

Uklanjanje organske tvari iz otpadne vode biorazgradnjom

Tutić, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:333351>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Josip Tutić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat **Josip Tutić**

Predao je izrađen završni rad dana: 4. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Miroslav Jerković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Monika Šabić Runjavec, znanstvena suradnica, Sveučilište u
Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 7. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Josip Tutić

UKLANJANJE ORGANSKE TVARI IZ OTPADNE VODE
BIORAZGRADNJOM

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Doc. dr. sc. Miroslav Jerković

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac na pomoći i savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Svojim roditeljima se zahvaljujem jer su mi omogućili obrazovanje te se zahvaljujem braći na podršci.

Hvala kolegama primijenjenim kemičarima i kolegama s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta na svojoj ukazanoj pomoći i suradnji tijekom studija.

Zahvaljujem se samom sebi jer nisam odustao.

SAŽETAK

Sve značajnija prisutnost organskih onečišćujućih tvari u okolišu predstavlja jedan od najvećih ekoloških izazova modernog doba. Uporaba organskih tvari u proizvodima poput farmaceutika, kozmetike, pesticida te plastičnih masa uzrok je onečišćenju voda koje predstavlja ozbiljnu opasnost za ekosustave. Sve veći značaj ovog ekološkog problema doveo je do razvoja tehnologija obrade otpadnih voda, što uključuje i proces biološke obrade, odnosno biorazgradnje organskih tvari iz otpadnih voda uz pomoć mikrobnog katabolizma. Temeljni cilj ovakvog postupka obrade otpadnih voda je potpuno ukloniti neku organsku onečišćujuću tvar ili ju uz pomoć metabolizma mikroorganizama pretvoriti u tvari koje nisu toksične. Biorazgradnja organskih tvari se zbog svoje ekonomičnosti i izrazite sigurnosti za okoliš nametnula kao jedan od dominantnih postupaka obrade otpadnih voda i s vremenom njena uporaba biva sve češća.

Biorazgradnja se često koristi u obradi voda onečišćenih farmaceutskim proizvodima i njihovim derivatima koji nastaju pod utjecajem okolišnih čimbenika, a mogu biti toksične za ljude i ostale organizme s kojima nerijetko dolaze u izravan kontakt. Neki od najčešće prisutnih organskih ksenobiotika farmaceutskog podrijetla u okolišu su lijekovi protiv bolova poput diklofenaka i paracetamola te lijekovi koji se koriste za liječenje dijabetesa tipa 2 poput metformina. U ovom radu opisana su svojstva navedenih farmaceutika, ekotoksikološki rizici njihove prisutnosti u okolišu te načini na koje se nad istima može provesti postupak biorazgradnje.

Ključne riječi: biorazgradnja, otpadne vode, diklofenak, paracetamol, metformin

SUMMARY

The increasing presence of organic pollutants in the environment is one of the greatest environmental challenges of today. The use of organic substances in products such as pharmaceuticals, cosmetics, pesticides, and plastics is the cause of water pollution, which poses a serious threat to ecosystems. The increasing importance of this ecological problem has led to the development of wastewater treatment technologies, which include the process of biological treatment, i.e. the biodegradation of organic substances from wastewater by microbial catabolism. The main objective of this wastewater treatment process is to completely remove an organic pollutant or convert it into non-toxic substances with the help of the metabolism of microorganisms. Due to its cost-effectiveness and exceptional environmental safety, biodegradation of organic matter has become one of the most important wastewater treatment processes and is being used more and more frequently over time.

Biodegradation is often used in the treatment of water contaminated with pharmaceutical products and their derivatives, which are formed by environmental factors and can be toxic to humans and other organisms with which they frequently come into direct contact. The most common organic xenobiotics of pharmaceutical origin found in the environment include painkillers such as diclofenac and paracetamol, and drugs used to treat type 2 diabetes such as metformin. This paper therefore describes their properties, the ecotoxicological risks of their presence in the environment and the possibilities of biodegradation.

Key words: biodegradation, wastewater, diclofenac, paracetamol, metformin

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. KARAKTERISTIKE OTPADNIH VODA	3
2.1.1. Podjela otpadnih voda	3
2.1.2. Onečišćujuće tvari u otpadnim vodama	4
2.1.3. Farmaceutici kao onečišćujuće tvari	5
2.2. POSTUPCI OBRADJE OTPADNIH VODA	6
2.2.1. Stupnjevi obrade otpadnih voda	7
2.2.2. Mehanička obrada otpadnih voda	7
2.2.3. Fizikalno-kemijska obrada otpadnih voda	9
2.2.4. Biološka obrada otpadnih voda	13
2.3. FARMACEUTICI	17
2.3.1. Diklofenak	18
2.3.2. Metformin	19
2.3.3. Paracetamol	20
3. PREGLEDNI DIO	22
3.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU	22
3.1.1. Prisutnost diklofenaka u okolišu	23
3.1.1.1. Toksičnost diklofenaka	25
3.1.2. Prisutnost metformina u okolišu	26
3.1.2.1. Toksičnost metformina	28
3.1.3. Prisutnost paracetamola u okolišu	29
3.1.3.1. Toksičnost paracetamola	31
3.2. BIORAZGRADNJA ORGANSKIH ONEČIŠĆUJUĆIH TVARI	33
3.2.1. Biorazgradnja metformina	36
3.2.2. Biorazgradnja paracetamola	42
3.2.3. Biorazgradnja diklofenaka	45
4. ZAKLJUČAK	51
5. LITERATURA	52

1. UVOD

Industrijalizacija te brojne druge antropogene aktivnosti 21. stoljeća od temeljne su važnosti za ekonomski i civilizacijski razvitak društava diljem svijeta, ali su također uzročnici onečišćenja vode, tla i zraka zbog nastajanja velikih količina otpada u tekućem, krutom te plinovitom stanju. Proizvodnja antropogenog otpada je neizbježna, pri čemu značajna količina završi u otpadnim vodama. Otpadne vode su vode koje su prošle kroz neki uporabni ciklus uslijed kojeg su postale onečišćene i potencijalno štetne za okoliš. [1] Otpadne vode se dijele na otpadne vode iz kućanstva i industrijske otpadne vode. Svaka od navedenih vrsta otpadnih voda ima karakterističan kvalitativni i kvantitativni kemijski sastav, a samim time i karakteristična fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Sastav otpadnih voda ovisi o vrsti ljudske djelatnosti za koju je voda korištena, stupnju razvoja društva, kulturi i navikama ljudi te brojnim drugim čimbenicima. [2]

Otpadne vode predstavljaju značajan rizik za okoliš te zahtijevaju različite postupke i procese za uklanjanje onečišćujućih tvari. Fizikalnim procesima se onečišćujuće tvari uklanjaju separacijskim postupcima temeljenim na različitim fizikalnim svojstvima tvari, bez promjene njenog kemijskog sastava. Kemijskim i biološkim procesima onečišćujuća tvar prolazi kroz niz kemijskih promjena. [3] Promjene strukture tvari mogu biti uzorkovane kemijskim i fizikalno-kemijskim promjenama te mikrobnim metabolizmom. Proces biološkog pročišćavanja otpadnih voda podrazumijeva uklanjanje onečišćujuće tvari uz biološku aktivnost mikroorganizama procesom biorazgradnje. [1] Ovom vrstom procesa se najčešće uklanjaju organski ksenobiotici te dušikovi spojevi i spojevi fosfora. [3]

Jedan od najčešćih oblika organskih ksenobiotika u otpadnim vodama su farmaceutici. Farmaceutici su različiti aktivni spojevi koji se koriste u svrhu postizanja povoljnog terapijskog učinka i prevencije patoloških stanja kod ljudi i životinja. Neki od najprisutnijih aktivnih tvari detektiranih u otpadnim vodama pripadaju skupini antipiretika i analgetika te antidijabetika. Paracetamol i diklofenak su često korišteni lijekovi koji djeluju kao antipiretici i analgetici, dok je metformin jedan od najkorištenijih antidijabetika. [3]

U ovome radu prikazani su i objašnjeni neki od načina biorazgradnje često korištenih lijekova metformina, diklofenaka i paracetamola koji su jedni od značajnijih organskih onečišćujućih tvari u otpadnim vodama. Također su objašnjeni osnovni koncepti i primjena tehnologija obrade otpadnih voda te je predložen ekotoksikološki značaj prisutnosti metformina, diklofenaka i paracetamola u okolišu.

2. OPĆI DIO

2.1. KARAKTERISTIKE OTPADNIH VODA

2.1.1. Podjela otpadnih voda

Sve značajniji utjecaj otpadnih voda na okoliš potaknuo je sve češće proučavanje istih. Ustanovljeno je da su količina i kvaliteta otpadnih voda pod utjecajem mnogih faktora. [3] Općenito se otpadne vode mogu podijeliti na dvije skupine:

1. otpadne vode iz kućanstva (sanitarne otpadne vode)
2. industrijske otpadne vode

Otpadne vode iz kućanstva onečišćene su otpadnim tvarima nastalim kao produkt ljudskog metabolizma, pripreme obroka, pranja rublja i održavanja stambenih objekata. Međusobno su često slične po sastavu i u načelu su štetne za okoliš zbog prisutnosti patogenih mikroorganizama ljudskog podrijetla, sredstava za dezinfekciju, površinski aktivnih tvari (tenzida) i farmaceutskih aktivnih tvari (lijekovi). S druge strane, industrijske otpadne vode se zbog raznovrsnog podrijetla i različitih prisutnih onečišćujućih tvari po svojim karakteristikama međusobno razlikuju, a stupanj njihovog onečišćenja može biti i nekoliko stotina puta veći od otpadnih voda iz kućanstva. Kemijska i farmaceutska industrija najznačajnije su industrijske grane kada se govori o otpadnim vodama s obzirom na to da su otpadne vode koje proizlaze iz takvih pogona nerijetko izrazito toksične i potencijalno opasne za okoliš zbog prisutnosti raznih kemijskih agenasa koji su nerijetko mutageni ili toksični. [1] Otpadne vode iz kućanstava i industrije pročišćavaju se prije nego što se ispuste u prirodne ekosustave kao što su rijeke, jezera ili oceani. [4]

Negativan utjecaj otpadnih voda na prirodne vode u koje se ispuštaju ovisi o stupnju njihovog onečišćenja koji se određuje pomoću brojnih pokazatelja, a koji ukazuju na njezin kvalitativni i kvantitativni sastav. Kvaliteta prirodnih voda može znatno utjecati na kvalitetu vode za piće. [5]

2.1.2. Onečišćujuće tvari u otpadnim vodama

Otopljene i suspendirane tvari u otpadnim vodama mogu biti organske i anorganske. Organske tvari uključuju: ugljikohidrate, masti, proteine, površinski aktivne tvari, pesticide i druge kemikalije koje se koriste u poljoprivredi te hlapljive organske spojeve. Anorganske tvari, osim inertnih materijala pijeska i šljunka, uključuju teške metale, dušik i fosfor, kloride te sumporove spojeve. U otpadnim vodama mogu biti prisutni i plinovi poput ugljikovog dioksida, dušika, kisika, sumporovodika, metana itd. [1] Onečišćujuće tvari koje su prisutne u otpadnim vodama moguće je okarakterizirati prema njihovim fizikalnim, kemijskim i biološkim svojstvima. Karakterizacija otpadnih voda uključuje:

1. fizikalna svojstva (ukupna suha tvar, ukupna suspendirana tvar, ukupna otopljena i hlapljiva tvar)
2. kemijska svojstva (ukupni dušik, ukupni fosfor, organske tvari)
3. biološka svojstva (bakterijski indikatori, ukupan broj koliformnih bakterija – TC , broj fekalnih koliformnih bakterija - FC i broj fekalnih streptokoka – FS)
4. posebni pokazatelji onečišćenja (biokemijska potrošnja kisika – BPK i kemijska potrošnja kisika – KPK, ukupni sadržaj otopljenog ugljika – TOC i ekvivalent stanovnika - ES)

Fizikalna, kemijska i biološka svojstva međusobno su povezana. Na primjer, temperatura utječe na količinu plinova otopljenih u otpadnim vodama, a koji potom utječu na biološku aktivnost u otpadnim vodama. [6]

Fizikalno-kemijska svojstva otpadnih voda podrazumijevaju temperaturu, mutnoću, električnu provodnost, pH vrijednost, miris te prisutnosti različitih onečišćenja poput dušika, fosfora i teških metala. Često korišteni pokazatelji za iskazivanje svojstava neke otpadne vode su BPK i KPK, koji se koriste za mjerenje organskih tvari ili razine onečišćenja otpadnih voda pri pročišćavanju otpadnih voda. KPK ukazuje kolika je količina kisika potrebna da bi se kemijski oksidiralo sve sadržane organske spojeve u otpadnoj vodi i izražava količinu biorazgradivog i nebiorazgradivog organskog onečišćenja. S druge strane, BPK je pokazatelj koji se odnosi na količinu kisika koja je potrebna da bi se mikrobiološkim metabolizmom uklonila biorazgradiva organska tvar. Samim time, vrijednost BPK iskazuje prisutnost biorazgradivih organskih tvari u otpadnim vodama. [2]

Biološke karakteristike prvenstveno se odnose na prisutnost određenih mikroorganizama u otpadnim vodama. Najvažnije grupe mikroorganizama koje se mogu naći u otpadnim vodama su bakterije, gljive, protozoe te virusi. Većina ovih mikroorganizama, posebno bakterije i protozoe su odgovorne i neophodne za biološku obradu otpadnih voda, no neke predstavljaju svojevrsnu sigurnosnu prijetnju. [1] Biološka svojstva otpadnih voda uključuju uz navedene mikroorganizme prisutnost bakterijskih indikatora (TC, FC i FS). Prisutnost mikroorganizama u otpadnim vodama pod utjecajem je fizikalno-kemijskih svojstava npr. pH vrijednosti. [5]

2.1.3. Farmaceutici kao onečišćujuće tvari

Farmaceutici su farmaceutski proizvodi koji se koriste u svrhu liječenja, prevencije te dijagnosticiranja različitih patoloških stanja u humanoj i veterinarskoj medicini. Farmaceutski oblik se sastoji od pomoćnih tvari i od aktivne farmaceutske tvari (API) koja je nositelj farmakoterapijskog učinka nekog lijeka. Kako se razlikuju indikacije za uporabu lijeka te farmakodinamski i farmakokinetički aspekti djelovanja nekog lijeka koje želimo postići, lijekovi se proizvode u različitim oblicima i koncentracijama. Lijekovi pri sobnoj temperaturi mogu biti u krutom (npr. acetilsalicilna kiselina, atropin), tekućem (npr. nikotin, etanol) ili u plinovitom stanju (npr. dušikov(I) oksid, inhalacijski anestetik). Jedan od najčešćih oblika lijekova za peroralnu primjenu su kapsule, sirupi i tablete, ali se mogu nalaziti i u obliku krema, otopina za injektiranje te flastera. [3]

U posljednjem desetljeću ostaci mnogih lijekova otkriveni su u otpadnim i površinskim vodama. Lijekovi se nakon primjene izlučuju u izvornom obliku ili kao metaboliti. Otpadne vode iz kućanstva glavni su izvor iz kojeg farmaceutici dospijevaju do vodenog okoliša, a mnoge od aktivnih farmaceutskih tvari još uvijek nije moguće ukloniti obradom otpadnih voda. Općenito, postojanost biološke aktivnosti lijekova i njihov potencijalno štetan utjecaj na ključne biološke procese poput rasta i reprodukcije organizama koji su u kontaktu s istima predstavljaju ozbiljnu prijetnju. Djelotvorna tvar u lijekovima je dizajnirana da utječe manje ili više specifično na ciljane metaboličke i molekularne puteve, ali treba uzeti u obzir da njeno djelovanje često prate mnoge nuspojave i da je njezin utjecaj na druge vrste ne mora biti istovjetan s utjecajem na ljude. [5]

Toksični utjecaj tvari dijeli se na akutni i kronični ovisno o vremenu tijekom kojeg je organizam bio izložen istoj. Akutna toksičnost podrazumijeva one štetne učinke koji su nastupili uslijed kratkotrajne izloženosti organizma visokim koncentracijama tvari. [3] Često se upravo akutna toksičnost tvari koristi u animalnim studijama kako bi se odredila vrijednosti LD₅₀ te predstavlja onu količinu neke tvari koja je letalna po 50 % animalne populacije na koju je ispitujemo. [7] Kronična toksičnost se odnosi na skup štetnih učinaka koji se manifestiraju uslijed repetitivnog i dugotrajnog izlaganja organizma određenoj tvari. Kod kronične toksičnosti česta je kulminacija toksičnih učinaka po organizam te je samim time pojava raznih patoloških stanja očekivana. Toksičnost farmaceutika također ovisi o brojnim faktorima i teško ju je predvidjeti, ali neki od čimbenika mogu biti koncentracija farmaceutika, interakcija s drugim prisutnim tvarima, vrijeme izlaganja vanjskim uvjetima npr. UV zračenju, svojstva i struktura djelotvorne tvari npr. planarnost molekule, hidrofilnost, polarnost itd. [1]

Nesteroidni protuupalni lijekovi se u Republici Hrvatskoj (RH) najčešće mogu kupiti bez liječničkog recepta, stoga je njihova uporaba izrazito prisutna u općoj populaciji. Samim time je zapažena njihova značajna prisutnost u otpadnim vodama kao i prisutnost njihovih metabolita. Lijekovi iz skupine antidijabetika se također sve češće koriste i sve su prisutniji u otpadnim vodama iako se u RH izdaju isključivo uz liječnički recept. [3]

2.2. POSTUPCI OBRADE OTPADNIH VODA

Postupci obrade otpadnih voda od velikog su značaja za očuvanje okoliša i javnog zdravlja. S obzirom da je njihovim razvojem sigurna i pitka voda postala dostupnija, ovom obradom otpadnih voda se omogućuje smanjenje utjecaja na okoliš u koji se ispušta nakon uporabe. [2] Iako se najčešće u obradi otpadnih voda koriste kombinacije postupaka, one se prema temeljnim principima dijele na mehaničke, fizikalno-kemijske i biološke. Također se prema stupnjevima obrade otpadnih voda svrstavaju su na preliminarne, primarne, sekundarne i tercijarne. [1]

2.2.1. Stupnjevi obrade otpadnih voda

Preliminarni stupanj obrade podrazumijeva uklanjanje krutog i krupnog otpada poput polietilentereftalatne (PET) ambalaže, plutajućih tvari, pijeska i masnih čestica, jer one kao takve mogu uzrokovati probleme u održavanju ili radu sustava u kojima se vrši pročišćavanje voda. Otpadne tvari se uklanjaju pomoću rešetki te se provodi mjerenje protoka otpadne vode. Primarni stupanj obrade otpadne vode obuhvaća postupke pročišćavanja kojima se uklanjaju suspendirane tvari putem taloženja ili flotacije uz čestu upotrebu taložnih sredstava (koagulanata, flokulanata). [7] Sekundarni ili biološki stupanj služi za uklanjanje onečišćujućih tvari u obliku koloidnih čestica ili pravih otopina koje zaostanu nakon preliminarne i primarne obrade. Ona može obuhvaćati isključivo biološke procese, ali može uključivati uz biološke i kemijske, fizikalno-kemijske procese ili njihove kombinacije. Sekundarna obrada može biti aerobna i anaerobna. Odabir vrste biološkog procesa koji će biti dio postupka sekundarne obrade ovisi o vrsti onečišćenja. [1] Tercijarni stupanj neophodan je kod otpadnih voda koje su onečišćene velikim količinama makronutrijenata, velikim količinama spojeva dušika i fosfora ili nekim specifičnim onečišćenjem. Uklanjanje dušikovih spojeva razlikuje se ovisno o tome je li spoj kojeg uklanjamo organska tvar ili nije. U slučaju velikih količina fosfora nemoguće je provesti biološki postupak zbog toga što najčešće nije zadovoljen neophodan omjer ugljika, dušika i fosfora kako bi se odvijao mikrobiološki proces. U ovom stupnju obrade također se vrši uklanjanje zaostalih suspendiranih krutih tvari različitim filterima ili mikrositom te dezinfekcija otpadnih voda. [6]

2.2.2. Mehanička obrada otpadnih voda

Mehanička obrada u tehnologiji pročišćavanja otpadnih voda obuhvaća protjecanje otpadne vode kroz kanale i cjevovode, mjerenje protoka, izdvajanje grubog materijala na rešetkama i sitima, odvajanje inertnih, taložnih i filtrabilnih čestica, kao i odvajanje masti i ulja. Svi navedeni postupci u svojoj osnovi imaju primjenu mehaničkih postupaka, bez kemijskih promjena onečišćujućih tvari. Primjena mehaničkih tehnoloških postupaka prvenstveno se odnosi na uklanjanje neotopljenih onečišćujućih tvari te dijela koloidnih čestica veličine 0,001 - 1 μm .

