

# Procjena utjecaja eritromicina na bakteriju *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode

---

Miloloža, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:070655>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Martina Miloloža**

**PROCJENA UTJECAJA ERITROMICINA NA**  
**BAKTERIJSKU KULTURU *Pseudomonas putida* IZOLIRANU**  
**IZ FARMACEUTSKE OTPADNE VODE**

**DIPLOMSKI RAD**

**Voditelj rada: prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac**

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

**Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac**

**Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević**

**Dr. sc. Martina Sudar, znan. sur.**

**Zagreb, rujan 2018.**

*Od srca se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac na pruženim prilikama kojima sam unaprijedila svoje znanje i stekla nova korisna iskustva. Hvala Vam na sugestijama, ohrabrenjima, stručnim savjetima i velikoj podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala Moniki Šabić, mag. ing. oecoing., uz čiju sam asistenciju imala priliku izraditi ovaj rad i puno naučiti. Ovaj rad ne bi bio ovo što jest bez Vaše pomoći. Hvala na svim savjetima, usmjerenjima, strpljenju, razumijevanju, kao i prekovremenim satima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Svojim ste me primjerom uvijek iznova motivirali.*

*Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na ugodnoj radnoj atmosferi, a gospođi Marijani Vidaković zahvaljujem se na stručnoj pomoći tijekom rada u laboratoriju.*

*Također, zahvaljujem se profesorici dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević i dr. sc. Martini Sudar na prilici rada u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, te strpljenju i stručnim savjetima za taj dio rada.*

*Mojoj obitelji hvala na potpori tijekom cijelog školovanja.*

*Hvala dragome Bogu na svemu!*

## SAŽETAK

Demografski rast stanovništva, širenje urbanih sredina, razvoj industrije te ubrzani način života, pokretačke su sile za povećanu upotrebu i proizvodnju farmaceutika. Različiti su izvori njihova dospijevanja u okoliš, a uslijed abiotičkih i biotičkih djelovanja mogu promijeniti svoju prvotnu strukturu. Potrebno je pratiti koncentracije farmaceutika u okolišu te standardnim metodama određivati njihov utjecaj na izložene organizme. Makrolidni se antibiotici navode kao štetni po okoliš uslijed velike potrošnje i duljeg zadržavanja u okolišu. U svrhu uklanjanja farmaceutika iz okoliša, proučavaju se razni postupci, no sve zastupljenije postaje iskorištavanje enzimatske sposobnosti mikroorganizama za njihovo uklanjanje. U ovome je radu provedena procjena utjecaja makrolidnog antibiotika eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz otpadne farmaceutske vode. Testovi toksičnosti provedeni pomoću bakterije *Vibrio fischeri* svrstavaju eritromicin kao slabo toksičnu tvar uz mogući rizik po okoliš. Istraživan je potencijal biorazgradnje eritromicina bakterijskom kulturom *P. putida* s obzirom na rezultate testova osjetljivosti koji su pokazali otpornost kulture na raspon koncentracija eritromicina 0,2-2000 mg L<sup>-1</sup>. Nakon uzgoja stanica bakterijske kulture na *Tryptic Soy Broth*-u, praćena je aktivnost enzima esteraze u uvjetima bez i uz dodatak 0,2 mg L<sup>-1</sup> i 200 mg L<sup>-1</sup> eritromicina. Aktivnost enzima je rasla bez obzira na koncentraciju eritromicina, ali su pri 200 mg L<sup>-1</sup> uočene morfološke promjene stanica *P. putida*.

**Ključne riječi:** eritromicin, *Pseudomonas putida*, *Vibrio fischeri*, *Tryptic Soy Broth*, esteraza

## SUMMARY

Demographic growth of population, urbanization, industrialization and hectic lifestyle are driving forces for increasing utilization of pharmaceuticals and their production. There are different sources of their entry into the environment and due to abiotic and biotic activity their primary structures can be changed. It is necessary to control concentration of pharmaceuticals in the environment and determine their impact on exposed organisms by standard methods. Macrolide antibiotics are harmful for the environment due to their large consumption and longer environmental persistence. In order to remove pharmaceuticals from the environment, different processes are being researched with emphasis on enzymatic capability of microorganisms. In this study, assessment of the macrolide antibiotic erythromycin on bacterial culture *Pseudomonas putida* isolated from pharmaceutical wastewater was investigated. Bioassays conducted with bacteria *Vibrio fischeri* classified erythromycin as low toxic substance with possible risk for the environment. Biodegradation potential of erythromycin with bacterial culture *Pseudomonas putida* was investigated with susceptibility tests which indicated the resistance of bacteria at range of erythromycin concentration from 0.2 to 2000 mg L<sup>-1</sup>. After cultivation of bacterial culture on *Tryptic Soy Broth*, activity of enzyme esterase was determined in conditions without and with addition of 0.2 mg L<sup>-1</sup> and 200 mg L<sup>-1</sup> of erythromycin. Activity of enzyme increased regardless of erythromycin concentration, while morphological changes of *P. putida* were noticed at 200 mg L<sup>-1</sup> of erythromycin.

**Key words:** erythromycin, *Pseudomonas putida*, *Vibrio fischeri*, *Tryptic Soy Broth*, esterase

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. FARMACEUTICI U OKOLIŠU .....	3
2.1.1. Testovi toksičnosti.....	6
2.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika.....	9
2.1.3. Izvori farmaceutika u okolišu.....	10
2.2. ANTIBIOTICI .....	13
2.2.1. Makrolidni antibiotici .....	18
2.2.2. Eritromicin .....	20
2.2.3. Sudbina eritromicina u vodenom okolišu.....	23
2.3. BIOLOŠKA OBRADA OTPADNE VODE S AKTIVNIM MULJEM .....	25
2.3.1. Aktivni mulj .....	28
2.3.2. Utjecaj antibiotika na aktivni mulj .....	30
2.3.3. Utjecaj eritromicina na aktivni mulj .....	31
2.4. BAKTERIJSKA KULTURA <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> .....	32
2.4.1. Otpornost bakterijske kulture <i>P. putide</i> na makrolide .....	33
2.4.2. Enzimi .....	34
2.4.3. Podjela enzima .....	36
2.4.4. Aktivnost enzima .....	36
2.4.5. Enzim eritromicin esteraza .....	37
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	39
3.1. MATERIJALI.....	39
3.1.1. Makrolidni antibiotik – eritromicin.....	39
3.1.2. Farmaceutska otpadna voda.....	39
3.1.3. Priprema otopine eritromicina .....	39
3.1.4. Izolirana bakterijska kultura .....	39
3.1.5. Proces biorazgradnje.....	40
3.1.6. Fosfatni pufer za ispiranje stanica bakterijske kulture .....	40
3.1.7. Mjerni instrumenti i oprema .....	41
3.2. METODE RADA.....	41
3.2.1. Određivanje toksičnosti eritromicina pomoću <i>Vibrio fischeri</i> .....	41
3.2.2. Identifikacija bakterijske kulture <i>Pseudomonas putide</i> .....	42
3.2.3. Testovi osjetljivosti .....	42

3.2.4. Proces biorazgradnje s bakterijskom kulturom <i>P. putidom</i> .....	43
3.2.5. Krivulja rasta bakterijske kulture <i>P. putide</i> .....	44
3.2.6. Mikroskopska analiza .....	45
3.2.7. Uzgoj bakterijske kulture <i>P. putide</i> .....	46
3.2.8. Određivanje aktivnosti enzima esteraze .....	46
3.2.9. Obrada rezultata .....	47
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>49</b>
4.1. ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI ERITROMICINA POMOĆU <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	49
4.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE <i>PSEUDOMONAS PUTIDE</i> .....	50
4.3. TESTOVI OSJETLJIVOSTI .....	51
4.4. PROCES BIORAZGRADNJE ERITROMICINA BAKTERIJOM <i>P. PUTIDOM</i> .....	52
4.5. KRIVULJA RASTA BAKTERIJSKE KULTURE <i>P. PUTIDE</i> .....	52
4.6. MIKROSKOPSKA ANALIZA .....	55
4.7. AKTIVNOST ENZIMA ESTERAZE .....	62
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>63</b>
5.1. TESTOVI TOKSIČNOSTI .....	64
5.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE <i>PSEUDOMONAS PUTIDE</i> .....	66
5.3. TESTOVI OSJETLJIVOSTI .....	67
5.4. PROCES BIORAZGRADNJE ERITROMICINA BAKTERIJOM <i>P. PUTIDOM</i> .....	67
5.5. KRIVULJA RASTA BAKTERIJSKE KULTURE <i>P. PUTIDE</i> .....	68
5.6. MIKROSKOPSKA ANALIZA .....	72
5.7. AKTIVNOST ENZIMA ESTERAZE .....	74
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>76</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>77</b>

## 1. UVOD

Farmaceutici, sredstva za osobnu higijenu, kao i mnogi drugi sintetski proizvodi promijenili su današnji način života.<sup>1</sup> Porastom broja stanovnika, industrijalizacijom i urbanizacijom povećava se potreba za njihovim korištenjem. Iako pridonose modernom načinu života, odnosno visokoj kvaliteti života, porastom proizvodnje i povećane upotrebe farmaceutika dolazi do onečišćenja okoliša.<sup>2</sup> Dokumentiran je njihov pronalazak u površinskim, podzemnim, ali i pitkim vodama te sedimentu i tlu.<sup>3-6</sup> Iako koncentracije farmaceutika u okolišu<sup>3,7</sup> iznose nekoliko ng L<sup>-1</sup> ili µg L<sup>-1</sup>, uslijed njihovog kontinuiranog dospijevanja u okoliš, povećava se izloženost organizama u okolišu zbog čega može doći ozbiljnih posljedica po ljudsko zdravlje i okoliš.<sup>8,9</sup>

Saznanja o ekotoksikološkim i subletalnim utjecajima farmaceutika na organizme u tlu i u vodi još nisu do kraja istražena pa je nužno sagledavanje njihova utjecaja na organizme u okolišu.<sup>10</sup> Navedeno je zaključeno na temelju projekata koje je provela Europska komisija na temu farmaceutika u okolišu, no kao veliki problem prepoznato je onečišćenje i voda i tla farmaceuticima.<sup>11</sup> S obzirom na *Environmental Risk Assessment*, ERA, dva su gledišta za farmaceutske proizvode: rizik i štetnost. Prema rizičnosti, identificiraju se produkti i proučava se sudbina i utjecaji farmaceutika u okolišu prema OECD smjernicama. Naglasak na intrinzična svojstva farmaceutika promatra se s gledišta štetnosti, a ukazuje na njihova svojstva: otpornosti na razgradnju, potencijal bioakumulacije i toksičnosti. Stoga, farmaceutici ne bi trebali biti ispušteni u okoliš.<sup>11</sup>

Razni su izvori dospijevanja farmaceutika u okolišne sastavnice, a najčešće su to kompleksni sustavi, među koje se ubrajaju i otpadne vode iz farmaceutske industrije. Prema Pravilniku,<sup>12</sup> moraju se zadovoljiti propisane granične vrijednosti emisija otpadnih voda. Da bi se one postigle, upotrebljava se biološka obrada s obzirom na jednostavnost izvedbe, isplativost te učinkovitost.<sup>13,14</sup> Biorazgradnja se smatra kao najvažniji proces uklanjanja velikog broja ksenobiotika, uključujući i farmaceutike. Mikroorganizmi su važni razgrađivači organske tvari jer na taj način osiguravaju hranjive tvari za druge organizme u hranidbenom lancu. Stoga se navode kao vitalni za održavanje funkcionalnosti ekosustava.<sup>10</sup> Promjene u sastavu mikroorganizama povezane su s promjenama u ekosustavu, jer su esencijalni kako za



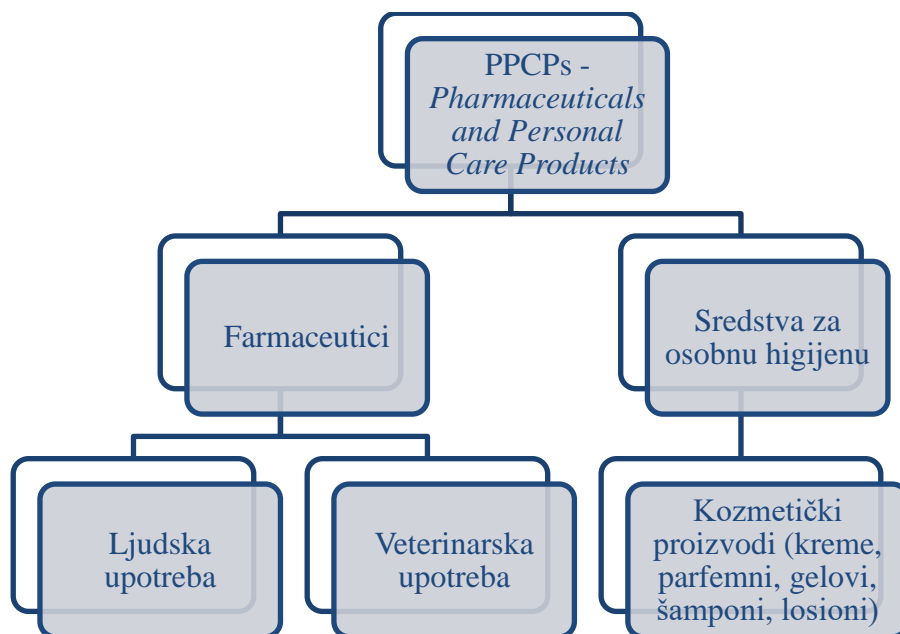
funkcioniranje, tako i za kvalitetno stanje prirodnog ekosustava. Okolišni mikroorganizmi su veliki izvor genetske raznolikosti i metaboličkih sposobnosti, a prisutnost farmaceutika u okolišu može utjecati na njihov sastav i aktivnost.<sup>10</sup> Sudbina farmaceutika u tlu ili vodi ovisi o brojnim čimbenicima, poput fizikalno-kemijskih svojstava, okolišnih čimbenika i klimatskih uvjeta te vrsti prisutnih mikroorganizama.<sup>15,16</sup> Mikroorganizami imaju sposobnost brze prilagodbe na novonastale uvjete te posjeduju brojne enzime pomoću kojih mogu ukloniti onečišćujuće tvari.

U ovom radu je ispitana toksičnost makrolidnog antibiotika eritromicina pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* te utjecaj istog antibiotika na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Farmaceutici u okolišu

U vodenim sustavima pronalaze se sredstva za higijenu koja se svakodnevno koriste, a u znanstvenoj literaturi farmaceutski i kozmetički proizvodi poput krema, parfema, gelova, šampona, losiona, zajedno su obilježeni kraticom PPCPs – *Pharmaceuticals and Personal Care Products* (slika 2.1.).<sup>1,3,17</sup> Posljednjih tridesetak godina zabrinutost znanstvenika izaziva sve češći pronalazak farmaceutika u okolišu.<sup>1,3</sup> Farmaceutici su tvari sa specifičnom biološkom aktivnošću koje se koriste u humane i u veterinarske svrhe za liječenje i prevenciju bolesti te poboljšanje zdravstvenog i fiziološkog stanja tijela.<sup>5,9,18</sup> Prema terapijskoj svrsi dijele se na analgetike, antibiotike, antiepileptike, antineoplastike, antidepresive, beta blokatore, komponente koje djeluju na endokrini sustav te na dodatke prehrani (vitamini, dijetni proizvodi).<sup>1,7,9</sup>



Slika 2.1. Prikaz podjele PPCPs-a, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*.

Na tržištu postoji od 5000 do 10000 različitih formulacija lijekova po pojedinim zemljama, a u svijetu se, prema nekim procjenama, za humanu medicinu koristi oko 4000 aktivnih djelatnih tvari čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100000 tona.<sup>13</sup> Samo u Velikoj Britaniji koristi se više od 3000 djelatnih tvari, dok se

u Europskoj uniji koristi oko 26 % djelatnih tvari postojećih na svjetskom tržištu.<sup>5</sup> Farmaceutski proizvodi su molekule sastavljene od aktivne djelatne tvari, API, eng. *active pharmaceutical ingredient*, i pomoćnih tvari, eng. *excipients*. Pomoćne tvari se dodaju u svrhu unaprijeđenja proizvodnje, poboljšanja stabilnosti i kontrole opuštanja lijeka te pristupačnosti lijeka pacijentima. Neke od njih su primjerice pigmenti, boje, šećeri, antioksidansi, anorganske soli.<sup>19</sup> API su kompleksne bioaktivne, antropogene molekule s različitim fizikalno-kemijskim i biološkim djelovanjima, dobivene organskim i biološkim sintezama.<sup>7,18</sup> Ključan su dio lijeka koji ima ulogu liječenja i/ili prevencije od bolesti te poboljšanja zdravstvenog stanja.<sup>3</sup> Proizvode se tako da bi u niskim koncentracijama, uslijed biološke aktivnosti, bile djelotvorne u ljudskom organizmu.

Prva znanstvena upozorenja o biološkim učincima lijekova u okolišu objavljena su početkom devedesetih godina prošlog stoljeća kada su znanstvenici uočili masovnu pojavu feminiziranih riba mužjaka.<sup>13,17</sup> Takva patološka feminizacija povezana je s djelovanjem sintetskog estrogenog hormona koji se koristi za kontracepciju. Navodi se da 17- $\alpha$ -etinilestadiol utječe na reproduktivni ciklus riba pri koncentraciji od 4 ng L<sup>-1</sup>.<sup>20-23</sup> Daljnja potvrda da lijekovi zaista dovode do ekoloških katastrofa bio je nestanak supova na indijskom potkontinentu uslijed djelovanja diklofenaka.<sup>1,24</sup> U vodama su otkriveni i lijekovi poput antiepileptika karbamazepina, zbog kojeg se naglo smanjila populacija vodenih kukaca te antidepresiva, kao što je fluoksetin koji nepovoljno utječe na mriještenje školjaka.<sup>13</sup>

Farmaceutici se svrstavaju u posebnu skupinu prioriternih onečišćujućih tvari, eng. *emerging contaminants*, ECs.<sup>1,25</sup> Takve onečišćujuće tvari definiraju se kao tvari sintetskog ili prirodnog podrijetla koje su prisutne u okolišu i imaju potencijal uzrokovati negativne posljedice po ljudsko zdravlje ili organizme u okolišu. Antibiotici i hormoni su klasificirani kao ECs zbog njihove učestalosti u okolišu, nedovoljnog poznavanja ekološkog utjecaja i zbog manjka zakona koji kontroliraju njihova ispuštanja.<sup>1,18</sup>

Europska je komisija 2015. godine utvrdila popis tvari za koje je potrebno praćenje diljem Unije u području vodnog gospodarstva u skladu s Direktivom 2008/105/EZ Europskog parlamenta i Vijeća.<sup>26</sup> Tvari su svrstane po svojim CAS brojevima (*Chemical Abstracts Service* – Služba za podatke o kemijskim tvarima) i EU brojevima te je Komisija utvrdila moguće metode analize uvrštenih tvari, kako je prikazano u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Popis tvari koje su uvrštene na tzv. „watch listu“.

Naziv tvari/ skupine tvari	CAS broj	EU broj	Indikativna metoda analize	Najveća prihvatljiva granica detekcije metode (ng L <sup>-1</sup> )
<b>Etinilestradiol 17- alfa (EE2)</b>	57-63-6	200-342-2	SPE velikog volumena – LC- MS-MS	0,035
<b>Estradiol 17-beta (E2), estron (E1)</b>	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	SPE-LC-MS-MS	0,4
<b>Diklofenak</b>	15307-86-5	239-348-5	SPE-LC-MS-MS	10
<b>2,6-diterc-butil-4- metilfenol</b>	128-37-0	204-881-4	SPE-GC-MS	3 160
<b>2-etilheksil-4- metoksicinamat</b>	5466-77-3	226-775-7	SPE-LC-MS-MS ili GC-MS	6 000
<b>Makrolidni antibiotici– eritromicin, klaritromicin, azitromicin</b>	114-07-8 81103-11-9 83905-01-5	204-040-1 / 617-500-5	SPE-LC-MS-MS	90
<b>Metiokarb</b>	2032-65-7	217-991-2	SPE-LC-MS-MS ili GC-MS	10
<b>Neonikotinoidi</b>			SPE-LC-MS-MS	9
<b>Oksadiazon</b>	19666-30-9	243-215-7	LLE/SPE-GC-MS	88
<b>Tri-alat</b>	2303-17-5	218-962-7	LLE/SPE-GC-MS ili LC-MS-MS	670

Na razini EU dostupne informacije ukazuju na to da bi uvrštene tvari mogle predstavljati znatan rizik za vodeni okoliš ili znatan rizik koji se putem okoliša, nakon njihova ulaska, prenosi te su na temelju toga i svrstane na „watch listu“. Praćenjem tvari s popisa trebali bi se dobiti visokokvalitetni podaci o njihovim koncentracijama u vodnom okolišu, koji su prikladni za procjenu rizika na kojima se i temelji utvrđivanje prioriternih tvari. Potrebno je istraživati rizik pojedinačnih komponenti, ali nadasve, i smjese jer se farmaceutici u prirodi nalaze u kompleksnim smjesama, tzv. matricama.<sup>6</sup> Granica detekcije onečišćujućih tvari prema navedenim metodama, trebala bi biti barem jednako niska kao i koncentracija svake tvari u odgovarajućem mediju, a ispod koje se ne očekuju štetni učinci. Do sada korištene metode detekcije

su tekućinska i plinska kromatografija s masenom spektroskopijom te ekstrakcija (SPE),<sup>27,28</sup> ali istražuju se i naprednije metode detekcije zbog ograničenosti postojećih. U predviđanju kemijske sudbine lijekova u okolišu i za razumijevanje reakcijskih mehanizama transformacija primjenjuje kvantnokemijski pristup.<sup>17</sup> Kako bi se globalni problem onečišćenja otpadnih i pitkih voda lijekovima i njihovim razgradnim produktima pokušao riješiti, u novije se vrijeme pristupa s gledišta farmakoekologije. Farma-ekologija ili farmakoekologija, pretpostavlja interdisciplinarnan pristup toksikologa, kemičara, farmaceuta, liječnika, ali i sociologa u rješavanju onečišćenja okoliša uzrokovano sve većom potrošnjom lijekova.<sup>17</sup>

Problematika lijekova u okolišu postala je dio službenih izvještaja krovnih međunarodnih institucija koje brinu o zdravlju ljudi, Svjetske zdravstvene organizacije, SZO, i Europske agencije za okoliš, EEA.<sup>17</sup> Direktive Europske unije uključuju EU Sewage Sludge Directive 86/278/EEC, The Bathing Water Directive 2006/7/EC i The Dangerous Substances Directive 2006/11/EC.<sup>6</sup> Ulaskom u Europsku uniju, Republika Hrvatska je uskladila svoje zakone s EU direktivama. Farmaceutski se otpad ubraja u opasni medicinski otpad, a obveze vezano za gospodarenje medicinskim otpadom propisane su *Zakonom o održivom gospodarenju otpadom*. (94/13) i *Pravilnikom o gospodarenju medicinskim otpadom* (NN 50/15). Takvim se otpadom smatraju svi lijekovi i tvari, uključujući i njihovu primarnu ambalažu, koji su postali neupotrebljivi zbog isteka roka valjanosti, prolijevanja, rasipanja, pripremljeni pa neupotrebljeni ili se ne mogu koristiti zbog drugih razloga.<sup>29</sup> Prema podacima iz 2015. godine, farmaceutski se otpad uglavnom izvozi na zbrinjavanje, a manjim se dijelom zbrinjavanje obavlja u postrojenjima ovlaštenima za uporabu i/ili zbrinjavanje opasnog otpada spaljivanjem.<sup>29</sup> Što se tiče otpadnih voda iz farmaceutske industrije i procjednih voda s odlagališta otpada, maksimalno dopuštene koncentracije propisane su prema Pravilniku<sup>12</sup> koji je donesen temeljem *Zakona o vodama* (14/14).

### 2.1.1. Testovi toksičnosti

Studije pokazuju da većina farmaceutika koja se koristi za ljudsko zdravlje biva izlučena u vodeni okoliš. Iako su pronađeni u okolišu u niskim koncentracijama, njihovo kontinuirano dospijevanje u okoliš predstavlja ekološki problem globalnih razmjera.<sup>30-32</sup> Različito se ponašaju u okolišu, no predviđa se da se u vodenim

sustavima mogu ponašati kao postojane molekule s akutnim utjecajem na neciljane organizme. Monitoring vodenih medija omogućava pronalazak i identifikaciju prisutnih molekula, a biotestovi su koristan alat koji daju uvid u biološki učinak antibiotika na organizme.<sup>33</sup>

Biotestovi su standardizirani testovi koji se provode na organizmima izlažući ih toksičnim molekulama kako bi se odredio njihov biološki i ekološki rizik/utjecaj. Većina podataka vezana za toksičnost farmaceutika tiče se akutnog učinka na organizme. Zakonski koncept ERA bazira se na provođenju setova kratkotrajnih ekotoksikoloških testova provedenih na tri do četiri različite vrste organizama. Testni organizmi su reprezentativni organizmi hranidbenog lanca definirani prema OECD uputama.<sup>34</sup> Biotestovi se mogu provoditi s algama, cijanobakterijama, račićima *Daphnia magna*, biljkama, ribama, miševima. Ovisno o vremenu izlaganja, može se odrediti utjecaj molekula na organizme: akutni - izloženost traje u minutama (5, 15, 30 min) ili kronični - izloženost traje satima/danima (24, 48, 96 h).

