

Originalni naučni rad DOI: 10.5937/DDD25123P

## DETEKCIJA REZIDUA LARVICIDA U KANALIMA NA LEVOJ OBALI DUNAVA GRADA BEOGRADA

### DETECTION OF LARVICIDE RESIDUES IN CANALS ON THE LEFT BANK OF THE DANUBE IN BELGRADE

*Dragana Popović<sup>1\*</sup>, Andrija Vučetić<sup>1</sup>, Jovana Savanović<sup>1</sup>,  
Tatjana Ćurčić<sup>1</sup>, Dragana Despot<sup>1</sup>*

#### **Kratak sadržaj**

Komarci predstavljaju značajan zdravstveni rizik kao vektori prenosioci zaraznih bolesti, zbog čega se u urbanim sredinama sprovode programi njihove kontrole. Jedna od glavnih mera je upotreba larvicida u vodenim staništima, kako bi se sprečio razvoj odraslih jedinki. Leva obala Beograda predstavlja područje sa razgranatom mrežom kanala u kojima se pored atmosferskih voda ulivaju i otpadne komunalne vode iz obližnjih domaćinstava, zbog nepostojanja izgrađene kanalizacione mreže. Ovi kanali predstavljaju pogodno stanište za razvoj komaraca, pa se u tim oblastima redovno primenjuju hemijske mere suzbijanja. Kako su larvicidi formulisani da ciljano deluju na razvojni stadijum komaraca, njihovo prisustvo u vodenoj sredini može imati potencijalne ekološke posledice. Ova studija ima za cilj da analizira prisustvo i postojanost rezidua larvicida u kanalima na Levoj obali Beograda nakon prošlogodišnje primene. Uzorkovanje je sprovedeno na odabranim lokacijama. Za detekciju larvicida se koristi savremena instrumentalna tehnika, kao što je tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Dobijeni podaci pružaju bolji uvid u perzistentnost larvicida u vodenoj sredini, što može biti korisno za dalje procene rizika i unapređenje strategije suzbijanja komaraca u urbanim ekosistemima.

**Ključne reči:** larve komaraca, LC-MS/MS, perzistentnost larvicida, rezidue larvicida, urbani vodeni sistemi

#### **Abstract**

Mosquitoes represent a significant health risk as vectors of infectious diseases, which is why their control programs are implemented in urban areas. One of the primary measures for mosquito population management is the application

---

<sup>1</sup> Master inženjer zaštite životne sredine Dragana Popović; master biohemičar Andrija Vučetić; master inženjer tehnologije Jovana Savanović; diplomirani hemičar Tatjana Ćurčić, prim. dr Dragana Despot, specijalista urgentne medicine; Zavod za biocide i medicinsku ekologiju, Trebevička 16, 11000 Beograd, R. Srbija

\* e-mail kontakt osoba: dragana.popovic@biocidi.org.rs

*of larvicides in aquatic habitats to prevent the development of adult mosquitoes. The left bank of the Danube in Belgrade is characterized by an extensive network of canals, which, in addition to collecting rainwater, also receive domestic wastewater due to the absence of a developed sewage system. These canals provide favorable breeding ground for mosquitoes, leading to the regular implementation of chemical control measures. Since larvicides are formulated to specifically target mosquito larvae, their presence in aquatic environments may have potential ecological consequences. This study aims to assess the persistence and stability of larvicide residues in the canals on the left bank of Belgrade following their application in the previous year. Sampling was conducted at selected locations, and the detection of larvicides was performed using advanced instrumental techniques, such as liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The obtained data provides valuable insights into the persistence of larvicides in aquatic environment, which may contribute to risk assessment and the optimization of mosquito control strategies in urban ecosystems.*

**Keywords:** *larvicide residues, larvicide persistence, LC-MS/MS, mosquito larvae, urban water systems*

## UVOD

Komarci predstavljaju značajan zdravstveni rizik kao vektori prenosioci zaraznih bolesti, zbog čega se u urbanim sredinama sprovode programi njihove kontrole. Jedna od glavnih mera je upotreba larvicida u vodenim staništima, kako bi se sprečio razvoj odraslih jedinki. Leva obala Beograda predstavlja područje sa razgranatom mrežom kanala u kojima se pored atmosferskih voda ulivaju i otpadne komunalne vode iz obližnjih domaćinstava, zbog nepostojanja izgrađene kanalizacione mreže. Ovi kanali predstavljaju pogodno stanište za razvoj komarca, pa se u tim oblastima redovno primenjuju hemijske mere suzbijanja. Larvicidi koji se najčešće primenjuju kao hemijski tretman za suzbijanje larvi komaraca su na bazi aktivnih materija piriproksifena i diflubenzurona. Kako su larvicidi formulisani da ciljano deluju na razvojni stadijum komaraca, njihovo prisustvo u vodenoj sredini može imati potencijalne ekološke posledice.