Ovim postupkom odstranjuju se materijali iz otpadne vode koji bi ometali ili opterećivali naredne stupnjeve pročišćavanja vode, kao i rad samih uređaja u postrojenju. [1]

Kako bi se osigurala zadovoljavajuća učinkovitost sustava za mehaničku obradu otpadnih voda, vrlo je važna informacija o optimalnom protoku vode kroz postrojenje. Naime, neodgovarajući dotok vode može prouzrokovati vrlo loš rad sustava te potpuno ugroziti njegovo funkcioniranje. Optimalan dotok vode je također jedan od važnih čimbenika koji utječu na učinkovitost bioloških procesa obrade voda. [4] Iz navedenog razloga provodi se ujednačavanje protoka otpadne vode, to jest egalizacija. Egalizacija se provodi na način da se tijekom projektiranja predviđa potrebni kapacitet egalizacijskog bazena kako bi sustav mogao podnijeti hidrauličke udare vode u periodima maksimalnog opterećenja te da bi se mogao osigurati konstantan dotok vode do ostalih uređaja u sustavu. Osim ujednačavanja protoka otpadnih voda u postrojenju, egalizacija za ulogu ima i ujednačavanje kemijskog sastava otpadne vode (homogenizaciju). [1] Rješavanje projektnog problema svodi se na izračunavanje potrebnog kapaciteta egalizacijskog bazena, na temelju maksimalne, minimalne i srednje vrijednosti protoka. U mehaničkim postupku obrade otpadnih voda također je važan odabir rešetki za uklanjanje grubog materijala. [8]

Taloženje ili precipitacija fenomen je nastajanja krute faze u nekoj otopini uslijed odvijanja kemijske reakcije, promjene pH otopine, utjecaja električne struje ili prekoračenja vrijednosti konstante produkta topljivosti za neku tvar. [9] Taloženje je jedan od važnih fenomena koji imaju široku primjenu u mehaničkoj obradi voda, odnosno uklanjanju brojnih organskih i anorganskih onečišćujućih tvari. Prema načinu taloženja čestica u otpadnoj vodi razlikuju se četiri tipa: diskretno (slobodno), agregatno, zonalno i stiješnjeno taloženje. Ukoliko čestice u vodi nemaju međusobnog doticaja i ukoliko izostaje vanjski utjecaj, tada se čestice talože u skladu sa svojim individualnim karakteristikama, a taloženje se naziva diskretno ili slobodno. [1]

Uz taloženje, u mehaničkoj obradi voda koristi se flotacija. Flotacija se može opisati kao fenomen sljepljivanja krutih čestica neke onečišćujuće tvari u vodi kada ta tvar dođe u kontakt sa plinom koji je u njoj dispergirana. U tu svrhu najčešće se koristi zrak koji se raspršuje s dna bazena, koji na putu prema gore skuplja čestice i sa sobom ih nosi na površinu vode. Također je flotaciju moguće provesti na način da se pod velikim tlakovima zrak otopi u otpadnoj vodi te se naknadnim smanjenjem tlaka isti zrak oslobađa prilikom čega se na površini vode stvara se koncentrirana pjena koja

sadrži onečišćujuću tvar te ju je jednostavno ukloniti. Flotacija se koristi kao alternativna opcija u odnosu na druge postupke, poput taloženja, centrifugiranja ili filtracije, a često je od njih učinkovitija i ekonomski opravdanija. [1,2]

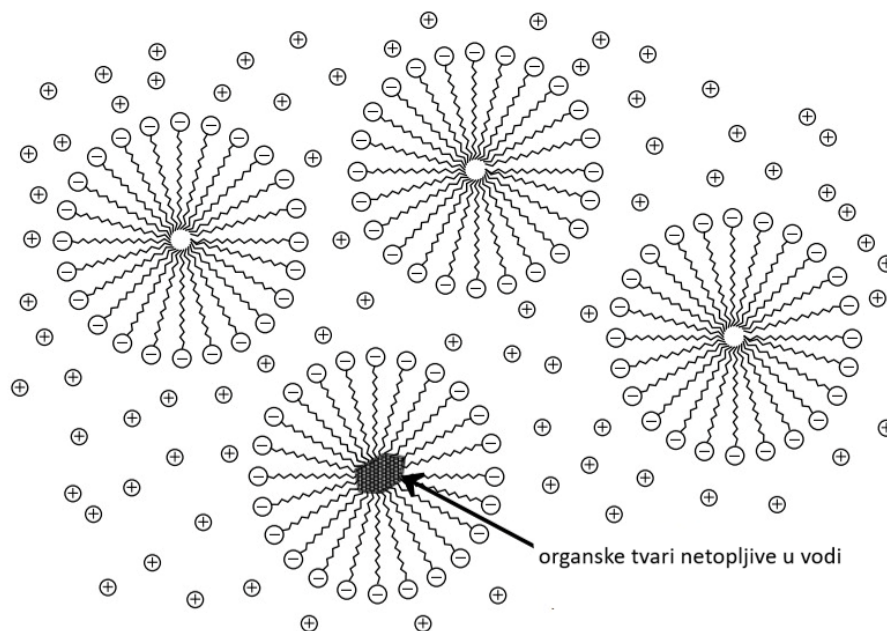
2.2.3. Fizikalno-kemijska obrada otpadnih voda

Temeljni princip fizikalno-kemijskih postupaka je promjena svojstava onečišćujućim tvarima kako bi ih se lakše uklonilo iz vode. Tu spadaju koagulacija, flokulacija, kemijska precipitacija, oksidacija, adsorpcija te promjene pH vrijednosti. Ovi postupci omogućuju uklanjanje tvari uz dodatak koagulanta i drugih kemikalija (npr. vapno za uklanjanje fosfora). [6]

U otpadnoj vodi je moguće često naići na koloidne čestice onečišćujućih tvari koje su relativno malih dimenzija te se za njih ne može očekivati da će spontano taložiti pod utjecajem gravitacije. Kako su koloidne čestice često kemijski inertne, za njihovo uklanjanje iz otpadnih voda najčešće se koriste koagulacija i flokulacija. [1] Koagulacija je fizikalno-kemijski proces prevođenja kvazi-jednofaznog u stvarni dvofazni sustav, kojim se postiže destabilizacija koloidnih čestica uz kemijska sredstva, čime se postiže preduvjet za njihovo agregiranje. Osnovni fenomeni na kojima se temelji koagulacija su van der Waalsove intermolekularne privlačne sile te elektrostatska odbijanja. [10] Dakle, koagulacija uključuje dodavanje sredstava za koagulaciju i flokulaciju te stvaranje uvjeta koji će omogućiti naknadno uklanjanje čestica. S druge strane, flokulacija je agregacija destabiliziranih čestica (čestica kod kojih je smanjen električni površinski naboj) i produkata taloženja nastalih flokula. Flokulacija je samo fizikalni proces formiranja mase krupnih flokula od sitnih destabiliziranih koloidnih čestica. Agregirane flokule se uklanjaju gravitacijskim taloženjem i/ili filtracijom. Ova dva procesa se nadovezuju. [11]

Koagulacija i flokulacija su se često koristile u pripremi vode za piće i uklanjanje mutnoće vode, no u novije vrijeme sve se češće primjenjuju u postupcima uklanjanja metalnih iona, toksičnih organskih tvari, virusa i radionukleotida iz otpadnih voda. Temeljni princip djelovanja jest adsorpcija čestica onečišćujućih tvari na koloidne čestice (micele) nakon čega slijedi precipitacija te separacija onečišćujuće tvari od vode. Na slici 2.1 vidljiv je shematski prikaz strukture micela u vodenom mediju. Morfologija micela jest takva da je vanjski dio strukture hidrofilan, a

unutarnji hidrofoban (alkilni lanci). Zbog takve morfologije, koloidne čestice nerijetko sadržavaju razne organske tvari poput herbicida. Stoga, osim primjene u postrojenjima za obradu otpadnih voda, koloidne čestice mogu biti i nosioci onečišćujućih tvari. Nadalje, micelle se koriste u obradi otpadnih voda jer posjeduju mogućnost povećanja razgradnje organske onečišćujuće tvari, uklanjaju emulgirane tvari te pospješuju stabilnost istaloženih tvari. [1,7,12]



Slika 2.1. Shematski prikaz strukture čestice micela u vodenom mediju [7]

S obzirom na to da su koloidne čestice električki nabijene te da čine sustav u kojem dolazi do neprekidnog gibanja čestica, stabilnost otopine koloidnih čestica uvelike ovisi o elektrokinetičkim karakteristikama. [11] Većina koloidnih čestica u vodenom mediju je negativnog naboja te je samim time prisutna elektrostatska privlačnost s tvarima koje su pozitivnog naboja. Dakle, kationi se adsorbiraju na površinu koloidne čestice i okružuju je, pri čemu se formira adsorpcijski ili Šternov sloj. Potom Šternov sloj sačinjen od kationa elektrostatski privlači anione iz otopine te se njihovim vezanjem stvara još jedan sloj, to jest dolazi do grupiranja aniona i kationa oko koloidne čestice. [1] Konačno, dolazi do nastanka difuzijskog sloja koji je sačinjen od aniona i kationa koji do koloidne čestice dolaze procesom difuzije. Adsorpcijski i difuzijski sloj zajedno čine protuionski dvosloj u kojem svaki od slojeva ima svoj potencijal. Što je veća razlika potencijala između difuzijskog i

adsorpcijskog sloja oko koloidne čestice (zeta potencijal), to je veće međusobno odbijanje koloidnih čestica te je sustav stabilniji. Dakle što je manji zeta potencijal koloidnih čestica, to je veća nestabilnost koloidnog sustava pa je lakše ukloniti koloidne čestice iz vode. Utjecajem na debljinu difuzijskog sloja moguće je utjecati na vjerojatnost spajanja samih koloidnih čestica i njihovo ukрупnjivanje. Upravo dodavanjem koagulanata smanjuje se debljina difuzijskog sloja te se time potiče agregacija koloidnih čestica odnosno omogućava se proces uklanjanja onečišćujućih tvari iz vode. Također, je potrebno uzeti u obzir da je debljina dvosloja na koloidnim česticama manja što je otopina koncentriranija. [12]

Kemijska sredstva koja se dodaju u koloidni sustav s ciljem njegove destabilizacije su najčešće spojevi aluminijske ili željezne soli poput aluminijevog klorhidrata, aluminijevog sulfata te željeznog sulfata. Koagulanti na bazi aluminijske i željezne soli se često koriste zbog zadovoljavajuće učinkovitosti te dostupnosti. S druge strane, u procesu flokulacije se često koriste spojevi na bazi kaolina ili sintetički polimeri čija je uloga optimiranje uvjeta za formiranje flokula. [1] Važno je spomenuti da je kontakt između koloidnih čestica nužan te se isti postiže miješanjem otpadne vode raznim miješalima. Za postizanje koagulacije koristi se brzo miješanje jer je potrebno ostvariti što intenzivniji kontakt kationa s negativno nabijenim koloidnim česticama. Prilikom izvođenja flokulacije primjenjuje se sporo miješanje jer se želi izbjeći proces raspada flokula odnosno proces deflokulacije. [2]

Kemijska precipitacija je još jedna od operacija fizikalno-kemijske obrade voda odnosno proces u kojem se dodavanjem odgovarajućih kemijskih sredstava u otpadne vode, otopljene i suspendirane komponente prevodi u oblike koji se talože. Taloženje započinje procesom stvaranja centara kristalizacije odnosno nukleacijom, a potom slijedi proces rasta kristala. Karakteristike taloga ovise o tome koji je od navedena dva procesa intenzivniji. U slučaju obrade otpadnih voda je poželjno da se ostvaruje manje centara kristalizacije, ali da oni budu većih dimenzija. [13] U postupcima obrade voda, taloženje se najčešće primjenjuje pri uklanjanju teških metala koji bi mogli biti problem u kasnijoj biološkoj obradi zbog svojeg toksičnog djelovanja. [1] Proces se temelji na dodatku kemijskih tvari u vodu te njihovoj reakciji s prisutnim ionima u vodi. Ukupne koncentracije iona i taložnih sredstava moraju biti veće od produkta topljivosti taložnog produkta da bi se ioni mogli prevesti iz vode u talog te izdvojiti. [9] Postupak taloženja može imati svoja ograničenja kada je veličina suspendiranih čestica mala uz prisutnost onečišćujućih tvari. Nadilaženje navedenih

ograničenja vrši se dodavanjem kemikalija koje reagiraju sa onečišćujućim tvarima u otpadnoj vodi uz stvaranje teško topljivog produkta. [1]

Koncentracija vodikovih kationa (H^+), odnosno pH vrijednost, utječe na topljivost taloga na način da ovisno o vrsti koja se taloži, promjene u pH potiču ili umanjuju taloženje neke tvari. Prilagodba pH je najčešći postupak koji prati druge procese u tehnologiji pročišćavanja otpadnih voda. U većini slučajeva učinkovitost određenog procesa ovisi o pH vrijednosti, pa je njegovo održavanje ili prilagodba na željenoj razini od velike važnosti, ali i značajno utječe na očuvanje potrebnih uvjeta u samoj vodi u smislu skladištenja dijelova opreme ili bazena i kanala u kojima se provodi pročišćavanje otpadnih voda. Na primjer, povećanje kiselosti otpadnih voda može uništiti beton iz kojeg se izrađuju bazeni, a s druge strane, lužnato okruženje može u potpunosti zaustaviti biološke procese koji se primjenjuju u obradi otpadnih voda. Lužnate otpadne vode su tehnološki manje zahtjevne od kiselih. [2, 9]

Oksidacija onečišćujućih čestica se često koristi u obradi otpadnih voda ili prirodne vode za prevođenje i modificiranje nepoželjnih kemijskih vrsta u manje nepoželjne i manje toksične kemijske vrste. Kemijska oksidacija u pročišćavanju otpadnih voda uključuje uporabu oksidacijskih sredstava, kao što su ozon (O_3), vodikov peroksid (H_2O_2), kalijev permanganat ($KMnO_4$) i klor (Cl_2). Često se s ciljem aktivacije navedenih oksidacijskih sredstava koristi svjetlost kako bi se osigurala dovoljna energija za odvijanje reakcija oksidacije onečišćujućih tvari. [8] Oksidacijski procesi se nerijetko koriste s ciljem uklanjanja neugodnog mirisa vode, uklanjanja uzročnika raznih obojenja, selektivnu oksidaciju organskih spojeva te za dezinfekciju voda. [2] Proces oksidacije u pročišćavanju otpadnih voda posebno se koristi u smanjenju vrijednosti BPK i KPK, kao i za oksidaciju amonijaka i biorazgradivih organskih spojeva. Poseban problem u obradi otpadnih voda je amonijak, jer je obično prisutan u otpadnim vodama. Uklanjanje amonijaka danas je najčešće i ekonomski najopravdanije biološkim postupcima. Međutim, u slučajevima kada sam biološki proces ne može ukloniti sav prisutni amonijak, kemijsku oksidaciju treba primijeniti na izlazu iz postrojenja kako bi otpadna voda zadovoljila zakonski propisane granične vrijednosti prije ispuštanja u prirodni prijemnik. [1]

Adsorpcija i aeracija su postupci kojima je moguće fizikalno-kemijski ukloniti onečišćujuće tvari iz vode. Adsorpcija je proces vezivanja čestica adsorbensa na krutu površinu adsorbata koji može biti ostvareno pravom kovalentnom kemijskom vezom, intermolekularnim silama te elektrostatskom (ionskom) vezom. [10] Adsorpcija se

često koristi u obradi otpadnih voda jer je često moguća regeneracija adsorbata i ovisno o karakteristikama materijala nam omogućuje uklanjanje velikog broja onečišćujućih tvari. S druge strane, aeracija je operacija koja funkcionira na način da se u otpadnu vodu uvodi plinovitu fazu (često zrak ili kisik) s ciljem uklanjanja plinova poput ugljikovog dioksida, dušika, amonijaka i brojnih hlapljivih organskih tvari. Prisutnost kisika u otpadnoj vodi također ide u prilog naknadnoj biološkoj obradi. [1]

2.2.4. Biološka obrada otpadnih voda

Proces biološke obrade otpadnih voda temelji se na aktivnosti mikroflora prisutne u vodi koja tijekom svoje životne aktivnosti, odnosno za odvijanje fizioloških funkcija i reprodukcije, koristi značajan dio organske i manji dio anorganske tvari u otpadnim vodama. Biološkom obradom se primarno uklanjaju otopljene biorazgradive organske onečišćujuće tvari na način da ih se mikrobnim metabolizmom pretvara u plinovite metabolite koji izlaze iz otpadne vode ili se akumuliraju u stanicama mikroorganizama te ih je moguće ukloniti postupcima poput taloženja. [6] Mikroorganizmi mogu metabolizirati toksične organske tvari na bezopasne produkte u procesu koji se naziva biorazgradnja. [5] Organska tvar se ne gubi u ovom procesu, već se samo iz otopljenog oblika pretvara u staničnu biomasu. [1]

Biološka obrada otpadnih voda se provodi prirodnim procesom biorazgradnje. Prirodni procesi biorazgradnje su sporiji, te se pri obradi otpadnih voda ubrzavaju na način da se osiguraju povoljni uvjeti za mikroorganizme u bioreaktoru s ciljem postizanja veće učinkovitosti. [1] Najčešća primjena bioloških procesa u pročišćavanju otpadnih voda jest uklanjanje organskih tvari, dušika i fosfora te za razgradnju viška biomase nakon sekundarne obrade (mulj iz sekundarnog taložnika) tijekom biološke stabilizacije mulja. [4]