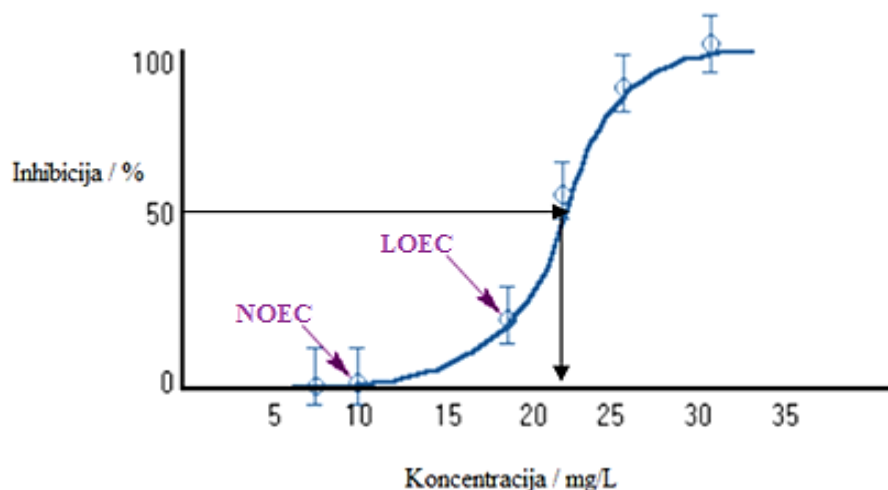
Postoje dvije strategije testova: light-off i light-on. U light-off se ubrajaju testovi mjerenja bioluminiscencije. Biotestovi koji se temelje na smanjenju bioluminiscencije široko su korišteni za ispitivanje toksičnosti pojedinačnih kemikalija, smjese kemikalija i uzorke iz okoliša. Prednosti su im jednostavnost provedbe, osjetljivost i brzina jer izloženost uzorka traje 15 do 30 minuta. Najčešće korištene bakterije za provedbu testova bioluminiscencije su *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* i *Pseudomonas fluorescens*. Prema HRN EN ISO 11348-3:2010, test s *V. fischeri* je standardizirani test za određivanje kvalitete vode. Koristi se u raznim zemljama kako bi se istražila toksičnost molekula, ali primjerice i otpadnih tokova s odlagališta otpada, na bioluminiscenciju bakterija.<sup>35,36</sup>

*Vibrio fischeri* su Gram negativne, pokretljive, štapičaste, morske bakterije. Mogu živjeti samostalno, u simbiozi, kao saprofiti ili paraziti. Primjerice, navedena bakterija s havajskom lignjom *Euprymna scolopes* tvori simbiozu. Ekspresija luminiscencije ovisi o gustoći stanica bakterija *V. fischeri*, koja je veća u simbiozi u odnosu na samostalan život te do emitiranja svjetlosti neće doći ukoliko nije velika gustoća stanica. Za sposobnost bioluminiscencije zaslužan je enzim luciferaza. Luminiscencija je reakcija u kojoj enzim luciferaza oksidira organske molekule, na primjer aldehid, uz redukciju flavin mononukleotida, FMNH<sub>2</sub> i otpuštanje energije u obliku plavo-zelene svjetlosti valne duljine 490 nm:<sup>37</sup>



Za ovaj proces potreban je kisik, a reguliran je preko *lux* gena. „Quorum sensing“ regulira ekspresiju gena kod bakterija u korelaciji s gustoćom stanice. Proizvodi i otpušta „autoinduktere“ koji modificiraju ekspresiju gena uslijed promjena u gustoći populacije stanica. Do smanjenja bioluminiscencije, može doći i u slučaju oksidativnog stresa ili akumulacije reducensa.<sup>38</sup>

Kao rezultat provedenih testova toksičnosti, dobiva se koncentracija koja izaziva inhibiciju bioluminiscencije u 50 % populacije,  $EC_{50}$ . Ta koncentracija očitava se iz koncentracija odgovor krivulje koja je sigmoidalna krivulja oblika slova S, prikazana na slici 2.2. NOEC ili eng. *no – observed efective concentration*, predstavlja najvišu koncentraciju kod koje nema utjecaja na izložene organizme, dok je LOEC ili eng. *lowest observed efective concentration*, najniža koncentracija kod koje je uočen utjecaj na testirane organizme. Y-os krivulje čini inhibicija izražena u postocima, a x-os koncentracije ispitivane tvari u  $mg L^{-1}$ .



Slika 2.2. Koncentracija odgovor krivulja.

Prema EU Direktivi 93/67/EEC molekule se razvrstavaju s obzirom na vrijednosti izmjerenih efektivnih koncentracija, odnosno koncentracije neke tvari u površinskim vodama, MEC, eng. *measured efective concentracion*, i s obzirom na vrijednost  $EC_{50}$  izraženoj u  $mg L^{-1}$ . Prema podjeli  $EC_{50}$  vrijednosti, ispitivana tvar je:  $< 1 mg L^{-1}$  jako toksična za vodene organizme,  $1-10 mg L^{-1}$  toksična,  $10-100 mg L^{-1}$  štetna,  $>100 mg L^{-1}$  neštetna za vodene organizme.<sup>34</sup> Kako bi se odredio potencijalni rizik antibiotika na ljudsko zdravlje, ali i mogući rizik i utjecaj ostalih farmaceutika i na ljude i na okoliš, kao važan alat navodi se procjena rizika.<sup>6</sup> U te svrhe procjenjuju

se dvije koncentracije: predviđena ekološka koncentracija, PEC, i predviđena neutjecajna ekološka koncentracija, PNEC. PNEC vrijednost se može izračunati pomoću  $EC_{50}$  podijeljene s faktorom 1000. Za farmaceutike, PNEC služi kao indikator za potencijalni rizik na ljudsko zdravlje i ekosustav. No, prema smjernicama Europske agencije za procjenu medicinskih proizvoda, EMEA, da bi se započeo proces procjene rizika, PEC vrijednost treba biti viša od  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , koja se navodi kao koncentracija farmaceutika opasna po okoliš.<sup>20,39,40</sup> Procjena PEC-a gruba je zbog složenosti sustava, (u okolišu se nalazi veliki broj komponenti), zbog nedovoljno pouzdanih podataka o ukupnoj količini farmaceutika te postoji mnogo putova farmaceutika u okolišu.<sup>20,41</sup> Omjer PEC/PNEC ili MEC/PNEC je omjer koji ukazuje na rizik za okoliš, a označava se RQ, eng. *risk quotient*. Dijeli se na tri razine: 0,01-0,1 *mali rizik*; 0,1-1 *srednji rizik*;  $>1$  *visoki rizik*.<sup>42,43</sup> Ukoliko je taj omjer manji od 1 upućuje da ta molekula ne predstavlja opasnost po okoliš, no ukoliko je veći ili jednak 1 ukazuje na rizik i potrebno je, prema smjernicama OECD-a, provesti ekotoksikološke testove.<sup>34</sup> Istraživanja pojedinačnih tvari jednostavnije je provesti u odnosu na istraživanja smjesa farmaceutika, koje uvažavaju činjenicu sinergizma među komponentama, te su takva istraživanja rijetka i skupa.<sup>17</sup>

### 2.1.2. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika

Farmaceutici se definiraju kao organski spojevi molekulske mase od 200 do 500 daltona. Većina ih je biološki aktivna i hidrofilna, kako bi bili lako podnošljivi ljudskom tijelu, te postojana, kako bi se izbjegla njihova razgradnja prije djelovanja. Većinom su topivi u vodi i nehlapivi, neki su polarni i teže talože. Hidrofobni farmaceutici imaju tendenciju bioakumulacije i taloženja u sediment.<sup>7,13,44-46</sup>

Ponašanje i sudbina farmaceutika u vodenom okolišu ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, kemijskoj strukturi, topljivosti u vodi, koeficijentu razdiobe ( $K_{ow}$ ) te o Henryjevoj konstanti (He).<sup>5,7,25,44</sup> Prema vrijednosti  $\log K_{ow}$ , molekule mogu imati različit potencijal sorpcije.<sup>15</sup> Lipofilnije molekule imaju veći potencijal akumulacije na čvrstu fazu, a hidrofilnije veću mogućnost da se zadrže u vodenoj fazi.

$K_{oc}$  vrijednost je parametar koji ukazuje na potencijal gubitka molekule preko procesa sorpcije. Što je viša vrijednost  $\log K_{oc}$ , veća je mogućnost da će se molekula sorbirati na čvrste čestice, sadržavajući organski ugljik u obliku suspendiranih čestica,



nepolarnih masti i lipida, mineralnih ulja, površinski aktivnih tvari koje su prisutni u kućanskim otpadnim vodama. Farmaceutici s niskom vrijednosti log  $K_{oc}$ , težit će vodenoj fazi te će se lakše izdvojiti iz mulja ili sedimenta. Vrijedi spomenuti da se procjena PEC-a bazira na koeficijentu razdiobe (mulj-voda),  $K_{ow}$  i kiselo-baznoj konstanti,  $pK_a$ .<sup>46</sup> Vrijednost konstante  $pK_a$  upućuje na sposobnost disocijacije farmaceutika u otpadnoj vodi. Pri nižim vrijednostima  $pK_a$  u odnosu na pH vode, molekula će disociirati.

Ovisno o farmakološkim svojstvima lijeka, mogu se izlučiti kao smjesa metabolita, nepromijenjena polazna tvar ili kao konjugirana s pomoćnim tvarima.<sup>44</sup> Mogu nastati metaboliti koji se u prisutnosti polarnih molekula hidroliziraju i transformiraju u biološki aktivne molekule.<sup>6</sup> Takvi metaboliti su topivi u vodi pa im je pokretljivost u okolišu veća.<sup>15,17,31,47</sup> Također, mogu nastati razgradni metaboliti koji su toksičniji od polaznog oblika molekule.<sup>15,25</sup> Farmaceutici se razlikuju po svojstvima kao što su stabilnost, sposobnost sorpcije, topivost, otpornost na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju ili afinitet vezanja na krute čestice.<sup>13</sup>

Farmacetske djelatne tvari predstavljaju opasnost u okolišu jer su otporne na razgradnju, a imaju i dugi vijek poluraspada u okolišu. Vrijeme poluraspada  $DT_{50}$ , eng. *degradation half-life*, definira se kao vrijeme koje je potrebno da se razgradi pola od ukupno primijenjene količine farmaceutika.<sup>9,13,25,44,46</sup> Što je dulje vrijeme poluraspada farmaceutika, povećana je mogućnost od prodiranja u podzemne vode te tako predstavljaju opasnost za onečišćenje pitkih voda.<sup>34</sup> Također, ekotoksični su jer već i niske koncentracije mogu negativno utjecati po izložene organizme, čak više kronično nego akutno što ovisi o njihovoj bioraspoloživosti, mogućnosti razgradnje i o fizikalno-kemijskim svojstvima.<sup>48</sup> Zbog navedenog i trajne izloženosti tim štetnim spojevima prevladava zabrinutost za kopnene i vodene organizme.

### 2.1.3. Izvori farmaceutika u okolišu

Izvori farmaceutika obuhvaćaju ljudsku potrošnju lijekova i dodataka prehrani, industriju, posebice farmaceutsku industriju, upotrebu lijekova u veterinarske svrhe, otpadne vode iz bolnica, procjedne vode s odlagališta otpada te komunalni otpad, ali i groblja, kao što je prikazano na slici 2.3.<sup>5,7,9,21,31,44,48</sup>



Izvor farmaceutika u okolišu je i industrija proizvodnje lijekova i dodataka prehrani, tj. farmaceutska industrija. Eksplozivni rast industrije, kao i ljudske populacije rezultira povećanjem proizvodnje. Stoga, za objekte i postrojenja iz farmaceutske industrije u Republici Hrvatskoj su prema Pravilniku<sup>12</sup> propisane granične vrijednosti emisija otpadnih voda za fizikalno-kemijske, ekotoksikološke, organske i anorganske pokazatelje. S obzirom na propisano, nužno je da se otpadne vode iz industrijskih proizvodnji pročišćavaju prije ispuštanja u vodene prijamnike.

Jedan od glavnih izvora farmaceutika u okolišu predstavljaju bolnice. Otpadne vode iz bolnica sadržavaju patogene bakterije, ostatke farmaceutika i njihove metabolite, konjugirane molekule, dezinfekcijska sredstva, radioaktivne elemente i druge kemikalije.<sup>48</sup> Jednom kada takve molekule dospiju u okoliš, mogu ući u prehrambeni lanac i koncentrirati se pa i akumulirati do većih članova hranidbenog lanca što se naziva biomagnifikacija.<sup>8,45</sup> U otpadnim vodama iz bolnica, pronađeni su farmaceutici ciprofloksacin, penicilini, karbapenemi, beta-laktami u koncentracijama od nekoliko  $\mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>49,50</sup>

Korištenjem farmaceutika u cilju poboljšanja zdravlja, povećavaju se koncentracije dospjele u okoliš, a ujedno i odlaganjem ambalaža ili lijekova na odlagališta otpada. Unatoč što su odlagališta osigurana po pravilima struke, moguće je prodiranje štetnih tvari preko procjednih voda u podzemne vode ili tlo. Oni se nalaze u takvim otpadnim vodama zbog neispravnog odlaganja ambalaže iskorištenih lijekova ili lijekova kojima je istekao rok trajanja. Naime, većina ljudi odlaže lijekove u komunalni otpad te na taj način završe na odlagalištima otpada.

Nakon ispuštanja obrađenih otpadnih voda u vodene ekosustave različite su mogućnosti razgradnje farmaceutika, kako je prikazano na slici 2.4. Može doći do fotolize uslijed absorbiranja UV zračenja, a hidrolizom dolazi do raspada molekule u vodenim medijima te daljnjim prijenosom otopljenih oblika komponenti. Moguća je i sorpcija molekula ili biorazgradnja pomoću prisutnih mikroorganizama. Uslijed otapanja i difuzijskog prijenosa kroz vodeni medij, neke se molekule mogu biokoncentrirati u vodenim organizmima. Do isparavanja u atmosferu dolazi u slučaju hlapljivih oblika molekula. Tako su u vodovodnim vodama lijekovi prisutni u nižim koncentracijama, a često se pojavljuje anksiolitik meprobamat ( $50 \text{ ng L}^{-1}$ ), analgetik fenazon ( $400 \text{ ng L}^{-1}$ ), antiepileptik karbamazepin ( $260 \text{ ng L}^{-1}$ ) te regulator lipida klofibrinska kiselina ( $300 \text{ ng L}^{-1}$ ).<sup>18,51</sup>



Slika 2.4. Mogući putovi razgradnje farmaceutika u okolišu.<sup>9</sup>

Najveća potražnja lijekova od europskih zemalja navodi se za Francusku iza koje slijedi Poljska.<sup>48</sup> Mnogi se lijekovi mogu kupiti bez recepta što potiče njihovu prodaju, a najviše se koriste antibiotici, kontracepcijska sredstva i lijekovi iz terapijskih skupina za kardiovaskularni, gastrointestinalni sustav te dišni, živčani i mišićni sustav.<sup>1,6</sup> Predviđa se da će se upotreba farmaceutika u sljedećih 10 do 50 godina povećavati, a kao „pokretačke sile“ za proizvodnju novih lijekova navode se eksponencijalni porast i starenje stanovništva, urbanizacija te razvoj novih bolesti.<sup>52</sup>

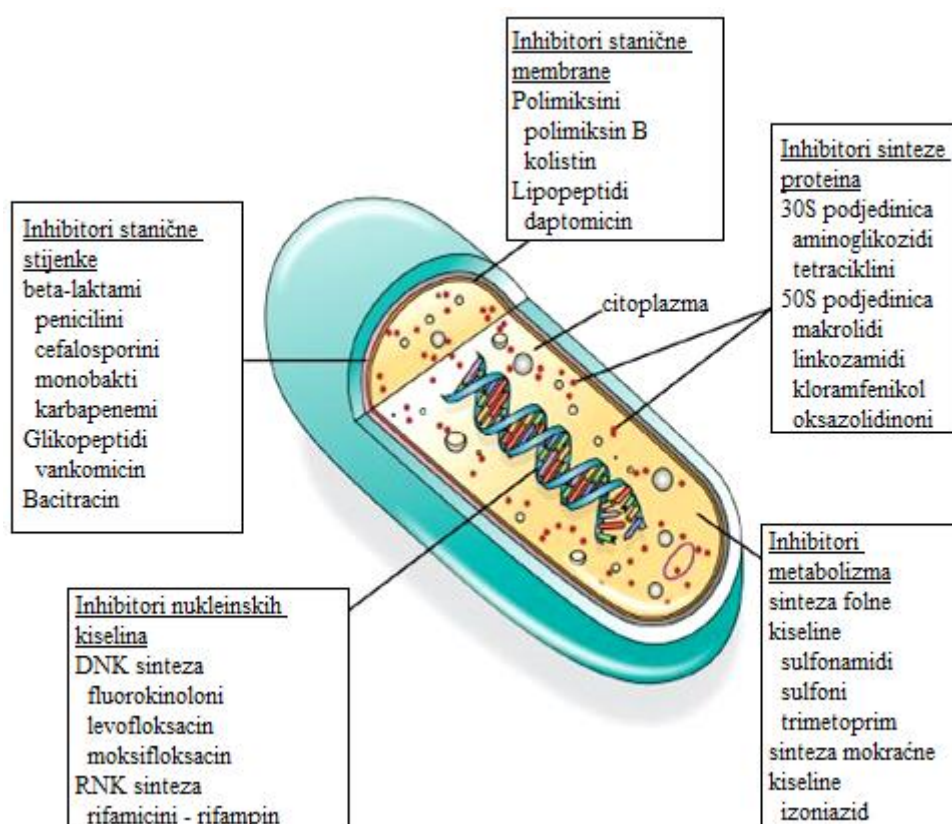
## 2.2. Antibiotici

Antibiotici su organski spojevi koji mogu potpuno uništiti bakterije ili zaustaviti njihov rast i razmnožavanje. Definišu se kao lijekovi s terapijskom svrhom koji inhibiraju i usporavaju rast mikroorganizama (bakterija, gljivica).<sup>8</sup> Prvi antibiotik prirodnog podrijetla je penicilin proizveden od gljivice roda *Penicillium*.<sup>9</sup> Antibiotici se mogu dobiti prirodnim putem, kemijskim sintezama ili kemijskim modifikacijama. Većina su male molekule s molekulskom masom od manjom 1000 daltona. Navode se kao komponente koje nisu opasne za domaćina, a izvršavaju kemoterapeutske učinke u slučaju infekcija kod ljudi, životinja i biljaka. Tri su glavna uvjeta kako bi antibiotik mogao djelovati protiv bakterija: 1) antibiotik mora uspješno

dospjeti do stanice, 2) antibiotik mora djelovati na ciljanu stanicu u odgovarajućoj količini i 3) antibiotik se ne smije deaktivirati ili modificirati.<sup>15</sup>

Mogu se grupirati prema kemijskoj strukturi, mehanizmu i načinu djelovanja. Prema kemijskoj strukturi dijele se na 11 skupina: aminoglikozidi, beta-laktami, glikopeptidi, penicilini, makrolidni, oksazolidinoni, cefalosporini, polimiksini, streptogramini, tetraciklini, sulfonamidi, fluorokinolini.<sup>6,16</sup>

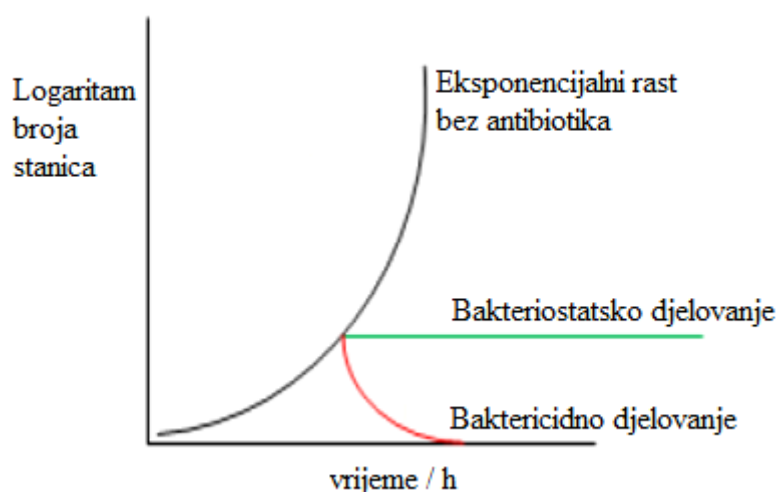
Prema mehanizmu djelovanja, mogu inhibirati biosintezu stanične stijenke, sintezu proteina, funkciju stanične membrane, sintezu nukleinskih kiselina, metaboličke putove i sintezu ATP-a, kao što je prikazano na slici 2.5.



Slika 2.5. Podjela antibiotika prema mehanizmu djelovanja.

Prema načinu djelovanja, antibiotici mogu imati bakteriostatsko ili baktericidno djelovanje. Antibiotici s bakteriostatskim učinkom izazivaju reverzibilnu inhibiciju rasta i razmnožavanja bakterija, dok s baktericidnim izravno utječu na bakterije i ireverzibilno ih ubijaju. Bakteriostatski antibiotici djeluju tako da inhibiraju, primjerice, sintezu proteina te tako neće nastati novi protein, no bakterija će preživjeti dok god ima dovoljno proteina za diobu stanice. Snažnije djelovanje

imaju baktericidni antibiotici te se za bakterijske infekcije kod ljudi takvi antibiotici više preporučuju. Bez prisutnosti antibiotika, broj bakterijskih stanica eksponencijalno raste u kratkom periodu. No u prisutnosti antibiotika s bakteriostatskim djelovanjem ne dolazi do razmnožavanja bakterija, već do stagnacije njihova broja, ali ostaju sposobne za preživljavanje. Dok baktericidni antibiotici ubijaju bakterije uz smanjenje broja stanica zbog odumiranja istih, što prikazuje slika 2.6.<sup>53</sup>



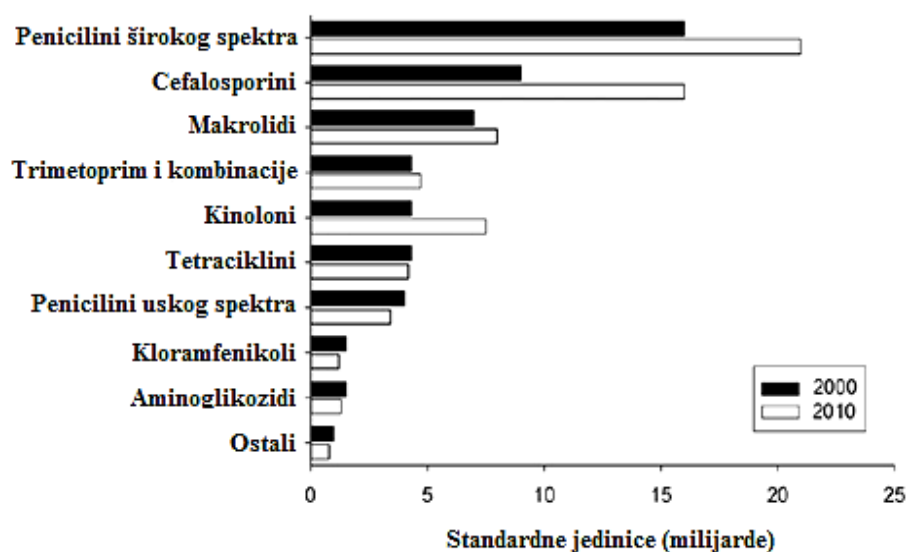
Slika 2.6. Prikaz bakteriostatskog i baktericidnog djelovanja antibiotika na bakterije u odnosu na rast bakterija bez antibiotika.

Tri su ključna čimbenika za liječenje bakterijske infekcije: domaćin, patogen i lijek. Važna je selektivnost antibiotika, odnosno da ubija ili inhibira ciljane patogene uz minimalnu ili nikakvu štetu za domaćina. Među baktericidne antibiotike ubrajaju se vankomicin, metrenidazol, aminoglikozidi, fluorokinoloni, penicilini, cefalosporini, dok se kloramfenikol, trimetoprim, klindamicin, sulfametoksazol, eritromicin svrstavaju u bakteriostatske. Visoke koncentracije bakteriostatskih antibiotika, mogu djelovati baktericidno, dok niske koncentracije baktericidnih antibiotika mogu imati bakteriostatski učinak.

Unatoč tome, djelovanje antibiotika različito je s obzirom na podjelu bakterija prema Gramu. Na Gram pozitivne bakterije djeluju na citoplazmatsku membranu, a na Gram negativne na vanjsku membranu. Antibiotici mogu imati uži ili širi spektar djelovanja. Oni užeg spektra djelovanja djeluju na specifične bakterije, dok šireg spektra djelovanja učinkoviti su na razne bakterije.

S obzirom na pH uvjete, mogu se pojaviti u obliku različitih iona: neutralnih, kationa, aniona i zwitter iona. Fizikalno-kemijska i biološka svojstva, kao što su  $\log K_{ow}$ , sorpcija, fotorazgradnja, antibiotska aktivnost, kao i toksičnost, određena su pH-vrijednošću. O njoj ovisi i topivost, odnosno ponašanje u vodenim medijima, hidrofobnost/hidrofilnost te vrijednost omjera razdiobe  $\log K_{ow}$ .<sup>8,44</sup>

Nekoliko stotina različitih antibiotika se upotrebljava u humanoj i veterinarskoj medicini. Koriste se kao promotori rasta prilikom uzgoja životinja, kao dodaci prehrani u ribogojilištima i kao kortikosteroidi u peradarstvu. Svjetska godišnja potrošnja seže između 100 i 200 kilo tona.<sup>20</sup> U Europi se godišnje potroši približno 13500 tona antibiotika, od toga 65 % u humanoj te 35 % u veterinarskoj medicini. Klinička potrošnja iznosi oko 10 % od ukupne potrošnje antibiotika. Na slici 2.7. prikazana je potrošnja različitih vrsta antibiotika, a među prva tri se ubrajaju makrolidni antibiotici. Ljudska upotreba antibiotika po stanovniku razlikuje se od države do države, no od europskih zemalja najveću prodaju imaju Francuska, Španjolska, Portugal, Belgija dok je najmanja uočena kod Nizozemske, Danske, Njemačke, Austrije.<sup>9</sup>

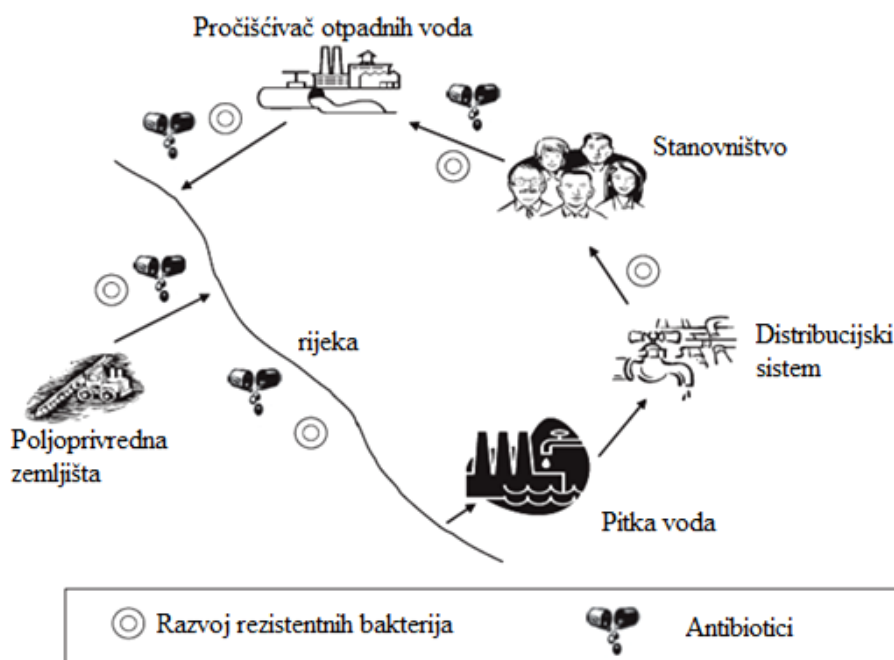


Slika 2.7. Usporedba potrošnje antibiotika na svjetskoj razini za 2000. i 2010. godinu.<sup>54</sup>

Najveći izvori antibiotika u okoliš su bolnice, kućanstva, farme i farmaceutska industrija te ribogojilišta gdje se izravno u vodu ispuštaju, ipak, prevelike količine antibiotika.<sup>6,9</sup> Odlaganjem stajnjaka (izlučevina životinja) na poljoprivredna zemljišta

ili mulja koji zaostaje nakon obrade otpadne vode, farmaceutici i njihovi metaboliti mogu dospjeti u podzemne vode, ući u hranidbeni lanac, taložiti se u tlu, ovisno o njihovim svojstvima.<sup>8</sup>

Kao glavni izvor antibiotika u okolišu, navodi se izlučivanje iz ljudskih i životinjskih organizama. Antibiotici koji se koriste u humanoj medicini, završavaju u, tzv. smeđim vodama, tj. komunalnim otpadnim vodama koje mogu sadržavati vrlo kompleksne smjese različitih farmaceutika. Kao najučestaliji i najčešće pronađeni navode se cefaleksin, sulfametoksazol, kofein, salicilna kiselina, kloramfenikol, ibuprofen, eritromicin-H<sub>2</sub>O, diklofenak i naproksen.<sup>18</sup> U površinskim vodama nizvodno od uređaja za obradu komunalnih otpadnih voda te u izlaznoj struji nakon takve obrade, pronađeni su antibiotici u koncentracijama od nekoliko  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Također, većina antibiotika se ne metaboliziraju potpuno te se eliminiraju iz tijela između 30 % i 90 % u nepromijenjenom obliku u otpadne vode.<sup>6,47</sup> Ukoliko zaostanu u tlu, antibiotici su duže vrijeme otporni na razgradnju, a veterinarski antibiotici se akumuliraju u tlu.<sup>6</sup> Nakon ispuštanja u okoliš, antibiotici mogu imati razne utjecaje na vodene i kopnene ekosustave, a do čovjeka se mogu vratiti preko pitke vode, kako je prikazano na slici 2.8.