Piriproksifen, odnosno 2-[1-metil-2-(4-fenoksifenoksi)etoksi]piridin (Lima i sar., 2011), je snažan insekticid poznat po relativnoj stabilnosti u životnoj sredini i lipofilnim osobinama (koeficijent raspodele oktanol/voda  $K_{ow} = 5,6$ ) (Katagi i sar., 1994). U velikoj meri se koristi u različitim programima zaštite javnog zdravlja, kao alternativa organofosfornim i piretroidnim pesticidima (Lima i sar., 2011). Piriproksifen je jedan od najefikasnijih analoga juvenilnog hormona (USEPA, 2007), zahvaljujući sposobnosti da inhibira razvoj i sazrevanje larvi (Meola i sar., 2000), imitira juvenilni hormon III (Wang i sar., 2005), sprečava uspešno izleganje insekata (Ohba i sar., 2013), remeti larvalni razvoj (Wang i sar., 2013) ili izaziva morfološke abnormalnosti kod odraslih jedinki, čime se

smanjuje njihova reproduktivna sposobnost (Maoz i sar., 2017). Različite studije su pokazale da koncentracije korišćene za suzbijanje komaraca mogu imati štetne efekte na širok spektar kopnenih i vodenih beskičmenjaka, uključujući pčele, amfipode, rakove i dafnije, kako u embrionalnim, tako i u odraslim stadijumima razvoja (Truong i sar., 2016; Lawler, 2017; Azevedo-Linhares i sar., 2018; Maharajan i sar., 2018; Maharajan i sar., 2020).

Koncentracije ovog insekticida su detektovane u rekama zapadnog Mediterana, kao što su Ebro (Ccanccapa i sar., 2016) i Júcar (Moura i sar., 2020) u rasponu od 37,74 ng/l do 99,59 ng/l, kao posledica primene u poljoprivredi.

Diflubenzuron je insekticid iz klase benzilurea koji inhibira sintezu hitina, ključnog za formiranje egzoskeleta kod insekata, čime efikasno deluje na larvalne stadijume štetočina poput moljaca i komaraca (U.S. Geological Survey [USGS], 1994). Fizički, to je belo kristalno jedinjenje sa niskom rastvorljivošću u vodi (0,14 mg/l na 20°C) i relativno visokom stabilnošću u sedimentima, što doprinosi njegovoj akumulaciji u vodenim ekosistemima (Extension Toxicology Network [EXTOXNET], 1996). Uprkos niskoj toksičnosti za ribe i biljke, diflubenzuron može imati značajan ekotoksikološki uticaj na vodene beskičmenjake, posebno rakove i zooplankton, pri koncentracijama u nanogramskom opsegu, što izaziva zabrinutost zbog potencijalnih efekata na neciljane organizme u akvakulturi i prirodnim staništima (Arias-Andres i sar., 2015).

Ova studija ima za cilj da analizira prisustvo i postojanost rezidua larvicida u kanalima na Levoj obali Dunava u gradu Beogradu nakon prošlogodišnje primene. Uzorkovanje je sprovedeno na odabranim lokacijama. Danas se za detekciju rezidua larvicida koristi savremena instrumentalna tehnika, kao što je tečna hromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Cilj ovog rada je da se sagleda prisustvo larvicida u vodenoj sredini.

## UZORKOVANJE

Postupak uzorkovanja, konzerviranja, čuvanja i transport uzoraka voda trenutnih uzoraka je sproveden primenom internacionalnim standardnih metoda za uzorkovanje, EN ISO 5667-1:2023, SRPS EN ISO 5667-3:2024 i SRPS ISO 5667-10:2021. Oprema korišćena za uzorkovanje trenutnih uzoraka je štap sa posudom. Uzorci su uzorkovani krajem februara i početkom marta 2025. godine.

