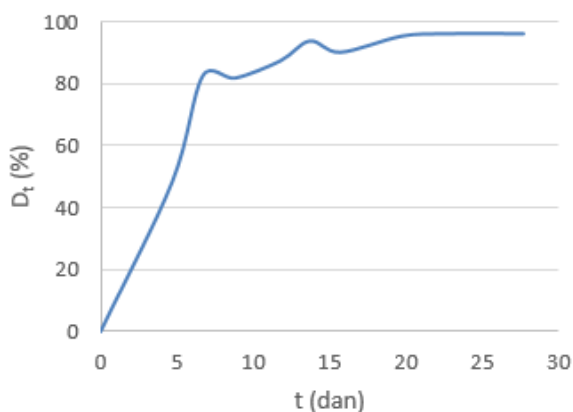
3. Rezultati in diskusija

3.1 Razgradnja saharin v standardnem testu

Pri biorazgradnji saharina v standardiziranem testu so bili zagotovljeni optimalni pogoji za biorazgradnjo (slika 2). Saharin se je razgradil v 10 dneh, maksimalni nivo biorazgradnje je znašal 96 %, konstanta psevdo 1. reda je znašala $0,21 \text{ dan}^{-1}$. V 11 dneh je biorazgradnja dosegla 90 % maksimalne stopnje razgradnje in razpolovni čas DT50 je znašal 5 dni. Potrdili smo, da je saharin pri optimalnih pogojih lahko razgradljiva snov. S testom MRT (angl. manometric respirometry test) so tudi drugi avtorji potrdili lahko razgradljivost saharina (začetna koncentracija saharina $22,9 \text{ mg L}^{-1}$), saj je 60 % razgradljivost dosegel v 10-dnevnom oknu, maksimalni nivo biorazgradnje je znašal 88 %, medtem ko v testu CBT (angl. closed bottle test) ni bil kvalificiran kot lahko razgradljiva snov (Bergheim et al., 2015). Razliko so avtorji pripisali pogojem v testih, saj je v testu CBT koncentracija mikroorganizmov znatno nižja (nekaj mL komunalne odpadne vode v primerjavi s 30 mg L^{-1} aktivnega blata v testu MRT). Referenčna snov se je razgradila 90 % v petih dneh, zato lahko zaključimo, da je bil test pravilno izveden (ISO 7827, 2010).

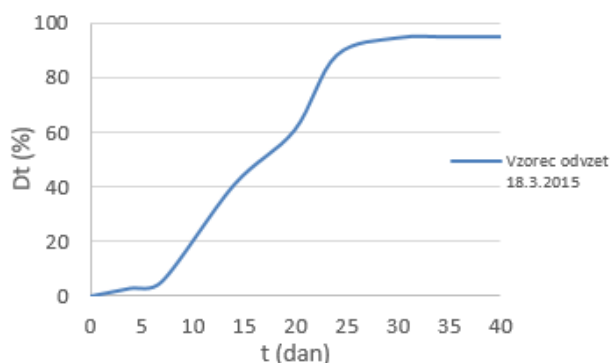
3.2 Razgradnja saharina v površinskih vodah

Saharin se je v vodi iz reke Pivke dobro razgrajeval, 90 % v 23 dneh (slika 3). Razpolovni čas je znašal 16 dni, lag faza je trajala 8 dni in hitrost biorazgradnje je bila $0,14 \text{ dan}^{-1}$. Rečna voda je vsebovala višje koncentracije fosforja, bila je evtrofna (preglednica 1), kar zagotavlja bolj optimalne pogoje za delovanje mikroorganizmov in posledično verjetno tudi njihove višje koncentracije. Višje koncentracije fosforja in tudi kloridov so lahko posledica bližine naselja, saj so bili vzorci odvzeti pred ponorom reke Pivke v Postojnsko jamo.



Slika 2: Krivulja biorazgradnje saharina v standardnem testu, optimalnih pogojih.

Figure 2: Biodegradation curve of the saccharin in the standardised test, under optimal conditions.