Poznata su dva osnovna oblika mikrobiološki procesa: aerobni – procesi koji se odvijaju u prisutnosti kisika i anaerobni – procesi koji se odvijaju bez kisika. Mikrobiološki procesi mogu se odvijati i u uvjetima koji se više ili manje približavaju graničnim koncentracijama otopljenog kisika. [2] Razlika je u putevima biološke oksidacije organskih tvari. Aerobni oksidacijski put karakterizira generiranje veće količine slobodne Gibbsove energije (G). Navedeno rezultira brzim i intenzivnim

rastom biomase, a time i brzom staničnom aktivnošću što omogućuje bolje pročišćavanje otpadnih voda nego u anaerobnim postupcima. Zbog razlike u brzini biokemijskih reakcija i slobodnoj energiji, prema krajnjim vrijednostima koncentracija organskih tvari koje zaostaju u otpadnim vodama, nakon aerobne obrade može se dobiti znatno bolja kvaliteta otpadnih voda. Stoga se obično i nakon anaerobne obrade primjenjuje aerobni proces kako bi se dodatno osigurala bolja kvaliteta otpadnih voda. Ovisno o kvaliteti otpadnih voda, u praksi se kombiniraju ova dva procesa kako bi se postigao najbolji konačni učinak obrade. [1,4]

U biološkoj obradi otpadnih voda treba postići sljedeće ciljeve:[1]

1. transformacija (oksidacija) otopljenih i pojedinih biorazgradivih organskih tvari u siguran krajnji produkt
2. ugradnja suspendiranih i neistaloženih tvari u biofilm
3. transformacija ili uklanjanje nutrijenata (hranjivih tvari)
4. uklanjanje organskih tvari prisutnih u tragovima

Procesi mikrobiološke biorazgradnje ovise o okolišnim čimbenicima koji se odnose na sastav i koncentraciju onečišćujućih tvari u vodi, prisutnost drugih kemijskih komponenti koje potiču ili inhibiraju rast kao i pH, tlak te temperatura.[1] Oni izravno utječu na brzinu procesa, rast biomase, potrošnju prisutnog organskog onečišćenja (supstrata), kao i na učinkovitost procesa. Valja napomenuti da utjecaj navedenih čimbenika na populaciju mikroorganizama ovisi o vrsti mikroorganizama koji se koriste. Na primjer, kod nekih termofilnih bakterijskih vrsta povišena temperatura pozitivno utječe na brojnost jedinki, dok kod ostalih to nije slučaj. [14] Također, koncentracija onečišćujućih tvari, odnosno supstrata, utječe na brojnost jedinki mikroorganizma jer ona predstavlja izvor energije za isti.[4] Na brojnost mikroba također utječe i generacijsko vrijeme, odnosno vrijeme koje je potrebno da se stanice dijele.[14] Da bi se matematički opisao taj utjecaj, korišteni su kinetički parametri koji uključuju navedene utjecaje. Kinetički parametri se ne mijenjaju s vremenom u jednom definiranom sustavu, ali se njihove vrijednosti razlikuju ovisno o tome u kojem tipu sustava se odvija biološki proces. Prema kinetičkim karakteristikama biološke procese dijelimo na kontinuirane i diskontinuirane, no u tehnologiji obrade otpadnih voda najčešće se radi o kontinuiranim procesima. [1] Kako bi se jedan biološki proces mogao matematički opisati neophodno je poznavati

četiri kinetička parametra mikrobnog rasta: maksimalna specifična brzina mikrobnog rasta (μ_m), specifična brzina odumiranja mikroorganizama (k_d), konstanta zasićenja odnosno afiniteta mikroorganizma prema supstratu (K_s) i prirast biomase (Y). Jednadžba koja opisuje brzinu rasta mikroorganizama:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Veličina μ definira se kao specifična brzina rasta mikroba i definira sve specifičnosti mikrobiološkog sustava. [4] Specifična brzina rasta mikroba pokazuje odnos mikroorganizma prema supstratu, jesu li fizički parametri okoliša u kojem se proces odvija prikladni za njegov rast te je li prisutna inhibirajuća tvar. S obzirom na to da veličina je X masena koncentracija stanica, t predstavlja vrijeme, a dX/dt promjenu masene koncentracije (brojnosti) stanica u vremenu. [14]

Aktivni mulj je naziv za biomasu suspendiranu u otpadnoj vodi u obliku flokula ili pahuljica. U pahuljicama se osim živih i aktivnih mikroorganizama, nalaze mrtve stanice te organska i anorganska tvar iz otpadne vode koja se uklanja. Postoje dva tipa sustava u kojem se koristi aktivni mulj: sustavi sa recirkulacijom i bez nje. [8] Temeljna razlika je u tome što se kod recirkulacije vraća dio aktivnog mulja u bioreaktor zbog održavanja stabilnih uvjeta, dok kod sustava bez recirkulacije toga nema. [1] Ovisno o tome ima li sustav recirkulaciju ili ne, ovisit će i mikrobiološka kinetika procesa poput rasta koncentracije biomase te smanjenja vrijednosti koncentracije supstrata. No neovisno o recirkulaciji, u bioreктору se aktivni mulj održava u suspenziji, a dovođenjem otpadne vode odvijaju se tri paralelna procesa: 1. reakcija disimilacije odnosno oksidacija organske tvari, 2. reakcija asimilacije tj. sinteze novih stanica biomase i 3. reakcija autooksidacije tj. endogena respiracija stanica biomase. [4] Proizvedene nove stanice (biomasa), odumrle stanice i prisutne inertne i biorazgradive tvari u otpadnim vodama predstavljaju masu materijala koji se mora svakodnevno uklanjati iz bioreaktora kako bi se proces održao u kontinuiranom radu. Količina tvari izražena je kao ukupna suspendirana tvar (TSS) i biomasa odnosno organska suspendirana tvar (VSS). [2]

Onečišćujuće tvari u otpadnim vodama većinom sadrže spojeve ugljika, dušika i fosfora stoga je biorazgradnja istih od izričitog značaja. Dušik se nalazi u otpadnim vodama u obliku brojnih organskih spojeva, amonijaka, nitrita i u plinovitom stanju. Organski dušik nalazi se u topljivom i netopljivom obliku s tim da se topljivi organski dušik se uglavnom nalazi unutar sastava uree i aminokiselina. [1] Biološko uklanjanje spojeva dušika temelji se na procesima nitrifikacije te naknadne denitrifikacije.

Nitrifikacija je dvostupanjski proces oksidacije amonijaka koji se obavlja pomoću dvije grupe bakterija. [4] U prvom stupnju se amonijak oksidira do nitrita jednom grupom autotrofnih bakterija, a u drugom se nitriti oksidiraju do nitrata uz pomoć druge grupe autotrofnih bakterija. U procesu nitrifikacije najčešće sudjeluju autotrofne bakterije roda *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* čija je uloga oksidacija amonijaka do nitrita, a onda do nitrata. [1] Drugi rod autotrofnih bakterija koji omogućava biološku oksidaciju amonijaka do nitrita su *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* i *Nitrosorobrio*. Oksidacijom amonijeveg iona do nitrata, dušik se prevodi u manje štetan oblik, a i u konačnom tretmanu dušik se mora ukloniti iz vode do vrijednosti prihvatljivih graničnih vrijednosti koncentracija prema važećim pravilnicima o kvalitetu vode. Učinkovitost ovog procesa odražava se u postotku uklonjenog amonijaka. Pojednostavljeno, tijekom reakcije nitrifikacije se može prikazati na sljedeći način: $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$. [17]

Biorazgradnji dušikovih spojeva prethodi oksidacija onečišćujućih ugljikovodika od strane heterotrofnih bakterija da bi se nakon uklanjanja istih uz pomoć autotrofnih bakterija započeo proces oksidacije organskog onečišćenja koje sadržava dušik. [1] Također jer važno uzeti u obzir da je mikrobiološka kinetika u slučaju autotrofnih bakterija nešto sporija u odnosu na heterotrofne te manje učinkovito provode biorazgradnju organskih dušikovih spojeva u odnosu na učinkovitost s kojom heterotrofne bakterije oksidiraju ugljikovodike. [4]

Nitrati nastali u procesu nitrifikacije otpadnih voda također se moraju ukloniti iz vode procesom biološke denitrifikacije ukoliko njihova koncentracija prelazi granične vrijednosti. Nitrati se iz otpadnih voda uklanjaju procesima asimilacijske ili desimilacijske redukcije. Temeljni mehanizam postupka asimilacijske redukcije jest redukcija nitrata do amonijaka jer je amonijak ključan u brojnim staničnim sintezama nakon čega se on troši od strane bakterija. [1] Veći značaj i primjenu u biološkoj obradi otpadnih voda ima postupak desimilacijske redukcije nitrata koja se temelji na činjenici da su nitriti i nitrati dobri elektron-akceptor te da u biokemijskim

reakcijama često služe kao oksidacijska sredstva za brojne organske i anorganske elektron-donore. Dakle, da bi desimilacijska redukcija mogla biti uspješno provedena važno je da se u otpadnoj vodi nalazi izvor organskog onečišćenja koje bi se u ovom slučaju oksidiralo, dok bi se nitriti i nitrati reducirali do plinovitog dušika. Biološka denitrifikacija uključuje biološku oksidaciju organskih supstrata u obradi otpadnih voda pomoću nitrata ili nitrita kao akceptora elektrona umjesto kisika. Proces se provodi tako što u nedostatku otopljenog kisika (anerobno) ili u ograničenim koncentracijama (anoksično) enzimska nitratna reduktaza potiče transport elektrona u respiratornom lancu i olakšava prijenosa vodika i elektrona na nitrate. [8]

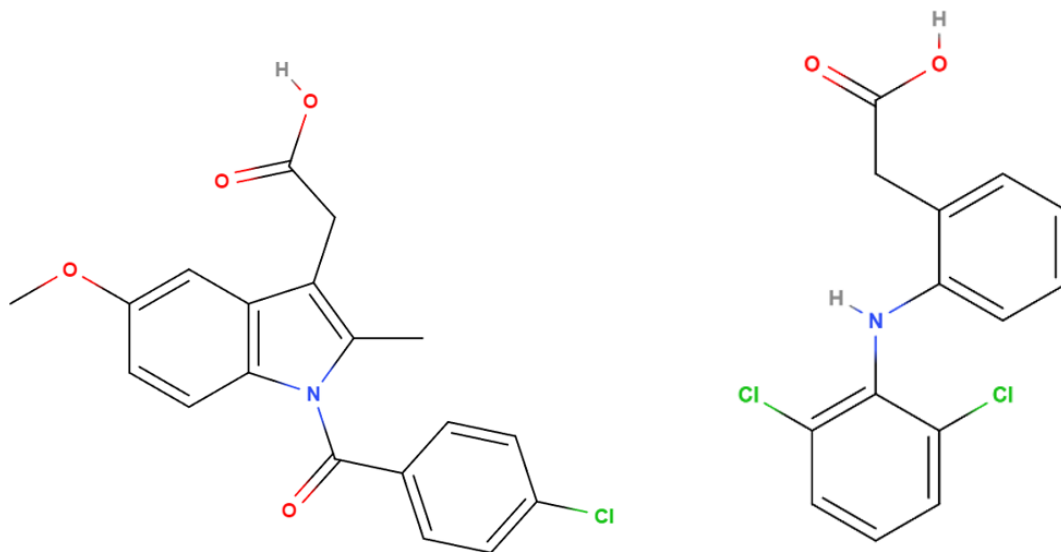
Spojevi fosfora se zajedno sa spojevima dušika moraju ukloniti iz otpadnih voda jer dovode do eutrifikacije vodotoka. Eutrifikacija vodotoka podrazumijeva proces obogaćivanja hranjivim tvarima što dovodi do prekomjernog razmnožavanja cijanobakterija. [1] Cilj biološkog uklanjanja fosfora iz otpadnih voda je da se potakne razvoj fosfat-akumulirajućih mikroorganizama koje imaju sposobnost vezanja fosfata u svoju staničnu masu uslijed čega se smanjuje koncentracija fosfora u vodi. Potom se istaložena biomasa koja u sebi ima vezan fosfor uklanja iz otpadnih voda taloženjem. Proces se može provesti u anaerobnim, aerobnim ili anoksičnim uvjetima jer većina fosfat-akumulirajućih mikroorganizama može koristiti nitrate umjesto kisika za oksidaciju u vitalnim biokemijskim reakcijama. [5]

2.3. FARMACEUTICI

Farmaceutici su tvari korištene u farmakoterapiji koja uključuje primjenu lijekova radi liječenja bolesti, a koji u zadnje vrijeme imaju sve značajniji utjecaj na okoliš. Lijekovi koji se koriste u farmakoterapiji se dijele na skupine prema ciljanoj namjeni i učinku kojeg postižu. Trend uporabe farmaceutika određene skupine prati trend pojave određenih patoloških stanja kod ljudi, stoga su neki od najčešće korištenih i propisivanih lijekova antidijabetici, analgetici, antipiretici, antihistaminici i antibiotici. [15] Neki od najčešće korištenih antidijabetika su metformin, glikvidon, liraglutid i dapagliflozin, dok se kao analgetici često koriste paracetamol, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen i naproksen. [3]

2.3.1. Diklofenak

Diklofenak-natrij je jedan od često korištenih lijekova iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL skupina), koji djeluju protuupalno, analgetski i antipiretski. Zbog svojih svojstava koristi se za ublažavanje boli i upale kod niza stanja kao što su bol u zglobovima, mišićima ili tetivama, kod napadaja gihta, i kod postoperativne boli i oteknuća u stomatologiji. [3,16]



Slika 2.2. Struktura indometacina (lijevo) i diklofenaka (desno) [17]

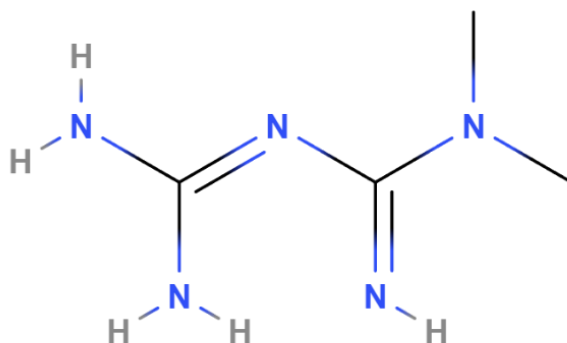
Mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji djelovanja ciklooksigenaze (COX), enzima koji je odgovoran za sintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Prostaglandin je eikozanoid koji ima značajnu fiziološku ulogu kao medijator upale i boli te predstavlja jednu od temeljnih molekula u signalizaciji boli. Postoje dva tipa enzima ciklooksigenaze te se lijekovi iz ove skupine razlikuju prema selektivnosti prilikom inhibiranja enzima ciklooksigenaze 1 (COX-1) i ciklooksigenaze 2 (COX-2). [3] Diklofenak-natrij pokazuje veći afinitet prema inhibiciji COX-2 stoga se češće koristi kod osoba kod kojih bi uporaba NSAIL lijekova koji imaju afinitet za inhibiciju COX-1 enzima mogla uzrokovati probleme u gastrointestinalnom traktu. S obzirom na strukturu prikazanu na slici 2.2. diklofenak pripada derivatima ariloctene kiseline, zajedno s indometacinom. Karboksilna skupina u obje strukture oponaša karboksilat u arahidonskoj kiselini koja je inače supstrat za COX enzim. Ta sličnost omogućuje vezanje lijekova na COX enzime. Za djelovanje diklofenaka je važno da je

za karboksilnu skupinu vezana planarna aromatska regija koja je od karboksilne skupine udaljena za jednu metilensku skupinu. U strukturi je važna i druga aromatska regija koja je nekoplanarna u odnosu na prvu. Kod diklofenaka su također važni atomi klora jer sprječavaju rotaciju oko jednostruke veze koja bi smjestila aromatske regije u koplanarni položaj čime bi se izgubila mogućnost inhibicije enzima. [17]

S obzirom na to da je diklofenak slaba kiselina, on je slabo topljiv u vodi stoga se lijek nalazi u obliku soli s Na^+ ili K^+ kationima. Slaba topljivost u vodi čini ga pogodnim za uporabu u obliku raznih krema i masti s ciljem postizanja lokaliziranog djelovanja na bolno područje. Također, diklofenak je dobro topljiv u nepolarnim organskim otapalima i termički je stabilan na sobnoj temperaturi. [3,17]

2.3.2. Metformin

Metformin je antidijabetik, po strukturi je bigvanid (jedini lijek u toj skupini). On je jedan od najčešće korištenih lijekova za liječenje dijabetesa tipa 2, a djeluje na način da smanjuje rezistenciju stanica na inzulinske učinke i inhibira glukoneogenezu u jetri, čime smanjuje koncentraciju glukoze u krvi. Također smanjuje apsorpciju glukoze u crijevima. Regulirajući razinu glukoze u krvi, smanjuje učestalost komplikacija dijabetesa. Osim toga, može dovesti do smanjenja tjelesne težine, povoljno utječe na razinu lipida u krvi i ne uzrokuje hipoglikemiju, zbog čega ima prednost naspram nekih drugih antidijabetičkih lijekova. Metformin se koristi u obliku kapsula i tableta raznih koncentracija. [3,16]

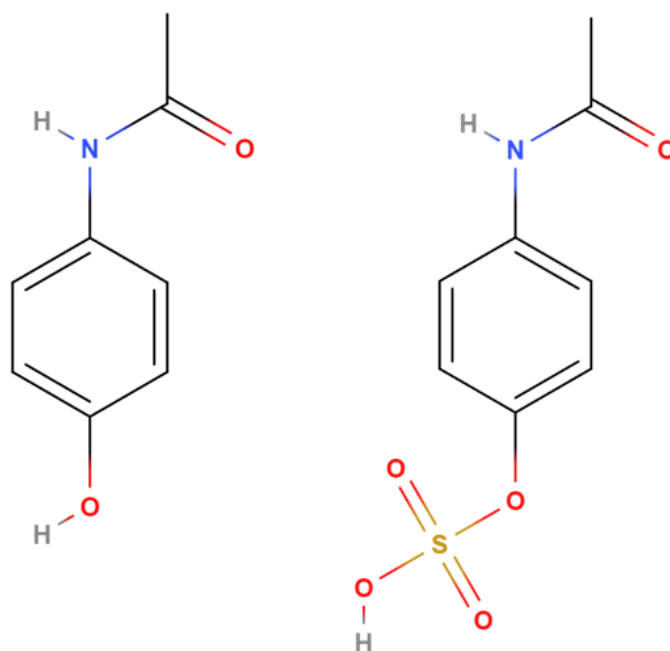


Slika 2.3. Struktura molekule metformina [15]

Struktura molekule metformina (slika 2.3.) sadrži dva gvanidinska funkcionalna dijela koji su međusobno povezani što mu omogućava farmakoterapijski učinak. Metabolizam metformina se uglavnom odvija u jetri gdje nastaju njegovi brojni metaboliti koji se izlučuju putem urina te na taj način dopijevaju u otpadne vode. [17]

2.3.3. Paracetamol

Paracetamol ili acetaminofen je još jedan od lijekova čija se biološka aktivnost temelji na inhibiciji enzima ciklooksigenaze. [3] Paracetamol kao i lijekovi iz NSAIL skupine ima analgetski i antipiretski učinak, ali ne pripada skupini NSAIL lijekova jer u njegovom slučaju izostaje protuupalno djelovanje. Stoga su indikacije za korištenje ovog lijeka slične kao i u slučaju NSAIL lijekova, za ublažavanje blage do umjerene boli npr. kod glavobolje, zubobolje, boli u leđima, reumatske i mišićne boli te za snižavanje povišene tjelesne temperature. [16]



Slika 2.4. Struktura molekule acetaminofena (lijevo) i acetaminofen sulfata (desno) [17]

Na temelju slike 2.4. može se vidjeti da paracetamol prema strukturi pripada derivatima anilina. Osnova strukture je *para*- supstituirani benzenski prsten. Paracetamol spada u skupinu fenola, a ne smatra se lijekom iz NSAIL skupine jer izostaje karboksilna skupina. Acetaminofen sulfat ima gotovo identičnu strukturu kao paracetamol, samo umjesto hidroksilne skupine ima sulfatnu skupinu. [17]