U radu su prikazani uzorci, koji su uzorkovani na četiri lokacije na levoj obali Dunava grada Beograda, iz kanala u kojima se pored površinske vode ulivaju i otpadne vode iz septičkih jama, atmosferske otpadne vode i vode koje se spiraju sa okolnih poljoprivrednih površina, tabela 1. Ispitivane lokacije nisu tretirane larvicidima od prošlogodišnjeg tretmana larvi. Lokacije su nulte tačke, tačke na kojima ranije nije ispitivano prisustvo koncentracije piriproksifena i diflubenzurona.

**Tabela 1.** Karakteristike istraživanih lokaliteta u opštini Palilula, Beograd

Lokalitet	Naselje	GPS koordinate	Izvor zagađenja	Vegetacija uz obalu
1	Kotež	N 44°50.9627' E 020°28.6737'	Otpadne vode iz domaćinstava i atmosferske vode	Nisko barsko rastinje
2	Kotež	N 44°50.8514' E 020°29.3789'	Otpadne vode iz domaćinstava i atmosferske vode	Nisko barsko rastinje
3	Kotež	N 44°50.6089' E 020°29.8503'	Otpadne vode iz domaćinstava i atmosferske vode	Visoko barsko rastinje
4	Borča	N 44°50.6064' E 020°29.8582'	Otpadne vode iz septičkih jama	Nisko barsko rastinje

## MATERIJAL I METODE

Analitički standardi piriproksifena i diflubenzurona koji su korišćeni su visoke čistoće-HPLC, proizvođača CPA Chem. Organski rastvarači (metanol, acetonitril) koji su korišćeni su visoke čistoće, LC-MS grade, proizvođača VWR, dok je tetrahidrofuran Sigma-Aldrich. Mravlja kiselina, proizvođača VWR, je takođe LC-MS grade.

Priprema uzoraka ima više faza. Najpre, uzorci su filtrirani kroz najlonskih filter papir (0,45 µm), zatim je sprovedena ekstrakcija na čvrstoj fazi (*SPE, eng. solid phase extraction* – ekstrakcija na čvrstoj fazi). SPE ekstrakcija predstavlja najčešće korišćenu tehniku pripreme uzoraka koje se primenjuju u svrhu prečišćavanja i uklanjanja smetnji pre instrumentalne analize (Sabik i sar, 2000; Farajzadeh i sar, 2013).

Za SPE ekstrakcija je korišćena hidrofobna polistiren/divinil benzen (PS/DVB) kopolimerna kolona (CHROMABOND HR-X, 85 µm, 3 ml/500 mg, proizvođača Macherey-Nagel). Postupak ekstrakcije započet je kondicioniranjem kolone odgovarajućim rastvaračem, tj. sa metanolom a zatim vodom, kako bi se aktivirala adsorpciona površina. Nakon kondicioniranja, propušteno je oko 1 l uzorka vode kroz SPE kolonu pri kontrolisanom protoku kako bi se osiguralo efikasno zadržavanje analita na adsorbentu. Kolona je ostavljena da se suši a zatim je analit (rezidue piriproksifena) eluiran korišćenjem organskih rastvarača metanola i tetrahidrofurana u odnosu 1:1 (Macherey-Nagel, 2022).

Nakon završene ekstrakcije uzorak je uparen, radi koncentrisanja analita, uparavanjem u struji azota do zapremine između 0,5 (Nakhjavan, B i sar, 2021) i 1 ml. Po završetku uparavanja uzorak je rekonstituisan u zakišeljenoj mobilnoj fazi (acetonitril sa 0,1% mravlje kiseline i voda sa 0,1% mravljom kiselinom u odnosu 50:50) u normalnom sudu od 2 ml.

Uzorak je nakon završene ekstrakcije, uparavanja i ponovne filtracije uzorka analiziran na tečnom hromatografu sa tanden masenom spektrometrijom (UPLC-MS/MS).