Slika 2.8. Ciklički sustav komunalne vode uslijed ljudske potrošnje antibiotika i njihov prijenos okolišem uz moguću razvoj rezistentnih bakterija.<sup>20</sup>



Znanstvenici se najviše usredotočuju na antibiotike jer njihovim koncentriranjem u vodama dolazi do povećanog rizika od razvoja rezistentnih bakterija. Nastanak rezistentnih mikroorganizama može negativno djelovati na ljudsko zdravlje, tj. može povećati negativne učinke kao što su povećanje bolesti ili epidemija koje je teško liječiti. Rezistencija se definira kao svojstvo bakterija koje imaju sposobnost deaktivirati antibiotike, odnosno kao mehanizam koji blokira inhibiciju ili ubijanje bakterija što dovodi do preživljavanja bakterija unatoč izloženosti antibiotika.<sup>6,16,20</sup>

### 2.2.1. Makrolidni antibiotici

Kao alternativa penicilinu, 1952. prvi su put upotrijebljeni makrolidni antibiotici kao lijekovi protiv infekcija uzrokovanih od Gram pozitivnih bakterija. Najveća današnja upotreba im je za respiratorne bolesti poput upale pluća. Termin makrolid odnosi se na strukturu, a označava veliki makrociklički laktonski prsten na koji su vezani jedan ili više deoksi šećera. Njihovo djelovanje može biti baktericidno ili bakteriostatsko, ovisno o koncentraciji lijeka i tipu mikroorganizama. Prvi protuupalni učinci makrolidnih antibiotika u kliničkoj praksi uočeni su još 80-tih godina prošlog stoljeća pri korištenju eritromicina za liječenje difuznog panbronholitisa (DPB), a danas postoje brojna klinička izvješća koja ukazuju na djelotvornost makrolidnih antibiotika u liječenju niza kroničnih upalnih bolesti.<sup>55,56</sup>

Obzirom na relativno široki spektar djelovanja, mogućnost oralne primjene i neškodljivost, makrolidni antibiotici zauzimaju važno mjesto u liječenju zaraznih bolesti. U kliničkoj su praksi najzastupljeniji eritromicin, klaritromicin i azitromicin koji se najčešće koriste u liječenju izvanbolničkih stečenih infekcija dišnih putova. Polusintetski derivati eritromicina, azitromicin, klaritromicin i telitromicin pokazuju širi spektar djelovanja koji uključuje Gram negativne bakterije *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*. Azitromicin je manje aktivan protiv Gram pozitivnih bakterija nego eritromicin, a klaritromicin i njegovi metaboliti dvostruko su aktivniji od eritromicina u terapiji *Haemophilus influenzae*. Azitromicin je dodatno aktivan na netuberkulozne bakterije, *Bartonella henselae*, *Rhodococcus equi*, *Toxoplasma* spp., *Cryptosporidium* spp. i vrste iz roda *Plasmodium*. Zanimljivo je nadodati da je azitromicin jedan od najprodavanijih lijekova na svijetu radi

jednodnevnog doziranja, visokih tkivnih i staničnih koncentracija koje postiže te mogućnosti primjene u trudnoći i kod djece.<sup>55</sup> Telitromicin ima strukturu koja poboljšava vezanje na bakterijske ribosome i *in vitro* aktivnost.<sup>57</sup> Ketolidi su nova grupa makrolidnih antibiotika čija struktura omogućava veću stabilnost u kiselom mediju te inducira rezistenciju.<sup>57</sup>

Makrolidni antibiotici su hidrofobne molekule koje se u okolišu duže vremena zadržavaju, ali se smatraju nedostupnima za biorazgradnju. U odnosu na ostale skupine lijekova, najčešće su propisani od strane liječnika s oko 41 tona, no u bolnicama njihova upotreba je vrlo mala, samo 2 tone.<sup>6,41</sup> Nađeni su u komunalnim otpadnim i površinskim vodama u koncentracijama od nekoliko  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a eritromicin i klaritromicin su pronađeni u rijekama Po i Lambro u Sjevernoj Italiji u koncentracijama između 10 i 100  $\text{ng L}^{-1}$ .<sup>31</sup>

Makrolidi djeluju na bakterije tako da se vežu na 50S podjedinicu ribosoma. Makrolidi koji imaju  $^{14}\text{C}$  atoma vežu se preko  $^5\text{C}$  atoma na šećeru dezozaminu tvoreći vodikovu vezu, dok  $^{15}\text{C}$  i  $^{16}\text{C}$  makrolidi tvore hidrofobne interakcije s 50S podjedinicom ribosoma. Makrolidi sa  $^{16}\text{C}$  atoma mogu se vodikovom vezom vezati na aminokiselinu adenin na određenoj poziciji na ribosomu, a mogu se vezati i pomoću  $^6\text{C}$  atoma na ribosom stvarajući kovalentnu vezu. To nije moguće za  $^{14}\text{C}$  i  $^{15}\text{C}$  makrolide jer na toj poziciji imaju hidroksilnu ili estersku grupu.<sup>31,52,56-59</sup>

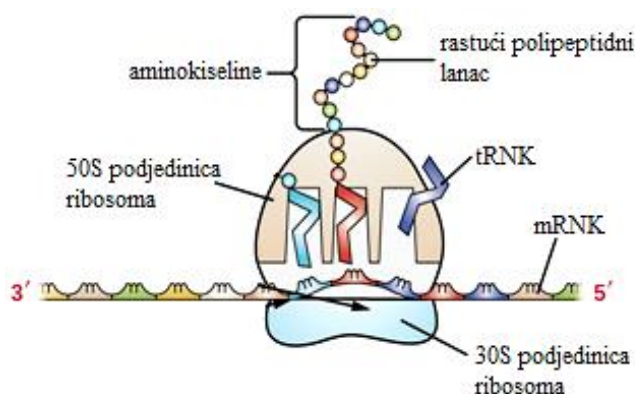
Četiri su načina na koje makrolidi postižu inhibiciju proteina:<sup>60</sup>

1. Inhibiraju rast peptidnog lanca tijekom translacije
2. Ubrzavaju disocijaciju peptidil tRNA iz ribosoma
3. Inhibiraju stvaranje peptidne veze
4. Stvaraju interakcije s 50S podjedinicom ribosoma

Svi mehanizmi djelovanja ovise o strukturi makrolida i mjestu vezanja na ribosomu. Utjecaj makrolida na stvaranje peptidne veze moguć je zbog vezanja u blizini centra peptidil transferaze.  $^5\text{C}$  atom makrolida prolazi preko peptidil transferaze, dok kod  $^{16}\text{C}$  makrolida prolaze dalje od centra i izravno kataliziraju peptidnu vezu. Šećer dezozamin u  $^{14}\text{C}$  makrolida ne dostiže peptidil transferazu što objašnjava manji inhibični utjecaj na reakcije transpeptidaze.

Glavni mehanizam inhibicije sinteze proteina je vezanje makrolida na tunel kroz koji izlazi peptid. Tunel je sastavljen od 23S rRNA s početkom u centru peptidil transferaze koji se proteže duž cijele podjedinice ribosoma (slika 2.9.). Tunel je

relativno širok, a sadrži suženja koja tvore proteini smješteni na kraćoj udaljenosti od centra peptidil transferaze. Makrolidi se vežu blizu suženja i blokiraju rast peptidnog lanca. U prisutnosti  $^{14}\text{C}$  i  $^{15}\text{C}$  makrolida, polimerizacija prvih nekoliko aminokiselina odvija se neometano, a inhibicija rasta peptidnog lanca događa se sve dok ne dosegne mjesto na kojem se makrolid vezao na suženje tunela. Inhibicija peptida, eventualno, rezultira disocijacijom peptidil tRNA iz ribosoma. Makrolidi uzrokuju akumulaciju aminokiselina, ali inhibiraju sintezu peptida. Makrolid se natječe za mjesto na tunelu s peptidom pa je moguće da zbog većeg afiniteta dođe do interakcije te peptid može maknuti makrolid s mjesta vezanja.<sup>60</sup>



Slika 2.9. Prikaz djelovanja makrolidnih antibiotika na sintezu proteina.

Makrolidi se nakupljaju u raznim vrstama stanica, ali je njihovo nakupljanje najjače u fagocitnim stanicama što se smatra korisnim procesom u kontekstu liječenja bakterijskih infekcija.<sup>55</sup> Novija istraživanja pokazuju učinak makrolidnih antibiotika na bakterijske faktore virulencije, posebno na smanjivanje njihove pokretljivosti te sposobnosti adherencije na stanice domaćina.<sup>55</sup> Od posebnog je interesa inhibični učinak nekih makrolidnih antibiotika, poput azitromicina i klaritromicina, na ekspresiju faktora virulencije kod bakterije *Pseudomonas aeruginosa* te na formiranje biofilma što omogućuje smanjenu osjetljivost ovog patogena na gotovo sve antibiotike.<sup>47,61</sup>

### 2.2.2. Eritromicin

Eritromicin je najviše korišteni makrolidni antibiotik zbog širokog spektra djelovanja i biološke aktivnosti.<sup>6</sup> Prvi je puta izoliran iz *Streptomyces erythreus*.<sup>62</sup>

Sastoji se od makrolaktonskog prstena sastavljenog od 14 ugljikovih atoma i dva šećera: bazičnog dezozamina i neutralne kladinoze.<sup>57</sup> Eritromicin se koristi u stočnoj hrani za uzgoj svinja i peradi.<sup>9</sup> Eritromicin A i njegovi polusintetski derivati su treći najkorišteniji antibiotici, a najčešće se pronalazi u okolišu zbog značajne upotrebe u veterinarske svrhe gdje se koristi kao promotor rasta i za prevenciju bakterijskih bolesti. Prvenstveno, eritromicin djeluje na bakterije bakteriostatski, no baktericidno može djelovati pri višim koncentracijama.<sup>62</sup>

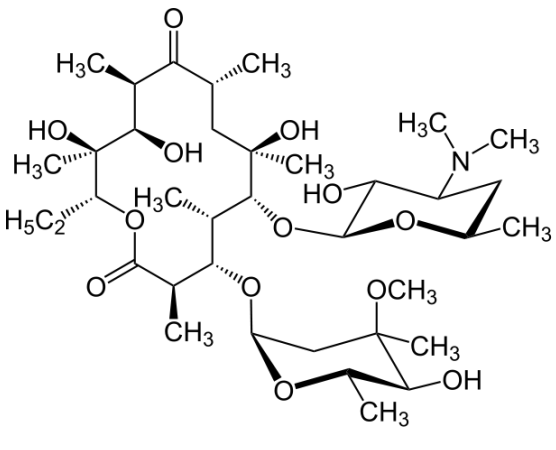
Vrlo je učinkovit u borbi s najučestalijim bakterijskim patogenima dišnog sustava: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*, ali pokazuje slabu aktivnost na sojeve *Haemophilus influenzae*. Učinkovit je i protiv niza drugih bakterija, kao npr. ostalih pripadnika *Streptococcus*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp., *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Bordetella pertusis*, *Campylobacter jejuni*, *Treponema pallidum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*.<sup>55</sup> No, bakterije iz obitelji *Enterobacteriaceae* navode se kao visoko otporne na eritromicin zato što proizvode enzime eritromicin esteraze i rRNA metilaze.<sup>63</sup>

Od 21 antibiotika u humanoj i u veterinarskoj upotrebi, eritromicin i eritromicin-H<sub>2</sub>O su najučestalije pronađeni u čak 139 industrijskih i gradskih otpadnih struja u SAD-u.<sup>9,64</sup> Eritromicin A se lako adsorbira na komponente tla, posebice na minerale gline, što ga čini nedostupnim za biorazgradnju u sedimentu. Omjer razgradnje eritromicina A koji je sorbiran na čestice tla ubrzan je kiselom površinom glinenih čestica i kataliziran glinenim mineralima. Ključno je ponašanje eritromicina A u sedimentu jer sorpcija i razgradnja dovode do njegove inaktivacije. U vodenim sustavima na biorazgradnju utječu topivost eritromicina i prisutnost materijala na koji se može sorbirati. Ukoliko pKa eritromicina A iznosi, primjerice, 8,36, dolazi do protoniranog oblika koji se može snažno adsorbirati na čestice gline pri čemu takve molekule postaju nedostupne mikroorganizmima za razgradnju. Stoga, omjer biorazgradnje ovisi ponajviše o omjeru desorpcije eritromicina sa čestica tla, jer to utječe na njegovu biodostupnost, te o broju prisutnih mikroorganizama.<sup>64</sup>

Može se otapati u etanolu, smjesi vodikovog peroksida i klorovodične kiseline, acetonu, kloroformu, acetonitrilu, etil acetatu.<sup>65</sup> Prema literaturi,<sup>66</sup> topivost s porastom temperature opada, čime ga je teže otopiti. Eritromicin je bazična molekula i lako tvori soli s kiselinama, a otopine trebaju biti zaštićene od svjetla zbog mogućnosti fotorazgradnje. U tablici 2.2. dan je pregled fizikalnih-kemijskih svojstava

eritromicina. Eritromicin može biti lako deaktiviran u probavnom sustavu preko želučane kiseline do dehidrirane forme, eritromicin-H<sub>2</sub>O, uslijed gubitka jedne molekule vode.<sup>50</sup> U ljudskom tijelu počinje djelovati unutar 1,5-2 sata, a oko 60 % se izlučuje u nepromijenjenom obliku iz organizma.<sup>67</sup>

Tablica 2.2. Fizikalno – kemijska svojstva eritromicina.<sup>58,59,66,67</sup>

Svojstvo	ERITROMICIN	
Terapeutska vrsta	Makrolidni antibiotik	Kemijska struktura <sup>60</sup>
CAS broj	114-07-8	
Molekulska masa / g mol <sup>-1</sup>	733,94	
Formula	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>	
Topivost u vodi	slabo topiv do 2000 mg L <sup>-1</sup> pri 20 ± 5 °C <sup>66</sup>	
log K <sub>ow</sub>	1,58 pri 25 °C i pH 7,4	
pK <sub>a</sub>	8,36-8,8/8,9	
K <sub>d</sub> / L kg <sup>-1</sup>	6000	
Vrijeme poluraspada / dana	6,8-37,9	
Farmakološki omjer / %	više od 60 % izlučuje se u nepromijenjenom obliku	

Eritromicin-H<sub>2</sub>O je pronađen u površinskim vodama 0,1-1,7 ng L<sup>-1</sup>, u podzemnim vodama 0,05 ng L<sup>-1</sup>, u otpadnim vodama u koncentracijama višim od 6,0 ng L<sup>-1</sup>.<sup>4,5</sup> Dehidrirana forma eritromicina pronađena je i u površinskim i u otpadnim vodama diljem svijeta.<sup>42</sup> Takav oblik eritromicina ima zanemarivo antibakterijsko djelovanje, ali može biti uključen u stvaranje bakterijske otpornosti prema polaznom obliku molekule. Otpornost bakterija se procjenjuje prema inhibicijskim

koncentracijama koje su za Gram pozitivne bakterije u rasponu od 0,01 do 10 mg L<sup>-1</sup>, dok za Gram negativne iznose 0,1-200 mg L<sup>-1</sup>.<sup>61</sup>

Eritromicin djeluje na bakterije tako da inhibira sintezu proteina vezajući se na 50S podjedinicu ribosoma tijekom eksponencijalne faze rasta.<sup>62</sup> Točnije, veže se na nukleotide iz domene V na 23S rRNA. Veza nastaje između <sup>5</sup>C atoma 14 makrolidnog prstena i rRNA. Eritromicin se veže na ribosome preko šećera deozamina tvoreći vodikovu vezu sa dušičnim bazama na nukleotidima. Djelovanje eritromicina ovisi o peptidu, odnosno eritromicin uzrokuje inhibiciju rasta peptida ovisno o redosljedu aminokiselina.<sup>60</sup> Nadalje, može destabilizirati vanjsku membranu bakterijske stanice povećavajući joj permeabilnost s obzirom na interakciju s dvovalentnim kationima kojom nastaju mostovi između slojeva lipopolisaharida.<sup>52,61</sup>

### 2.2.3. Sudbina eritromicina u vodenom okolišu

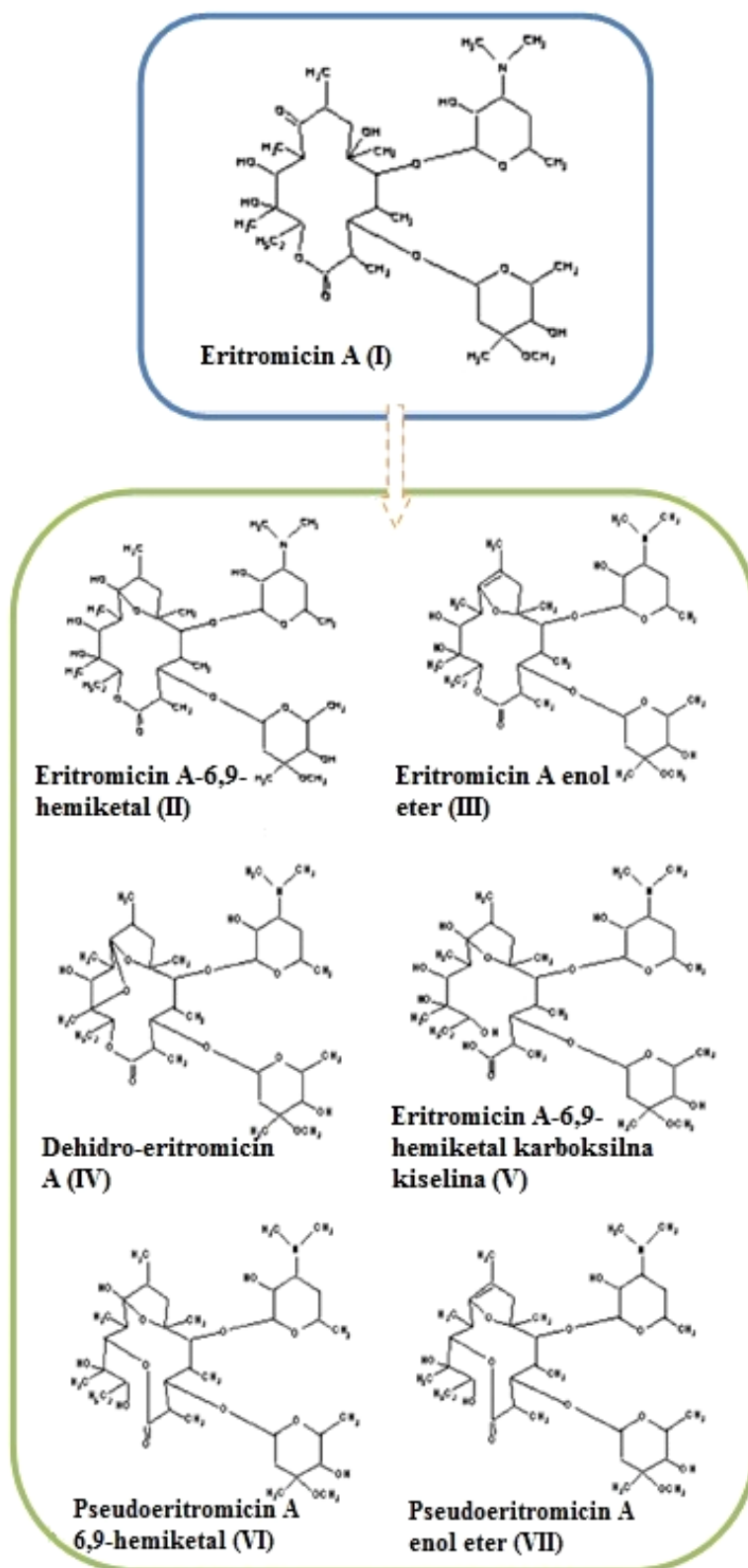
Eritromicin je nestabilan i u kiselom i u alkalnom području što ukazuje da je njegova razgradnja u vodenom okolišu ovisna je o pH-vrijednosti. Razgradnja se događa preko dehidracije na tri forme (slika 2.10.):<sup>64,68</sup>

- dehidrirani eritromicin A (IV)
- eritromicin A enol (III)
- pseudoeritromicin A enol eter (VII)

Smanjenjem pH-vrijednosti u vodenim otopinama, raste topivost i razgradnja eritromicina A (I) na oblik dehidriranog eritromicina A (IV). Navode se dva moguća puta razgradnje: preko eritromicina A enola etera (III) kao intermedijera do dehidriranog eritromicina A (IV) ili direktnom dehidracijom eritromicina A-6,9-hemiketala (II).

U kiselim uvjetima, eritromicin A-6,9-hemiketal (II) prelazi u dehidrirani eritromicin A (IV) uz povratnu reakciju do forme eritromicina A enola etera (III). U blago lužnatim uvjetima, pseudoeritromicin A-6,9-hemiketal (VI) nastaje kataliziranom hidrolizom eritromicina A-6,9-hemiketala karboksilne kiseline (II) uz popratne reakcije dehidracije. Dolazi do hidrolize esterske veze eritromicina A-6,9-hemiketala (V), bazno katalizirane hidroksidnim ionom. Reakcija je popraćena reesterifikacijom karboksilne kiseline s <sup>11</sup>C-hidroksilnom grupom i reakcijama

dehidracije pseudoeritromicina A-6,9-hemiketal (VI) do pseudoeritromicina A enola etera (VII).<sup>68,69</sup>

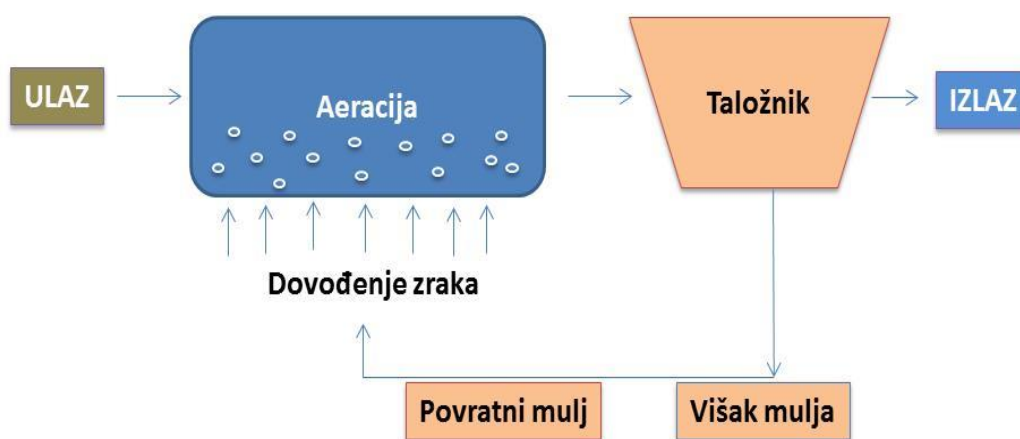


Slika 2.10. Prikaz strukture eritromicina i njegovih metabolita u vodenom okolišu.<sup>68</sup>

### 2.3. Biološka obrada otpadne vode s aktivnim muljem

Učinkovita i isplativa biološka obrada otpadnih voda provodi se pomoću mikroorganizama, odnosno temeljeno na njihovoj enzimskoj razgradnji prisutnih onečišćujućih tvari. Najčešći način pročišćavanja otpadnih voda je proces obrade s aktivnim muljem.<sup>13,14,20,70</sup> Odlikuju ga prednosti kao što su relativno niski investicijski troškovi, relativno jednostavna izvedba uređaja, visok je stupanj uklanjanja ukupne suspendirane tvari i BPK<sub>5</sub> vrijednosti te ekološki je prihvatljiviji proces, primjerice, od kloriranja. No, velika je potrošnja energije zbog intenzivne aeracije, nastaju povećane količine mulja koje je potrebno zbrinuti, a može doći i do stvaranja pjene, što su nedostaci ovoga procesa.<sup>13,14,70</sup>

Tijekom biološke obrade heterotrofni mikroorganizmi u prisutnosti otopljenog kisika razgrađuju organsku tvar u otpadnoj vodi.<sup>71</sup> U reaktor se dovodi otpadna voda te se aeracijom pospješuje kontakt između biomase i supstrata, ali se i sprječava taloženje na dnu ili unutrašnjosti reaktora (slika 2.11.). Također, aeracijom se osigurava izmjena supstrata i produkata metabolizma, kao i potrebna koncentracija kisika za održavanje aktivnosti mikroorganizama. Dio se aktivnog mulja, koji nastaje tijekom procesa, vraća u reaktor kako bi se održavala razina biomase, a višak mulja se izdvaja.<sup>71</sup>



Slika 2.11. Prikaz aerobne biološke obrade otpadnih voda.