Za razliku od diklofenaka, paracetamol je dobro topljiv u vodi što mu omogućava brzu apsorpciju u fiziološkim tekućinama i vrlo dobru bioraspoloživost. Dobra topljivost u vodenom mediju također omogućava primjenu ovog lijeka u obliku sirupa. Acetaminofen se djelomično metabolizira putem jetrenim mikrosomalnim enzimima prilikom čega nastaju paracetamol sulfat i glukuronid koji su inaktivni metaboliti, dok se manje od 5 % acetaminofena mokraćom izlučuje u nepromijenjenom obliku. Jedan od sporednih, ali izrazito kemijski aktivnih metabolita acetaminofena je *N-acetil-p*-benzokinon koji se javlja pri primjeni prevelikih doza acetaminofena, a izrazito je hepatotoksičan i nefrotoksičan. [3,16]

3. PREGLEDNI DIO

3.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Upotreba farmaceutskih proizvoda u sklopu farmakoterapije je razvojem medicinskih znanosti sve opsežnija, češća i dostupnija. Poznato je da farmaceutski proizvodi prisutni u okolišu mogu biti izrazito toksični, stabilni te da se često mogu bioakumulirati u organizmima, npr. u tkivima životinja koje ih konzumiraju. Prilikom kontakta visokih koncentracija farmaceutika s organizmom postoji rizik od pojave akutne toksičnosti, dok u slučaju kada se radi o dugotrajnom izlaganju malim koncentracijama farmaceutika može nastupiti kronična toksičnost. [1, 18]

Analgetici, zajedno s anksioliticima, rangirani su kao jedni od najčešće korištenih lijekova 21. stoljeća. Nerijetko se neiskorišteni anksiolitici i analgetici kojima je istekao rok trajanja bacaju u komunalni otpad, putem kojeg dospijevaju u tla i u vodeni okoliš. Prisutnost ovakvih kemijskih spojeva u vodenom okolišu sa sobom nosi određene toksikološke rizike s obzirom na to da je većina lijekova namijenjena za humanu uporabu u točno određenim koncentracijama i načinima primjene. [15] Dakle, farmaceutici prisutni u okolišu predstavljaju opasnost za kompletni ekosustav, pa tako i za ljudsku vrstu. Jedan od značajnijih primjera utjecaja farmaceutika na ekosustav je pojava sve učestalije bakterijske rezistencije na antibiotike, koja nastupa uslijed njihove prisutnosti u vodenom okolišu. [1]

Farmaceutici često imaju znatnu otpornost na biološku razgradnju i mogu dugo zadržati svoju kemijsku strukturu koja ima toksično djelovanje. Dugoročno gledano, kontinuirano odlaganje farmaceutika u vode može dovesti do bioakumulacije koja uzrokuje potencijalnu opasnost za vodene i kopnene organizme kao što je toksičnost, razvoj otpornosti patogenih mikroba, endokrini poremećaji i mutageni utjecaj. [7] U mnogim je zemljama, poput Ujedinjenog Kraljevstva, Grčke i Sjedinjenih Američkih Država, pojava farmaceutika u otpadnim vodama zabrinjavajuća jer je učestalost identifikacije istih u uzorcima dosta visoka i kreće se od preko 90 % u širokom rasponu koncentracija koje često predstavljaju potencijalni toksikološki rizik. [15]

3.1.1. Prisutnost diklofenaka u okolišu

Diklofenak kao jedan od najčešće korištenih lijekova iz NSAIL skupine u posljednjih nekoliko desetljeća sve je prisutniji u tlu, podzemnim i površinskim vodama te u otpadnim vodama. [19] Zbog sve veće prisutnosti i sve više dokaza o ekotoksičnom djelovanju, diklofenak je nedavno od strane EU institucija svrstan na popis 100 farmaceutika čiju koncentraciju treba pomno pratiti i čiji ekotoksikološki utjecaj treba istražiti. [3,20]

Neki od glavnih izvora diklofenaka i njegovih metabolita su farmaceutske otpadne vode, otpadne vode iz zdravstvenih ustanova poput bolnica te otpadne vode iz kućanstva. Onečišćenje diklofenakom nastupa uslijed masovne proizvodnje istog u farmaceutskim proizvodnim postrojenjima te uslijed njegove uporabe u farmakoterapijske svrhe u zdravstvenim ustanovama i kućanstvima. [20]

Diklofenak dospijeva u tlo, podzemne, površinske i otpadne vode različitim putevima, no zbog svojeg hidrofilnog karaktera i kemijske stabilnosti najveću prijetnju predstavlja za vodeni okoliš. [20] Ovaj lijek nerijetko dospijeva u vode i tla nepropisnim direktnim odlaganjem neiskorištenih farmaceutskih proizvoda koji ga u svom sastavu imaju kao aktivnu tvar. Ekskrecija diklofenaka je također jedan od važnih puteva preko kojih ovaj lijek i njegovi metaboliti mogu dospjeti u okoliš. Naime, uslijed ingestije diklofenaka radi postizanja njegovih farmakoterapijskih učinaka kod ljudi i životinja, on se izlučuje iz organizma urinom, stolicom i znojem, koji često završe u komunalnim otpadnim vodama ili u površinskim vodama. [17]

Brojne studije ukazuju na to da oko 75 % količine korištenog diklofenaka završi u okolišu. Kontinuiranim ispištanjem u okoliš, diklofenak postaje pseudotrajna onečišćujuća tvar. Dospijecem diklofenaka u okoliš i u kontakt s mikroorganizmima nastupaju spontani biotički i abiotički procesi njegove degradacije. Kako su oni ograničene učinkovitosti, često je ljudska intervencija potrebna za njegovo potpuno uklanjanje. Najznačajniji abiotički proces kojem je diklofenak podložan je fotoliza uz Sunčevo UV zračenje, ali to samo po sebi nije dovoljno za njegovo potpuno uklanjanje. [20]

Metaboliti diklofenaka koji su prisutni u okolišu često su povezani s većom toksičnošću od matičnog spoja, ali se lakše mogu ukloniti iz okoliša. Povišene koncentracije diklofenaka u površinskim vodama dovele su do povećane prisutnosti njegovih metabolita i transformacijskih produkata poput 3'-hidroksidiklofenaka, 4'-

hidroksidiklofenaka i 5-hidroksidiklofenaka. Metabolitima diklofenaka pripadaju i konjugat glukuronida, konjugat sulfata i diklofenak-laktam, koji dospijevaju u okoliš putem ljudskih izlučevina te 8-klorokarbazol. U površinskim vodama koncentracija diklofenaka često je veća od 1 µg/L, dok su prosječne koncentracije nekih njegovih metabolita prikazane u Tablici 3.1. [19,21]

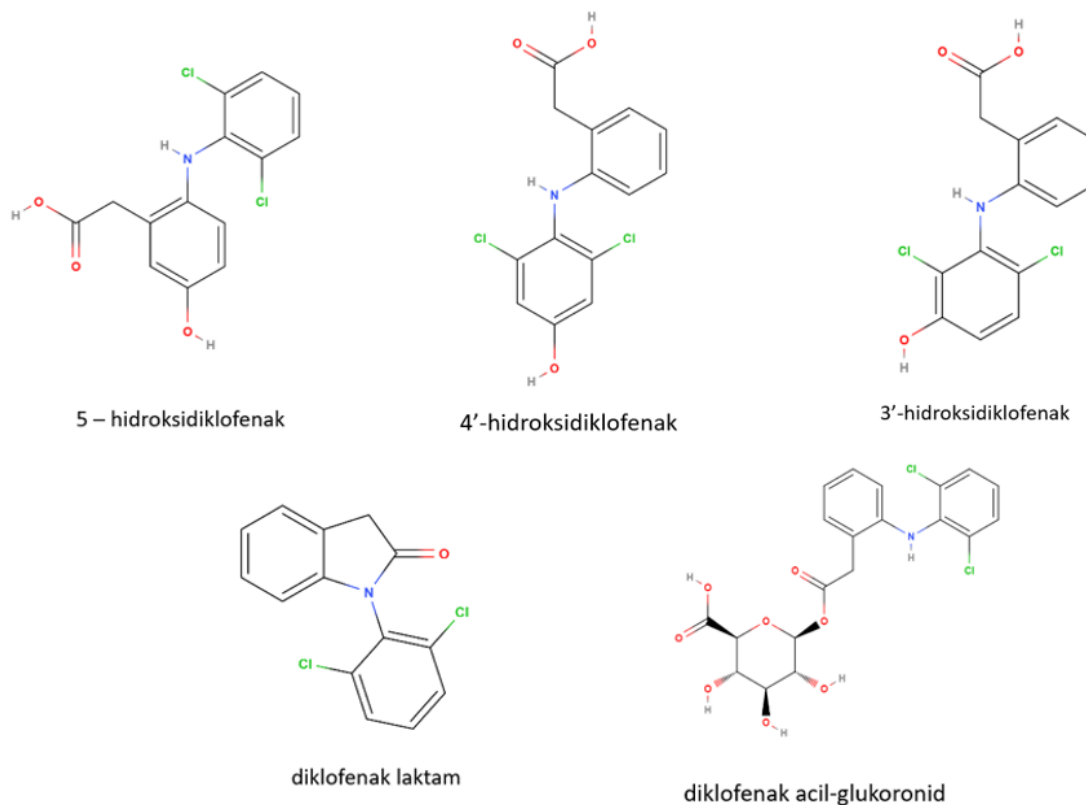
Tablica 3.1. Prosječne koncentracije metabolita diklofenaka u površinskim vodama

Metabolit diklofenaka	Prosječna koncentracija u površinskim vodama
3'-hidroksidiklofenak	0,3 µg/L
4'- hidroksidiklofenak	1,8 µg/L
5 - hidroksidiklofenak	0,008 µg/L

Prisutnost diklofenaka u podzemnim vodama predstavlja veliki rizik za kvalitetu pitke vode. Globalno je utvrđeno da se koncentracije diklofenaka otkrivene u podzemnim vodama u Kanadi, Indiji, Luksemburgu, Poljskoj, Francuskoj, Njemačkoj, Srbiji, Španjolskoj i Tajvanu kreću od 2,5 ng/L do 13,48 µg/L. U podzemnim vodama je također ustanovljena prisutnost 4'-hidroksidiklofenaka, što upućuje na to da je onečišćenje površinskih voda neosporivo utjecalo na onečišćenje podzemnih voda. U zemljama poput Francuske, Švedske i Japana ustanovljena je prisutnost diklofenaka u pitkoj vodi i to u prosječnim koncentracijama od 18 ng/L do 25 ng/L. Kako se pitka voda direktno povezuje s ljudskim zdravljem, ovaj podatak definitivno izaziva zabrinutost. [20]

U slučaju analize otpadnih voda, koncentracije diklofenaka i njegovih derivata drastično ovise o tome o kojoj vrsti otpadne vode se radi, a najviše koncentracije ustanovljene su u farmaceutskim otpadnim vodama. Koncentracija 4'-hidroksidiklofenaka u otpadnim vodama iznosi oko 1,7 µg/L, a 5-hidroksidiklofenaka 0,86 µg/L. Diklofenak je također pronađen u tlu, gdje dospijeva iz izvora poput obrađenih otpadnih voda, onečišćenih površinskih voda te voda koje se koriste za navodnjavanje. Razna istraživanja pokazala su rasprostranjenost diklofenaka u tlu u rasponu od 0,2 ng/L do 257 µg/L, što je manje u odnosu na koncentracije koje su prisutne u površinskim vodama. Na slici 3.1. prikazane su strukture derivata

diklofenaka koje se često nalaze u okolišu. Strukturna razlika hidroksiliranih derivata je u položaju hidroksilne skupine u odnosu na benzenski prsten (položaj 3', 4' ili 5). Navedene strukturne razlike posljedica su različitih okolišnih uvjeta te mehanizama kemijskih reakcija koje se odvijaju. [21,20]



Slika 3.1. Strukture derivata diklofenaka prisutnih u okolišu [19]

3.1.1.1. Toksičnost diklofenaka

Nedavna toksikološka ispitivanja potvrdila su višestruke negativne učinke diklofenaka na sisavce, što uključuje kardiotoksične, hepatotoksične, nefrotoksične, neurotoksične, genotoksične i hematotoksične učinke. Također je utvrđeno da kada se diklofenak primijeni zajedno s lijekovima poput makrolidnih antibiotika, kardiotoksični i hepatotoksični utjecaji mogu biti drastičniji zbog sinergističkog djelovanja. [3,16] Na sisavce također toksično utječu derivati diklofenaka poput 4',5-dihidroksidiklofenaka, koji ima depolarizirajući efekt na mitohondrije u hepatocitima čovjeka uslijed kojeg nastupa stanična smrt. Hepatotoksični učinak također mogu imati 4'-hidroksidiklofenak, 5-hidroksidiklofenak te diklofenak-acil glukoronid na

način da inhibiraju sintezu ATP-a (adenozin trifosfata) u hepatocitima, što je dokazano na štakorima. [20]

Tijekom ispitivanja toksikološkog utjecaja diklofenaka na vodene organizme ustanovljeno je da on često utječe na vrijeme nosivosti ženskih jedinki i da može biti embriotoksičan, ali utjecaj izloženosti varira od vrste do vrste te ovisi o vremenu izloženosti. Ustanovljeno je da diklofenak može inhibirati translaciju, čime se onemogućuje sinteza proteina u skladu s genskom uputom te može utjecati na aktivnost enzima koji kataliziraju vitalne fiziološke procese. Izloženost vodenih organizama diklofenaku također može utjecati na veličinu jedinki te izazvati metilaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNK), što za posljedicu može imati mutageno djelovanje i pojavu raznih tipova neoplazija na ribama. [19,20]

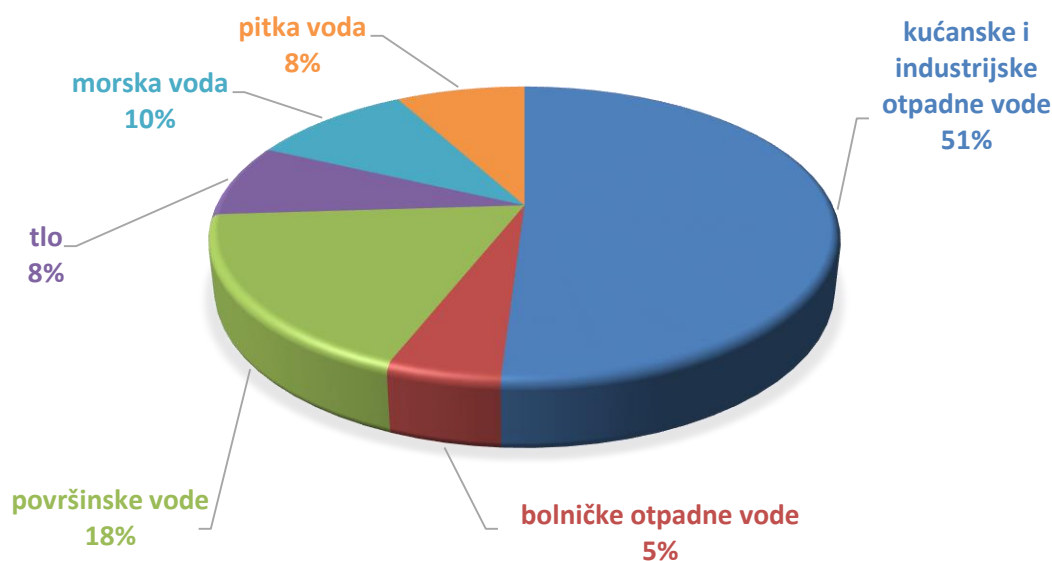
Utjecaj diklofenaka na biljne vrste uglavnom se očituje u smanjenom rastu biljke, koji nastupa uslijed njegove genotoksičnosti i citotoksičnosti. Također je ustanovljeno da diklofenak može izazvati promjene u strukturi kloroplasta i na taj način poremetiti proces fotosinteze. Isto tako, ukoliko se diklofenak akumulira u biljnim tkivima, javlja se stanje abiotičkog stresa, zbog povećane koncentracije enzima antioksidativnog djelovanja. Dakle, na temelju dostupnih toksikoloških podataka diklofenak je potencijalno opasan za vrste poput raznih vrsta sisavaca, riba, biljaka i drugih. Evidentno je da dugotrajna izloženost diklofenaku, čak i pri niskim dozama, igra glavnu ulogu u njegovu toksičnom djelovanju. [20,21]

3.1.2. Prisutnost metformina u okolišu

Metformin je jedan od najčešće korištenih antidijabetika, stoga i ne čudi činjenica da je prisutan u površinskim i podzemnim vodama te u tlu. Značajan izvor metformina u otpadnim vodama je urin osoba koje ga uzimaju u sklopu antidijabetičke terapije. Poznato je da se oko 70 % terapijske doze metformina i njegovih metabolita eliminira putem urina i fecesa, uslijed čega završava u otpadnim vodama. [3] Metformin u tlo i vode također dopijeva direktnim i nepropisnim odlaganjem neiskorištenih farmaceutskih pripravaka koji ga sadržavaju kao aktivnu farmaceutsku tvar (API). S obzirom na njegove potencijalne toksične utjecaje na neciljane organizme s kojima dolazi u kontakt, koncentracije metformina u vodama i tlu se pomno prate širokim spektrom instrumentalnih analitičkih metoda. [22] Prema dostupnim podacima o koncentracijama metformina u vodenom okolišu najviše

koncentracije metformina prisutne su u razvijenim zemljama, gdje se najviše i koriste antidijabetici s obzirom na veću prevalenciju pretilosti i šećerne bolesti tipa II. Prema 42 studije provedene u EU 51% uzoraka za analizu metformina uzetih iz otpadnih voda bilo je pozitivno na prisutnost metformina, 28 % iz površinskih voda te 5 % uzoraka iz bolničkih otpadnih voda. [18]

Koncentracija metformina uvelike ovisi o tipu uzorka te o lokaciji uzimanja istog. Recimo, u otpadnim vodama u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) prosječna koncentracija metformina iznosi 2,3 ng/L, dok je u Portugalu situacija drastično lošija jer je prosječna koncentracija metformina 325 ng/L. Površinske vode u Njemačkoj često ne sadržavaju metformin, dok je on u SAD-u prisutan u koncentraciji od 9200 ng/L. Situacija s pitkom vodom također se razlikuje od države do države, pa na primjer u Austriji nema značajne prisutnosti metformina, dok je u Njemačkoj njegova koncentracija 61 ng/L Varijacije u koncentracijama također mogu biti posljedica i korištenje različitih instrumentalnih analitičkih metoda. [18]



Slika 3.2. Raspodjela ukupne količine metformina u raznim segmentima okoliša [18]

Prema globalnom prosjeku analitičkih podataka o koncentracijama metformina (slika 3.2.) može se vidjeti da je 51% količine metformina u okolišu prisutno u otpadnim vodama (efluenti i influenti), 18 % u površinskim vodama, a 8 % u tlu. U morskoj vodi je sadržano 10 % metformina, a pitka voda sadržava 8 % od ukupne količine prisutne u okolišu. [18] Također je važno pratiti koncentracije i prisutnost derivata metformina s obzirom na to da derivati neke farmaceutski aktivne tvari mogu

također predstavljati određeni ekotoksikološki rizik, koji je često veći od originalnog lijeka. [15]