### LC-MS/MS Hromatografija

Metoda detekcije rezidua piriproksifena i diflubenzurona je razvijena na tečnom hromatografu sa tanden masenom spektrometrijom proizvođača Agilent, Infinity II 1260 Prime/Ultivo Triple Quadrupole) Kolona koja je korišćena je Zorbax RRHD (2,1x50 mm, 1,8 mikrona). Razdvajanje je postignuto korišćenjem gradijentne metode korišćenjem dve mobilne faze. A mobilna faza je zakišeljena voda sa 0,1% mravljom kiselinom, dok je mobilna faza B zakišeljena acetonitril sa 0,1% mravljom kiselinom. Ukupno vreme analize je 20 min. sa vremenom kondicioniranja sistema od 4 minuta (posttime). Retenciono vreme piriproksifena je 13,2 min, dok je kod diflubenzurona 10,2 min.

Kalibracija je primenjena u opsegu 10-100 ng/l za oba analita. Između svakog standarda, kao i između uzoraka puštan je blank (zakišeljena voda i zakišeljena acetonitril u odnosu 50:50) kako bi se izbegao uticaj carry over-a.

Analize su sprovedene pri protoku od 0,3 ml/min sa injekcijom uzorka u zapremini od 5 µl. Temperatura kolone je 35°C.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ove studije pokazali su prisustvo piriproksifena u koncentracijama od 23,3 ng/l (lokalitet 1) i 83,5 ng/l (lokalitet 4) na dva od četiri analizirana lokaliteta. Na preostala dva lokaliteta, koncentracije piriproksifena su bile ispod limita kvantifikacije (LOQ = 10 ng/l). Detektovane koncentracije na sva četiri lokaliteta za diflubenzuron su ispod limita kvantifikacije metode, tj. iznosile su manje od 10 ng/l. Ovakva prostorna raspodela može biti posledica više faktora, uključujući dinamiku toka vode, količinu primenjenog larvicida, stepena zasićenja organske materije i lokalnih uslova mikroklimе.

Piriproksifen je poznat po visokoj efikasnosti u niskim koncentracijama (World Health Organization [WHO], 2008). Studije su pokazale da piriproksifen može uticati na populacije planktonskih organizama i vodenih račića (Matsumura, 2011; Halstead i sar., 2015), posebno pri produženom izlaganju čak i pri koncentracijama nižim od 50 ng/l. S obzirom na to da su detektovane koncentracije piriproksifena blizu 50 ng/l, može se zaključiti da postoji potencijal za dugotrajno biološko delovanje nakon primene, ali i za moguće neželjene efekte na neciljane vrste.

Urbani kanali, kao što su oni na levoj obali Dunava, često imaju smanjenu dinamiku razmene vode i izraženo prisustvo organskih zagađivača, što može doprineti sporijem razlaganju insekticida i njihovoj dužoj perzistentnosti (Kühn i sar., 2020). Upravo takvi uslovi doprinose detekciji rezidua larvicida mesecima nakon njihove primene.

Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za uvođenjem sistema za rutinski monitoring rezidua u urbanim vodenim sredinama, kao i za reevaluacijom dinamike i doza u programima kontrole komaraca. Primenom savremenih analitičkih tehnika, kao što je LC-MS/MS, moguće je pratiti koncentracije ispod biološki značajnih pragova i pravovremeno intervenisati u slučaju akumulacije.

## ZAKLJUČAK

Ova studija je pokazala prisustvo rezidua piriproksifena u kanalima na levoji obali Dunava u Beogradu mesecima nakon njegove primene, i to u koncentracijama koje premašuju biološki aktivne pragove za suzbijanje larvi komaraca. Iako nisu detektovane na svim lokalitetima, pronađene koncentracije se uklapaju u opseg poznat iz literature, sa pojedinačnim vrednostima koje ukazuju na potencijalnu lokalnu akumulaciju. Rezultati ukazuju na potrebu za pažljivim planiranjem tretmana i kontinuiranim monitoringom rezidua, kako bi se postigla ravnoteža između efikasne kontrole vektora i zaštite vodenih ekosistema. Dobijeni podaci mogu doprineti daljoj optimizaciji programa za suzbijanje komaraca u urbanim sredinama i boljoj proceni ekotoksikološkog rizika.