Tijekom procesa biološke razgradnje, farmaceutici se vežu na pahuljice aktivnoga mulja ili prelaze u otopljeni oblik što ovisi o njihovoj hidrofobnosti. Za to svojstvo, ključan je koeficijent raspodjele koji ukazuje na raspodjelu promatrane



molekule između organske i vodene faze.<sup>15</sup> Primjerice, veće vrijednosti koeficijenta imaju ibuprofen, ketoprofen, naproksen, mefenamična kiselina i gemfibrozil, te se pretpostavlja da će doći do njihova vezanja na pahuljice aktivnoga mulja.<sup>15</sup> Manja učinkovitost uklanjanja karbamazepina objašnjava se njegovom otpornošću i topivošću u vodi, što upućuje na nisku  $pK_a$  vrijednost. Triklozan se navodi kao biorazgradiv, ali ima veliku vrijednost koeficijenta raspodjele tako da adsorbira na aktivni mulj.<sup>72</sup>

Različiti su navodi o učinkovitosti uklanjanja farmaceutika za proces biološke obrade jer proces ovisi o brojnim čimbenicima:<sup>6,15,21,44,72</sup>

- a) vrsti, koncentraciji i fizikalno-kemijskim svojstvima farmaceutika
- b) karakteristikama aktivnog mulja kao što su starost, taloživost, prilagodljivosti, kompaktnost pahuljica aktivnoga mulja
- c) hidrauličkom vremenu zadržavanja, HRT, i vrijeme zadržavanja aktivnoga mulja, SLR
- d) procesnim uvjetima poput temperature, intenzitetu svjetlosti, pH-vrijednosti te koncentraciji otopljenog kisika
- e) toksičnom učinku prisutnih farmaceutika
- f) geografskom području, tj. lokaciji uređaja, kao i o godišnjem dobu

Na mehanizam biološke obrade utječe temperatura i pH-vrijednost. Porast temperature utječe na proces hidrolize, te na vrijeme poluraspada onečišćujuće tvari. Prema istraživanju,<sup>6</sup> povećanjem temperature, vrijeme poluraspada farmaceutika se smanjuje pri konstantnoj pH-vrijednosti i u prisutnosti nitritnih iona u vodenim medijima.<sup>15</sup> pH-vrijednost ima ključnu ulogu na ponašanje molekula tijekom obrade otpadnih voda jer određuje njihovu topljivost, tvorbu veza, izmjenu iona. U slučaju da molekule tvore anione, doći će do smanjenja efektivne vrijednosti  $K_{ow}$  uz porast potencijala sorpcije.<sup>15,41</sup> Neki se farmaceutici učinkovitije uklanjaju smanjenjem vremena zadržavanja mulja, *sludge loading rate*, SLR, i/ili povećanjem hidrauličkog vremena zadržavanja, *hydraulic retention time*, HRT. Oba čimbenika su određena starošću mulja. Povećanje starosti mulja rezultira smanjenjem SLR-a i porastom HRT-a. Tako dolazi do povećanja populacije bakterija koje sporije rastu, odnosno njihove brže prilagodbe na novonastale uvjete te su tada komponente izložene velikom broju bakterija i njihovim enzimima što utječe na njihovu razgradnju.<sup>15</sup>

Učinkovitost biološke obrade s aktivnim muljem različita je s obzirom na vrstu farmaceutika, a prikaz je dan u tablici 2.3.

Tablica 2.3. Učinkovitost uklanjanja različitih farmaceutika s aktivnim muljem iz komunalnih otpadnih voda.

Farmaceutik	Učinkovitost uklanjanja	Literatura
Norfloksacin	85%	Harris i sur. <sup>6</sup>
Ciprofloksacin	83%	
Ibuprofen	55%	
Triklozan	45-90%	
Bisfenol A	>80 %	Zrnčević i sur. <sup>13</sup>
Estradiol, estron	>75%	
Diklofenak	<20 %	Onesios i sur. <sup>40</sup>
Eritromicin	23,8-26%	
Fluoksetin	>70%	
Sulfonamidi	25 %	Watkinson i sur. <sup>47</sup>

Biorazgradnja je biološki proces koji obuhvaća obradu farmaceutika pomoću mikroorganizama do ugljikovog dioksida i vode.<sup>5</sup> Visoke koncentracije antibiotika pronađene u mulju ukazuju da ne dolazi do biorazgradnje, već koncentriranja na aktivni mulj.<sup>6</sup> Biosorpcija antibiotika na mulj ovisi o pH-vrijednosti, lipofilnosti, površinskom naboju antibiotika/aktivnog mulja i kemijskoj strukturi molekule. Ipak, nije poznato tijekom kojih uvjeta dolazi do sorpcije na aktivni mulj i uslijed nastanka kojih veza te da li su te molekule biodostupne i aktivne i nakon sorpcije.<sup>6</sup> Mineralizacijom ili biotransformacijom smatra se kompletna eliminacija antibiotika i njihovih metabolita iz nekog izvora onečišćenja, odnosno potpuna konverzija u ugljikov dioksid, vodu i anorganske ione. Kemijske reakcije procesa biotransformacije dijele se u dvije grupe. U prvu grupu reakcija se ubrajaju oksidacija, redukcija i hidroliza, a u drugoj fazi, fazi konjugacije, dolazi do reakcije s polarnim grupama i formiranja neaktivnih metabolita koji su topljivi u vodi.<sup>5,48</sup>

Farmaceutici tijekom biološke razgradnje mogu podlijeći:<sup>20,48</sup>

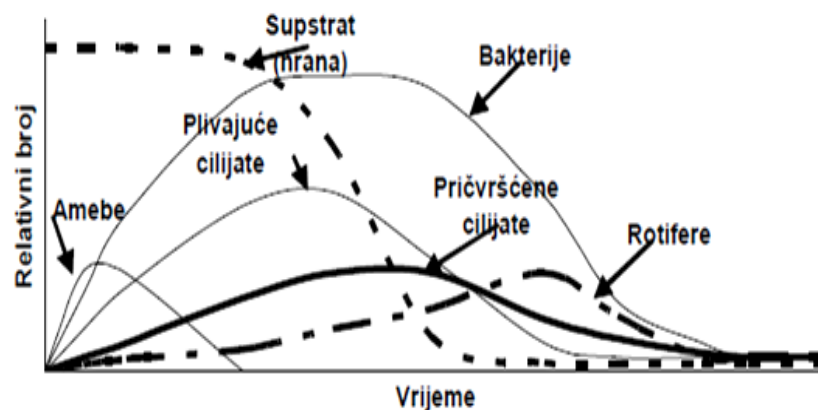
- mineralizaciji do ugljikovog dioksida i vode
- transformaciji na hidrofobnije komponente koje će se onda adsorbirati na aktivni mulj
- transformaciji na hidrofilnije komponente koje su topivije u vodi

No, znanstvenici su uočili jedan fenomen, točnije da se količina nekih farmaceutika u aktivnom mulju povećava. Koncentracija farmaceutika je na izlazu veća nego na ulazu u sustav za obradu vode te se to naziva negativnom bilancom mase. Proizlazi da u aktivnom mulju neki lijekovi nastaju. Prema istraživanju u kojim se pratilo 48 farmaceutika tijekom biološke obrade, za antiepileptik karbamazepin i antibiotik ofloksacin, izlazna koncentracija bila je povećana za 80 do 120 % u odnosu na ulaznu. Mehanizam nastajanja nije razjašnjen, ali se pretpostavlja da mikroorganizmi koji se nalaze u aktivnom mulju spajaju raspadnute dijelove farmaceutika i tako obnavljaju strukturu karbamazepina i ofloksacina. Neočekivana ponašanja u vodenom okolišu pokazuju i drugi lijekovi poput sintetskih hormona jer se njihove strukture danju razgrađuju, a noću obnavljaju.<sup>17</sup> Razumijevanje biokemijskih procesa pregrađivanja lijekova u okolišu, ipak je nedovoljno za točno predviđanje njihove sudbine ili za procjenu učinka lijekova na vodene organizme i okoliš. Nepredvidljivost i iznenađujuće ponašanje lijekova otežava i dizajn postrojenja za obradu otpadnih voda.<sup>17</sup>

### 2.3.1. Aktivni mulj

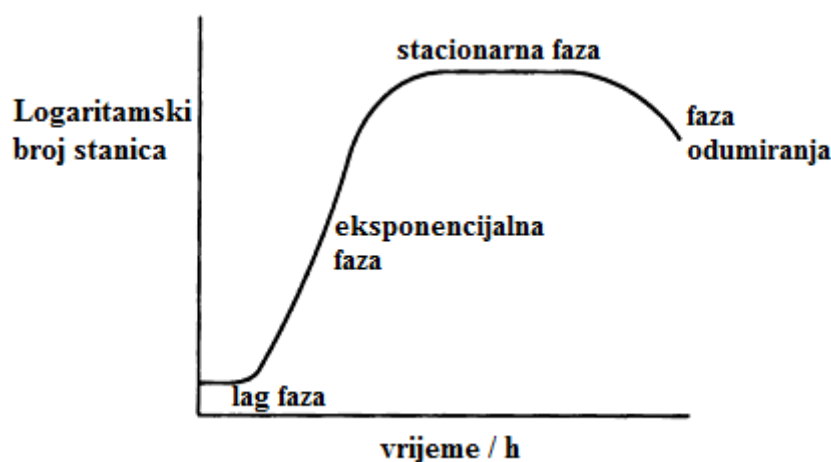
Pošto se uklanjanje organskih tvari iz otpadnih voda ostvaruje pomoću aerobnih mikroorganizama, upravo aktivni mulj ima ključnu ulogu u ovome procesu. Bitno je postići stabilnu mikrobnu zajednicu koja će biti sposobna prilagoditi se različitim procesnim uvjetima. Aktivni mulj čini skup mikroorganizama, a najzastupljenije su bakterije, koje čine oko 95 % ukupne populacije.<sup>73</sup> Uz bakterije, nalaze se i protozoe (slobodno plivajuće, pričvršćene ili puzeće), metazoe te alge i kvasci.<sup>71</sup> Kako se aktivni mulj sastoji od raznih vrsta mikroorganizama, tijekom procesa dolazi do njihove smjene. Smanjenjem koncentracije supstrata, povećava se

broj mikroorganizama, kako je vidljivo na slici 2.12. Prisutnost pojedinih mikroorganizama ukazuje na stupanj pročišćenosti otpadne vode.



Slika 2.12. Prisutnost i relativna brojnost pojedinih grupa mikroorganizama tijekom razgradnje organske tvari u otpadnoj vodi.<sup>71</sup>

Tijekom biološke obrade nastaju povećane količine mulja te je težnja postići što manji rast mikroorganizama, odnosno njihovu stacionarnu fazu rasta.



Slika 2.13. Krivulja rasta mikroorganizama.<sup>74</sup>

Na slici 2.13. prikazane su četiri su faze rasta mikroorganizama: lag faza, log faza ili eksponencijalna faza, stacionarna faza i faza odumiranja stanica. Tijekom prve faze ne dolazi do razmnožavanja mikroorganizama, već samo do povećavanja njihovog volumena. U početnoj fazi mikroorganizmi sintetiziraju enzime i intermedijere potrebne za rast i razmnožavanje. Sljedeća faza je faza najbržeg razmnožavanja mikroorganizama i proizvodnje metabolita vezanih za rast. Broj

stanica se povećava geometrijski dok koncentracija toksičnih produkata metabolizma nije previsoka. Tijekom stacionarne faze, uravnoteženo je nastajanje i odumiranje mikroorganizama, a odumrle stanice oslobađaju hranjive tvari za stanice koje dalje rastu i razmnožavaju se. U fazi odumiranja stanica nagomilavaju se toksični otpadni produkti, smanjuje se koncentracija hranjivih tvari, broj živih stanica se smanjuje geometrijski, a mrtve stanice bivaju lizirane pomoću autolitičkih enzima.<sup>74</sup>

Pahuljice aktivnog mulja sastoje se od različitih organskih i anorganskih tvari, veličine su od 500-1000  $\mu\text{m}$  i posjeduju veliku površinu zbog spužvaste građe.<sup>71</sup> Da bi nastale pahuljice aktivnoga mulja, nužno je da neke bakterije izlučuju na površinu svoje stanične stijenke ekstracelularnu polimernu supstancu, EPS.<sup>71,75</sup> Taj želatinozni polimer sastavljen je od 90 % proteina i polisaharida te ga luče mikroorganizmi svojim metabolizmom. Ispunjavajući mostove između mikroorganizama, povezuje ih u cjelinu te tako funkcioniraju kao mikrobna zajednica.

Ponašanje biomase prema tvarima koje imaju toksični utjecaj na biomasu može biti ispitano preko EPS-a koji čini 70 % aktivnoga mulja. Mreža polimera omogućuje mikroorganizmima veliku gustoću stanica, njihovo preživljavanje te adsorpciju onečišćujućih tvari, nutrijenata i minerala. Bakterije koje tvore biofilm su 1000 puta otpornije na antibiotike u odnosu na mikroorganizme u suspenziji. Mikroorganizmi ispuštaju i topljivi mikrobni produkt, *soluble microbial products*, SMP, koji sa EPS-om djeluje kao pufer prilagođavajući se tako promjenjivim okolnostima. Pretjerano njihovo lučenje, EPS-a i SMP-a, može biti kao odgovor na stresnu situaciju ili kao indikator bakterijske osjetljivosti na okolišne promjene.<sup>75</sup> Tako se izlaganjem bakterija onečišćujućim tvarima i proučavanjem lučenja EPS-a uočava ponašanje biomase, a može se pratiti i sposobnost biomase za razgradnju onečišćujućih tvari (npr. mjereći KPK-vrijednost).<sup>75</sup>

### 2.3.2. Utjecaj antibiotika na aktivni mulj

Dospjeli antibiotici na aktivni mulj djeluju tako da mogu povećati bakterijsku rezistenciju. Tijekom biološke obrade otpadnih voda, može doći do proliferacije rezistentnih bakterija na antibiotike. Nastaju uslijed transfera rezistentnih gena na nerezistentne bakterije. Transfer se gena ostvaruje preko tri koraka: 1) konjugacije preko kontakta između stanica, 2) transdukcije gena pomoću virusa i 3) transformacije

rezistentnog plazmida DNK u bakterije. Procesni uvjeti u otpadnoj vodi mogu poboljšati prijenos gena, a tada dolazi i do povećanja organskih tvari i rasta bakterija.<sup>20</sup>

Prema literaturi, koncentracije farmaceutika od  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  utječu na strukturu bakterijske zajednice.<sup>76</sup> Smanjenjem raznolikosti zajednice, umanjuje se mogućnost da se mikroorganizmi prilagode specifičnim okolišnim promjenama što može utjecati na ključne funkcije aktivnog mulja.<sup>76</sup> U slučaju inhibicije bakterija, može doći do ozbiljnih posljedica za razgradnju organskih tvari, a prilikom skupljanja otpadnih voda iz bolnica uočeno je reduciranje broja bakterija te starenje mulja. Rod *Pseudomonas* ima sposobnost razgraditi antibiotik ofloksacin i to čak od 37,5 % do 46,7 % u 24 sata, bez obzira da li se radi o razgradnji samoga ofloksacina ili o smjesi ofloksacina i nekoliko farmaceutika.<sup>77</sup> No, rezultati pokazuju da može doći do inhibicije rasta bakterija, upravo u prisutnosti smjese farmaceutika što izravno utječe i na razgradnju onečišćujućih tvari i na smanjenje učinkovitosti biološkog procesa.

### 2.3.3. Utjecaj eritromicina na aktivni mulj

Mogući mehanizmi utjecaja eritromicina na aktivni mulj su inhibicijski utjecaj na biorazgradnju supstrata, utjecaj na kinetički odgovor mikrobne zajednice i mogući učinak na sastav mikrobne zajednice. Eritromicin utječe na raznolikost i gustoću biomase, odnosno uzrokuje promjene u strukturi mikrobne zajednice što upućuje na selekciju mikroorganizama koji su prilagodljiviji na novonastale uvjete i otporni na mogući inhibicijski učinak eritromicina ili njegove dehidrirane forme. Eritromicin utječe na aktivni mulj narušavajući strukturu pahuljica aktivnoga mulja pri izloženosti  $10 \text{ mg L}^{-1}$  eritromicina tijekom 24 sata.<sup>59</sup>

Dok se akutni učinak očituje kroz kratko kontaktno vrijeme inhibitora i aktivnog mulja te neprilagođenosti kulture, kronični se učinak događa uslijed konstantne izloženosti aktivnoga mulja inhibitorima. Eritromicin ima akutno djelovanje na kinetičko ponašanje mikrobne zajednice, odnosno mijenja brzinu potrošnje supstrata što izravno utječe na rast biomase. Uslijed kontinuiranog uvođenja eritromicina, njegov se učinak na mikrobnu zajednicu iskazuje inhibicijom mikrobne zajednice, redukcijom hidrolize, blokiranošću za skladištenjem supstrata te ubrzanim procesom endogene respiracije. Konstantnim kontaktom od  $50 \text{ mg L}^{-1}$  eritromicina u

periodu od 30 dana, dolazi do značajnog smanjenja aktivnosti biomase, odnosno, eritromicin zaustavlja metaboličke funkcije mikrobne zajednice i to za više od 30 %.<sup>59</sup> Uslijed pada enzimskih aktivnosti mikrobne zajednice, inhibira se djelovanje biomase što znači da ne dolazi do razgradnje supstrata. Doziranje eritromicina smanjuje se i relativna potrošnja kisika što dodatno ukazuje da razgradnja supstrata nije moguća preko metaboličkih reakcija. I akutni i kronični utjecaj utječu na kinetiku procesa. Uslijed tih učinaka, posljedično dolazi do promjene sastava mikrobne zajednice, kao i učinkovitosti procesa.<sup>78,79</sup>

Koncentracije eritromicina veće od 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  utječu na proizvodnju EPS-a. Eritromicin je pri koncentraciji od 10  $\text{mg L}^{-1}$  utjecao na sposobnost biomase da razgradi onečišćujuće tvari, a pri koncentraciji od 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , eritromicin je slabo utjecao na lučenje EPS-a. No, njegov značajan utjecaj uočen je uslijed povećanog izlučivanja EPS-a, što je potvrđeno praćenjem biomase koja je bila osjetljivija na eritromicin pri višim koncentracijama. Eritromicin se može smatrati biorazgradiv jer se nije našao adsorbiran na aktivnom mulju. Djeluje na aktivni mulj tako da pri koncentraciji od 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  inhibira heterotrofne bakterije. Također, uzrokuje parcijalnu inhibiciju nitrificirajućih bakterija pri 5  $\text{mg L}^{-1}$ , ali i potpunu inhibiciju nitrificirajućih bakterija pri 50  $\text{mg L}^{-1}$ .<sup>80</sup>

### 2.4. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida*

Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* je Gram negativna nefermentirajuća bakterija. Saprofitski je pokretljivi bacil prirodno prisutan u tlu i vodi.<sup>80</sup> Predstavlja veliki interes za istraživanja u području medicine, prehrambene tehnologije, okolišne mikrobiologije i fitopatologije.<sup>81</sup> Za bakterije roda *Pseudomonas* navodi se da su proizvođači velikog broja ekstracelularnih enzima, primjerice lipaza.<sup>80</sup> Stoga je prepoznata mogućnost primjene ove bakterije u procesima biorazgradnje zbog brojnih enzima te ima široku primjenu u bioremedijaciji jer može razgraditi razne onečišćujuće tvari. Koristi se u područjima onečišćenima teškim metalima jer pomoću enzima krom reduktaze uklanja krom. Nadalje, razgrađuje molekule i alifatskih i aromatskih ugljikovodika izlučivanjem enzima dioksigenaze. Sposobna je metabolizirati molekule toluena, naftalena, stirena, benzena, 4-nitrofenola, azo bojila, halogene fenole, triklorbenzene, klorkatehole, antibiotik triklozan.<sup>80-83</sup> Bakterija *Pseudomonas putida* ima potencijal razgradnje molekule benzena i to s visokom

učinkovitošću pri različitim koncentracijama. Može razgraditi i polistirensku pjenu za koju se smatralo da je biološki nerazgrađiva, kao i molekulu pirena. Podnosi ekstremne uvjete, primjerice nisku temperaturu i nedostatak hranjivih tvari pa ima mogućnost enzimske aktivnosti i na Arktiku. Može se koristiti i za bioremedijaciju izgorjelog tla. Rod *Pseudomonas* ima sposobnost razgraditi diuretik kofein s učinkovitošću od 80 % tijekom 48 sati. Razgrađuje herbicid atrazin u tlu koristeći ga kao izvor dušika za rast, a metabolizira ga i nakon što se potroši sav izvor dušika. Rod *Pseudomonas* je otporan na široki raspon antibiotika te primjerice može razgraditi molekulu antibiotika cefaleksina.<sup>84</sup>

Ova bakterijska kultura striktni je aerob što znači da u uvjetima bez kisika ne može opstati te luči EPS što pospješuje stvaranje pahuljica aktivnoga mulja. Ima razvijenu rezistenciju na fluorokinolone i karbapeneme. Prema literaturi,<sup>45,61</sup> rod *Pseudomonas* je otporan na eritromicin pri koncentraciji od 50 mg L<sup>-1</sup>. Glavni regulatorski protein u metabolizmu *Pseudomonas putide* je protein kataboličke represije, eng. *Catabolite repression control*, Crc. Uključen je u nekoliko kataboličkih puteva - za razgradnju šećera, ugljikovodika, aromatskih komponenti, amino kiselina, kao i komponenti koje sadrže dušik. Crc može inhibirati razgradnju alkana kod *Pseudomonas putide*. Ima ulogu i u metaboličkom putu prenošenja signala tako da može promijeniti metabolizam ugljika, a ima utjecaj i na stvaranje biofilma kod *Pseudomonas putide*. Istraživanje je pokazalo da je ekspresija Crc-a najveća tijekom eksponencijalne faze rasta bakterije te se smanjuje kako bakterija ulazi u stacionarnu fazu rasta (tri do četiri puta manja). Ekspresija ovoga proteina ovisi o uvjetima rasta, tj. izvoru ugljika i fazi rasta bakterije.<sup>85</sup>

### 2.4.1. Otpornost bakterijske kulture *P. putide* na makrolide

Mehanizmi bakterijske rezistencije na makrolide su ciljana mutacija, izbacivanje pomoću crpki, modifikacija antibiotika i razgradnja antibiotika.<sup>86</sup> Enzimski katalizirana deaktivacija podrazumijeva hidrolizu laktonskog prstena preko *ere* gena, a pomoću enzima: eritromicin esterazama, makrolidnim fosfotransferazama i linkosamid nukleotidiltransferazama.<sup>58,66,87</sup> Eritromicin esteraze pronađene su u *Staphylococcus aureus* i u *Pseudomonas* sp.<sup>88</sup>

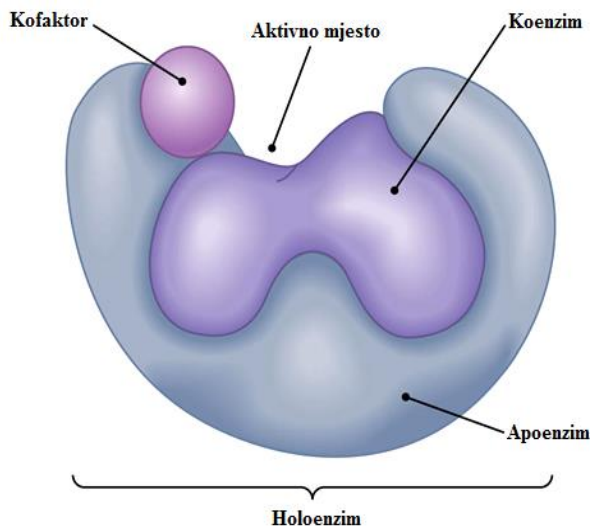


Osim enzimske razgradnje, postoji i podjela rezistencije bakterija prema biokemijskom i genetskom aspektu.<sup>52</sup> U biokemijske ubrajaju se crpke za izbacivanje i vanjska membrana, *outer membrane*, OM, pomoću kojih se smanjuje koncentracija lijeka promjenom permeabilnosti membrane, ali bez modifikacije antibiotika.<sup>52</sup> Crpke za izbacivanje nađene su skoro u svim bakterijskim vrstama, a dijele se u pet obitelji.<sup>89</sup> U Gram negativnih bakterija prisutna je RND obitelj.<sup>86</sup> Crpke za izbacivanje su membrane sastavljene od proteina koje izbacuju antibiotike izvan stanice i održavaju unutarstaničnu koncentraciju niskom. OM smanjuju propusnost membrane što rezultira manjim protokom antibiotika. Takve crpke imaju širok spektar djelovanja što omogućava bakterijama višeantibiotsku rezistenciju ili MDR, *multidrug resistance*. Gram negativne bakterije, u koje se ubraja *Pseudomonas putida*, imaju mehanizam djelovanje preko vanjske membrane. Takav sustav obrane omogućava bakterijama otpornost na antibiotike, biocide, boje, deterdžente, inhibitore metabolizma, aromatske ugljikovodike, toksične zasićene kiseline te žučne soli.<sup>87</sup>

### 2.4.2. Enzimi

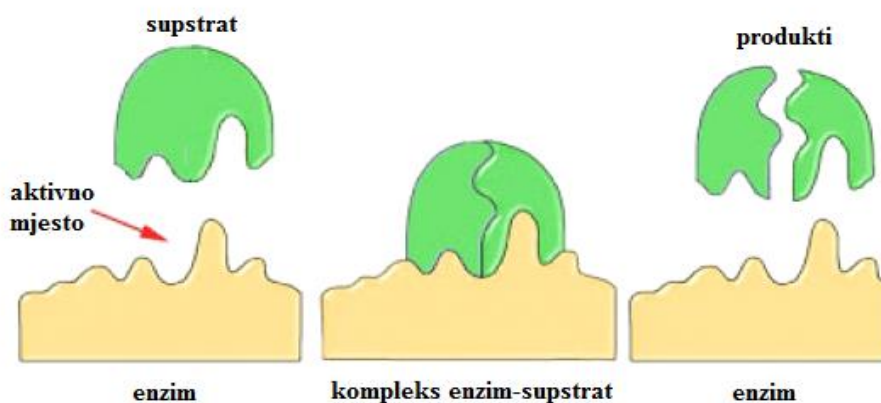
Izraz enzim dolazi od grčke riječi *enzim* što znači zakiseliti, a po prvi put je upotrijebljen pri opisu tvari koju su pronašli u ekstraktu kvasca, a koja je dovela do fermentacije šećera. Nazivi enzima daju se prema tvari (supstratu) na koju djeluju, primjerice amiloza, osnovni sastojak škroba, supstrat je za enzim amilazu. Također, enzimi se imenuju na osnovi njihova zajedničkog djelovanja, npr. dehidrogenaze premještaju vodik sa supstrata na koenzim, dok dekarboksilaze premještaju ugljikov dioksid. Nastavak *-aza* na kraju označava imena svih enzima.<sup>90</sup>

Biološki materijal koji se koristi u bioprocima je stanica mikroorganizma, a aktivni dio stanica su enzimi. Enzimi ili biokatalizatori su biološki katalizatori koji ubrzavaju reakcije u živim organizmima i u točno određenim uvjetima. Po kemijskoj strukturi su proteini, a njihova kompleksna struktura organizirana je u četiri strukturalna nivoa. Prema građi mogu se podijeliti na jednostavne i konjugirane enzime, a razlika je što su jednostavni enzimi samo proteini dok konjugirani sadrže i neproteinske skupine.<sup>90</sup> Konjugirani se enzimi sastoje od *koenzima* – neproteinskog i *apoenzima* – proteinskog dijela te tako zajedno čine potpun enzim – *holoenzim*, slika 2.14.