3.1.2.1. Toksičnost metformina

Prilikom ispitivanja toksičnosti metformina na sisavcima (miševima) utvrđeno je da on može prijeći kroz placentu te da se može prenijeti tijekom laktacije putem majčinog mlijeka na potomstvo. Također je ustanovljeno da njegova prisutnost u ženskim jedinkama miševa ne utječe na ovulacijski ciklus, ali je koncentracija hormona estradiola u krvnoj plazmi bila znatno povišena. [18] Ovisno o dozi, prisutnost metformina u organizmu sisavaca također može utjecati na smanjenje apetita, uslijed čega jedinke koje su izložene metforminu gube na tjelesnoj masi. Također je primjena metformina na miševima pokazala da je navedeni lijek u korelaciji s pojavom upalnih procesa i nekroze epitelnog tkiva u žlijezdama slinovnicama. Uz prethodno navedeno, ustanovljeno je da metformin može imati genotoksičan i hematotoksičan učinak s obzirom na to da oštećuje DNK molekulu pri određenim koncentracijama te dovodi do supresije koštane srži, pa može negativno utjecati na brojnost eritrocita. [18,23]

Brojna istraživanja utjecaja metformina na ribama utvrdila su da je prisutan utjecaj na endokrini sustav, na ponašanje jedinki te je uočen utjecaj na rast i razvoj jedinki nekih vrsta. Također je ustanovljeno da je prisutnost metformina u vodenom okolišu povezana s pojavom jajnih stanica u reproduktivnim organima mužjaka te spermatogonijskih stanica u reproduktivnim organima ženki. Nadalje, prisutnost metformina je povezana s oksidativnim stresom, uslijed kojeg se javljaju povišene koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta koje mogu biti citotoksične. Ustanovljeni su i toksični učinci koji su u korelaciji s biološkom dobi jedinki kao npr. utjecaj metformina na ribe *Pimepales promelas*, koji se očituje u drastičnim promjenama u ekspresiji gena povezanih s endokrinim sustavom kod mladih jedinki. Takav učinak nije ostvaren kod odraslih muških jedinki. Dakle, utjecaj na ribe je značajan čak i pri niskim koncentracijama te se može reći da metformin predstavlja ozbiljnu prijetnju za populaciju riba, njihov opstanak i reprodukciju. [22]

3.1.3. Prisutnost paracetamola u okolišu

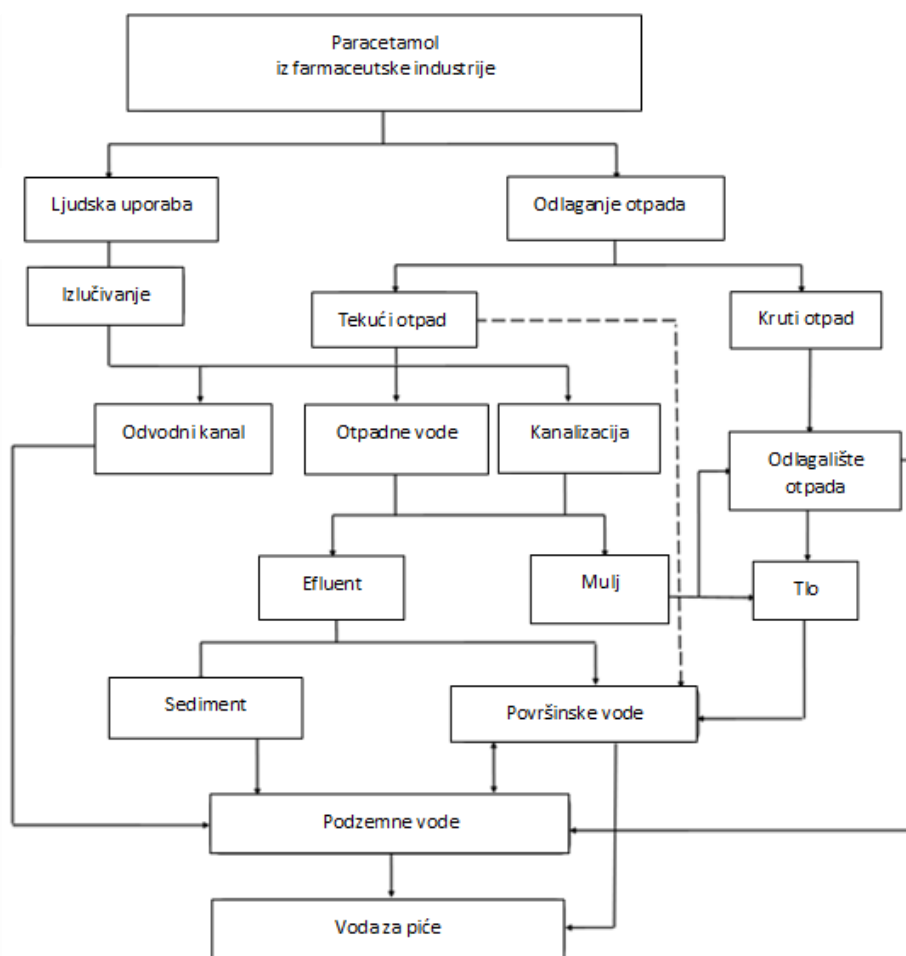
Paracetamol ili acetaminofen je jedan od mikrokontaminanata čiji su glavni izvori otpadne vode iz kućanstava i industrije. Dospijeva u kanalizaciju na razne načine i nakuplja se u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda te u konačnici dolazi do pitke vode. Nakon obrade u postrojenjima za pročišćavanje paracetamol i dalje ostaje u ispuštenoj vodi i onečišćuje tlo, sediment i podzemne vode. Može se reći da je paracetamol uglavnom prisutan u kanalizaciji i postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, površinskim vodama, podzemnim vodama, tlu i u sedimentu. [15]

Kako je paracetamol jedan od najčešće korištenih analgetika i antipiretika, za koji uglavnom nije potreban liječnički recept, u mnogim zemljama poput SAD-a, Kine, Francuske i Ujedinjenog Kraljevstva (UK) koncentracija paracetamola u otpadnim vodama nalazila se u rasponu od 0,1 do 300 mg/L, a učestalost njegove identifikacije u uzorcima nerijetko je iznosila i 100 %. [24,25]

U Južnoj Koreji paracetamol je činio i do 80 % ukupnih farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda u otpadnim vodama, a u Kini je dokazana koncentracija u otpadnim vodama iznosila 3,4 mg/L, daleko više od ostalih spojeva koji se koriste u farmakoterapijske i kozmetičke svrhe. Navedeni podaci upućuju na dominantnu prisutnost paracetamola u okolišu u odnosu na druge organske onečišćujuće tvari, što je zapravo odraz njegove učestale konzumacije. Također je u mnogim provedenim istraživanjima ustanovljeno da su koncentracije paracetamola u otpadnim vodama u drastičnom porastu. Npr., 2006. godine u Baltimoreu je prijavljena koncentracija paracetamola u okolišu bila 0,96 mg/L, dok prema podacima za i nakon 2012. navode se i do 100 puta veće koncentracije. [26]

Što se tiče površinskih voda, koncentracije paracetamola variraju ovisno o mjestu na kojem je uzet uzorak. U Južnoj Koreji paracetamol je najčešće detektirana onečišćujuća tvar, koja je prisutna u 80 % uzoraka površinskih voda s prosječnom koncentracijom od 33 ng/L. U Francuskoj i Španjolskoj učestalost detekcije paracetamola u površinskim vodama bila je u rasponu od 28 do 41 %, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama koncentracija paracetamola u površinskim vodama bila u rasponu od 2,5 do 17 ng/L, pri čemu je jezero Michigan bilo jedno od područja s najvišom koncentracijom paracetamola. [24, 26]

Također je poznato da je paracetamol kao onečišćujuća tvar prisutan i u tlu i sedimentu, posebice u urbanim područjima s velikom populacijom. Koncentracije paracetamola u tlu obično su daleko manje od onih u vodama, no zabrinutost zbog njegove potencijalne akumulacije u tlu i organizmima te genotoksičnih svojstava njegovih derivata i dalje je opravdana. [26] Najveće koncentracije paracetamola u tlu i u sedimentu pronađene su na području Masan Bay u Južnoj Koreji. Smatra se da je navedeno područje jedno od najonečišćenijih obalnih područja zbog prisutnosti intenzivnih industrijskih aktivnosti te velike populacije i gustoće naseljenosti. Koncentracije paracetamola u pitkoj vodi u Kini, SAD-u i Grčkoj su iznad 100 µg/L, što je veća vrijednosti od preporučene maksimalne koncentracije (71 ng/L), dok je u državama poput Španjolske i Francuske ta koncentracija u pitkoj vodi manja od preporučene maksimalne vrijednosti. [24]



Slika 3.3. Shema puteva kojima paracetamol dopijeva do pitke vode [27]

Na slici 3.3. nalazi se shematski prikaz puteva kojima paracetamol dopire u pitke vode. Vidljivo je da su glavna dva izvorišta paracetamola kojeg nalazimo u okolišu ljudska uporaba u svrhe liječenja povišene temperature i bolova te odlaganje otpadnih voda u farmaceutskim tvrtkama koje paracetamol proizvode kao API u brojnim lijekovima raznih oblika. [27]

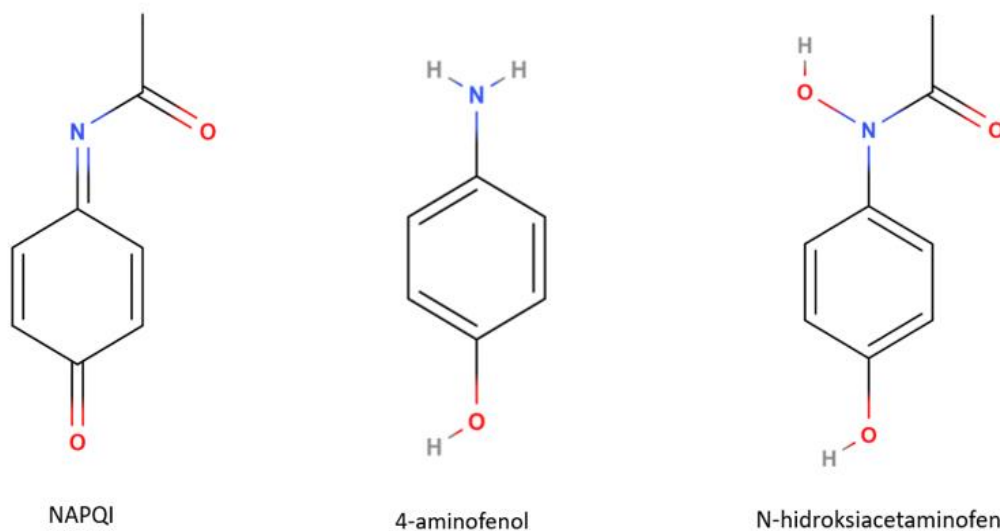
3.1.3.1. Toksičnost paracetamola

Paracetamol se smatra sigurnim lijekom kada se uzima u propisanim dozama, no u slučaju pretjerane konzumacije može dovesti do zatajenja jetre i zatajenja bubrega, kako kod ljudi tako i kod brojnih drugih vrsta sisavaca. Paracetamol se u optimalnim uvjetima metabolizira na netoksične produkte i nešto malo toksičnih produkata koji bivaju neutralizirani u netoksični oblik, no prilikom konzumacije prevelike količine paracetamola, klasični metabolički putevi se prezasiće te dolazi do pojačane oksidacije paracetamola u njegov metabolit *N*-acetil-*p*-benzokinonimin (NAPQI) koji je izrazito toksičan. [17,28] Dakle, prilikom konzumacije preporučenih količina paracetamola, glutation (GSH, tripeptid koji neutralizira radikalne molekule) se veže na njegove toksične metabolite i čini ih netoksičnima. [3]

Neki od najpoznatijih derivata paracetamola su NAPQI, *N*-hidroksiacetaminofen i 4-aminofenol. [28] Mnoga toksikološka istraživanja potvrdila su da navedeni derivati paracetamola, ovisno o dozi i vrsti organizama na koje djeluju, mogu djelovati genotoksično narušavajući strukturu nukleinskih kiselina na način da se kovalentno vežu na iste. Uz vezivanje na molekule DNK i RNK (ribonukleinsku kiselinu), dokazane su i kromosomske aberacije, odnosno promjene u strukturi kromosoma, što je jedan od aspekata njihove genotoksičnosti. Paracetamol i njegovi metaboliti uzrokuju i malformacije u strukturama proteina, odnosno denaturaciju proteina u organizmima, uslijed čega proteini gube svoju biološku funkciju. Upravo je proces kovalentnog vezanja na proteine odgovoran za njegovo citotoksično djelovanje. [26]

Genotoksični utjecaj paracetamola na sisavce temeljen je na njegovom svojstvu da inhibira sintezu DNK molekula u stanicama na način da se smanjuje količina deoksiribonukleotida za sintezu DNK. Inhibicija sinteze DNK predstavlja rizik za genom nekog organizma i dovodi do smanjene sposobnosti stanica da se pravilno dijele i obnavljaju. Navedeno toksično djelovanje paracetamola se opisuje

kao njegov neizravni genotoksični učinak obzirom da se ne radi o direktnom utjecaju na genetski materijal. [26] S druge strane, istraživanja na prokariotima su pokazala da paracetamol i njegov najreaktivniji metabolit NAPQI nemaju genotoksične učinke u raznim sojevima bakterija kao što su *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. U slučaju biljaka pokazalo se da paracetamol isto kao i kod sisavaca može imati genotoksični učinak. U konkretnom slučaju je ustanovljena učestala pojava kromosomskih lomova te rekombinacija i mutacija genetskog materijala u stanicama koje su bile izložene paracetamolu. [29]



Slika 3.4. Strukture derivata acetaminofena [28]

Paracetamol također izrazito toksično djeluje na slatkovodne beskralježnjake, gdje se pokazalo je koncentracija od oko 50 mg/L dovodi do 50%-tnog toksičnog učinka (EC_{50}) na tretiranu populaciju, dok je za bakterije i makrofitne vrste ta vrijednost > 400 mg/L. Dakle, prema EC_{50} vrijednosti, bakterije i makrofitne vrste bolje podnose prisutnost paracetamola u vodenom mediju. [24] Na slici 3.4. prikazane su strukture derivata paracetamola iz koje je vidljivo da su svi para supstituirani anilinski derivati, ali se razlikuju prema supstituentima. Sva tri navedena derivata također imaju elektrofilnu kinonsku funkcionalnu skupinu koja je sklona reakciji sa nukleofilnim skupinama u biomolekulama poput proteina što može dovesti do toksičnosti. [17]

3.2. BIORAZGRADNJA ORGANSKIH ONEČIŠĆUJUĆIH TVARI

Primarni cilj biološke obrade otpadnih voda jest pretvorba organskih onečišćujućih tvari koje su biorazgradive u netoksične produkte putem metabolizma mikroorganizama (najčešće bakterija). Biorazgradnja je utemeljena na složenim biokemijskim reakcijama u kojima glavnu ulogu imaju enzimi. Enzimi biokatalitički djeluju i omogućuju razne biokemijske reakcije u kojima se događa razgradnja većih organskih molekula na manje. [15] Dakle, mikroorganizmi se koriste kako bi pretvorili otopljena i dispergirana organska onečišćenja u jednostavnije konačne produkte. Najčešće se proces biorazgradnje provodi uz pomoć više vrsta mikroorganizama koji čine heterogene mikrobne zajednice. U mikrobnim zajednicama mogu se nalaziti vrste mikroorganizama poput bakterija, arhea, protozoa, gljivica i algi. [1,2]

Biorazgradnja se primjenjuje u obradi kućanskih i industrijskih otpadnih voda te se u potpunosti mogu ukloniti spojevi dušika i fosfora te specifična organska onečišćenja (pesticidi, kozmetički konzervansi...). U industrijskim otpadnim vodama često se nalaze spojevi koji toksično djeluju na mikroorganizme, stoga je njihovo prethodno uklanjanje neizbježno. [1,15]

U procesu biorazgradnje pri obradi otpadnih voda važno je poznavati mikroorganizme koje koristimo kako se optimirali uvjeti poput temperature i pH vrijednosti. [1] Većina prokariotskih mikroorganizama preživljava širok raspon temperaturnih i pH vrijednosti, no cilj je postići što veću konverziju procesa biorazgradnje, a za to su važni optimalni uvjeti. Naime, ukoliko se proces provodi u uvjetima preniske temperature, to uglavnom drastično negativno utječe na brzinu odvijanja mitoze u bakterijskim stanicama, pa samim time i na biomasu. Općenito bakterije mogu podnijeti pH vrijednosti od 4 do 9,5. Optimalne pH vrijednosti za većinu bakterija kreću se između 6,5 i 7,5. [5,14] Velika većina organskih onečišćujućih tvari iz otpadnih voda prirodnog je porijekla te se mogu razgraditi od strane brojnih vrsta bakterija u aerobnim i anaerobnim uvjetima. U otpadnim vodama je detektirano oko 70000 sintetskih organskih spojeva, od kojih je značajan broj biološki nerazgradiv, izrazite kemijske stabilnosti i potencijalno opasan za ekosustav. [2] U tablici 3.2. navedeni su primjeri za organske onečišćujuće tvari koje su prisutne u okolišu.