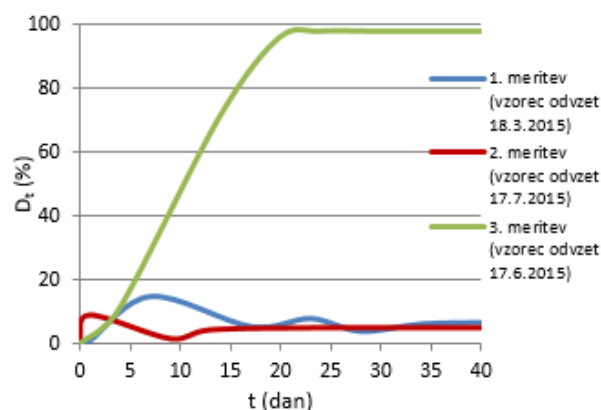


Slika 3: Krivulja biorazgradnje saharina v vodi reke Pivke.

Figure 3: Biodegradation curve of the saccharin in water sample of the Pivka River.

V vodi iz reke Unice se saharin pri prvi in drugi meritvi ni razgrajeval, kljub opazni prisotnosti fosforja (slika 4, preglednica 1). Pri prvi meritvi je bila voda mezotrofna, zajeta spomladi, vsebovala je nižje koncentracije fosforja. Pri drugi meritvi je bila voda eutrofna, zajeta poleti. Pri tretji meritvi se je saharin razgrajeval dobro, voda je bila hipertrofna, zajeta poleti. Razgradil se je 98 % v 14 dneh, razpolovni čas je bil 10 dni in čas za 90 % maksimalne stopnje razgradnje je znašal 18 dni (slika 4). Iz tega sklepamo, da so bili v tej vodi optimalni pogoji za biorazgradnjo saharina. Vode so bile zajete na Planinskem polju v bližini kraja Jakovica. Tu vodostaj reke čez leto močno niha, v bližini so mokrotne travnate površine z veliko

biotsko pestrostjo, kjer reka Unica tudi večkrat letno poplavlja. Voda je vsebovala tudi višje koncentracije hranil, dušika in fosforja, kar je lahko ne samo posledica naravnega okolja, ampak tudi bližine naselja. Vse skupaj lahko vodi k višji koncentraciji mikroorganizmov v zajetih vzorcih površinskih vod, ki so morda celo adaptirani na saharin, ter dobrim pogojem za delovanje mikroorganizmov.



Slika 4: Krivulja biorazgradnje saharina v vodi reke Unice.

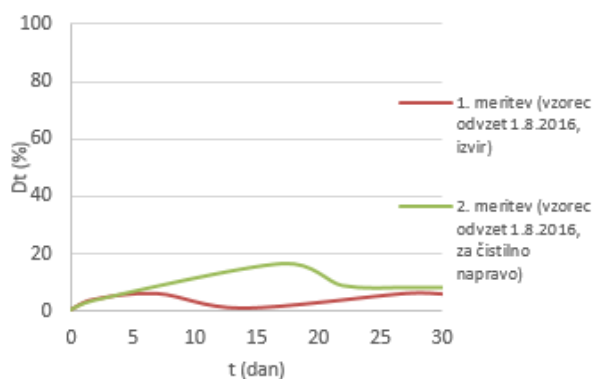
Figure 4: Biodegradation curve of the saccharin in the water sample from the Unica River.

V vodi iz reke Ljubljanice se saharin ni razgradil (slika 5), kljub prisotnosti hranil. Vzorci vod so bili odvzeti na izviri reke, Močilnik in na Vrhniki za čistilno napravo. Zajete vode so vsebovale višje koncentracije fosforja in so bile eutrofne (preglednica 1). Vzorec, zajet v Močilniku, je dejansko izvir podzemne vode, torej voda, ki je poniknila na kraškem območju in katere onesnaženje izvira iz drugih območij. Vzorec površinske vode na Vrhniki pa je bil odvzet na območju z večjo poseljenostjo in v bližini industrijskih obratov, v poletnem času. Glede na izvedene analize (preglednica 1) sta si vzorca po svoji sestavi precej podobna, vzorec, zajet po iztoku iz čistilne naprave, vsebuje le nekoliko več fosforja.

Zaradi bližine virov onesnaženja lahko sklepamo na prisotnost saharina v preiskovanih rečnih vodah, vendar se ta lahko v poletnem času razgradi s fotodegradacijo in tako v vodi ob zajemu trenutnega vzorca niso prisotni na saharin adaptirani mikroorganizmi, zato se saharin v teh vodah ne

razgrajuje, kljub temu da vode izvirajo v urbanih okoljih, kjer je onesnaženost z umetnimi sladili običajno zaznana (Perkola et al., 2016; Bergheim et al., 2015).