Slika 2.14. Prikaz građe konjugiranog enzima.

Vezivanjem supstrata za aktivno mjesto po sistemu ključ – brava, nastaje kompleks enzim – supstrat, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni uz izdvajanje produkta (slika 2.15.). Nekim enzimima za aktivnost su potrebni kofaktori. To su organske molekule male molekulske mase koje se reverzibilno vežu na enzim, npr. metalni ioni magnezija, cinka, željeza, bakra.<sup>90</sup> Najčešće služe kao nosači elektrona, specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina koje se prenose tijekom reakcije.



Slika 2.15. Prikaz mehanizma enzimskog djelovanja.

Enzimi su visoko aktivni, selektivni-enantioselektivni, stereospecifični, proizvedeni iz obnovljivih izvora, a djeluju u blagim uvjetima. Temeljem visoke aktivnosti kataliziraju reakcije, a selektivnošću kataliziraju točno određene reakcije. Stabilnost katalizatora je ključan parametar za volumetrijsku produktivnost

bioreaktora. Zbog navedenih svojstava, zamjenjuju opasne kemikalije, smanjuju potrošnju vode, sirovina, energije i broj procesnih stupnjeva, prihvatljiviji su za okoliš u odnosu na sintetske katalizatore te kataliziraju veliki broj reakcija. No, nestabilni su izvan prirodnog okruženja, uslijed promjene reakcijskih uvjeta moguća je njihova deaktivacija, a cijena njihove izolacije i pročišćavanja je visoka.<sup>90,91</sup>

### 2.4.3. Podjela enzima

Prema katalitičkom djelovanju, enzimi se razvrstavaju na šest skupina:<sup>92</sup>

- 1) *Oksidoreduktaze* - kataliziraju oksidacijske ili redukcijske reakcije uz primanje ili otpuštanje vodikovih atoma ili elektrona. Dijele se na četiri glavne skupine: dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze i oksigenaze.
- 2) *Transferaze* - kataliziraju reakcije u kojima dolazi do prijenosa funkcionalne skupine od donora do akceptora. Isključivo su unutarstanični enzimi i zahtijevaju prisustvo kofaktora.
- 3) *Hidrolaze* - kataliziraju reakcije hidrolize, odnosno sudjeluju u reakcijama cijepanja veze dodavanjem molekula vode. Postoje 12 podskupina hidrolaza, a za njihovu aktivnost prisustvo kofaktora nije nužno. Većina ih je izvanstanična i dovoljno robusna da bi mogli provoditi reakcije pa su najčešće korišteni enzimi u industriji. U ovu skupinu ubraja se i enzim eritromicin esteraza.
- 4) *Liaze* - kataliziraju reakcije u kojima se dodaju i oduzimaju skupine u svrhu stvaranja dvostruke veze.
- 5) *Izomeraze* - kataliziraju reakcije promjene supstrata u njegov izomer.

### 2.4.4. Aktivnost enzima

Aktivnost ispravne konformacije enzima snažno ovisi o okolišnim čimbenicima: pH-vrijednosti, temperaturi, miješanju, ionskoj jakosti, prisustvu detergenata, antibiotika, teških metala, koncentraciji supstrata, kao i koncentraciji enzima.<sup>91</sup> Svaki enzim ima svoje optimalno pH-područje, kao i temperaturni optimum, te se pri tim uvjetima postiže maksimalna katalitička aktivnost. Ta dva čimbenika utječu po istome trendu na aktivnost enzima. Naime, porastom pH-vrijednosti/temperature do maksimalne vrijednosti, aktivnost enzima raste, ali

daljnjim porastom, dolazi do pada aktivnosti enzima. Brzina enzimske reakcije može se opisati prema Michaelis – Menteničinoj kinetici gdje porastom koncentracije supstrata, raste i brzina reakcije do najviše vrijednosti. Koncentracija enzima i brzina reakcije su u linearnoj ovisnosti, odnosno povećanjem koncentracije enzima, linearno raste i brzina reakcije.

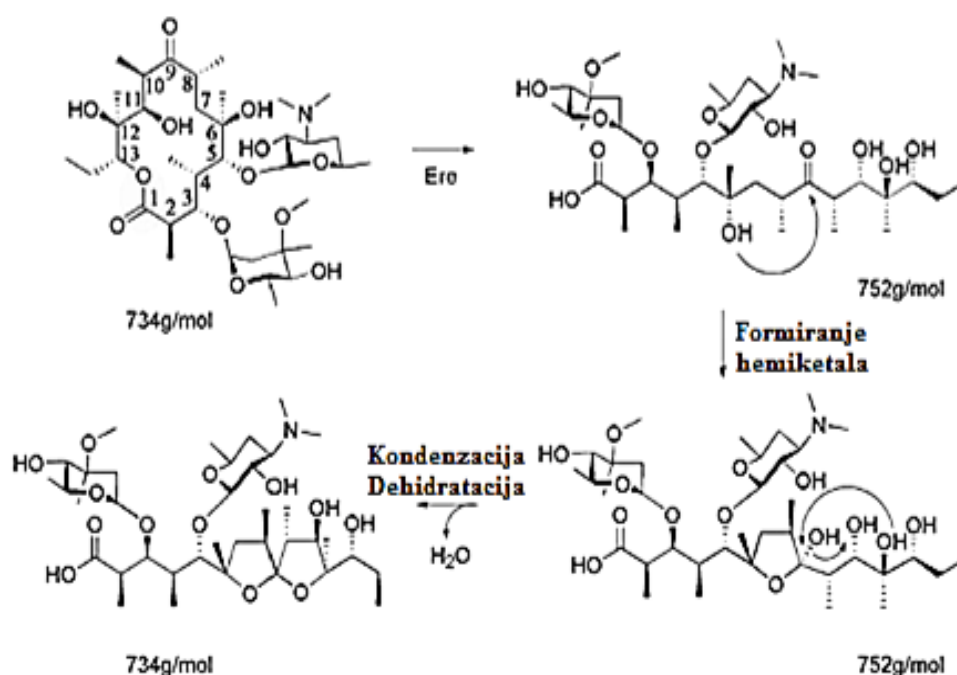
Enzimska aktivnost može biti inhibirana tvarima koje nalikuju supstratima, a koje se natječu za aktivno mjesto na enzimu. Ovakav se oblik inhibicije naziva kompetitivna inhibicija pri kojoj kompetitivni inhibitor sprječava vezanje enzima sa supstratom. U nekompetitivnoj inhibiciji, inhibitor se može ireverzibilno vezati na aktivno mjesto enzima ili na alosteričko mjesto na enzimu te tako uzrokuje promjenu oblika aktivnoga mjesta čime se ometa povezivanje supstrata. S obzirom na strukturu, enzimi su osjetljivi na procesne uvjete te stoga s enzimima treba pažljivo postupati jer aktivnost enzima utječe na konverziju supstrata.<sup>90,91</sup>

Poznato je iskorištavanje *Pseudomonas* spp. kao obećavajućih proizvođača enzima. Potencijalna je bakterija kao biokatalizator u dvofaznim fermentacijskim sistemima za sintezu finih kemikalija u visokim prinosima i ekonomski isplativim procesima. Pogodna je za ovakve vrste bioprocasa jer ima mogućnost prilagodbe na toksična otapala.<sup>93</sup> *Pseudomonas putida* posjeduje, između ostalih, i enzime: eritromicin esterazu i karboksilesterazu. Esteraze, ali i lipaze, upotrebljavaju se za dobivanje optički čistih sekundarnih alkohola. Ekstracelularni enzimi su većinom termostabilni, zadržavaju svoju aktivnost i nakon pasterizacije, čak i nakon ultrazvučnih tretmana pri visokim temperaturama.<sup>93</sup> Odlikuje ih visoka regio- i stereo-selektivnost uz dobru stabilnost, čak i u organskim otapalima, kao i neovisnost o kofaktorima. S obzirom na navedena svojstva, atraktivni su biokatalizatori za proizvodnju čistih kemikalija.<sup>94</sup>

### 2.4.5. Enzim eritromicin esteraza

Makrolidne esteraze, EreA i EreB, deaktiviraju eritromicin preko hidrolize makrolaktonskog prstena. EreA se povezuje s Gram negativnim bakterijama, dok se EreB, originalno otkrivena u *E. coli*, povezuje s Gram pozitivnim bakterijama.<sup>87</sup> Eritromicin esteraze su enzimi koji imaju hidrolitičko djelovanje. Napadaju eritromicin na esterskoj skupini pa dolazi do raspadanja <sup>14</sup>C laktonskog prstena na 6-

deoksieritininolid B koji se sastoji od  $^{15}\text{C}$  atoma. 1984. godine je po prvi puta izolirana eritromicin esteraza iz izolata *E. coli*, koji je otporan na makrolidne antibiotike. EreA je protein sastavljen od 406 aminokiselina mase 44,8 daltona, a EreB od 419 aminokiselina mase 48,2 daltona. Strukturna sličnost između esteraza, EreA i EreB, iznosi oko 25 %. Oba proteina mogu razgraditi makrolaktonski prsten napadom na estersku grupu što je popraćeno s neenzimatskom unutarmolekulskom razgradnjom. Pri tome nastaje hemiketal te sekundarnom ciklizacijom dolazi do unutarmolekulske kondenzacije uz dehidrataciju, kako je vidljivo na slici 2.16.



Slika 2.16. Razgradnja eritromicina enzimom eritromicin esteraza.<sup>87</sup>

Nadalje, strukturnom analizom EreA i EreB, utvrđeno je da nemaju sličnosti s homologima drugih biokemijskih enzima koji imaju sposobnost hidrolize. One tvore jedinstvenu tzv. „eritromicin esteraza obitelj“. EreB ima mogućnost razgradnje šireg spektra supstrata,<sup>27</sup> nego EreA, jer je sposobna metabolizirati ne samo prirodan eritromicin, već i njegove polusintetske derivate. No, nijedan enzim ne može hidrolizirati ketolide telitromicina. Imaju različite inhibitore jer dok EreB nije osjetljiva, EreA je osjetljiva na kelatne metalne spojeve.<sup>87</sup> Predlaže se da se eritromicin esteraze ne bi trebale tako nazivati, već makrolidne esteraze jer su pokazale djelovanje na sve makrolidne antibiotike.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Makrolidni antibiotik – eritromicin

U radu je korišten eritromicin koji se ubraja u skupini makrolidnih antibiotika. Visoke je čistoće (>99 %) i dobiven je iz farmaceutske tvrtke Pliva, Hrvatska d.o.o. Masene koncentracije eritromicina su označene s oznakom  $\gamma_E / \text{mg L}^{-1}$ .

##### 3.1.2. Farmaceutska otpadna voda

Za izolaciju bakterijske kulture korištena je otpadna voda iz farmaceutske industrije dopremljena s postrojenja Savski Marof iz tvrtke Pliva, Hrvatska d.o.o. Pripremom decimalnih razrjeđenja i uzgojem na hranjivoj podlozi *Tryptic Soy Broth*, TSB (Liofilchem, Italija), izolirana je najučestalija bakterijska kolonija.

##### 3.1.3. Priprema otopine eritromicina

Za pripremu temeljne otopine eritromicina koncentracije  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  u odmjerne tikvici od 100 mL odvagano je 200 mg eritromicina. Miješajući uz postupno dodavanje demineralizirane vode, sadržaj je otopljen pomoću ultrazvučne kupelji te je tikvica nadopunjena do oznake demineraliziranom vodom. Potom je priređen niz početnih koncentracija:  $\gamma_{E01}=0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E02}=2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E03}=20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E04}=200 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E05}=2000 \text{ mg L}^{-1}$ .

##### 3.1.4. Izolirana bakterijska kultura

Za provedbu testova osjetljivosti, procesa biorazgradnje, krivulje rasta te uzgoja bakterijske kulture za određivanje aktivnosti enzima korištena je bakterijska kultura izolirana iz farmaceutske otpadne vode. Bakterijska kultura uzgojena je naciepljivanjem na tekuću hranjivu podlogu TSB, na rotacijskoj termostatoranoj tresilici, pri  $160 \text{ o min}^{-1}$ ,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 24 sata te potom precjepljena na čvrstu hranjivu

podlogu u Petrijevim zdjelicama koje su inkubirane pri 37 °C, 24 sata. Od uzgojene kulture priređena je suspenzija čija je optička gustoća u hranjivoj podlozi iznosila 0,02 pri  $\lambda = 600$  nm za pokuse krivulje rasta te uzgoja za određivanje enzimatske aktivnosti.

#### 3.1.5. Proces biorazgradnje

##### Fosfatni pufer

Fosfatni je pufer pripremljen je u odmjernoj tikvici od 100 mL tako da je odvagano 2,18 g  $K_2HPO_4$ , 0,85 g  $KH_2PO_4$ , 2,218 g  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ . pH-vrijednost pufera podešena je na 7,55. Pripremljeni fosfatni pufer stavljen je na sterilizaciju.

##### Hranjiva podloga

Hranjiva se podloga sastojala od hranjivog bujona i natrijevog acetata. Za pripremu hranjive podloge u 200 mL destilirane vode izvagano je 1,6 g hranjivog bujona i 1,2 g natrijeva acetata. Nakon pripreme, hranjiva se podloga sterilizirala.

##### BPK voda

Za pripremu BPK vode vagano je 1,15 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,4 g  $CaCl_2$ , 0,0125 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0,085 g  $NH_4Cl$  u odmjernim tikvicama od 50 mL. Zatim se iz svake odmjerne tikvice izuzima volumen od 0,5 mL i prenosi se u tikvicu s 500 mL destilirane vode. Pripremljena BPK voda stavljena je na sterilizaciju.

#### 3.1.6. Fosfatni pufer za ispiranje stanica bakterijske kulture

Za ispiranje bakterijskih stanica *Pseudomonas putide* za određivanje aktivnosti enzima, korišten je 50 mM fosfatni pufer pripremljen od dviju soli: 2,62 g kalijevog dihidrogenfosfata,  $KH_2PO_4$ , (Gram-mol, Zagreb) i 5,36 g dikalijevog hidrogenfosfata,  $K_2HPO_4$ , (Lach-Ner, Češka, Fischer Chemical, UK) u 1000 mL destilirane vode. U svrhu podešavanja pH-vrijednosti fosfatnog pufera na vrijednost od 7,00, korištena je 30 % fosforna kiselina,  $H_3PO_4$ .

### 3.1.7. Mjerni instrumenti i oprema

U radu je korištena rotacijska termostatorirana tresilica Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka, za provedbu pokusa u šaržnim uvjetima. Za sterilizaciju hranjivih podloga, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Za homogeniziranje priređenih razrjeđenja uporabljen je homogenizator EV-100, Tehnica, Slovenija. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* uzgajana je u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska. Vrijednost pH određivana je pH-elektrodom SenTix® 940 pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Instrument je prije svake upotrebe kalibriran. Optička gustoća određivana je spektrofotometrijski pri  $\lambda=600$  nm, Hach, Model DR/2400, USA. Centrifuga Sigma 3K15, Njemačka, koristila se za ispiranje i ugušćivanje biomase. Prilikom pripreve otopina eritromicina korištena je ultrazvučna kupelj Bandelin, Sonorex Digitec DT 52/H, Berlin, Njemačka. Za razbijanje bakterijskih stanica korištena je ultrazvučna sonda Bandelin Sonopuls, Njemačka. Centrifugiranje uzoraka za određivanje aktivnosti enzima, rađeno je na centrifugi Universal 320 R, Hettich, Njemačka. Promjena apsorbancije u vremenu, određivana je na spektrofotometru Shimadzu UV-1800, SAD. Za precizno vaganje uporabljena je vaga Sartorius AG, Njemačka. Test toksičnosti je proveden na Lumistox 300, Dr Lange GmbH, Njemačka. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* mikroskopirana je pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Određivanje toksičnosti eritromicina pomoću *Vibrio fischeri*

Provedeni su testovi toksičnosti pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Inhibicija bioluminiscencije izmjerena je nakon inkubacije od 30 min prema standardnoj metodi HRN EN ISO 11348-3:2010 koristeći linearni niz.<sup>95</sup> Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari, u ovom slučaju antibiotika eritromicina. Kao mjera fiziološke aktivnosti koristi se prirodno svojstvo luminiscencije ove vrste bakterija. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 minuta. Instrument



očitava dva rezultata efektivne koncentracije: EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> koji predstavljaju volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20 %-tnog i 50 %-tnog pada luminiscencije.

TU ili toksične jedinice se računaju prema formuli 3.1.:

$$TU = \left( \frac{1}{EC_{50}} \right) \cdot 100\% \quad (3.1.)$$

TU predstavljaju relativnu toksičnost te se prema njenoj vrijednosti neka tvar može smatrati: 0 *netoksična* (NT), <1 *slabo toksična* (ST), 1-10 *toksična* (T), 11-100 *jako toksična* (VT) i >100 *ekstremno toksična* (ET). Što je veća TU vrijednost, veća je toksičnost ispitivane tvari.<sup>33</sup>

#### 3.2.2. Identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putida*

Za provedbu svih pokusa, u ovome je radu korištena bakterijska kultura *Pseudomonas putida* izolirana iz farmaceutske otpadne vode. Za uzgoj bakterije priređen je hranjiva podloga TSB u Petrijevim zdjelicama koje su inkubirane pri 37 °C, 24–48 sati. Klasifikacija bakterije u jednu od dviju velikih skupina: Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, provedena je metodom bojanja po Gramu<sup>96</sup> i testom s kalijevim hidroksidom. Također je ispitana enzimska aktivnost kulture biokemijskim testovima za prisutnost enzima oksidaze, katalaze i enzima za redukciju nitrata.<sup>97</sup>

Za određivanje roda i vrste bakterije korišten je API strip (eng. *Analytical profile index*) koji se sastoji iz više različitih biokemijskih testova temeljenih na enzimskoj aktivnosti kulture mikroorganizma. Čista bakterijska kultura inokulirana je na propisani način u za to predviđene jažice stripa. Tako pripremljen strip inkubiran je u termostatu pri 37 °C tijekom 24–48 sati. Očitavanje rezultata provedeno je uz pomoć dopunskih reagensa i tablice s rezultatima.<sup>98</sup>

#### 3.2.3. Testovi osjetljivosti

Disk difuzijski testovi osjetljivosti imaju prednosti nad ostalim metodama zbog jednostavnosti, niskih troškova, mogućnosti testiranja većeg broja mikroorganizama i antibiotika te lakoće interpretiranja rezultata. Antibiotik se nanosi

na disk gdje difundira u agar i inhibira rast testnog mikroorganizma. Na taj način se može uočiti kolika je učinkovitost ispitivanog antibiotika za određenu bakteriju. Ukoliko se vide zone inhibicije, mjere se promjeri svake zone kako bi se odredila veličina zone oko diskova u kojima nema rasta mikrobnih stanica. Prema promjeru zone inhibicije, slijedi klasifikacija antibiotika prema jačini djelovanja: 6-8 mm (jako slabo), 8-12 mm (slabo), 12-16 mm (dobro) i >16 mm (jako).<sup>99</sup>

Prilikom provedbe testova osjetljivosti, pripravljena je otopina eritromicina (poglavlje 3.1.3.) i suspenzija bakterijske kulture *P. putida* (poglavlje 3.1.4.). Primjenom sterilne tehnike rada pripravljena je suspenzija bakterijske kulture *P. putida*. Na Petrijeve zdjelice sa čvrstom sterilnom hranjivom podlogom TSB otpipetira se 0,1 mL homogenizirane svježije pripravljene bakterijske suspenzije optičke gustoće 0,02 te se štapićem po Drigalskom ravnomjerno rasporedi uzorak po površini hranjive podloge. Nakon toga slijedi postavljanje sterilnih diskova steriliziranom pincetom po sredini Petrijeve zdjelice. Diskovi se natapaju s 30  $\mu$ L otopine eritromicina, svake iz niza razrjeđenja. Stavlja se i slijepa proba tako da se na disk doda 30  $\mu$ L otapala u kojem je otopljena ispitivana tvar, u ovom slučaju demineralizirana voda. Uzorci se stavljaju na inkubaciju pri 37 °C, 24-48 sata.<sup>100</sup>

#### 3.2.4. Proces biorazgradnje s bakterijskom kulturom *P. putidom*

Proveden je proces biorazgradnje eritromicina s bakterijskom kulturom *Pseudomonas putidom*.<sup>101</sup> Pokus biorazgradnje je označen oznakom P1. Eritromicin se pripremio prema opisu u poglavlju 3.1.3., a korištene su radne otopine sljedećih koncentracija:  $\gamma_{E01}=0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E02}=2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E03}=20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E04}=200 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\gamma_{E05}=2000 \text{ mg L}^{-1}$ .

Proces biorazgradnje proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 100 mL na termostatiranoj rotacijskoj tresilici (slika 3.1.) pri  $26\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $160 \text{ o min}^{-1}$  tijekom 24 sata.<sup>101,102</sup> Kako bi se uklonila mogućnost fotorazgradnje eritromicina, tikvice su bile obložene zaštitnom folijom. Pokus se provodio u ukupno 12 tikvica (T1-T12), a tikvice su sadržavale suspenziju *P. putide*, fosfatni pufer, BPK vodu, hranjivu podlogu, opisanima u poglavlju 3.1.5., te otopine eritromicina pripremljenih radnih koncentracija. Sadržaj pojedine tikvice prikazan je u tablici 3.1.



Slika 3.1. Provedba pokusa biorazgradnje na termostatiranoj rotacijskoj tresilici.

Tablica 3.1. Sadržaj tikvica T1-T12 u pokusu biorazgradnje.<sup>102</sup>

Tikvica #	Početa koncentracija eritromicina / mg L <sup>-1</sup>	Dodani volumen eritromicina / mL	Suspenzija <i>P. putida</i> / mL	Hranjiva podloga / mL	Fosfatni pufer / mL	BPK voda / mL
1,2	0	0	1	10	4	25
3,4	0,2	4	1	10	4	21
5,6	2	4	1	10	4	21
7,8	20	4	1	10	4	21
9,10	200	4	1	10	4	21
11,12	2000	4	1	10	4	21

Ispitivano je pet različitih početnih koncentracija eritromicina u duplikatima. Kontrolne tikvice su omogućavale usporedbu i praćenje promjene mutnoće, boje i taloga u odnosu na ostale tikvice te u njih nisu dodane otopine eritromicina. Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje, uzimani su uzorci za praćenje optičke gustoće tijekom 16. i 24. sata.

#### 3.2.5. Krivulja rasta bakterijske kulture *P. putide*

Proveden je pokus rasta bakterijske kulture *Pseudomonas putida*, označen P2, u svrhu dobivanja krivulje raste navedene bakterijske kulture bez i uz dodatak eritromicina. Pokus je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 1000 mL na

rotacijskoj termostatoranoj tresilici s brzinom vrtnje od  $125 \text{ o min}^{-1}$  i temperaturi od  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 312 sati.<sup>103</sup> Kontrolna tikvica je sadržavala 180 mL tekuće hranjive podloge TSB, 355  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterijske kulture *P. putide* i 20 mL sterilne demineralizirane vode. U tikvice s eritromicinom dodana je hranjiva podloga i suspenzija bakterijske kulture uz 20 mL otopine eritromicina koncentracije  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , odnosno 20 mL otopine eritromicina koncentracije  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom provedbe pokusa praćena je optička gustoća, broj živih stanica (CFU) te mikroskopska analiza.

#### 3.2.6. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom su analizom praćene morfološke karakteristike bakterijske kulture *P. putide*. Od uzorka suspenzije bakterijske kulture *P. putide* i hranjive podloge bez i uz dodatak eritromicina, priređen je trajni preparat koji je obojan po Gramu. Tako priređen preparat mikroskopiran je na ukupnom povećanju od  $1000\times$ . Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima te pripremljeni na opisan način, nakon čega su mikroskopirani (slika 3.2.).



Slika 3.2. Svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom.

### 3.2.7. Uzgoj bakterijske kulture *P. putide*

Proveden je pokus uzgoja bakterijske kulture *Pseudomonas putide* bez i uz dodatak eritromicina, uz oznaku pokusa P3, u svrhu određivanja aktivnosti enzima.