Tablica 3.2. Prikaz najčešćih onečišćujućih tvari [2]

Izvor	Organske onečišćujuće tvari
nafta	alkani, alkeni, poliaromatski ugljikovodici, monociklički aromati (benzen, toluen, etilbenzen, ksileni, nafteni)
nehalogenirana otapala	alkoholi, ketoni, esteri, eteri, aromatski i alifatski ugljikovodici, glikoli, amini
halogenirana otapala	metilen klorid, kloroform, ugljikov tetraklorid, tetrakloreten, trikloreten, trikloreten, klorirani benzeni
insekticidi, herbicidi, fungicidi	organokloridni spojevi, organofosfati, karbamati esteri, fenil eteri, klorirani fenoli
municija i eksplozivi	nitroaromati (trinitrotoluen), nitratni esteri
industrijski intermedijeri	ftalatni esteri, benzen, fenol, klorbenzeni, klorofenoli, ksileni
hidraulične tekućine	poliklorirani bifenili
produkti proizvodnje	dioksini i furani

Sposobnost metaboličke razgradnje organskih onečišćujućih tvari prvenstveno ovisi o vrsti prisutnih mikroorganizama te o vremenu prilagodbe mikroorganizama na tu tvar. [1] Nije svejedno koja se vrsta mikroorganizama koristi za biorazgradnju različitih organskih tvari s obzirom na to da se mikrobn metabolizam i prisutnost enzima koji bi razgradili organsku tvar razlikuju od vrste do vrste. Također, ispostavilo se da je period prilagodbe mikroorganizama na organske ksenobiotike od izrazite važnosti jer uvelike utječe na učinkovitost procesa. Dakle, da bi proces biorazgradnje bio što uspješniji, potrebno je da se mikroorganizmi dugoročno izlažu organskom ksenobiotiku u odnosu na isprekidano izlaganje. [2,5]

Postoje tri osnovna puta biorazgradnje organskih ksenobiotika: [2]

1. organski ksenobiotik je supstrat za rast biomase
2. organski ksenobiotik djeluje kao elektron-akceptor
3. organski ksenobiotik je razgrađen kometaboličkim putem

Većina procesa biorazgradnje organskih onečišćujućih tvari temelji se na tome da je organski ksenobiotik (supstrat) tvar koja stanicama mikroorganizma može poslužiti za dobivanje energije metaboličkim putevima. Organsku tvar razgrađuju specifični enzimi čije je aktivno mjesto strukturno kompatibilno sa supstratom. [1]

U slučaju kometaboličke biorazgradnje organski ksenobiotik nije nutritivno relevantan za mikroorganizam te ne utječe ni na koji način na vitalne procese u stanicama. Organska tvar razgrađuje se od strane nespecifičnih enzima. Kometabolička biorazgradnja često kao produkte ima izmijenjene organske tvari jer se sam proces biorazgradnje ne događa u potpunosti kada bi produkti bili CO_2 i H_2O . Kometaboličku biorazgradnju provode bakterije koje proizvode enzime poput nespecifične monooksigenaze i dioksigenaze. Navedeni nespecifični enzimi služe kao medijatori u reakcijama kloriranih tvari sa kisikom i vodikom, pri čemu se mijenja struktura kloriranog spoja. Produkt koji je dobiven kometaboličkom biorazgradnjom nerijetko se dalje razgrađuje u drugim procesima. [1,2]

U procesima u kojima je organski ksenobiotik elektron-akceptor radi se o bioprocesu koji se odvija u anaerobnim uvjetima gdje tvari poput kloriranih organskih spojeva ne služe kao supstrati za rast biomase, već u tim uvjetima služe kao elektron-akceptor za oksido-redukcijske reakcije. [2]

Navedenim postupcima moguće je uklanjati širok spektar organskih onečišćujućih tvari, uključujući i tvari koje su u otpadnim vodama prisutne u tragovima poput prirodnih hormona, antikonvulziva, beta-blokatora, antibiotika i mnogih drugih. Tvari u tragovima prisutne su u otpadnim vodama u koncentracijama od nekoliko ng/L. Zbog niskih koncentracija navedenih tvari, one ne mogu adekvatno osigurati značajan rast biomase, stoga se njihova biorazgradnja najčešće provodi s bakterijama koje konzumiraju druge supstrate kao izvor energije. [5]

Procesi biorazgradnje se također mogu kategorizirati prema učinkovitosti kako je prikazano u Tablici 3.3. Dakle, ukoliko je učinkovitost uklanjanja organskog ksenobiotika $> 90 \%$, radi se o visoko biorazgradivoj tvari. Ukoliko je učinkovitost uklanjanja $60 - 85 \%$, radi se o umjereno razgradivoj tvari, dok je pri $20 - 60 \%$ područje slabe biorazgradivosti. Za tvari čija je vrijednost biorazgradnje ispod 20% učinkovitosti, može se reći da su jako slabo razgradive ili u potpunosti nerazgradive provedenim procesima biorazgradnje. [4]

Tablica 3.3. Podjela procesa biorazgradnje prema učinkovitosti za neke tvari [2]

Tvari	Koncentracija, ng/L	Namjena
Visoko biorazgradive tvari (učinkovitost > 90 %)		
acetaminofen	67290	analgetik, antipiretik
naproxen	21560	analegetik, antipiretik
triklosan	1100	antifungalni lijek, antibiotik
ibuprofen	13490	analegetik, antipiretik
kofein	50680	nootropik, stimulans
Umjereno biorazgradive tvari (učinkovitost 60-85 %)		
bisfenol A (BPA)	290	aditiv u plastici
eritromicin	120	antibiotik
trimetoprim	180	antibiotik
oksibenzon	30	UV filter u kremama
Slabo razgradive tvari (učinkovitost 20-60 %)		
sulfametoksazol	1000	antibiotik
metoprolol	390	beta blokator
lopromid	3190	kontrast za RTG
Teško biorazgradive ili nebiorazgradive tvari		
dilantin	50	antikonvulziv
karbamazepin	250	antikonvulziv

3.2.1. Biorazgradnja metformina

Kao što je prethodno spomenuto, metformin je lijek koji se koristi u liječenju dijabetesa tipa 2 i široko je rasprostranjen u europskim otpadnim vodama i površinskim vodama. U otpadnim vodama prosječna koncentracija od oko 60 ng/L izmjerena je u deset različitih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Njemačkoj,

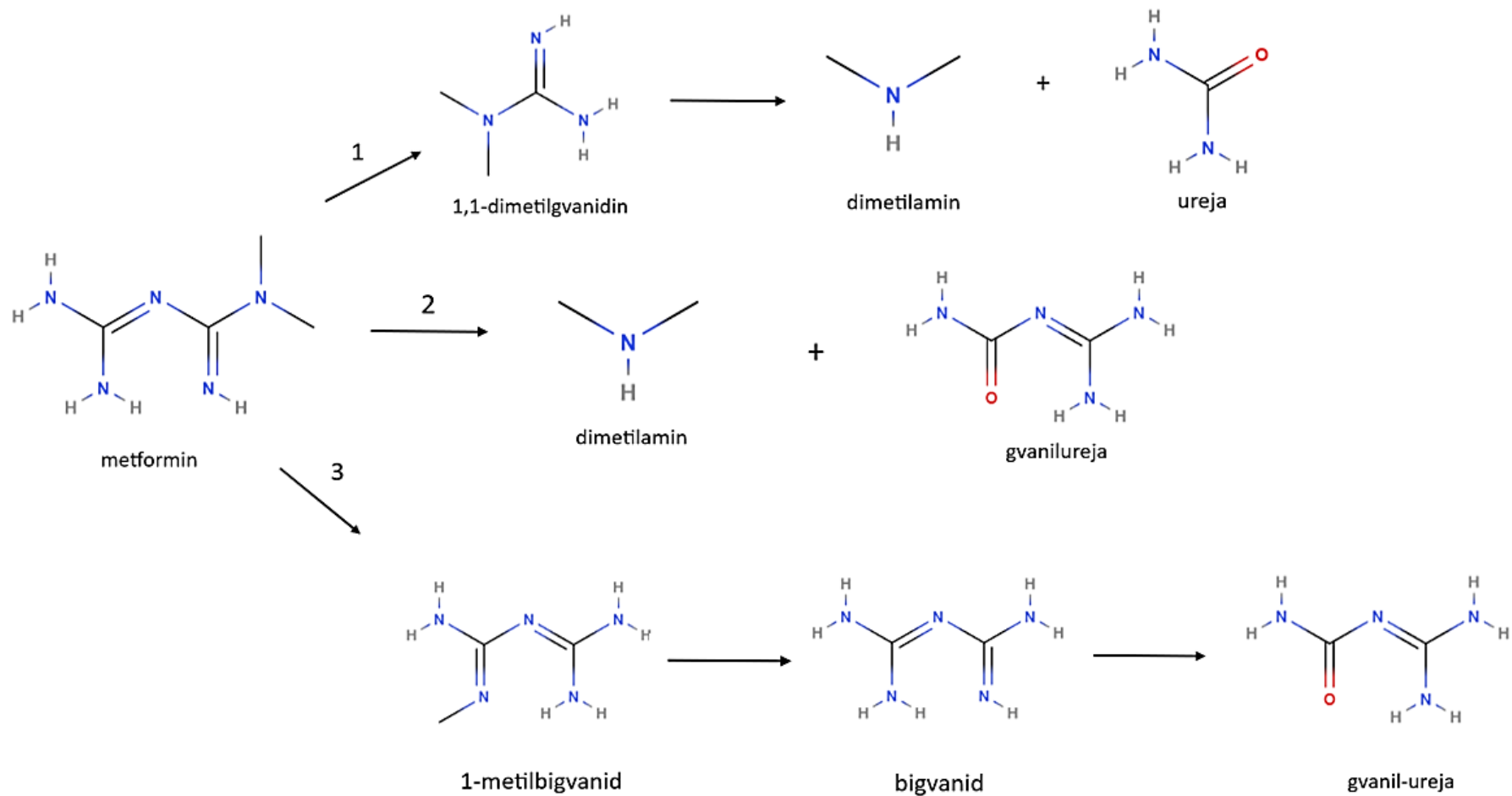
dok su njegove koncentracije u površinskim vodama od 1 do 8 µg/L zabilježene u belgijskim i nizozemskim rijekama. [16,15]

Također, u pokušajima da se metformin kategorizira u kontekstu sklonosti prema biorazgradnji, nastupila su brojna odstupanja. Dakle, u nekim sustavima se ispostavio kao izrazito biorazgrađiva tvar, dok se u drugim ispostavio kao kompletno postojana (nebiorazgrađiva) tvar. [18] Od tvari koje se klasificiraju kao biorazgrađive se očekuje da će vrlo kratko vrijeme ostati prisutne u vodama, međutim to nije uvijek slučaj s obzirom na to da biorazgradnja neke tvari ovisi o brojnim čimbenicima (vrsta inokuluma, temperatura, vrsta i brojnosti mikroorganizama). Jedan od važnih čimbenika koji također utječe na učinkovitost procesa biorazgradnje je vrijeme prethodnog izlaganja mikroorganizama organskom ksenobiotiku. Najčešći rezultat ispitivanja biorazgradnje metformina i gvanil-ureje jest njihova brza razgradnja i uklanjanje iz otpadnih voda. [22, 30]

Procesi biorazgradnje metformina mogu se provoditi u kemostat bioreaktorima. Uloga kemostat bioreaktora jest održavati populaciju mikroorganizama stabilnom i stacionarnom, tj. održavati jednaku dinamiku u umiranju stanica i rastu broja stanica. Dakle, kemostat je uređaj za kontinuiranu kultivaciju stanica mikroorganizama. Mikroorganizmi koji se kultiviraju rastu na hranjivom mediju koji sadrži različite soli te izvore brojnih hranjivih tvari. [2, 22]

Poznata su tri osnovna moguća procesa biorazgradnje metformina u okolišu. Kao što se može vidjeti iz slike 3.5. prvi mogući proces je da se iz metformina dobije međuprodukt 1,1-dimetilgvanidin koji se naknadno metabolizira na dimetilamin i ureju. U drugom mogućem procesu biorazgradnje se iz metformina direktno dobivaju produkti dimetilamin i gvanil-ureja. Navedena dva procesa su inicirana eliminacijom gvanidina i dimetilamina. U trećem mogućem procesu biorazgradnje metformina dobije se međuprodukt 1-metilbigvanid koji se naknadno pretvara u bigvanid i iniciran je demetilacijom. Kojim konkretno putem će se razgraditi metformin ovisi o tome koji mikroorganizam ga metabolizira. [31]

Prilikom provođenja ispitivanja biorazgradnje metformina često se uzorak lijeka stavlja u sterilne abiotičke uvjete kako bi se utvrdilo je li metformin podložan abiotičkom tipu biorazgradnje, odnosno razgradnji koja ne uključuje mikroorganizme. U navedenom slučaju nije uočena promjena koncentracije metformina, stoga se može reći da se isti ne razgrađuje abiotičkom razgradnjom. [22]



Slika 3.5. Prikaz 3 osnovna procesa biorazgradnje metformina u okolišu [31]

Učinkovitost biorazgradnje metformina u gvanil-ureju, koja je provedena pomoću aktivnog mulja, pokazuje različite vrijednosti. Evidentno je da se razgradnja dogodila u svakom pokusu koji je inokuliran aktivnim muljem, a koji nije prethodno bio izložen metforminu. Isti rezultati su se postigli i u uzorcima gdje je aktivni mulj bio izložen metforminu 1, 3 i 9 mjeseci. [22] Uočeno je da je učinkovitost procesa biorazgradnje metformina aktivnim muljem veća što je duži period prethodne izloženosti aktivnog mulja metforminu. Naime, u uzorcima koji su izloženi metforminu dogodila se potpuna razgradnja uz učinkovitost od 99,99 %, dok su druga dva uzorka pokazivala 28 % i 7 % zbog kraće izloženosti. [18]

Prema biodegradacijskim testovima (RTB) utvrđeno je da se uz pomoć aktivnog mulja metformin može biotransformirati u svoj metabolit gvanil-ureju (GUA), na što upućuju promjene koncentracija metformina i detekcije oba spoja uz pomoć instrumentalnih analitičkih tehnika. [30] Potvrda korelacije između razgradnje metformina i nastanka gvanil-ureje je činjenica da kad god bi se primijetila razgradnja metformina (pad koncentracije), također bi se dogodila detekcija gvanil-ureje. [22]

Udio biotransformiranog metformina se izražava u postotcima na način da se koncentracija metformina u nekom trenutku podijeli s vrijednosti njegove početne koncentracije. Postotak nastale gvanil-ureje se odnosi na to koliko je gvanil-ureje u stvarnosti nastalo u odnosu na to koliko je stehiometrijski moglo nastati razgradnjom metformina. Procesi razgradnje metformina i nastanka gvanil-ureje u korelaciji su te ovise o vremenu provođenja biorazgradnje i o vremenu prethodne izloženosti mikroorganizama iz aktivnog mulja organskom ksenobiotiku. Također je utvrđeno da je gvanil-ureja glavni biotransformacijski produkt metformina jer je maksimalna učinkovitost pretvorbe metformina u gvanil-ureju iznosila oko 80 %. [22]

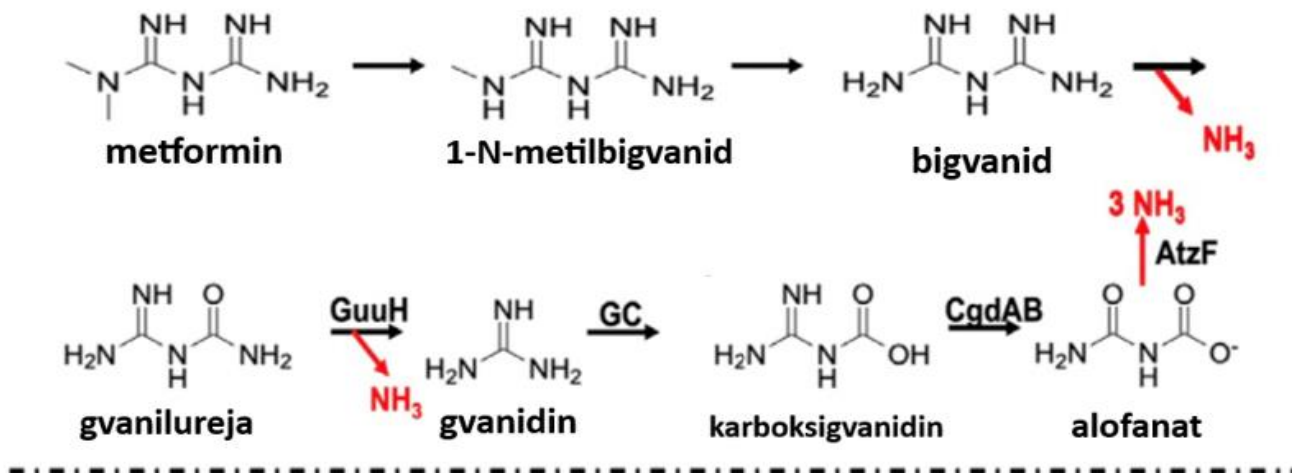
Kako se radilo o aktivnom mulju koji je mješavina raznih vrsta mikroorganizama, provedene su izolacija i identifikacija bakterijske vrste koja je zaslužna za razgradnju metformina. Bakterija je izolirana iz kemostata koji je prethodno bio izložen metforminu te je ispitan (sekvencioniran) gen za 16S rRNK. Usporedbom s bazom podataka GenBank s 98 %-tnom podudarnosti utvrđeno je da se radi o bakteriji *Aminobacter anthyllidis*, koja se nerijetko koristi za biorazgradnju mnogih drugih organskih ksenobiotika. Uz navedenu bakteriju u aktivnom mulju prisutne su i bakterije roda *Acinetobacter*, *Pelomonas* i brojne druge. Praćenjem brojnosti vrsta bakterijske populacije iz aktivnog mulja nakon izlaganja metforminu u

kemostatu ustanovljeno je da metformin utječe na dinamiku mikrobiološke populacije te na prisutnost nekih bakterijskih vrsta. Dakle, populacija određenih bakterijskih vrsta je rasla, dok je kod drugih vrsta došlo do smanjenja ili potpunog nestajanja. Također je ustanovljeno da je biorazgradnja metformina bila brža u aerobnim uvjetima, a sporija u anaerobnim uvjetima dok je kod gvanil-ureje situacija obrnuta. [22] Istraživanja su pokazala da aktivni mulj predstavlja obećavajući sustav za biorazgradnju metformina iz otpadnih voda u gvanil-ureju, ali da do naknadne eliminacije gvanil-ureje u daljnje produkte biorazgradnje nije došlo. [18, 22] Također je dokazano da mikrobiološka raznolikost u aktivnom mulju ima veliki utjecaj na biorazgradnju metformina. Vrijeme izloženosti populacije mikroorganizama također ima utjecaj na dinamiku biorazgradnje metformina zato što izloženost metforminu utječe na raznolikost i brojnost bakterijskih vrsta u aktivnom mulju. Uzevši sve navedeno u obzir, moguće je pretpostaviti da se aktivni mulj može i treba koristiti kao ekološki prihvatljiv i povoljan način za biorazgradnju metformina u otpadnim vodama. [2,5]

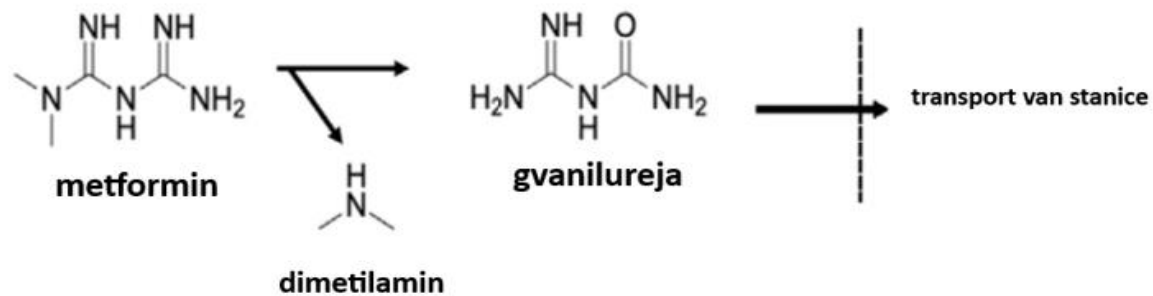
Još neke od bakterijskih vrsta za koje je poznato da razgrađuju metformin i njegove metabolite jesu *Pseudomonas mendocina* i *Aminobacter* sp. Njihovi se metabolički putevi za metformin razlikuju. U slučaju *Pseudomonas mendocina* metabolizam metformina se prvenstveno izvršava putem gvanil-ureje, tj. bakterija koristi enzime za demetilaciju metformina u gvanil-ureju te dalje na druge metabolite. [30] *Pseudomonas mendocina* koristi gvanil-ureju kao izvor dušika, što joj omogućava rast i razmnožavanje. Također ovaj bakterijski soj uz gvanil-ureju za rast i razvoj može koristiti i druge metabolite metformina poput metilbigvanida i bigvanid. Primijećeno je da se u anaerobnim uvjetima kao jedan od metabolita ovog procesa stvara dimetilamin, dok u slučaju aerobnih uvjeta to nije slučaj jer se on oksidira putem enzima monooksigenaze. [14]

S druge strane metabolizam metformina se kod bakterijskog soja *Aminobacter* sp. razlikuje u odnosu na isti kod bakterijskog soja *Pseudomonas mendocina* (slika 3.6.). Kada je metformin jedini izvor dušika, *Aminobacter* sp. ga razgrađuje uz proizvodnju gvanil-ureje i dimetilamina kao nusprodukata. Dimetilamin se i u ovom slučaju kao metabolit može detektirati u anaerobnim uvjetima jer izostaje oksidacija monooksigenazom. Glavna razlika između navedena dva bakterijska soja je u njihovom načinu djelovanja, intermedijarnim produktima i korištenju različitih enzimatskih puteva za razgradnju metformina. [30]