## LITERATURA

1. Arias-Andres, M., Rueda-Ruzafa, L., & Römbke, J. (2015). Effects of diflubenzuron on freshwater invertebrates: A review of laboratory and field studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(7), 1533–1544. <https://doi.org/10.1002/etc.2971>
2. Azevedo-Linhares, M., Souza, A. T. C., Lenz, C. A., Leite, N. F., Brito, I. A., Folle, N. M. T., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2018). Microcystin and pyriproxyfen are toxic to early stages of development in *Rhania quelen*: An experimental and modelling study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.066>
3. Ccanccapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., & Barceló, D. (2016). Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environmental Pollution*, 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
4. Extension Toxicology Network (EXTOXNET). (1996). *Pesticide information profile: Diflubenzuron*. Oregon State University. <http://extoxnet.orst.edu/pips/difluben.htm>
5. Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R., & Aghdam, A. A. (2013). Comparison of air-agitated liquid-liquid microextraction technique and conventional dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1300, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.006>
6. Halstead, N. T., McMahon, T. A., Johnson, S. A., Raffel, T. R., Romansic, J. M., Crumrine, P. W., & Rohr, J. R. (2015). Community ecology theory predicts the effects of agrochemical mixtures on aquatic biodiversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*, 18(4), 450–459. <https://doi.org/10.1111/ele.12426>
7. Katagi, T., & Takahashi, N. (1994). *Hydrolysis of S-31183 in buffered aqueous solutions*. Tokyo, Japan: Sumitomo Chemical Company.
8. Kühn, B. F., Gildemeister, A., & Schulz, R. (2020). Retention and mobility of pesticides in urban stormwater systems. *Science of the Total Environment*, 713, 136620. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136620>
9. Lawler, S. P. (2017). Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 139, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.047>
10. Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, E. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., & de Melo Santos, M. A. V. (2011). Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites & Vectors*, 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-5>
11. Macherey-Nagel. (2022). *CHROMABOND® vacuum manifolds* (str. 23). Düren, Nemačka: Macherey-Nagel GmbH & Co. KG.
12. Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Karthik, C., Nataraj, B., Nambirajan, K., Hemalatha, D., & Ramesh, M. (2020). Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and

- gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes. *Science of the Total Environment*, 735, 139496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139496>
13. Maharajan, K., Muthulakshmi, S., Nataraj, B., Ramesh, M., & Kadirvelu, K. (2018). Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study. *Aquatic Toxicology*, 196, 132–145. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.012>
  14. Maoz, D., Ward, T., Samuel, M., Müller, P., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., & Horstick, O. (2017). Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005651. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005651>
  15. Matsumura, F. (2011). Studies on the actions of synthetic juvenile hormone analogs and their environmental implications. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.535073>
  16. Meola, R., Meier, K., Dean, S., & Bhaskaran, G. (2000). Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development. *Journal of Medical Entomology*, 37(4), 503–506. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.4.503>
  17. Moura, J. A. S., & Souza-Santos, L. P. (2020). Environmental risk assessment (ERA) of pyriproxyfen in non-target aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 222, 105448. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105448>
  18. Nakhjavan, B., Bland, J., & Khosravifard, M. (2021). Optimization of a multiresidue analysis of 65 pesticides in surface water using solid-phase extraction by LC-MS/MS. *Molecules*, 26(21), 6627. <https://doi.org/10.3390/molecules26216627>
  19. Ohba, S. Y., Ohashi, K., Puijyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., & Takagi, M. (2013). The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PLoS ONE*, 8(7), e67045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067045>
  20. Sabik, H., Jeannot, R., & Rondeau, B. (2000). Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *Journal of Chromatography A*, 885, 217–236. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00527-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00527-7)
  21. Truong, L., Gonnerman, G., Simonich, M. T., & Tanguay, R. L. (2016). Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, 218, 1089–1093. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.068>
  22. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). (2007). *Draft list of initial pesticide active ingredients and pesticide inerts to be considered for screening under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*. Washington, DC: USEPA.
  23. U.S. Geological Survey (USGS). (1994). *Diflubenzuron: Hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review* (Biological Report 85(1.22)). <https://www.usgs.gov/publications/diflubenzuron-hazards-fish-wildlife-and-invertebrates-a-synoptic-review>
  24. Wang, C. Y., Teng, H. J., Lee, S. J., Lin, C., Wu, J. W., & Wu, H. S. (2013). Efficacy of various larvicides against *Aedes aegypti* immatures in the laboratory. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66(4), 341–344.
  25. Wang, H. Y., Olmstead, A. W., Li, H., & LeBlanc, G. A. (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.004>
  26. World Health Organization (WHO). (2008). *Pyriproxyfen in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*. Geneva: WHO Press. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HSE-WSH-08.01.12>