Sterilna hranjiva podloga TSB se inokulirala s 295  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterijske kulture *P. putide*, a ostali uvjeti su isti opisanim kao i u poglavlju 3.2.5.<sup>104</sup> Biomasa je ugušćena i isprana fosfatnim puferom opisanim u poglavlju 3.1.6. pomoću centrifuge pri 5500  $\text{rpm}$ , 10 min i 0  $^{\circ}\text{C}$ , 3 puta. Svrha centrifugiranja je izdvojiti biomasu od hranjive podloge. Uzorci su čuvani u zamrzivaču pri temperaturi od -70  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.8. Određivanje aktivnosti enzima esteraze

Nakon uzgoja bakterijske kulture i centrifugiranja dobivene su stanice koje su razbijene ultrazvučnom sondom tijekom 10 minuta uz hlađenje na ledenoj kupelji s ciljem dobivanja unutarstaničnih enzima razaranjem strukture stanične stijenke. Uzorci su potom centrifugirani pri 14000  $\text{rpm}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  tijekom 20 minuta, kako bi se odvojile stanice te se supernatant koristi za određivanje aktivnosti enzima. Aktivnost enzima esteraze bakterije *P. putide* određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 405 nm tijekom 100 sekundi, praćenjem promjene apsorbancije u vremenu,  $\frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t}$ , odnosno kao nagib dobivenog pravca ovisnosti apsorbancije o vremenu.<sup>87</sup> Postupak praćenja aktivnosti proveden je za svaki uzorak tri puta. Mjerenja su provedena u 50 mM HEPES puferu, pH 7,5, 2 mM *p*-nitrofenol butiratu, *p*-NPB, kao supstratu, te uz 0,2 % neionski detergent Triton X-100. Jedna jedinica (U) aktivnosti esteraze definirana je kao udio enzima potrebnog za nastajanje 1  $\mu\text{mol}$  *p*-nitrofenola u jednoj minuti pod specifičnim uvjetima. Komponente testa pomiješane su u kvarcnim kivetama te je na spektrofotometru praćena promjene apsorbancije u vremenu pa se prema jednadžbi 3.2. određuje volumna aktivnost, *V.A.*

$$V.A. = \frac{V_{uk}}{\epsilon_{405} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \quad (3.2.)$$

gdje je  $V_{uk}$  ukupni volumen uzorka u kiveti u mL,  $V_E$  volumen dodanog enzima u mL,  $\epsilon_{405}$  ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini 405 nm iznosi 0,0123  $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ,  $d$  predstavlja promjer kivete,  $d = 1 \text{ cm}$ , a  $\frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t}$  označava promjenu apsorbancije u

vremenu izraženu u  $\text{min}^{-1}$ . Prema jednadžbi 3.2., volumna aktivnost se izražava u U  $\text{mL}^{-1}$ , no rezultati su pomnoženi s volumenom te je V.A. u U, odnosno  $\mu\text{mol min}^{-1}$ . Određivanje aktivnosti enzima provedeno je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u sklopu izrade diplomskog rada.<sup>104</sup>

#### 3.2.9. Obrada rezultata

##### Test toksičnosti

Provedbom testova toksičnosti dobivene su vrijednosti luminiscencija za početne uvjete (0 minuta) i nakon 30 minuta. Za svako su se razrjeđenje, po linearnom nizu, radile dvije paralele te se rezultati računaju upotrebljavajući srednje vrijednosti luminiscencija. Inhibicija, izražena u postotku, računa se prema formuli 3.3.<sup>105</sup>

$$INH = 100 - \left( 100 \cdot \frac{LU_{uzi} \cdot LU_o}{LU_i \cdot LU_{uzo}} \right) [\%] \quad (3.3.)$$

gdje je  $LU_{uz0}$  luminiscencija uzorka na početku provedbe procesa u  $t=0$ ,  $LU_{uzi}$  luminiscencija uzorka nakon inkubacijskog vremena,  $t=30$  min.  $LU_0$  i  $LU_i$  predstavljaju srednje vrijednosti luminiscencija kontrola u  $t=0$  i nakon inkubacijskog vremena,  $t=30$  min.  $EC_{50}$  vrijednost u  $\text{mg L}^{-1}$  je dobivena preko uređaja Lumistox nakon provedbe testa pomoću bakterije *Vibrio fischeri*. Prema formuli 3.1. računata je TU vrijednost. Najniža koncentracija kod koje je uočena inhibicija kulture *Vibrio fischeri*, LOEC u  $\text{mg L}^{-1}$ , procjenjena je prema krivulji na slici 4.1.

##### Gompertz model

Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri Gompertzovog modela. Pomoću eksperimentalnih podataka, vrijednost  $\mu_{\max}$  je procjenjena prema nagibu pravca na krivulju tijekom eksponencijalne faze rasta. Asimptotski porast predstavlja najvišu postignutu vrijednost broja živih stanica izraženih preko omjera  $\ln(N/N_0)$ . Procjenjene su vrijednosti  $b$  i  $c$  konstanti prema jednadžbama 3.4. i 3.5.:

$$b = \frac{\mu_{\max} \cdot e}{a} \cdot \lambda + 1 \quad (3.4.)$$

$$c = \frac{\mu_{\max} \cdot e}{a} \quad (3.5.)$$

gdje je  $\mu_{\max}$  – maksimalna specifična brzina rasta,  $h^{-1}$ ,  $e$  – prirodni logaritam,  $a$  – asimptotski porast broja živih stanica,  $\lambda$  - trajanje lag faze rasta,  $h$ . Trajanje lag faze,  $\lambda$ , za sva tri sustava procijenjeno je pomoću jednadžbe 3.6.:

$$\lambda = \frac{b-1}{c} \quad (3.6.)$$

Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom prema simpleks metodi u programskom paketu Scientist.<sup>98</sup> Rezultati dobiveni simulacijom pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih podataka i vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s rezultatima pokusa.

Za usporedbu je provedeno testiranje hipoteze o jednakosti varijanci F-testom, uz nivo signifikantnosti od 0,05. Fischer-Snedecorov F-test je statistički test koji omogućuje usporedbu eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih matematičkim modeliranjem. Nulta hipoteza testa uzima u obzir da su varijance dvaju setova podataka jednake dok kontrahipoteza uzima u obzir da su različite. Test se provodi stavljanjem varijanci u omjer prema jednadžbi 3.7.:

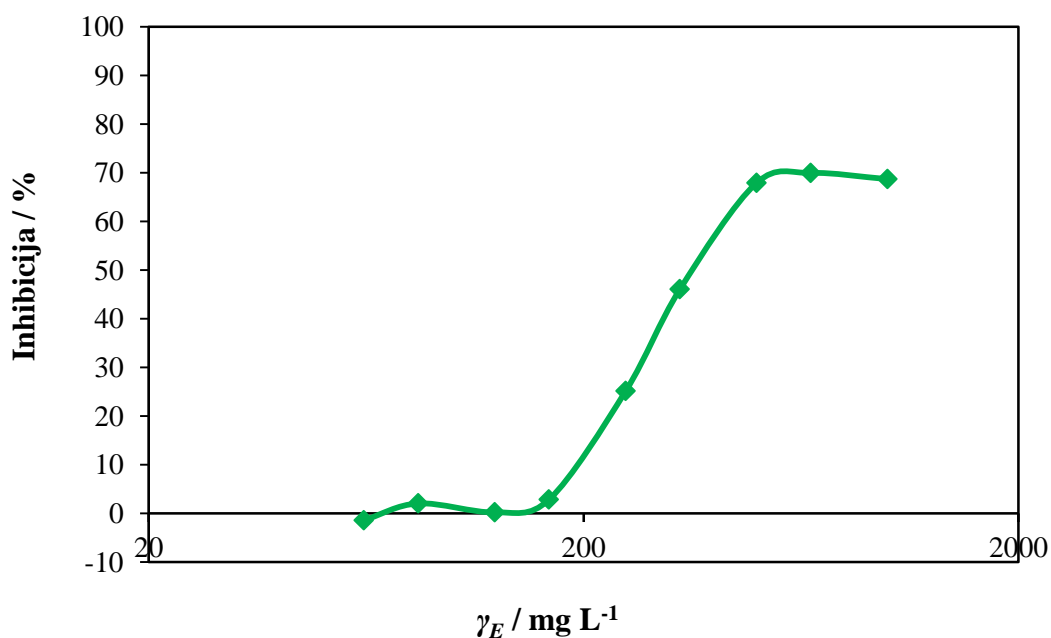
$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (3.7.)$$

gdje su  $s_1^2$  i  $s_2^2$  varijance koje se uspoređuju. Test se provodi uz pretpostavku da je  $s_1^2$  manje od  $s_2^2$ , čime se dobiva vrijednost F-testa u rasponu između 0 i 1. Približno ista vrijednost varijanci rezultira vrijednostima F bližim 1 i ukazuje na valjanost nulte hipoteze.<sup>106</sup>

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje toksičnosti eritromicina pomoću *Vibrio fischeri*

Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.1. proveden je test toksičnosti za vodenu otopinu eritromicina početne koncentracije  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  pomoću luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Rezultati su prikazani slikom 4.1. i vrijednosti parametara prikazani u tablici 4.1. procjenjene su prema opisu u poglavlju 3.2.9.



Slika 4.1. Koncentracija-odgovor krivulja za eritromicin provedbom akutnih testova toksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri*.

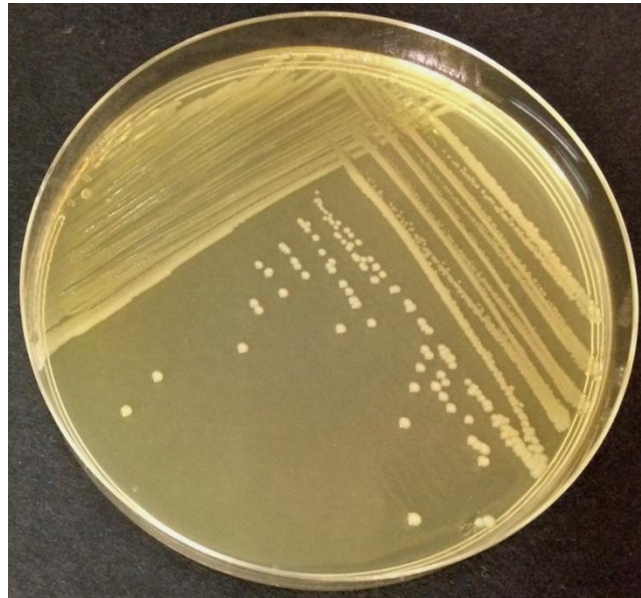
Tablica 4.1. Rezultati testova toksičnosti za eritromicin.

$EC_{50} / \text{mg L}^{-1}$	$LOEC / \text{mg L}^{-1}$	TU / -
428,80	166,67	0,23

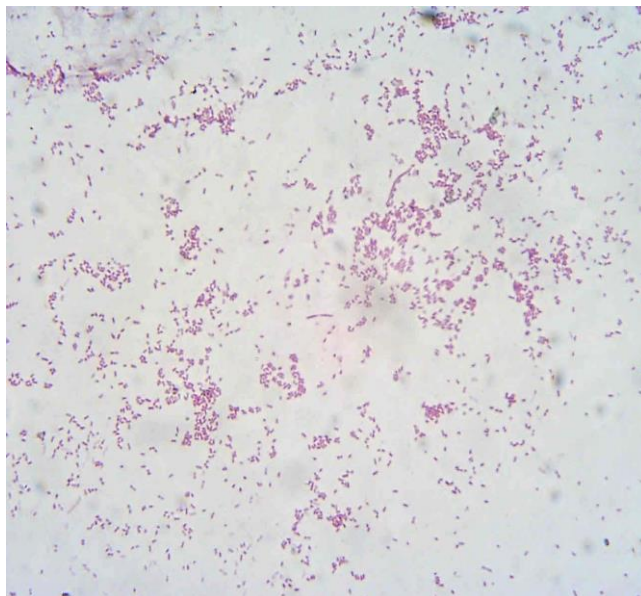


## 4.2. Identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putide*

Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2. provedena je identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putide*. Rezultati su prikazani slikama 4.2.- 4.4. te tablicom 4.2.



Slika 4.2. Fotografski snimak izrasle bakterijske kulture *Pseudomonas putide* dobivene tehnikom iscrpljivanja na *Tryptic Soy Broth*-u.

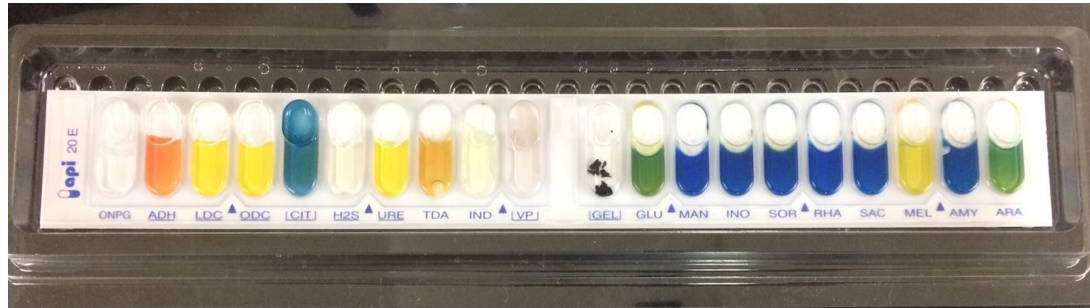


Slika 4.3. Mikrofotografija bakterijske kulture *Pseudomonas putide* obojane po Gramu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .

#### 4. Rezultati

Tablica 4.2. Rezultati provedenih testova za bakterijsku kulturu *P. putidu*.

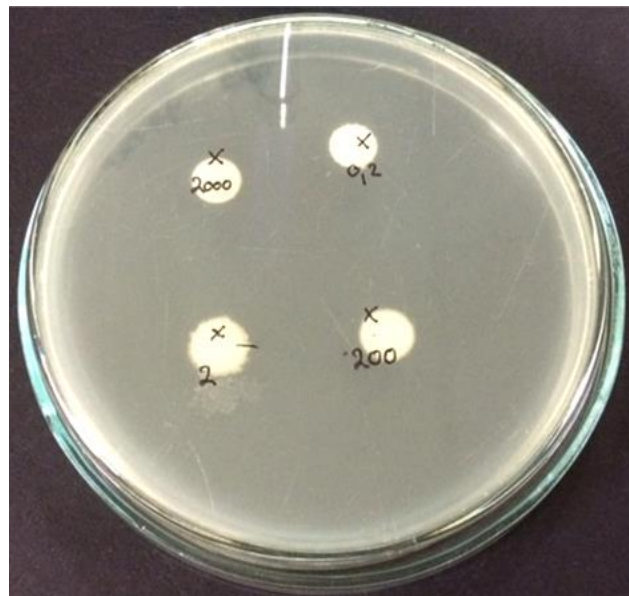
KOH	Oksidaza	Katalaza	Enzim za redukciju nitrata
+	+	+	-



Slika 4.4. Fotografiska snimka API 20E stripa pri 37°C nakon 24 sata inkubacije za bakterijsku kulturu *P. putidu*.

#### 4.3. Testovi osjetljivosti

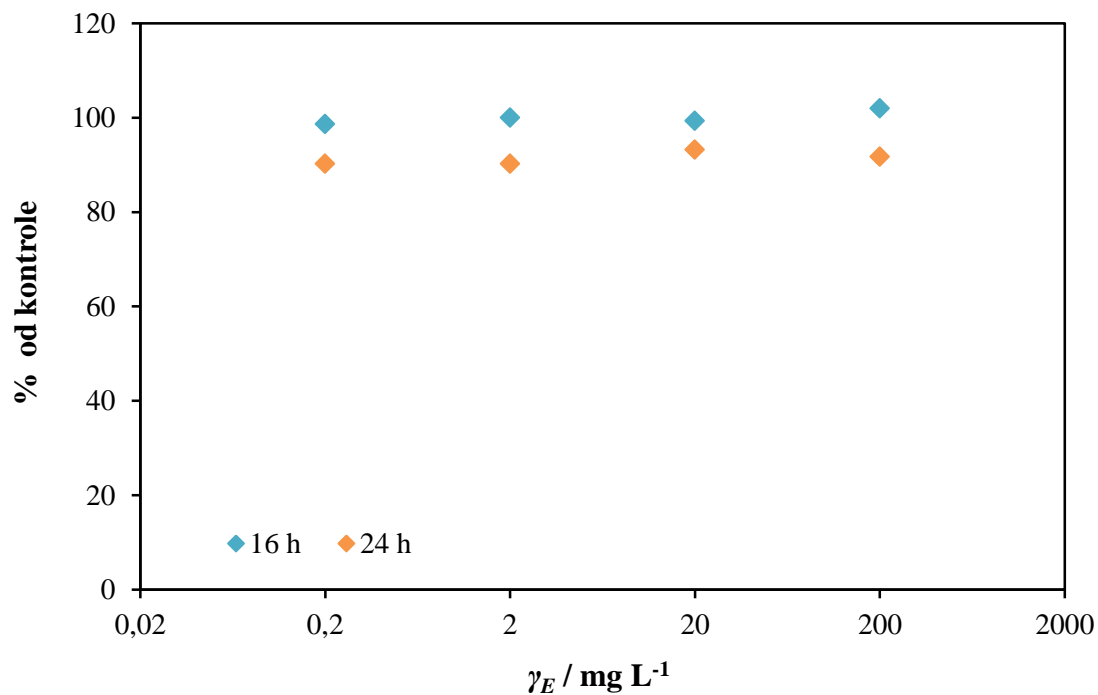
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. provedeni su testovi osjetljivosti za *P. putidu* na četiri koncentracije eritromicina. Rezultati su prikazani slikom 4.5.



Slika 4.5. Rezultati testovi osjetljivosti bakterijske kulture *Pseudomonas putide* na koncentracije eritromicina  $\gamma_{E01}$ ,  $\gamma_{E02}$ ,  $\gamma_{E04}$  i  $\gamma_{E05}$ .

#### 4.4. Proces biorazgradnje eritromicina bakterijom *P. putidom*

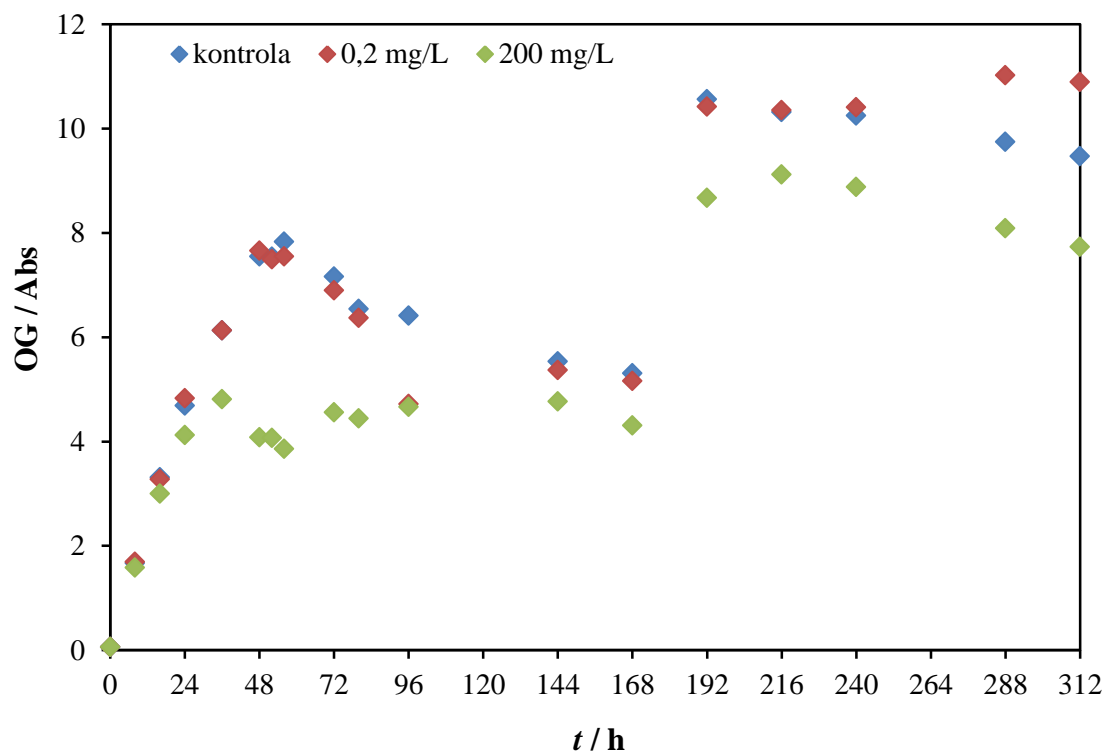
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4. proveden je proces biorazgradnje eritromicina bakterijskom kulturom *P. putidom*. Rezultati su prikazani slikom 4.6.



Slika 4.6. Promjene postotka od kontrole optičke gustoće bakterijske kulture *P. putide* za koncentracije eritromicina  $\gamma_{E01}$  -  $\gamma_{E04}$  u P1.

#### 4.5. Krivulja rasta bakterijske kulture *P. putide*

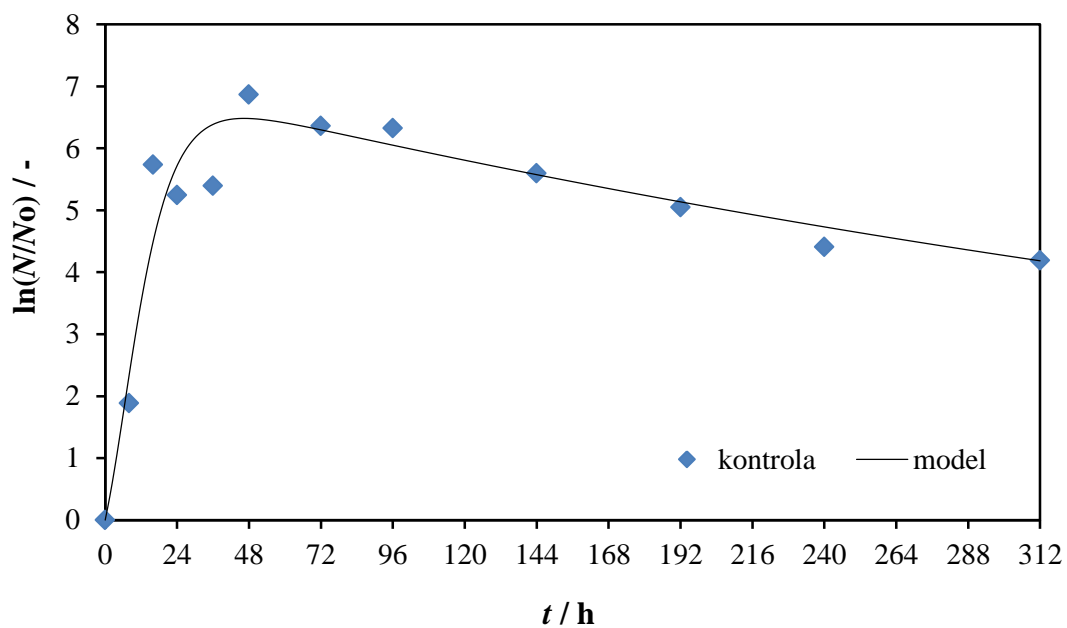
Postupcima opisanim u poglavljima 3.2.5. i 3.2.9. proveden je pokus rasta bakterijske kulture *Pseudomonas putide*. Rezultati su prikazani slikama 4.7.-4.10. te tablicom 4.3.



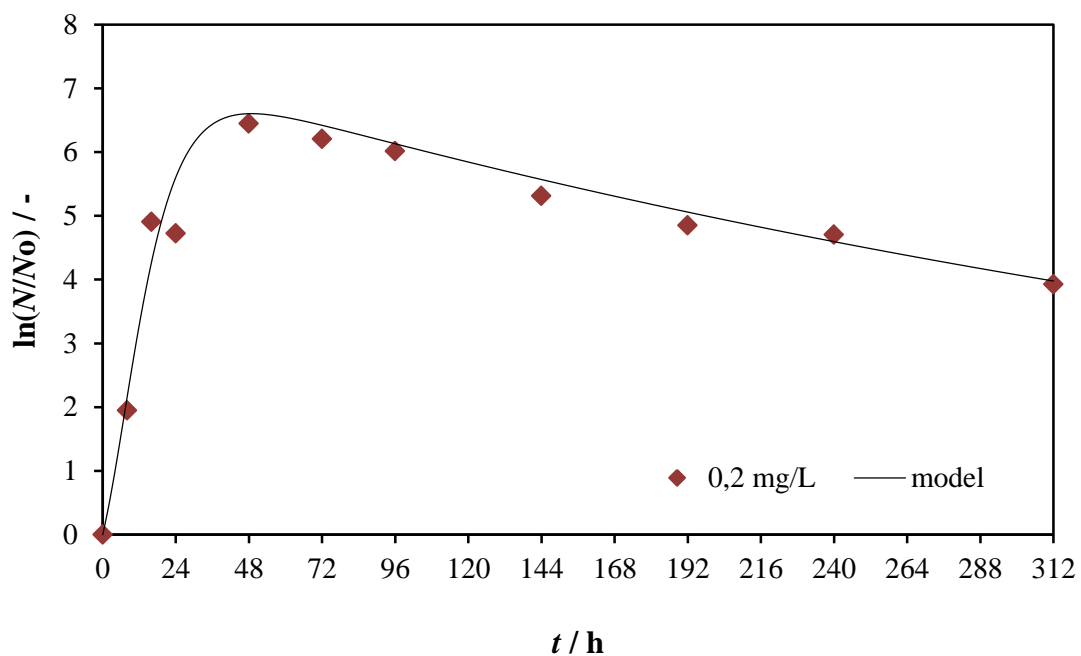
Slika 4.7. Promjena optičke gustoće *P. putide* tijekom 312 sati u P2, u kontroli te uz koncentracije eritromicina  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$ .

Tablica 4.3. Parametri Gompertz modela.