A *Pseudomonas mendocina* MET



B *Aminobacter* sp. MET



Slika 3.6. Sheme metaboličkih puteva razgradnje metformina od strane bakterija *Pseudomonas mendocina* i *Aminobacter* sp. [30]

3.2.2. Biorazgradnja paracetamola

Sve češća i izraženija pojava paracetamola u vodenom okolišu i vodi za piće izaziva zabrinutost zbog mogućih učinaka na okoliš i ljudsko zdravlje. Stoga se intenzivno radi na razvijanju tehnologije njegova uklanjanja iz otpadnih voda, što uključuje i postupak biorazgradnje. [15]

Paracetamol se u otpadnim vodama najčešće tretira uz pomoć kemijskih oksidacijskih procesa poput elektrokemijskih procesa, ozonizacije, tretiranja vodikovim peroksidom uz UV zračenje i brojnim drugim postupcima, ali se zbog visokih troškova i pojave sekundarnih onečišćujućih tvari nastoje razviti nove tehnologije tretiranja paracetamola u otpadnim vodama poput biorazgradnje. Prednosti postupka biorazgradnje paracetamola u otpadnim vodama u odnosu na već spomenute postupke su brojne, a neke od značajnijih su ekonomska isplativost, ekološka prihvatljivost te dobivanje konačnih netoksičnih produkata. [4, 8]

Poznato je da brojni organizmi imaju sposobnost metaboličkim putevima razgraditi paracetamol. [28] Upravo je za uklanjanje organskog ksenobiotika jedan od glavnih procesa biorazgradnja. Brojni mikroorganizmi su uspostavili učinkovite strategije koje uključuju specijalizirane enzimske sustave i metaboličke putove za pristup paracetamolu kao izvoru ugljika i energije. Na taj način su mikroorganizmi sposobni razgraditi paracetamol i pretvoriti ga u lako metabolizirajuće supstrate, odnosno omogućuju njegovo uklanjanje iz otpadnih voda. [1,14]

Poznato je da uz bakterije, brojne vrste gljiva iz roda *Penicillium* imaju sposobnost biorazgradnje paracetamola na način da ga koriste kao izvor dušika. Također, kako bakterijske vrste poput *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacia* i *Pseudomonas acidovorans* mogu rasti na solima derivata paracetamola (soli acetamida ili fenilacetamida) i koristiti ih kao izvore dušika i ugljika, pretpostavlja se da mogu biti korisne u procesima biorazgradnje. [28] Bakterije iz roda *Pseudomonas* inače se često koriste u obradi organskih onečišćenja zbog sposobnosti iskorištavanja aromatskih spojeva kao izvore ugljika i energije. Postoje brojne vrste koje se mogu koristiti u biorazgradnji paracetamola, no učinkovitost biorazgradnje i optimalni uvjeti u kojima je moguće koristiti određene vrste za biorazgradnju variraju. Isto tako, poznato je da se mikroorganizmi mogu kombinirano koristiti za postizanje potpune biorazgradnje paracetamola. [28,32]

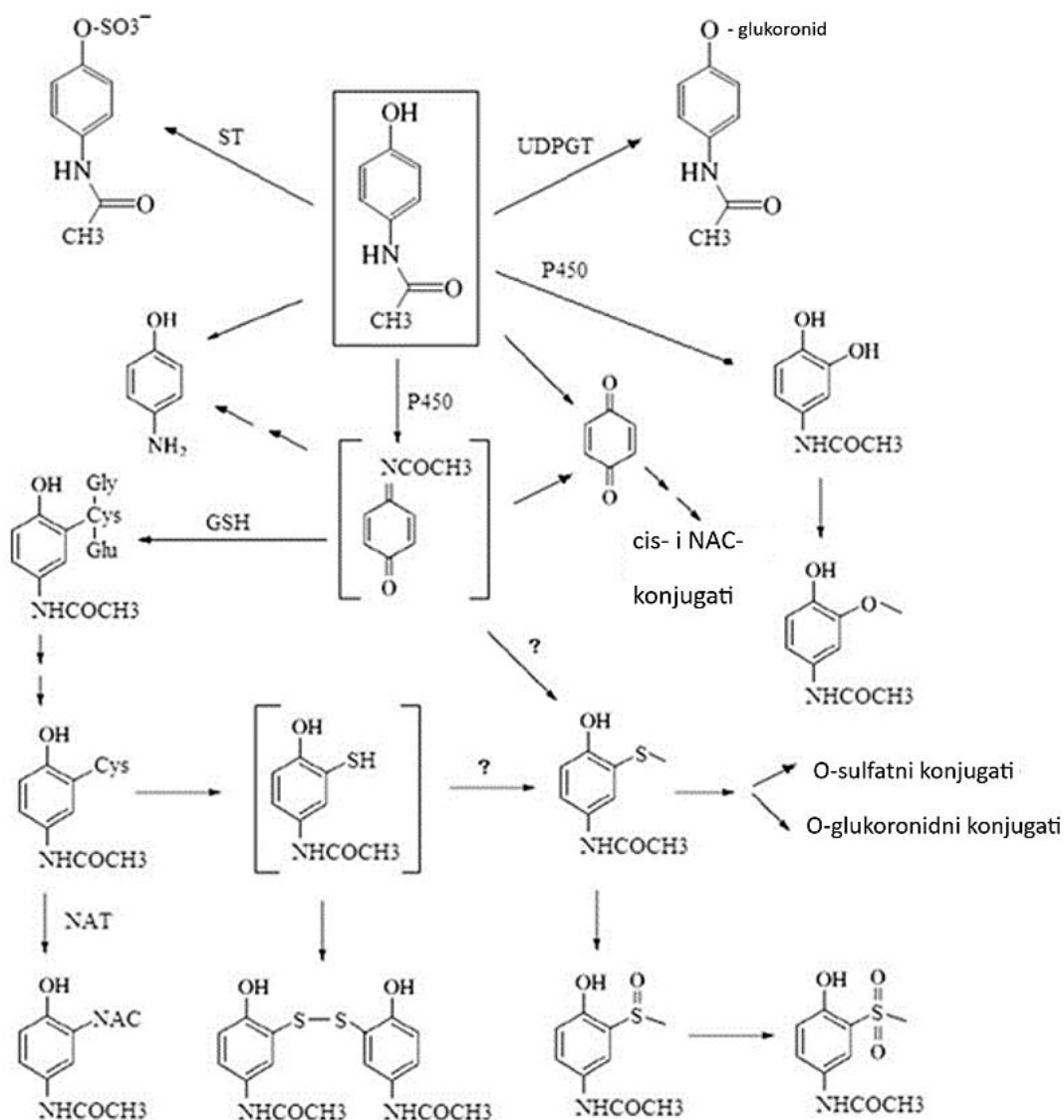
Prilikom biorazgradnje paracetamola odvijaju se spontani abiotički procesi njegove oksidacije i hlapljenja. Općenito, aromatski amini su skloni autooksidaciji uslijed izloženosti svjetlosnom zračenju i toplini. Ipak, hlapljenje i autooksidacija su od manjeg značaja za uklanjanje paracetamola s obzirom na to da se tek oko 1 % ukupne količine tvari uklanja tim procesima što čini biorazgradnju najznačajnijim procesom. [28]

Prije analize procesa biorazgradnje paracetamola potrebno je identificirati i karakterizirati njegove metabolite koji su često prisutni u okolišu te koji u kontaktu s bakterijama nerijetko bivaju inicijalne tvari u kataboličkim procesima. Proučavanje metaboličkih procesa kojima podliježe paracetamol i njegovi derivati najčešće se provode na raznim laboratorijskim životinjama. Važno je poznavati strukture i svojstva metabolita koji nastaju uslijed interakcije paracetamola i organizama jer navedeni metaboliti također imaju ekološki značaj kao i paracetamol koji je djelotvorna tvar. [25] Neki od najznačajnijih derivata paracetamola koji su prisutni u metaboličkim procesima su hidrokinon, malonska kiselina, 4-aminofenol, oksalna kiselina i dr. Kod životinja se paracetamol metabolizira prvenstveno u jetri u netoksične proizvode putem tri metabolička puta: [28,26]

1. glukuronidacija - čini 40 % do dvije trećine metabolizma paracetamola
2. sulfatacija (konjugacija sulfata) - iznosi 20 – 40 % metabolizma paracetamola
3. N-hidroksilacija i preraspodjela te konjugacija GSH-a – manje od 15 %

Na slici 3.7. je shematski prikaz metaboličkih puteva paracetamola u čovjeku. Svi od navedenih metabolita su detektirani u urinu te su samim time u različitoj mjeri prisutni u otpadnim vodama, tj. potencijalni su kandidati za biorazgradnju. Metabolizam paracetamola kod mikroorganizama uključuje različite metaboličke puteve. Najčešći put u biorazgradnji paracetamola je putem 4-aminofenola do hidrokinona, tj. hidrokinonski put. U hidrokinonskom putu se paracetamol konvertira u 1,4-benzendiol ili hidrokinon. Proces metabolizma paracetamola je u ovom slučaju inicijalno kataliziran amidohidrolazom uz oslobađanje acetatne skupine, čime nastaje 4-aminofenol. Nakon toga se amino skupina zamjenjuje hidroksilnom, pri čemu se formira hidrokinon. U konačnici dolazi do raspada aromatskog prstena. Uočeno je da je hidrokinonski put glavni put mikrobiološke razgradnje paracetamola jer su 4-aminofenol i hidrokinon identificirani kao glavni metabolički međuprodukti. Nakon formiranja hidrokinona, nastaju brojne karboksilne kiseline i dušični spojevi, pa je

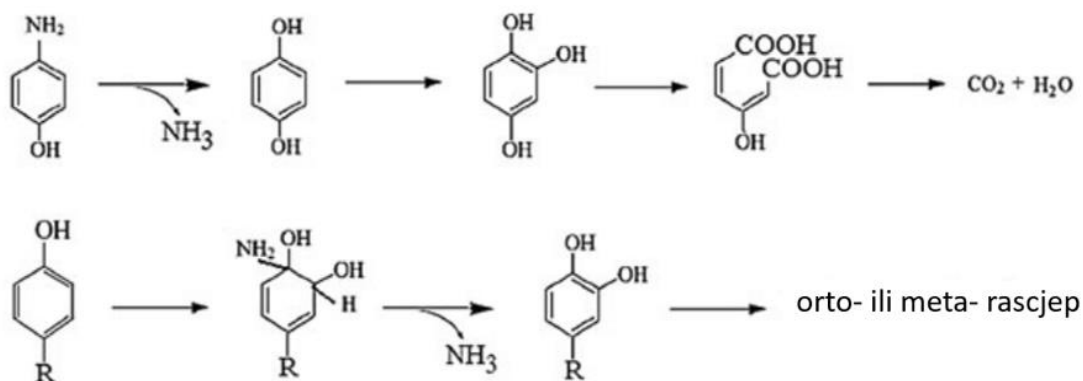
primijećen rast koncentracija istih, dok se koncentracije hidrokinona u sustavima smanjuju. [28, 24]



Slika 3.7. Metabolički putevi razgradnje paracetamola kod čovjeka. [28]

Drugi metabolički put paracetamola uključuje hidroksilaciju paracetamola koja je katalizirana hidrolitičkim enzimom. Uslijed hidroksilacije nastaje hidrokinon uz oslobađanje acetamida, a acetamid se naknadno može pretvoriti u oksaminsku kiselinu. Također je moguće da se paracetamol metabolizira putem pirokateholskog puta. U pirokateholskom putu se paracetamol prvo oksidira od strane hidroksilaze i formira se *N*-(4-hidroksifenil)acetamid kao prvi metabolit. Zatim se acilna skupina zamjenjuje s protonom i to rezultira nastajanjem *p*-aminofenola. *N*-(4-

hidroksifenil)acetamid se također oksidira pri čemu nastaju hidrokinon i 1,4-benzokinon, koji sudjeluju u ciklusu limunske kiseline. [28, 24]



Slika 3.8. Metabolički putevi za biorazgradnju 4-aminofenola anilina i anilinskih derivata. [28]

Iz prikazane gornje reakcije (slika 3.8.) baterijski soj *Burkholderia sp.* AK-5 može pretvoriti 4-aminofenol, jedan od glavnih metabolita paracetamola, u CO₂ i H₂O. Prvo se 4-aminofenol hidroksilacijom konvertira u 1,4-benzendiol, a potom i u 1,2,4-trihidroksibenzen. 1,2,4-trihidroksibenzen se oksidira u maleiloktenu kiselinu, uz katalitičko djelovanje enzima 1,2-dioksidogeneze. U donjoj reakciji poznato je da je inicijalna reakcija raspada anilina katalizirana od strane enzima dioksidogeneze i daje 1-amino-2-hidrodiol kao metabolite. Nakon toga se iz 1-amino-2-hidrodiola dobivaju derivati katehola, koji nadalje podliježu reakcijama *orto*- i *meta*- razgradnje. [28]

3.2.3. Biorazgradnja diklofenaka

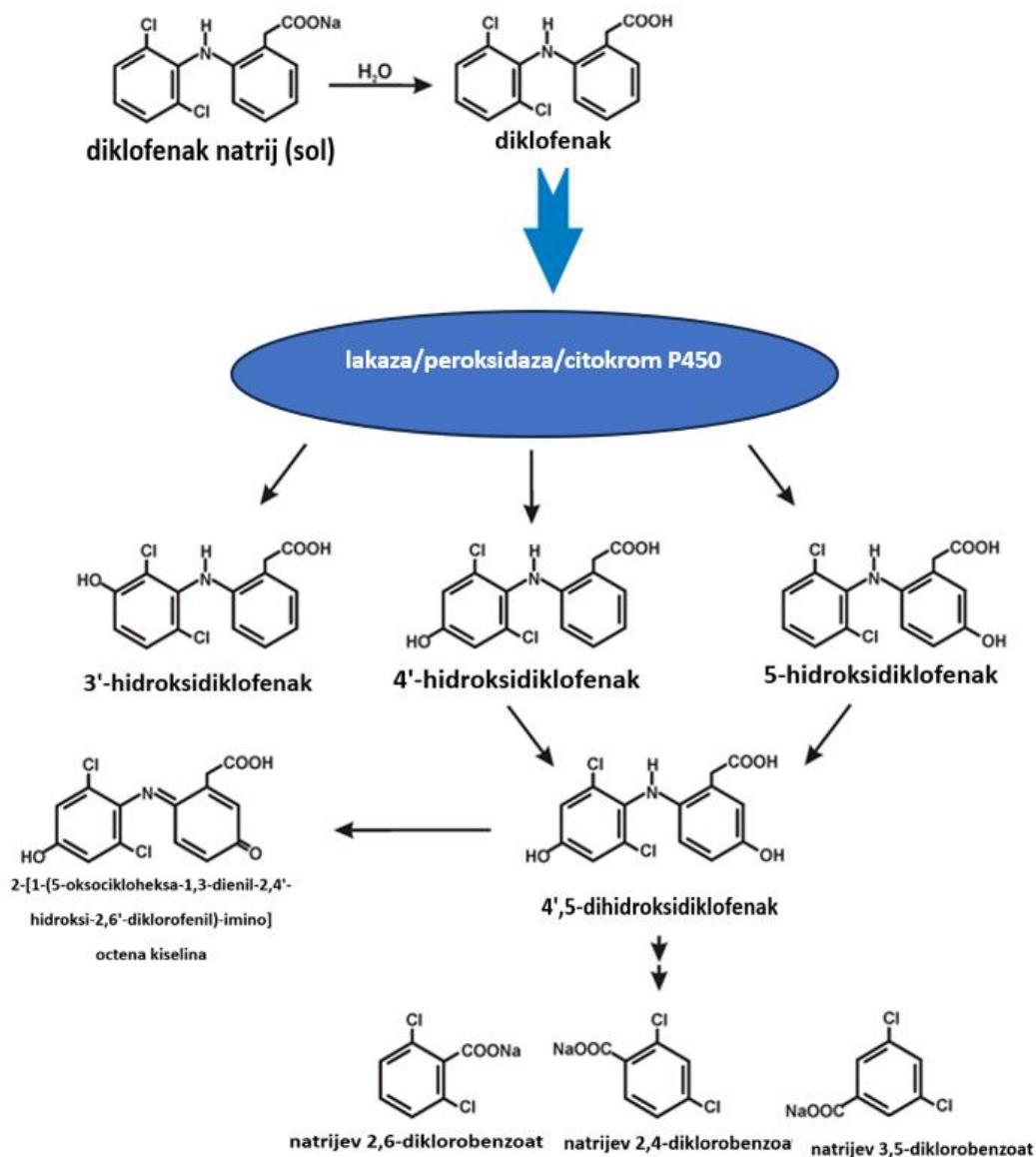
Kao što je već prethodno spomenuto, diklofenak je jedan od najčešće korištenih nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIL), koji djeluje kao inhibitor cikloooksigenaze odgovorne za sintezu prostaglandina. Nakon oralne primjene, diklofenak se brzo i potpuno apsorbira u crijevima, nakon čega se u jetri pretvara u svoje derivate. [15,16] Poznato je da bubrezi izlučuju 65 % oksidiranih metabolita diklofenaka, dok se ostali metaboliti poput acil-glukoronida izlučuju putem žuči. Navedeni metabolički putevi i putevi ekskrecije diklofenaka predstavljaju njegov glavni put kojim dolazi u kanalizacijske otpadne vode. [20]

Biorazgradnja diklofenaka u raznim oblicima njegovih soli najčešće se provodi uz pomoć bakterija i gljiva, jer iako konvencionalni fizikalno-kemijski postupci za njegovo uklanjanje imaju učinkovitost i do 80 %, ipak imaju ograničenja u odnosu na ekonomičnost i uspješnosti uklanjanja diklofenaka i njegovih derivata pretvorbom u netoksične produkte. Biorazgradnja se ispostavila kao izrazito ekonomično, praktično i ekološki prihvatljivo rješenje, a često se provodi na način da se kolonije mikroorganizama fiksira na čvrste nosače ili matrice. [19,20]

Procesi biorazgradnje diklofenaka najčešće uključuju transformaciju diklofenaka od strane raznih vrsta gljiva uz pomoć enzima lakaze, mangan-peroksidaze i enzimima u sastavu citokroma P450, koji su hemoproteinske strukture koje na sebi imaju vezane enzime za razgradnju ksenobiotika. Derivati diklofenaka koji se u tim procesima pojavljuju su hidroksilirani derivati poput 4'-hidroksidiklofenaka, 5-hidroksidiklofenaka, 3'-hidroksidiklofenaka i 4',5'-dihidroksidiklofenaka. Nadalje, neke od gljiva za koje je dokazano da biorazgrađuju diklofenak su: *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Mucor circinelloides*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Rhizopus microsporus* i brojne druge. Među bakterijskim sojevima koji imaju sposobnost metaboličke razgradnje diklofenaka su *Raoultella* sp. DD4, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Rhodococcus ruber*, *Labrys portucalensis* F11, *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Pseudomonas moorei* KB4, *Klebsiella* sp. KSC i *Proteus mirabilis*. [19]