Saharin je dobro razgradljiv pri optimalnih pogojih (poglavje 3.1.) in zato se pričakuje, da se bo tudi večinoma odstranil v bioloških čistilnih napravah in ga bomo našli v okolju samo v zelo nizkih koncentracijah. Čepprav je učinkovitost odstranjevanja saharina v konvencionalnih čistilnih napravah zelo visoka (več kot 90 % za koncentracijsko območje nekaj $10 \mu\text{g L}^{-1}$, Baena-Nogueras et al. 2018), so zaznali višje koncentracije saharina, tj. do $3,21 \mu\text{g L}^{-1}$ v večjem številu vzorcev (82,3 %) površinskih vod v Singapurju, v katere steka komunalna odpadna voda. Drug pomemben vir saharina v površinskih vodah je, kot že omenjeno, tudi živinoreja, predvsem tam, kjer se saharin uporablja kot dodatek krmi (Perkola in Sainio, 2014).



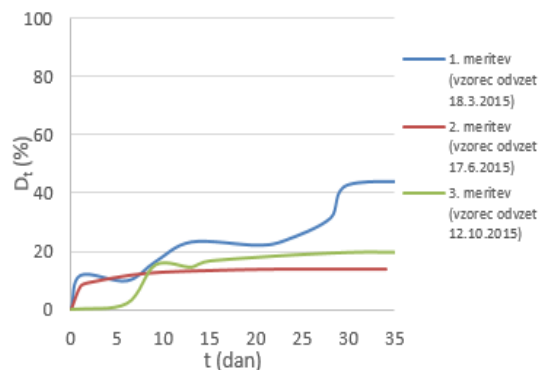
Slika 5: Krivulja biorazgradnje saharina v vodi reke Ljubljanice.

Figure 5: Biodegradation curve of the saccharin in the water sample from the Ljubljanica River.

3.3 Razgradnja saharina v podzemni vodi

V vodi vodotoka Planinske jame, iz Pivškega rokava, se saharin ni razgradil (slika 6). Poskus smo še dvakrat ponovili. Voda pri prvi (vzorec zajet spomladi) in drugi meritvi (vzorec zajet poleti) je bila mezotrofna, voda pri tretji meritvi (vzorec zajet jeseni) je vsebovala višje koncentracije fosforja in je bila evtrofna. Pri tretji meritvi je voda vsebovala tudi višje koncentracije dušika. V vseh vodah so bile

zaznane tudi višje koncentracije klorida, kar lahko nakazuje antropogeno onesnaženje (preglednica 1). Saharin se je pri prvi meritvi razgradil 43 %, pri drugi in tretji meritvi pa do 19 %.



Slika 6: Krivulja biorazgradnje saharina v vodi Planinske jame.

Figure 6: Biodegradation curve of the saccharin in a water sample from the Planina cave.

Saharin je izmerjen v številnih podtalnicah. Koncentracija saharina v podzemnih vodah v Švici, ki se napajajo iz rečnih vod, v katera stekajo odpadne vode iz čistilnih naprav, je bila do $0,26 \mu\text{g L}^{-1}$ (Spoelstra et al., 2013; Buerge et al., 2009; Buerge et al., 2011). Nekoliko višje vrednosti so določili v Singapurju, koncentracija saharina v podtalnici je bila do $0,78 \mu\text{g L}^{-1}$ (Buerge et al., 2009; Buerge et al., 2011; Tran et al., 2014). Koncentracije v podtalnici so bile vedno nižje kot v površinskih vodah, kar je lahko posledica dodatne biorazgradnje v površinskih vodah ali tudi posledica fotodegradacije, ki intenzivno poteka v poletnem času (Perkola et al., 2016; Bergheim et al., 2015). V primerjavi z drugimi umetnimi sladili so koncentracije saharina v podzemnih vodah nižje, do $0,147 \mu\text{g L}^{-1}$, koncentracija acesulfama je znašala do $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$, in sukraloze do $17 \mu\text{g L}^{-1}$, kar je posledica slabe razgradljivosti omenjenih umetnih sladil (Bergheim et al., 2015). Ker pa narašča tudi poraba natrijevega saharina kot sladila v živalski krmi (do $150 \text{ mg saharina kg}^{-1}$ krme), lahko zaradi svoje mobilnosti in stabilnosti v specifičnih pogojih tudi kmetijska dejavnost prispeva k onesnaženju podzemnih vod s saharinom (Rychen et al., 2018).