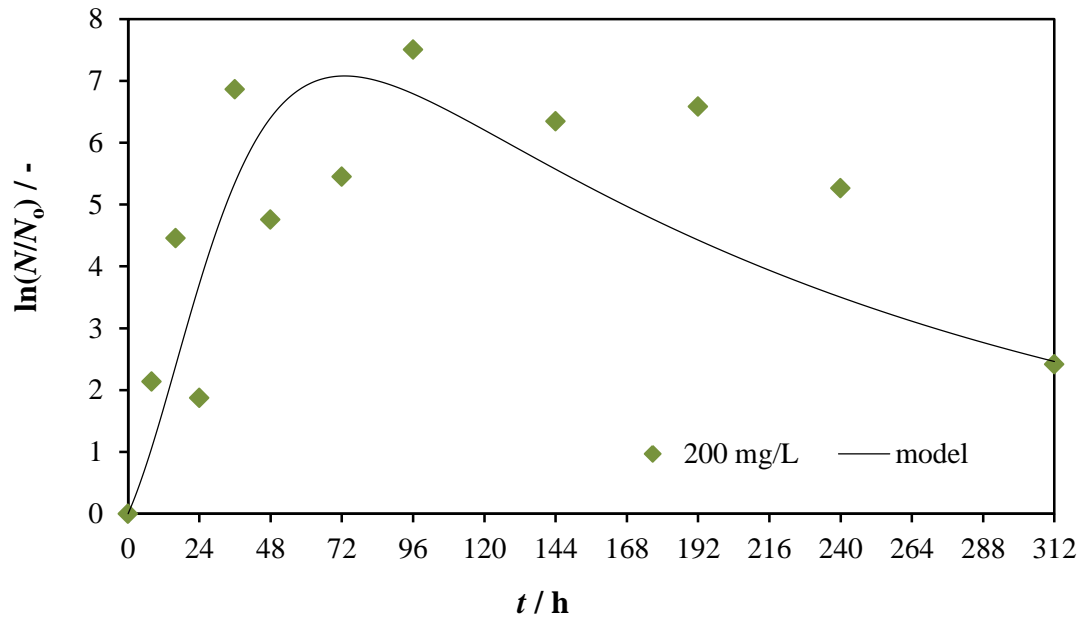
Pokus #	$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	$b / -$	$c / \text{h}^{-1}$	$k_d / \text{h}^{-1}$	F – test / -
Kontrola	0,17	0,73	0,1096	0,0017	0,96
0,2 mg L <sup>-1</sup>	0,25	0,74	0,0994	0,0020	0,94
200 mg L <sup>-1</sup>	0,22	0,86	0,0572	0,0049	0,93



Slika 4.8. Promjena logaritamskog broja živih stanica *P. putide* tijekom 312 sati u P2 za kontrolu. Usporedba rezultata pokusa i modela.



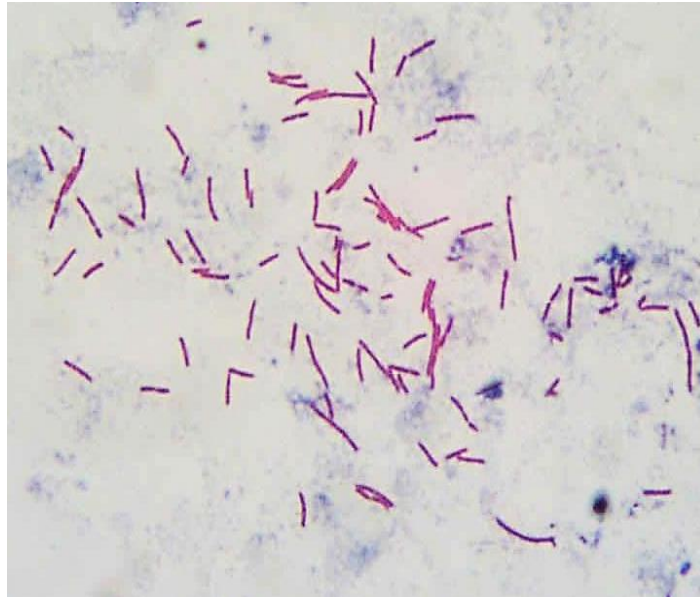
Slika 4.9. Promjena logaritamskog broja živih stanica *P. putide* tijekom 312 sati u P2 za  $\gamma_{E01}$ . Usporedba rezultata pokusa i modela.



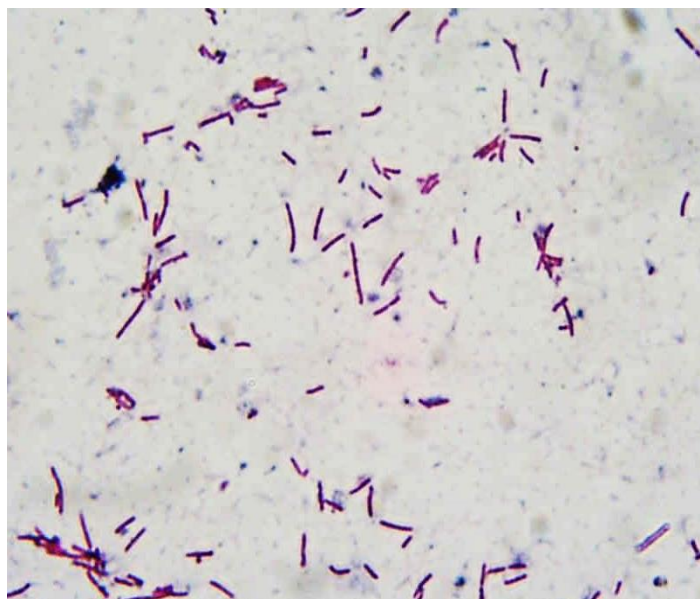
Slika 4.10. Promjena logaritamskog broja živih stanica *P. putide* tijekom 312 sati u P2 za  $\gamma_{E04}$ . Usporedba rezultata pokusa i modela.

#### 4.6. Mikroskopska analiza

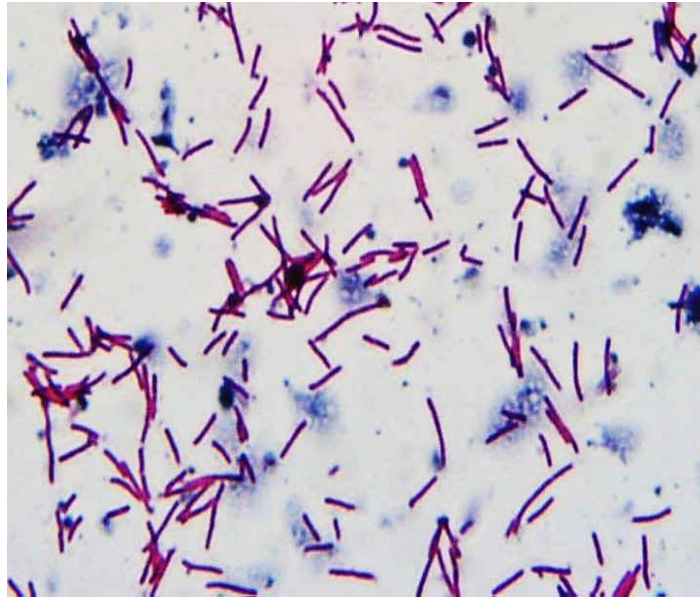
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.6. provedena je mikroskopska analiza *P. putide* tijekom pokusa rasta. Rezultati su prikazani slikama 4.11.-4.22.



Slika 4.11. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 8. satu u P2 za kontrolu snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



Slika 4.12. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 8. satu u P2 za  $\gamma_{E01}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .

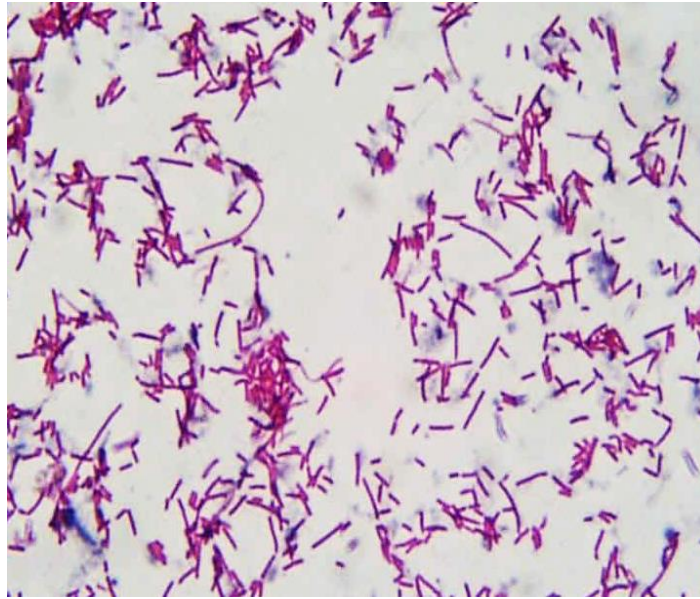


Slika 4.13. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 8. satu u P2 za  $\gamma_{E04}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .

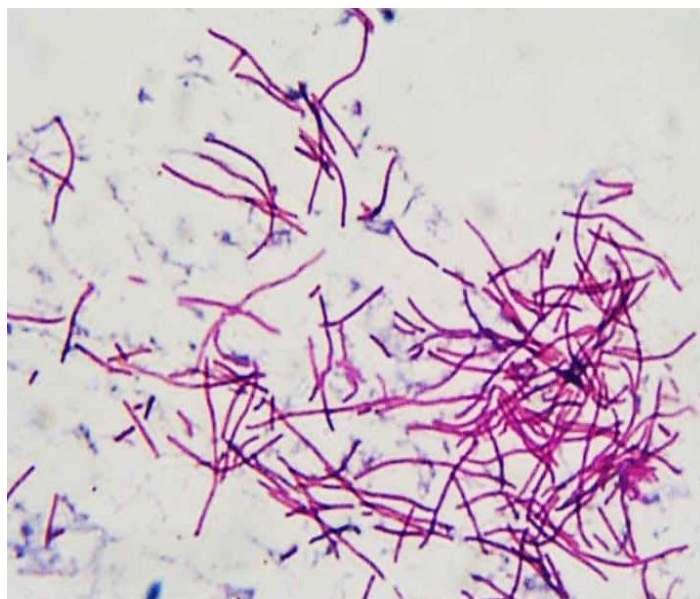


Slika 4.14. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 16. satu u P2 za kontrolu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .

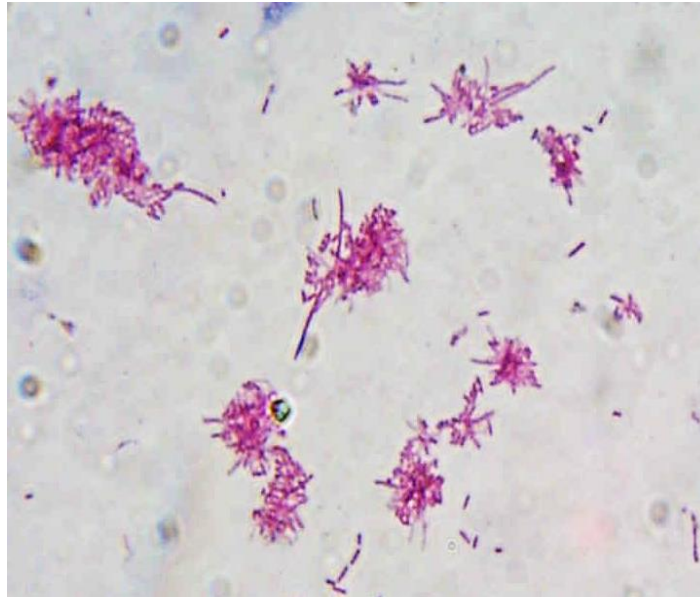




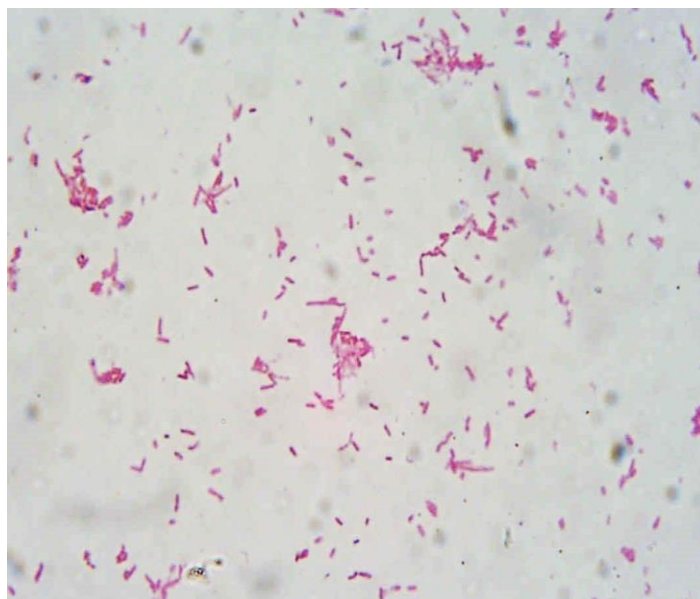
Slika 4.15. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* obojane u 16. satu u P2 za  $\gamma_{E01}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



Slika 4.16. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* obojane u 16. satu u P2 za  $\gamma_{E04}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



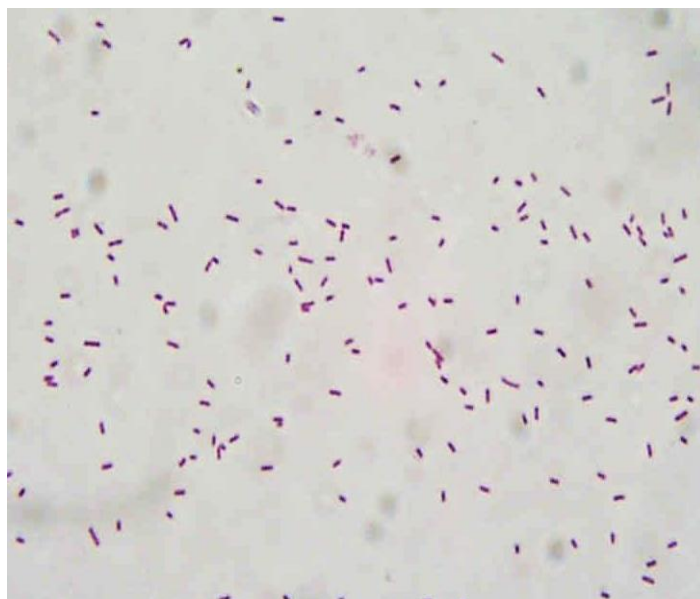
Slika 4.17. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 24. satu u P2 za kontrolu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



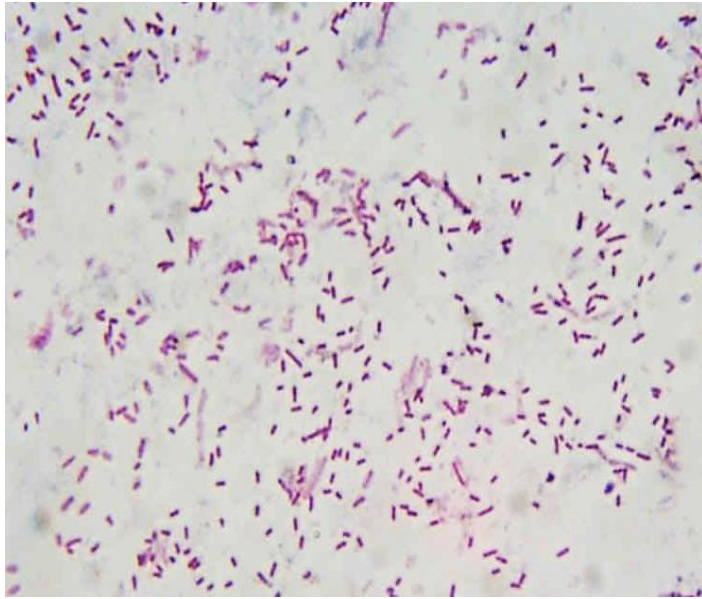
Slika 4.18. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 24. satu u P2 za  $\gamma_{E01}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



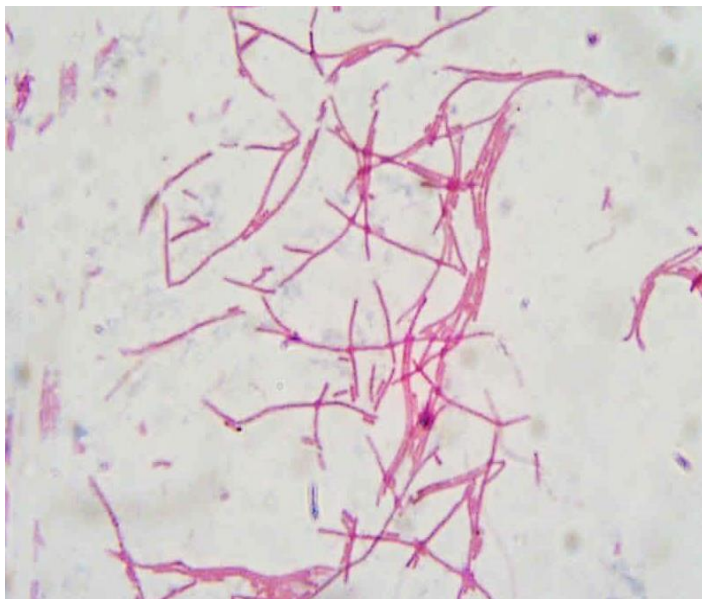
Slika 4.19. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 24. satu u P2 za  $\gamma_{E04}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



Slika 4.20. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 36. satu u P2 za kontrolu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



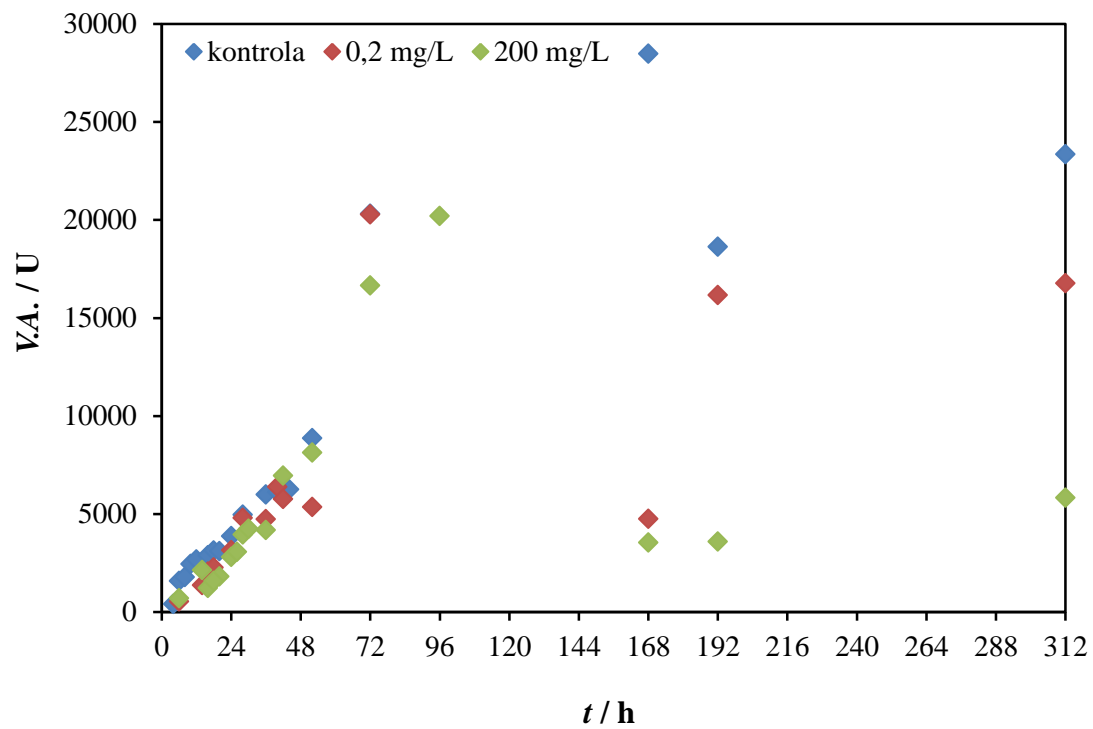
Slika 4.21. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 36. satu u P2 za  $\gamma_{E01}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .



Slika 4.22. Mikrofotografija bakterijske kulture *P. putida* u 36. satu u P2 za  $\gamma_{E04}$  eritromicina snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000 $\times$ .

#### 4.7. Aktivnost enzima esteraze

Postupcima opisanima u poglavljima 3.2.7. i 3.2.8. provedeno je određivanje aktivnosti enzima esteraze bakterijske kulture *P. putide*. Rezultati su prikazani slikom 4.23.



Slika 4.23. Promjene aktivnosti enzima esteraze bakterijske kulture *P. putide* tijekom 312 sati uzgoja bez i uz koncentracije eritromicina  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$ .

## 5. RASPRAVA

Kako zahtjevi potrošača rastu, posebice u razvijenim državama, konstantno se proizvode moderniji i učinkovitiji API-ji. Svjetska zdravstvena organizacija upozorila je na važnost razumne potrošnje lijekova jer se više od 50 % lijekova prepíše, izda ili proda na neprimjeren način. Lijekovi se mogu razgraditi na konjugirane ili hidrolizirane oblike molekula te time mogu nastati metaboliti veće biološke aktivnosti nego početne molekule.<sup>3</sup>

Od velikih količina farmaceutika koje dopijevaju u okoliš, najčešće se pronalaze antibiotici. Eritromicin je antibiotik sa znatnom potrošnjom jer se koristi i u humanoj i u veterinarskoj medicini, a tako se povećavaju izvori njegova dopijevanja u okoliš u kojem se može duže zadržavati zbog svojstva hidrofobnosti. Navodi se kao najčešće pronađen antibiotik u vodenim sustavima. Izmjerena koncentracija eritromicina u izlaznoj struji iz bolnica iznosi od 6000 ng L<sup>-1</sup> do 7545 ng L<sup>-1</sup>. U površinskim vodima maksimalna koncentracija eritromicina iznosi 3,98 µg L<sup>-1</sup>,<sup>107</sup> a pronađen je i u moru u rasponu koncentracija 0,10-16,70 ng L<sup>-1</sup>.<sup>42</sup> S obzirom na učestalost pronalaska eritromicina u okolišnim sastavnicama, uvršten je na listu prioritenih tvari čije se koncentracije u okolišu trebaju pratiti te provedbom standardiziranih testova određivati mogući utjecaj na vodene organizme. Akumulacija i otpornost antibiotika na razgradnju u okolišu može štetno utjecati na vodene i kopnene ekosustave, čak i pri niskim koncentracijama.<sup>108,109</sup>

Upravo zbog navednog, potrebno je istraživati procese uklanjanja farmaceutika, posebice antibiotika, iz okoliša. Njihovom uklanjanju pristupa se s gledišta fizikalnih, kemijskih i bioloških procesa. No zbog visoke cijene troškova ostalih procesa, biološki se procesi obrade navode kao najkorišteniji.<sup>108</sup> Eritromicin se brzo razgrađuje u tlu zahvaljujući biorazgradnji pomoću bakterije *Ochrobactrum* sp.<sup>108</sup> Bakterija *Pseudomonas putida* okolišni je mikroorganizam koji ga, također, može razgraditi.<sup>110</sup> Istraživanjima je potvrđeno da bakterije roda *Citrobacter* sp., *Klebsiella* sp. i *Vibrio* sp. pokazuju manju osjetljivost na eritromicin, a tijekom izloženosti 0,1 mg L<sup>-1</sup> eritromicina, otpornost su stekle bakterije *Campylobacter coli* i *Enterococcus faecium* te *Campylobacter jejuni* pri 0,25 mg L<sup>-1</sup>.<sup>111,112</sup>

## 5.1. Testovi toksičnosti

Svoystvo akutne toksičnosti ispitano je standardnim testom s bakterijom *Vibrio fischeri*. Smanjenje bioluminiscencije iskazano je preko postotka inhibicije u ovisnosti o ispitivanim koncentracijama eritromicina, čime je dobivena koncentracija odgovor krivulja, prikazana na slici 4.1., odnosno  $\alpha$  krivulja koja je uobičajena koncentracija odgovor krivulja za toksične tvari.<sup>113</sup> Pomoću krivulje može se ustanoviti djelovanje ispitivane tvari, sigurnost te toksičnost po vodene organizme. Porastom koncentracija eritromicina povećava se inhibicija. Pri nižim koncentracijama eritromicina uočava se odstupanje od očekivanog postotka inhibicije jer krivulja kreće od negativne vrijednosti inhibicije što ukazuje na efekt hormeze. Hormezu karakterizira stimulacija za testne organizme pri niskim koncentracijama toksične tvari, a inhibicija pri višim koncentracijama.<sup>113</sup> Pretpostavlja se da dolazi do porasta luminiscencije uzorka s eritromicinom u odnosu na kontrolu te se tako dobiva negativni postotak inhibicije. Različiti su navodi o stimulacijskom učinku eritromicina na *Vibrio fischeri*. Prema literaturi,<sup>113</sup> eritromicin može uzrokovati između 100-1000 puta interspecijskih razlika, što znači da različito utječe na testne organizme. Utjecaj eritromicina na bakteriju *Vibrio fischeri* uočava se preko smanjenja bioluminiscencije uslijed inhibicije enzima luciferaze koji je odgovoran za to fiziološko svojstvo i djelovanja eritromicina na regulacijski mehanizam koji kontrolira ekspresiju gena, tzv. „quorum sensing“.<sup>114</sup> S obzirom na provedene testove na dafnije, alge i ribe, kao najosjetljiviji testni organizmi na eritromicin navode se alge i dafnije.<sup>50,113</sup> Bakterija *Vibrio fischeri* ubraja se u proteobakterije te se očekuje da će zbog prokariotske građe biti osjetljivija na eritromicin. No, *Vibrio fischeri* se navodi kao slabije osjetljiv testni organizam na ispitivani makrolid, što objašnjava dobivene visoke koncentracije toksičnosti. Slabija osjetljivost se objašnjava s obzirom na to da je *Vibrio fischeri* Gram negativna bakterija, a eritromicin djeluje na Gram pozitivne bakterije.<sup>115</sup> *Vibrio fischeri* posjeduje i enzim esterazu,<sup>116</sup> čime se pretpostavlja otpornost i prilagodljivost bakterije uslijed izloženosti na eritromicin.