Jedan od najpoznatijih i najprimjenjivanijih načina biorazgradnje diklofenaka jest njegova razgradnja uz pomoć ligninolitičkih vrsta gljiva (slika 3.9.) poput *Trachydora polyzona*, *Mucor circinelloides* i *Trichoderma longibrachiatum*. Ligninolitičke vrste gljiva su karakteristične po tome što se nerijetko nalaze na kori drveća, što im omogućuje razgradnja lignina (biljnog polimera iz kore drveta). Takve vrste gljiva razgrađuju diklofenak na način da dolazi do nastanka intermedijarnih spojeva poput 2,6-diklorbenzojeve kiseline, 3,5-diklorbenzojeve kiseline i 2,4-diklorbenzojeve kiseline. Pojava navedenih karboksilnih kiselina u svojstvu intermedijera u postupku biorazgradnje diklofenaka utvrđuje da prvenstveno dolazi do heterolitičkog cijepanja ugljik-dušik veze u strukturi spoja. Također, nakon 10 dana inkubacije ustanovljeno je da u sustavu više nisu prisutni hidroksilirani derivati diklofenaka, a pojavili su se spojevi poput natrijevih soli 2,6-diklorbenzoata, 2,4-

diklorbenzoata te 3,5-diklorbenzoata uslijed cijepanja policikličke strukture intermedijera. [33]



Slika 3.9. Metabolički put razgradnje diklofenaka od strane gljiva [19]

Razgradnja diklofenaka uz pomoć bakterija nešto je kompleksnija u odnosu na gljive, no derivati poput hidroksiliranih derivata diklofenaka (npr. 5-hidroksidiklofenak) prisutni su u oba slučaja. Neki od najpoznatijih sojeva bakterija koje dokazano mogu razgraditi diklofenak su *Raoultella* sp. DD4 i *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Raoultella* sp. DD4 bakterijski soj pokazao se izrazito korisnim prilikom postizanja razgradnje manjih koncentracija diklofenaka (oko 0,6 mg/L), dok

je soj *Rhodococcus ruber* IEGM 346 izrazito sposoban za razgradnju visokih koncentracija diklofenaka (50 mg/L). [19,33]

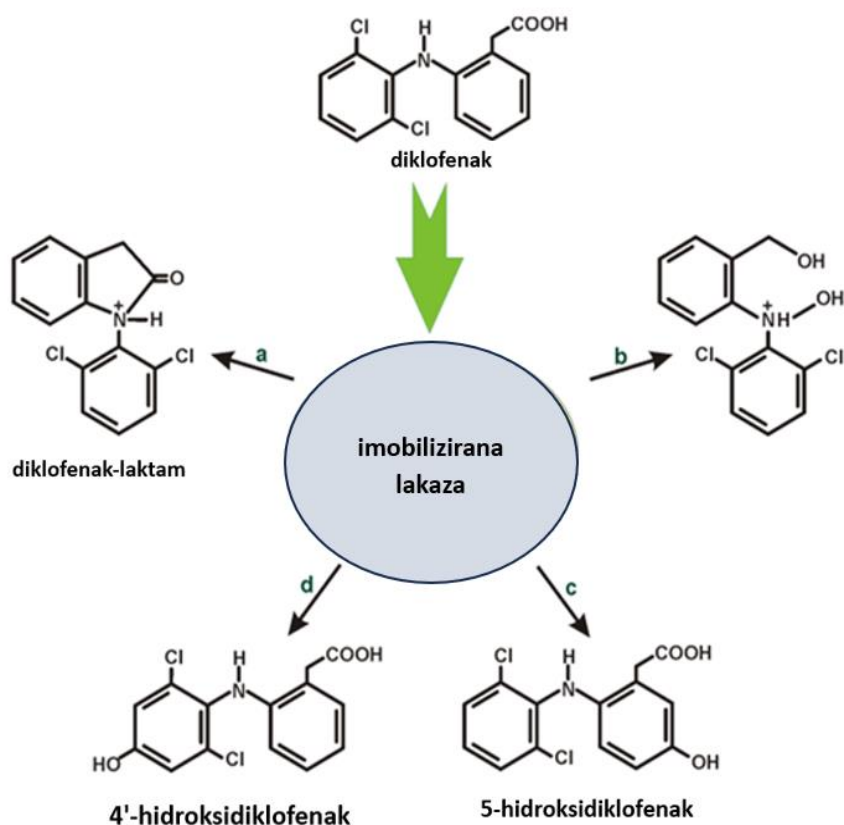
U bakterijskom metabolizmu diklofenaka prisutno je heterolitičko cijepanje ugljik-dušik veze uz naknadno otvaranje aromatskog prstena. Metabolizam diklofenaka pomoću soja *Rhodococcus ruber* IEGM 346 uključuje 16 intermedijernih kemijskih spojeva i derivata diklofenaka koji sudjeluju u nizu oksidacijskih reakcija u kojima se oksidiraju do homogentizinske kiseline. Kao produkti daljnje oksidacije homogentizinske kiseline preko kinonskih derivata nastaju fumarna kiselina, acetooctena kiselina te 4,6,7-trioksookt-2-en-dionska kiselina. Dakle, njihova detekcija je indikacija za uspješnu metaboličku razgradnju diklofenaka od strane *Rhodococcus ruber* IEGM 346 bakterijskog soja. [19]

Bakterijski soj koji je sposoban za potpunu razgradnju diklofenaka je *Labrys portucalensis* F11. Temeljni metabolit u biorazgradnji diklofenaka ovim sojem je benzokinonimin koji nastaje uslijed reakcije hidroksilacije. Nakon nastanka derivata hidrokinona nastupaju daljnje reakcije dekarboksilacije i hidroksilacije do konačnog netoksičnog produkta. Uslijed izostanka detekcije derivata diklofenaka nakon izvjesnog perioda razgradnje, može se pretpostaviti da je biorazgradnja diklofenaka sojem *Labrys portucalensis* F11 potpuna. Opisani metabolički put također ima određene sličnosti s procesom detoksikacije diklofenaka u sisavcima. [19]

Pseudomonas moorei KB4 je sposoban u monosupstratnoj kulturi razgraditi diklofenak u koncentracijama od 0,5 mg/L, dok uz dodatak natrijevog acetata i glukoze sposoban je za razgradnju koncentracije diklofenaka 1 mg/L u periodu od 12 dana. Tijekom razgradnje su detektirani već poznati metaboliti poput 4'-hidroksidiklofenaka i diklofenak-laktama. Bakterijski soj *Klesbiella* sp. KSC poznat je po tome što dobro razgrađuje izrazito visoke koncentracije diklofenaka (npr. 70 mg/L) u periodu od 72 sata. Prilikom razgradnje diklofenaka ovim bakterijskim sojem detektirano je 12 biotransformacijskih produkata iz skupina alkohola, ketona te mono- i polihidroksiliranih derivata diklofenaka koji su nastali uslijed brojnih reakcija dehidroksilacije, hidroksilacije, dekarboksilacije i deklorinacije. Biorazgradnja diklofenaka ovim bakterijskim sojevima je u svojoj suštini korisna i povoljna za okoliš jer u svim navedenim slučajevima kao krajnji produkti nastaju derivati diklofenaka koji su manje toksičnosti od samog diklofenaka. [19,33]

Biorazgradnja diklofenaka izvediva je i pomoću imobiliziranih sustava. Navedena metoda predstavlja obećavajući pristup u nastojanju da se razvije ekološki

prihvatljiva i ekonomski isplativa tehnologija obrade otpadnih voda. U procesima biorazgradnje koriste se imobilizirani mikroorganizmi i enzimi za biorazgradnju diklofenaka. Biomasa mikroorganizama se može imobilizirati samostalno prema prirodnoj tendenciji da oformi određene makrostrukture te uz pomoć prijanjanja stanica na čvrstu podlogu uz korištenje adheziva. [34] Jedan od primjera uporabe imobiliziranih mikroorganizama u procesu razgradnje diklofenaka je proces koji koristi biofilter s imobiliziranim mikroorganizmima aktivnog mulja. Nakon vremena prilagodbe koje je trajalo 2 mjeseca postignuta je i više nego zadovoljavajuća učinkovitost procesa od 97,63 %. Neke od imobiliziranih vrsta u biofiltru su: *Granulicella pectinivorans*, *Rhodanobacter terrae*, *Castellaniella denitrificans*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Bordetella petrii*, *Bryocella elongata* i *Rhodopseudomonas palustris*. [19]



Slika 3.10. Biorazgradnja diklofenaka uz lakazu u imobiliziranom sustavu [19]

Prednosti korištenja imobiliziranog sustava vidljive su u slučaju katalize oksidacije diklofenaka uz pomoć imobiliziranog enzima lakaze. Prilikom provođenja

ispitivanja učinkovitosti ustanovljeno je da ona iznosi 90 % u optimalnim uvjetima, a imobilizirani enzim je bio aktivan i narednim ciklusima provođenja ovog procesa. Na slici 3.10. vidljivo je da je imobilizirana lakaza katalizirala niz kemijskih reakcija kojima je diklofenak podvrgnut poput dekarboksilacije i dehidrogenacije čime se diklofenak pretvara u manje toksične tvari poput hidroksilnih derivata diklofenaka i diklofenak-laktama. [19]

Imobilizacijski sustavi povoljno utječu na učinkovitost procesa biorazgradnje diklofenaka iz otpadnih voda. Jedan od povoljnih učinaka imobilizacije je stabilnost i zaštita mikroorganizama ili enzima koje pruža što omogućuje da mikroorganizmi i enzimi ostanu aktivni tijekom duljeg vremenskog perioda, a to pak rezultira stabilnom i kontinuiranom biorazgradnjom diklofenaka. Također nije rijedak slučaj da imobilizacija mikroorganizama i enzima poveća njihovu aktivnost te se povećava i učinkovitost procesa biorazgradnje. [33] Imobilizacija isto tako omogućuje ponovno korištenje mikroorganizama ili enzima bez gubitka njihove aktivnosti, poboljšanu interakciju između različitih vrsta mikroorganizama te lakše kontroliranje okoliša u kojem mikroorganizmi ili enzimi djeluju. [19,34]

4. ZAKLJUČAK

Na temelju saznanja o uklanjanju organskih tvari iz otpadnih voda biorazgradnjom može se zaključiti:

1. Organski ksenobiotici poput naftnih derivata, sintetskih polimera i farmaceutika svojim nepredvidivim toksičnim djelovanjem predstavljaju ozbiljnu prijetnju za ekosustav.
2. Sve veća prisutnost raznih organskih ksenobiotika i njihovih derivata u vodama, tlu i sedimentu predstavlja globalnu prijetnju ljudskom zdravlju zbog potencijalnog interferiranja s vitalnim fiziološkim procesima uslijed akutne i kronične izloženosti istima.
3. Farmaceutici su jedni od najznačajnijih i najprisutnijih organskih ksenobiotika u ekosustavima čije je toksično djelovanje na organizme za koje nisu namijenjeni često nepredvidivo i izrazito opasno. Farmaceutici nerijetko djeluju na neciljane organizme kao endokrini disruptori i genotoksične tvari. Lijekovi koji završe u vodenom okolišu mogu potaknuti razvoj rezistencije kod patogenih mikroorganizama poput bakterija i gljivica.
4. Učinkovitost procesa biorazgradnje uvelike ovisi o vrsti mikroorganizama koji se koriste, stoga su istraživanja koja se provode od velike važnosti za daljnji razvoj tehnologije biološke obrade otpadnih voda. Biorazgradnja organskih tvari u otpadnim vodama predstavlja ekološki prihvatljiviju, učinkovitu te ekonomski isplativiju alternativu u odnosu na druge vrste procesa obrade otpadnih voda.
5. Razvoj tehnologije biološke obrade otpadnih voda jedan je od preduvjeta za osiguranje zdravstvene ispravnosti pitke vode te osiguravanju javnog zdravlja. Također predstavlja jedan od važnih čimbenika u nastojanjima da se očuva okoliš.
6. U razvoju tehnologije biološke obrade otpadnih voda s ciljem očuvanja okoliša potrebna je suradnja industrije, znanosti i institucija. U pristupanju rješavanja kompleksnog problema prisutnosti organskih ksenobiotika u otpadnim vodama važno je poštivati propise i procjene rizika.

5. LITERATURA

- [1] D. Povrenović, M. Knežević, Osnove tehnologije prečišćavanja otpadnih voda, Tehnološko-metarulški fakultet, Beograd, 2013., str. 5.-148.
- [2] G. Tchobanoglous, H. D. Stensel, R. Tsuchihashi, F. Burton, M. Abu-Orf, G. Bowden, W. Pfrang, Wastewater engineering treatment and resource recovery, McGraw Hill, London, 2014., str. 9.-15., 555.-570, 664.-667., 1492.-1493.
- [3] V. Trkulja, M. Šalković-Petrišić, M. Klarica, Temeljna i klinička farmakologija, Medicinska naklada, Zagreb, 2020., str. 3.-6., 643.-659., 761.-763.
- [4] M. Henze, M. C. M. van Loosdrecht, G. A. Ekama, D. Brdjanović, Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design, IWA Publishing, London, 2008., str. 15.-18., 53.-89., 341.
- [5] D. Fatta-Kassinos, K. Bester, K. Kümmerer, Xenobiotics in the Urban Water Cycle, Springer, New York, 2010., str. 307.-339.
- [6] C. Baird, M. Cann, Environmental chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 2012., str. 478. – 498.
- [7] S. E. Manahan, Environmental chemistry, CRC Press, London, 2010., str. 140.-147.
- [8] T. D. Reynolds, P. A. Richards, Unit operations and processes in environmental engineering, PWS Publishing Company, Boston, 1996., str. 128.-134.
- [9] Š. Cerjan-Stefanović, Osnove analitičke kemije, Tehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 1983., str. 98.-106.
- [10] P. Atkins, J. de Paula, J. Keeler, Physical chemistry, Oxford University press, Oxford, 2018., str. 623. – 628.; 832.-834.
- [11] J. C. Crittenden, R. R. Trussell, D. W. Hand, K. J. Howe, G. Tchobanoglous, J. H. Borchardt, MWH's Water treatment principles and design, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2012., str. 541.- 547.
- [12] J. Korta, J. Dvořák, L. Kavan, Principles of electrochemistry, John Wiley & Sons Inc., Chichester, 1993., str. 133.-135.
- [13] G. D. Christian, Analytical chemistry, John Wiley & Sons Inc., Washington, 2004., str. 325.-332.
- [14] G. Bitton, Wastewater microbiology, John Wiley & Sons, Gainesville, 2011., str. 68.-72., 361., 420.-422.
- [15] K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environment sources, fate, effects and risks, Springer, Berlin, 2008., str. 175.-180.
- [16] I. Francetić, D. Macan, Ž. Krznarić, I. Pavlić-Renar, K. Makar-Aušperger, I. Barić, B. Anić, V. Ivančan, Z. Giljević, M. Bilušić, A. Lovrenčić-Huzjan, M. Herceg, Farmakoterapijski priručnik, Medicinska naklada, Zagreb, 2015., str. 119.-120., 565.-566., 620.-621.
- [17] T. L. Lemke, D. A. Williams, V. F. Roche, S. W. Zito, Principles of medicinal chemistry, Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, Baltimore, 2013., str. 999.-1010.

- [18] E. P. Ambrosio-Albuquerque, L. F. Cusioli, R. Bergamasco, A. A. Sinopolis Gigliolli, L. Lupepsa, B. Ribeiro Paupitz, P. A. Barbieri, L. A. Borin-Carvalho, A. L. de B. Portela-Castro, Metformin environmental exposure: A systematic review, *Environmental toxicology and pharmacology* 83 (2021.), 103588.
- [19] D. Wojcieszynska, K. Łagoda, U. Guzik, Diclofenac biodegradation by microorganisms and with immobilised systems - A review, *Catalysts* 13 (2023.), 412.
- [20] P. Sathishkumar, R. A. A. Meena, T. Palanisami, V. Ashokkumar, T. Palvannan, F. L. Gu, Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota - a review, *Science of the total environment* 698 (2020.), 134057.
- [21] M. Scheurell , S. Franke , R.M. Shah, H. Hühnerfuss, Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan, *Chemosphere* 77 (2009.), 870.-876.
- [22] B. A.J. Poursata, R. J.M. van Spanning, M. Brasterb, R. Helmus, P. de Voogta, J. R. Parsons, Biodegradation of metformin and its transformation product, guanylurea, by natural and exposed microbial communities, *Ecotoxicology and environmental Safety* 182 (2019), 109414.
- [23] R. R. Amador, J. P. F.Longo, Z. G. Lacava, J. G. Dórea, M. de F. M. A. Santos, Metformin (dimethyl-biguanide) induced DNA damage in mammalian cells, *Genetics and molecular biology* 35 (2012.), 153.-158.
- [24] H. N. Phong Vo, G. K. Le, T. M. H. Nguyen, X.-T. Bui, K. H. Nguyen, E. R. Rene, T. D. Hien Vo, N.-D. Thanh Cao, R. Mohan, Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments, *Chemosphere* 236 (2019), 124391.
- [25] J. L. Tambosi, R. F. de Sena, M. Favier, W. Gebhardt, H. J. José, H. F. Schröder, R. de F. P. Muniz Moreira, Removal of pharmaceutical compounds in membrane bioreactors (MBR) applying submerged membranes, *Desalination* 261 (2010.), 148.-156.
- [26] U. Rannug, J.A. Holme, J.K. Hongslo, R. Sram, An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol, *Mutation research* 327 (1995), 179.-200.
- [27] A.G. Al-Kaf1, K. M. Najji, Q. Y. M. Abdullah, W. H. A. Edrees, Occurrence of paracetamol in aquatic environments and transformation by microorganisms: A review, *Chronicles of pharmaceutical science* 6 (2017.), 341.-355.
- [28] S. Wu, L. Zhang, J. Chen, Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms, *Applied microbiology and biotechnology* 96 (2012.), 875.–884.
- [29] J. Holme, E.J. Soderlund, Species differences in cytotoxic and genotoxic effects of phenacetin and paracetamol in primary monolayer cultures of hepatocytes, *Mutation research* 164 (1986.), 167.-175.
- [30] B. M. Martinez-Vaz , A. G. Dodge, Rachael M. Lucero, R. B. Stockbridge, A. A. Robinson, L. J. Tassoulas, L. P. Wackett, Wastewater bacteria remediating the pharmaceutical metformin: Genomes, plasmids and products, *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 10 (2022), 1086261.

- [31] T. Li, Z.-J. Xu, N.-Y. Zhou, Aerobic degradation of the antidiabetic drug metformin by *Aminobacter* sp. strain NyZ550, *Environmental science and technology* 57 (2023.), 1510.-1519.
- [32] B. D. Gusseme, L. Vanhaecke, W. Verstraete, N. Boon, Degradation of acetaminophen by *Delftia tsuruhatensis* and *Pseudomonas aeruginosa* in a membrane bioreactor, *Water research* 45 (2011.), 1829.-1837.
- [33] K. Stylianou, E. Hapeshi, M. I. Vasquez, D. Fatta-Kassinos, I. Vyrides, Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: Microbial intermediates and ecotoxicological assessment, *Journal of environmental chemical engineering* 6 (2018.), 3242.-3248.
- [34] M. Bilal, T. Rasheed, F. Nabeel, H.M.N. Iqbal, Y. Zhao, Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review, *Journal of environmental management* 234 (2019.), 253-264.

ŽIVOTOPIS

Josip Tutić [REDACTED]

[REDACTED] U Lipiku je započeo svoje obrazovanje, a Opću gimnaziju Daruvar upisuje 2015. godine. Nakon maturiranja 2019. zbog izrazitog interesa za prirodne znanosti upisuje preddiplomski studij Primijenjene kemije, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. U sklopu studija odradio je praksu na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe. Član je Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.