Preglednica 3: Parametri biorazgradnje saharina.

Table 3: Biodegradation of saccharin.

	Klasifikacija vod	t_L (dan)	t_w (dan)	D_m (%)	$DT50$ (dan)	t za dosego 90 % maksimalne stopnje razgradnje (dan)	k_1 (dan ⁻¹)
Standardiziran test	-	1,5	9,6	96	5,0	11,1	0,21
Reka Pivka	evtrofna	7,8	15,6	95	16,0	23,4	0,14
Reka Unica	mezotrofna	4,8	1,2	14	/	/	/
	evtrofna	0,8	/	11	/	/	/
	hipertrofna	3,4	14,4	98	10,0	17,8	0,22
Planinska jama	mezotrofna	0,8	27,0	43	/	/	/
	mezotrofna	2,0	6,0	14	/	/	/
	evtrofna	8,0	10,0	19	/	/	/
Reka Ljubljana, izvir, Močilnik	evtrofna	/	/	/	/	/	/
Reka Ljubljana, za čistilno napravo, Vrhnika	evtrofna	10,0	5,0	17	/	/	/

V preglednici 3 so zbrani rezultati biorazgradnje saharina v standardiziranem testu ter v testih z izbranimi vodami (poglavji 3.2. in 3.3.). Izkazalo se je, da je saharin dobro razgradljiv pri optimalnih pogojih ter v hipertrofni in tudi evtrofni vodi, kjer so prisotne dovolj velike količine hranil. Kljub vsemu je njegovo obnašanje ter obstojnost v okolju posledica številnih dejavnikov.

4. Zaključek

S standardiziranim testom smo določili, da je saharin v optimalnih pogojih, ki spodbujajo biorazgradnjo, lahko biorazgradljiva snov. 96 % se je razgradil v 10 dneh, po kratki lag fazi.

Pred testom biorazgradljivosti saharina v površinskih vodah in podzemni vodi smo vode razdelili v štiri trofična stanja oz. v štiri razrede, glede na vsebnost fosforja v vodi. Fosfor je bistveni faktor biorazgradnje. Saharin se je razgradil v vodi reke Pivke in reke Unice. Razgradil se je za več kot 70 % v manj kot 28 dneh. Maksimalni nivo biorazgradnje v teh vodah je znašal nad 90 % in čas razgradnje okrog 15 dni. Najhitreje se je razgradil v hipertrofni vodi reke Unice, z višjimi koncentracijami fosforja in dušika (98 % v 15 dneh). Predvidevamo, da se saharin dobro razgradi v naravnih vodah, če te vsebujejo aktivne mikroorganizme in višje koncentracije hranil za njihovo delovanje. Tveganje za kopičenje saharina v organizmih je ocenjeno kot nizko, saharin se ne

bioakumulira (log K_{OW} znaša 0,91) ter je obenem dobro topen v vodi (4000 mg L⁻¹). Kljub temu so številne študije dokazale, da ostaja v okolju ter da sta obseg in hitrost njegove pretvorbe v okolju odvisna od številnih dejavnikov (Sang et al., 2014).

Zahvala

Rezultati raziskave so nastali v okviru raziskovalnega programa P2-191 Kemijsko inženirstvo, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije.

Viri

- Armenta, S., Garrigues, S., De La Guardia, M. (2004). Sweeteners Determination in Table Top Formulations Using FT-Raman Spectrometry and Chemometric Analysis. *Anal. Chim. Acta* **521 (2)**, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.077>.
- ARSO (2008). Kakovost voda v Sloveniji. Bograf, Ljubljana.
- Bergheim, M., Gminski, R., Spangenberg, B., Debiak, M., Bürkle, A., Mersch-Sundermann, V., Kümmerer, K., Gieré, R. (2015). Antibiotics and Sweeteners in the Aquatic Environment: Biodegradability, Formation of Phototransformation Products, and in Vitro Toxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22 (22)**, 18017–18030. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4831-x>
- Buerge, I. J., Buser, H. R., Kahle, M., Müller, M. D., Poiger, T. (2009). Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **43**

(12), 4381–4385. <https://doi.org/10.1021/es900126x>.

Buerge, I. J., Keller, M., Buser, H. R., Müller, M. D., Poiger, T. (2011). Saccharin and Other Artificial Sweeteners in Soils: Estimated Inputs from Agriculture and Households, Degradation, and Leaching to Groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **45** (2), 615–621. <https://doi.org/10.1021/es1031272>.

Echa (2017). *Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment Chapter R. 7b: Endpoint Specific Guidance*; Vol. 2012.

ISO 7827 Water Quality - Evaluation of The "ready", "ultimate" aerobic Biodegradability of Organic Compounds in an Aqueous Medium - Method by Analysis of Dissolved Organic Carbon (DOC) (2010).

ISO 8245 Water Quality – Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) (1987).

Kobetičková, K., Mocova, K. A., Mrhalkova, L., Fryčova, Z., Koči, V. (2016). Artificial Sweeteners and the Environment. *Czech J. Food Sci.* **34** (2), 149–153. <https://doi.org/10.17221/220/2015-CJFS>.

Kudo, S., Takiyama, H. (2014). Production Method of Carbamazepine/Saccharin Cocrystal Particles by Using Two Solution Mixing Based on the Ternary Phase Diagram. *J. Cryst. Growth.* **392**, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2014.02.003>.

Lake County Water Authority, U. W. I. Learn More About Trophic State Index (TSI) - Lake http://www.lake.wateratlas.usf.edu/shared/learnmore.asp?toolsection=lm_tsi (1996) (accessed Jan 19, 2019).

Lange, F. T., Scheurer, M., Brauch, H. J. (2012). Artificial Sweeteners-A Recently Recognized Class of Emerging Environmental Contaminants: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **403** (9), 2503–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5892-z>.

Los Weinert, P., Pezza, H. R., de Oliveira, J. E., Pezza, L. (2004). A Simplified Spectrophotometric Method for Routine Analysis of Saccharin in Commercial Noncaloric Sweeteners. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7788–7792. <https://doi.org/10.1021/jf0402781>.

O'Donnell, K., Kearsley, M. (2012). *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology, Second Edition*; John Wiley and Sons, New York, NY.

Perkola, N., Sainio, P. (2014). Quantification of Four Artificial Sweeteners in Finnish Surface Waters with Isotope-Dilution Mass Spectrometry. *Environ. Pollut.* **184**, 391–396. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.017>.

Perkola, N., Vaalgamaa, S., Jernberg, J., Vähätalo, A. V. (2016). Degradation of Artificial Sweeteners via Direct and Indirect Photochemical Reactions.

Renwick, A. G. (1985). The Disposition of Saccharin in Animals and Man-A Review. *Food Chem. Toxicol.* **23** (4–5), 429–435. <https://doi.org/10.1016/0278->

6915(85)90136-X.

Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L., Bories, G., Cocconcilli, P. S., Flachowsky, G., Mantovani, A., Mayo, B., et al. (2018). Safety and Efficacy of Sodium Saccharin When Used as a Feed Flavour for Piglets, Pigs for Fattening, Calves for Rearing and Calves for Fattening. *EFSA J.* **16** (February).

Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y. K., Leung, K. S. Y. (2014). Evaluating the Environmental Impact of Artificial Sweeteners: A Study of Their Distributions, Photodegradation and Toxicities. *Water Res.* **52**, 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.002>.

Spoelstra, J., Schiff, S. L., Brown, S. J. (2013). Artificial Sweeteners in a Large Canadian River Reflect Human Consumption in the Watershed. *PLoS One* **8** (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082706>.

Tran, N. H., Hu, J., Li, J., Ong, S. L. (2014). Suitability of Artificial Sweeteners as Indicators of Raw Wastewater Contamination in Surface Water and Groundwater. *Water Res.* **48** (1), 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.053>.

Žgajnar Gotvajn, A. (1998). *Metodologija vrednotenja biorazgradljivosti kemikalij in odpadnih vod v vodnem mediju: doktorska disertacija*; Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.