U tablici 4.1. prikazani su rezultati testova toksičnosti, koji su dobiveni prema opisu u poglavlju 3.2.9. Inhibicija 50 % izložene populacije *Vibrio fischeri* ili  $EC_{50}$  vrijednost za eritromicin, iznosi 428,80 mg L<sup>-1</sup>. Prema podjeli  $EC_{50}$  vrijednosti, napisanoj u poglavlju 2.1.1., eritromicin se klasificira kao neštetan za vodene organizme jer je  $EC_{50}$  vrijednost veća od 100 mg L<sup>-1</sup>. Akutna toksičnost za eritromicin

iznosi u rasponu od 10 do 30 mg L<sup>-1</sup> za alge, rotifere, račiće, no za bakteriju *Vibrio fischeri* nije primijećen utjecaj ni pri maksimalnoj koncentraciji od 100 mg L<sup>-1</sup>.<sup>31</sup> Stoga se za *Vibrio fischeri* navodi EC<sub>50</sub> vrijednost veća od 100 mg L<sup>-1</sup> tijekom povodenja akutnog testa toksičnosti unutar 5, 15 i 30 minuta.<sup>31</sup> Navodi se da je potreban duži period izlaganja bakterije *Vibrio fischeri* eritromicinu kako bi se dobio relevantniji podatak o učinku eritromicina kao kada bi se našao u okolišu. Upitno je da li se akutnim testovima toksičnosti ukazuje na mehanizam djelovanja eritromicina na organizme ili predstavljaju baznu liniju toksičnosti. Naime, akutna toksičnost podrazumijeva vrijeme provedbe testa toksičnosti u trajanju od 5, 15 ili 30 minuta, što ipak nije dovoljno duga izloženost da bi se dobili relevantni rezultati toksičnosti.<sup>105</sup> Relativna se toksičnost, TU, računa prema formuli 3.1. i dobiva se vrijednost 0,23 te se eritromicin može klasificirati kao slabo toksičan (tablica 4.1.). Eritromicin je, prema provedenim testovima na algama i cijanobakterijama, klasificiran kao vrlo toksičan za vodeni svijet.<sup>31</sup> TU je proporcionalna s toksičnošću i ukazuje kakav može biti utjecaj ispitivane tvari na vodene organizme ukoliko dospije u okoliš. Naime, što je viša vrijednost TU, veća je i toksičnost ispitivane tvari. Najniža koncentracija kod koje se uočava utjecaj eritromicina na bakteriju *Vibrio fischeri* je LOEC. Početna se koncentracija od 2000 mg L<sup>-1</sup> razrijeđivala prema linearnom nizu te je LOEC ona koncentracija od koje kreće linearni porast inhibicije. Prema slici 4.1. i tablici 4.1., radi se o koncentraciji 166,67 mg L<sup>-1</sup> uz inhibiciju od 2,84 %. LOEC za eritromicin na *Vibrio fischeri* iznosi >100 mg L<sup>-1</sup> što upućuje na visoku toksičnu koncentraciju, koja se slaže s dobivenim rezultatima.<sup>34</sup> Usporedbe radi, LOEC za cijanobakterije i zelene alge iznosi 0,02 mg L<sup>-1</sup>,<sup>31</sup> što potvrđuje različitu osjetljivost testnih organizama na istu tvar.

Rezultati dobiveni po standardnim akutnim testovima toksičnosti podrazumijevaju rizik eritromicina na okolišne mikroorganizme. S obzirom na dostupne podatke za toksičnost, eritromicin se ubraja među najviše istraživane molekule.<sup>107</sup> Makrolidi su toksični i za račiće *Daphnia*, koji su bioindikatori onečišćenja voda, što ukazuje na značajan rizik za okoliš. Prema literaturi dobiven je RQ u iznosu od 3,10,<sup>117</sup> što je vrijednost veća od 1 te predstavlja visoki rizik po okoliš, odnosno ukazuje na mogući toksičan utjecaj eritromicina na vodene organizme u okolišu.<sup>42,43</sup> Prema vrijednostima RQ makrolidi se navode kao najštetniji u okolišu.<sup>31</sup> U svrhu cjelokupnog djelovanja eritromicina, posebice pri nižim koncentracijama na vodene organizme, poželjno je istraživanjem biomarkera uočavati



novonastale promjene. Također, u vodenom okolišu prevladava smjesa farmaceutika različitih terapijskih svrha, njihovih metabolita i transformacijskih produkata. Tako su mogući sinergistički i aditivni učinci, kao i veća toksičnost u odnosu na same komponente.<sup>31,113</sup>

### 5.2. Identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putida*

Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* izolirana je iz otpadne vode farmaceutske industrije. Uzgojena je na *Tryptic soy broth*-u na kojem je tehnikom iscrpljivanja dobivena čista bakterijska kultura (slika 4.2.) koja je korištena za daljnje testove identifikacije. Provedeno je bojanje po Gramu gdje se standardiziranim postupkom provedbe utvrdilo kako se radi o gram negativnoj bakteriji.<sup>118</sup> Različiti sojevi bakterija reagiraju drugačije tijekom bojanja po Gramu, a najčešće zbog različite debljine stanične stijenke. Tako je postignuta klasifikacija prema strukturi stanične stijenke jer Gram pozitivne imaju deblju staničnu stijenku sačinjenu od 95 % peptidoglikana, dok Gram negativne bakterije tanju od samo 5 % peptidoglikana. Iz tog razloga prilikom bojanja, kod gram negativnih bakterija etanol razara vanjski lipopolisaharidni sloj pri čemu se kristal violet-jod kompleks ispire kroz tanki sloj peptidoglikana te se stanice odboje i ponovno oboje safraninom, nakon čega su obojane crveno.<sup>97,118</sup> Mikroskopskom analizom uočene su stanice štapičastog oblika što se može vidjeti iz slike 4.3.

Proveden je i KOH test kojim se ispituje da li je istraživana bakterijska kultura gram negativna ili gram pozitivna. Budući da je prilikom miješanja mikrobne kulture s 3 % KOH na predmetnici s mikrobiološkom ušicom i njenim podizanjem došlo do nastanka vlakana, rezultat navedenog testa je pozitivan (tablica 4.2.), čime se potvrđuje da je ispitivana bakterijska kultura gram negativna.<sup>118</sup> U tablici 4.2. prikazani su i rezultati provedenih biokemijskih testova kako bi se odredila prisutnost ili odsutnost enzima oksidaze, katalaze i enzima za redukciju nitrata u ispitivanoj bakterijskoj kulturi. Testovi oksidaze i katalaze dali su pozitivan rezultat budući da se prilikom ispitivanja oksidaze pojavilo purpurno obojenje, dok su se prilikom testa na katalazu pojavili mjehurići plina. Test enzima za redukciju nitrata bio je negativan budući da nije došlo do pojave ružičastog obojenja što je znak odsutnosti nitratazne aktivnosti.<sup>97</sup>

Za identifikaciju bakterijske kulture korišten je API strip 20E. Na slici 4.4. prikazani su dobiveni rezultati nakon inkubacije iz kojih je utvrđeno da se radi o bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida* s visokom vjerojatnošću od 96,7 %. S obzirom na bogati enzimatski sustav bakterije *Pseudomonas putida*, posjedovanje enzima eritromicina esteraze, kao i mehanizam višestruke obrane, smatra se pogodnom za biorazgradnju eritromicina.<sup>43,119</sup>

### 5.3. Testovi osjetljivosti

Prije provedbe pokusa biorazgradnje, provedeni su testovi osjetljivosti izlaganjem bakterijske kulture *Pseudomonas putide* eritromicinu. Uslijed izlaganja bakterijske kulture *Pseudomonas putida* koncentracijama eritromicina  $\gamma_{E01}$ ,  $\gamma_{E02}$ ,  $\gamma_{E04}$  i  $\gamma_{E05}$  nisu uočene zone inhibicije, što se može vidjeti na slici 4.5. To ukazuje da je *Pseudomonas putida* otporan na djelovanje eritromicina.<sup>120</sup> Bakterija *Pseudomonas putida* je Gram negativna bakterija, a eritromicin je antibiotik koji djeluje na Gram pozitivne bakterije. Otpornost bakteriji omogućava i enzim eritromicin esteraza, kao i crpka koja služi za regulaciju koncentracije antibiotika unutar stanice. Smanjenje permeabilnosti stanične membrane *Pseudomonas putida* postiže izlučivanjem EPS-a te i na taj način regulira koncentraciju eritromicina unutar stanice. Maksimalna inhibicijska koncentracija eritromicina za Gram negativne bakterije je 100 puta veća nego kod Gram pozitivnih što ukazuje na njihovu nepropusnost membrane za eritromicin.<sup>121</sup>

### 5.4. Proces biorazgradnje eritromicina bakterijom *P. putidom*

S obzirom na rezultate testova osjetljivosti prikazanima u poglavlju 4.3., proveden je proces biorazgradnje eritromicina u šaržnim i submerznim uvjetima. Slika 4.6. pokazuje postotak od kontrole optičke gustoće u ovisnosti s logaritamskim koncentracijama eritromicina. Praćena je optička gustoća tijekom 16. i 24. sata izloženosti *Pseudomonas putide* rasponu koncentracija eritromicina  $\gamma_{E01}$ -  $\gamma_{E04}$ . Uočava se da porastom koncentracija eritromicina nema izražene inhibicije *Pseudomonas putide* što ukazuje na moguću biorazgradnju eritromicina. Na slici 4.6. prikazane su vrijednosti smanjenja optičkih gustoća za 16. i 24. sat. Vrijednost optičke gustoće u 16. satu se nije značajno mijenjala za ispitivane koncentracije eritromicina. U 24. satu

provedbe procesa biorazgradnje, optička gustoća kontrole bila je niža usporedno sa 16. satom. U ovome satu, prema slici 4.6., vidljivo je smanjenje optičke gustoće, pri koncentraciji  $\gamma_{E04}$  kada je postignuto najveće smanjenje optičke gustoće u odnosu na kontrolu te je postotak od kontrole za navedenu koncentraciju eritromicina iznosio 91,73 %, što je s obzirom na 16. sat manje za 7,60 %.

Najveće smanjenje optičke gustoće od kontrole zbilo se pri dvije koncentracije eritromicina i to u 16. satu pri  $\gamma_{E03}$ , a u 24. satu pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji eritromicina od  $\gamma_{E04}$ . Uspoređujući 16. i 24. sat, više vrijednosti postotka optičke gustoće od kontrole su postignute u 16. satu, dok su vrijednosti niže u 24. satu za sve ispitivane koncentracije eritromicina. Koncentracije eritromicina  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E02}$  se ponašaju približno jednako kontroli u svim satima, što upućuje da su to ipak preniske koncentracije da bi uzrokovale značajne utjecaje na bakteriju *Pseudomonas putidu*. Veće smanjenje optičke gustoće počinje se događati pri  $\gamma_{E03}$  i  $\gamma_{E04}$ , a najveća razlika, između ova dva sata uočava se pri koncentraciji eritromicina  $\gamma_{E04}$ . Dakle, duljim izlaganjem *P. putide* eritromicinu i pri višoj koncentraciji dolazi do blago toksičnog utjecaja. Uspoređujući ova dva sata provedbe procesa biorazgradnje nije došlo do značajnog pada optičke gustoće, odnosno do odumiranja bakterijske kulture. Stoga se pretpostavlja da eritromicin bakteriostatski djeluje na *P. putidu*.<sup>122</sup> Eritromicin joj može služiti kao izvor ugljika koji joj je neophodan za rast, ali i kao izvor dušika s obzirom na njegovu strukturu (tablica 2.2.).<sup>83</sup> Rezultati ukazuju na otpornost bakterijske kulture, kao i na prilagodljivost uslijed izlaganja eritromicinu.

### 5.5. Krivulja rasta bakterijske kulture *P. putide*

Proveden je pokus krivulje rasta bakterijske kulture *Pseudomonas putide* u šaržnim i submerznim uvjetima tijekom 312 sati (poglavlje 3.2.5.). Iz raspona koncentracija eritromicina ispitivanih u procesu biorazgradnje izabrane su dvije koncentracije  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$  kako bi se uvidio utjecaj eritromicina na rast *Pseudomonas putide* pri vrlo niskoj i visokoj koncentraciji.

Promjena optičke gustoće i broja živih stanica za kontrolnu otopinu prate isti trend, što je prikazano na slikama 4.7. i 4.8. Nakon 8. sata kreće eksponencijalna faza rasta *Pseudomonas putide* i rast vrijednosti optičke gustoće do 48. sata.<sup>123</sup> Nadalje dolazi do pada optičke gustoće do 168. sata te ponovni rast optičke gustoće od 192. sata. Eritromicin je antibiotik koji djeluje na bakterije u njihovoj eksponencijalnoj fazi

rasta te nakon te faze dolazi do smanjenja optičke gustoće. Procesom biorazgradnje je prikazano da se bakterija uslijed dužeg izlaganja eritromicinu prilagođava novonastalim uvjetima, što možemo primijetiti i u ovome pokusu. Naime, nakon pada optičke gustoće slijedi njen porast što se može protumačiti raspadom biomase, koji se uočava i po mikrofotografijama jer se nakon 36. sata uočavaju vrlo sitni štapići bakterijske kulture, što je opisano u poglavlju 5.6.

Prema slici 4.7., uspoređujući kontrolu u kojoj nema eritromicina i nižu koncentraciju eritromicina  $\gamma_{E01}$ , uočava se da su male razlike u vrijednostima optičkih gustoća. Odnosno, vrlo su mala odstupanja, što ukazuje da je to navedena koncentracija eritromicina nema toksični utjecaj na bakteriju *Pseudomonas putidu*. Uspoređujući kontrolu,  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$ , najniže vrijednosti optičke gustoće vidljive su u sustavu s  $\gamma_{E04}$ . Nadalje, uspoređujući sustav  $\gamma_{E04}$  s kontrolom uočavaju se veće razlike između optičkih gustoća. Prosječno se razlikuju za 1,63. Također, bitno je spomenuti da optička gustoća u sustavu s  $\gamma_{E04}$ , raste do 36. sata nakon čega slijedi pad vrijednosti uz manje varijacije do 168. sata. Porast optičkih gustoća u druga dva sustava traje do 48. sata. Time eksponencijalna faza traje 24 sata kraće u sustavu s najvišom koncentracijom eritromicina. To upućuje na toksični utjecaj eritromicina na *Pseudomonas putidu* te potvrđuje i rezultate procesa biorazgradnje jer se najveće smanjenje postotka od kontrole uočava pri koncentraciji eritromicina  $\gamma_{E04}$ .

Proučavanje dinamike promjena broja živih u sustavima postiže se matematičkim modeliranjem. U svrhu lakšeg prikazivanja i razumijevanja bioloških promjena, koji su rezultat međusobnih djelovanja različitih čimbenika, koriste se kinetički modeli.<sup>71,124</sup> Korišteni kinetički model za prikaz rasta broja živih stanica je Gompertz model, prikazan jednačinom (5.1.):<sup>124,125</sup>

$$N = N_o \cdot e^{(e^b - e^{(b-c)t})} \quad (5.1.)$$

gdje je  $N$  – broj živih stanica u vremenu  $t$  izražena preko  $\ln(N/N_o)$ ,  $N_o$  – početna vrijednost broja živih stanica u  $t=0$ ,  $b$  – konstanta koja je procjenjena prema formuli 3.4.,  $c$  – konstanta za čiju je procjenu korištena formula 3.5.,  $h^{-1}$ ,  $\mu_{\max}$  – maksimalna specifična brzina rasta,  $h^{-1}$ ,  $a$  – asimptotski porast vrijednosti broja živih stanica,  $\lambda$  – vrijeme trajanja lag faze rasta,  $h$ , i  $k_d$  – konstanta odumiranja živih stanica,  $h^{-1}$ .

Promjena broja živih stanica, odnosno  $\ln(N/N_0)$ , izražena je jednadžbom 5.2.:

$$\frac{dN}{dt} = r_N = (c \cdot e^{(e^b - e^{(b-c)t})} \cdot e^{(b-c)t}) - (k_d \cdot N) \quad (5.2.)$$

gdje su  $r_N$  – brzina rasta broja živih stanica, g  $L^{-1} h^{-1}$ ,  $t$  – vrijeme, h.

Gompertzovim modelom su procijenjeni parametri. Optimiranjem parametara dobivene su vrijednosti  $\mu_{\max}$ ,  $b$ ,  $c$  i  $k_d$  (tablica 4.3.). Dobivene vrijednosti parametara dalje su korištene zajedno s pretpostavljenim modelom (jednadžbe 5.1. i 5.2.) za simulaciju promjene broja živih stanica u šaržnom reaktoru. Dobivene vrijednosti procijenjenih parametara za  $\mu_{\max}$ ,  $b$  i  $c$  približne su vrijednostima prema literaturnim podacima.<sup>126,127</sup> Kako bakterije rastu eksponencijalno, može se u ovisnosti prikazati  $\ln(N/N_0)$  i vrijeme. Model obuhvaća četiri faze rasta bakterije koje su opisane parametrima: lag faza preko  $\lambda$  koje označava vrijeme trajanja lag faze,  $\mu_{\max}$  koji je definiran kao nagib tangente na točku infleksije na eksponencijalni dio krivulje, odnosno log fazu rasta,  $a$  je najviša postignuta vrijednost broja živih stanica što ukazuje na stacionarni rast i  $k_d$  koja podrazumijeva zadnju fazu, smanjenje broja živih stanica.<sup>124,128</sup> Prema tablici 4.3., vrijednost  $\mu_{\max}$  je najniža za kontrolu,  $\mu_{\max} = 0,17 h^{-1}$ . Najviša se postiže u sustavu s  $\gamma_{E01}$ ,  $\mu_{\max} = 0,25 h^{-1}$ , dok je vrijednost ovog parametra za  $0,03 h^{-1}$  niža za sustav s  $\gamma_{E04}$  u odnosu na  $\gamma_{E01}$ . To se može objasniti boljim rastom *P. putida* pri nižim koncentracijama toksičnih tvari.<sup>129</sup> Na vrijednosti maksimalne specifične brzine rasta, utjecaj imaju i uvjeti provedbe pokusa. Bakterija *P. putida* je uzgajana na TSB-u, na izrazito bogatoj podlozi hranjivim tvarima, među kojima je i glukoza, a takvi uvjeti potiču proizvodnju enzima.<sup>130</sup> Glukoza, kao lakši i alternativni supstrat, predstavlja za *P. putidu* izvor ugljika i energije, što povećava njenu metaboličku aktivnost pa i učinkovitost razgradnje eritromicina.<sup>119,131</sup> Po principu kometabolizma, nakon razgradnje glukoze, stanice su potaknute na iskorištavanje eritromicina kao supstrata te brže odumiru zbog njegovog mogućeg toksičnog utjecaja ili prisutnosti razgradnih produkata. Uslijed toksičnog utjecaja može doći do inhibicije rasta živih stanica, kao i smanjenja aktivnosti enzima, ovisno o uvjetima u sustavu (temperaturi i pH-vrijednosti koji se tijekom razgradnje mijenjaju).<sup>131,132</sup> Vrijednosti konstante  $b$  od 0,73 za kontrolu, tablica 4.3., i  $\gamma_{E01}$  koncentraciju eritromicina  $b = 0,74$  neznatno se razlikuju, dok je najviša vrijednost postignuta u sustavu s  $\gamma_{E04}$  eritromicina u kojem je iznosila 0,86. Za vrijednosti konstante  $c$  vrijedi suprotno. Najniža se vrijednost od  $0,0572 h^{-1}$  uočava pri  $\gamma_{E04}$  eritromicina, a približni su iznosi postignuti za

kontrolu,  $c = 0,1096 \text{ h}^{-1}$  i  $\gamma_{E01}$  eritromicina u iznosu  $0,0994 \text{ h}^{-1}$ . S obzirom na navedeno, kontrola i niža koncentracija eritromicina ponašaju se slično. Veća odstupanja u odnosu na te sustave uočavaju se pri višoj koncentraciji eritromicina, što dodatno upućuje na toksični utjecaj eritromicina na *Pseudomonas putidu*. S obzirom na jednadžbe 3.4. i 3.5., na vrijednosti konstanti  $b$  i  $c$  utječu  $\mu_{\max}$  i  $a$ , ali dodatno  $b$  ovisi i o vremenu trajanja lag faze. Što je dulje vrijeme lag faze, to je  $c$  manji jer je ovisnost obrnuto proporcionalna, kakva je i međusobna ovisnost konstanti  $b$  i  $c$ , kako se može uočiti u tablici 4.3. Nadalje, na njihove vrijednosti utječe i promatrani sustav. Treba napomenuti da vrijednosti parametara ovise o vrsti mikroorganizma, trajanju lag faze, modifikaciji Gompertz modela, kao i eksperimentalnim podacima (optička gustoća ili broj živih stanica) koji se koriste za procjenu parametara. Da se broj živih stanica brže smanjuje u sustavima uz dodatak eritromicina, ukazuju više vrijednosti konstante odumiranja,  $k_d$ , što ujedno i indicira na bržu izmjenu faza rasta mikroorganizama.<sup>71</sup> Najviša vrijednost konstante odumiranja,  $k_d = 0,0049 \text{ h}^{-1}$ , postignuta je pri višoj koncentraciji eritromicina, dok je najniža u kontroli,  $k_d = 0,0017 \text{ h}^{-1}$ . Pri  $\gamma_{E01}$  eritromicina, konstanta odumiranja je za  $0,0029 \text{ h}^{-1}$  niža usporedno s najvišom vrijednošću. Najviša vrijednost  $k_d$  u sustavu s  $\gamma_{E04}$  eritromicina, također, potvrđuje inhibicijski utjecaj na bakteriju *P. putidu*. Prema literaturi,<sup>129,130</sup> navodi se inhibicijski utjecaj na *Pseudomonas putidu* i bakterije roda *Pseudomonas* pri višim koncentracijama organskih onečišćujućih tvari.

Na slikama 4.8.-4.10. prikazani su grafovi ovisnosti logaritamskog omjera živih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas putide* tijekom 312 sati. Vidljivo je smanjenje broja živih stanica tijekom provedbe pokusa krivulje rasta u sva tri sustava. Uspoređujući promjenu broja živih stanica i optičke gustoće u sustavu s  $\gamma_{E04}$ , (slike 4.7. i 4.10.), uočava se isti trend. Unutar prvih 36 sati, broj živih stanica raste, nakon čega slijedi pad do 96. sata, u kojem je postignuta najviša vrijednost živih stanica, ali i optičke gustoće. Ponovni rast optičke gustoće postiže se u 192. satu, kao i broj živih stanica. To ukazuje da eritromicin djeluje na bakteriju *Pseudomonas putida* tijekom njenog logaritamskog rasta, odnosno tijekom prvih 36 do 48 sati te nakon toga slijedi pad živih stanica. Ponovni rast optičke gustoće uz daljnje smanjenje broja živih stanica označava odumiranje biomase. Prema literaturi,<sup>93</sup> uslijed izloženosti toksičnih tvari na bakterije, mogući je i gubitak staničnog adenozin tri fosfata, ATP-a, koji je energetske pokretač stanice. Narušavanjem energetske potencijala, bakterije aktiviraju obrambene crpke koje izbacuju toksične tvari iz stanice. Za njihov je rad

potrebna energija te tako ona ne može biti iskorištena za rast bakterije te dolazi do pada optičke gustoće, kao i broja živih stanica. U sustavu bez eritromicina, također, dolazi do pada optičke gustoće. Pri bržem rastu bakterijske kulture, smanjuje se proizvodnja ATP-a što upućuje na visoko energetske iskorištavanje supstrata kao izvora ugljika. Supstrat u ovome sustavu je izričito bogata podloga TSB.<sup>93</sup>

Na slikama 4.8.-4.10. vidljivo je kako su rezultati pokusa dobro opisani Gompertzovim modelom. Visoke vrijednosti F-testa (jednadžba 3.7.) prikazane su u tablici 4.3. Vidljivo je kako su rezultati testa blizu vrijednosti 1 na temelju čega se može ustanoviti kako model dobro opisuje promjenu broja živih stanica u svim pokusima.

### 5.6. Mikroskopska analiza

Mikroskopska analiza provedena je kako bi se uočile promjene morfologije bakterijskih stanica. Tijekom praćenja kontrole i dvije koncentracije eritromicina,  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$ , uočen je utjecaj eritromicina na morfologiju bakterije *Pseudomonas putide*. Prikazane su mikrofotografije u 8., 16., 24. i 36. satu, što su sati eksponencijalne faze rasta bakterije tijekom koje su zamijećene značajne promjene u morfologiji stanica bakterije *Pseudomonas putide*.

U 8. satu kreće eksponencijalna faza rasta bakterije *Pseudomonas putide*, gdje se na slici 4.11. uočavaju kratke bakterijske stanice štapićastog oblika. U istome satu, ali pri izloženosti koncentraciji eritromicina  $\gamma_{E01}$ , na slici 4.12. vidljivi su veći štapići. U sustavu s  $\gamma_{E04}$ , štapići su znatno veći, stanice su izduženije i tanje u odnosu na kontrolu (slika 4.13.).

U kontroli tijekom 16. sata (slike 4.14.-4.16.) uočavaju se manji štapići, ali uz prisutnost većih koji nalikuju kao da su spojeni u lance. U sustavu s  $\gamma_{E01}$  vidljivo je povećanje gustoće stanica te uz ponešto manjih štapića, prevladavaju izdužene stanice bakterijske kulture *Pseudomonas putide*. Izdužene stanice prevladavaju pri koncentraciji eritromicina  $\gamma_{E04}$ . Zabilježeno je produženje stanice *Pseudomonas aeruginosa* nakon kontakta s eritromicinom.<sup>133,134</sup> Do izduženja bakterijskih stanica dolazi jer eritromicin djeluje na proteine koji reguliraju sastavljanje stanične stijenke bakterija. Pri tome dolazi do rupičaste stanične stijenke, odnosno do povećane permeabilnosti iste, što dopušta da eritromicin lakše uđe u stanicu i veže se na ribosome. Općenito, pri izloženosti nižoj koncentraciji eritromicina, nastaju

udubljenja na bakterijskim stanicama, dok su pri višim koncentracijama uočene izdužene stanice bakterija.<sup>134</sup> Na vanjskoj strani membrane Gram negativne bakterije, uočavaju se lokalizmi, odnosno udubljenja. Stanice izgledaju kao da su spojene u lance, ali zapravo su ometane pri dijeljenju. Takve se stanice nazivaju dimeri. Rezultat toga je filamentacija kulture koja nastaje kada je metabolizam nedovoljan da nadoknadi nedostatak kisika u mediju. Može se pretpostaviti da zbog većeg izvora hranjivih tvari, podloge i eritromicina, *Pseudomonas putida* ima bržu izmjenu faza rasta i pri tome mu je neophodan kisik. Ukoliko ga nema dovoljno, odnosno kisik je limitirajući faktor, primijećeno je izduženje bakterijskih stanica bez dijeljenja.<sup>122,135</sup> Eritromicin se veže na proteine, odnosno ometa translokaciju te nastaju proteini nenormalne veličine. Inhibira sintezu proteina te primarno, uzrokuje produženje Gram negativnih bacila uz smanjenje ribosoma.<sup>134,136,137</sup> Dolazi do inhibicije peptidoglikana i izlazni proteini se ne slažu pravilno u vanjskoj membrani.

Početak stvaranja pahuljica zamijećen je u 24. satu provedbe pokusa krivulje rasta. Na slici 4.17. prikazane su povezane stanice bakterijske kulture *Pseudomonas putide* u kontroli, koje formiraju čvrste i kompaktne pahuljice. Manji štapići nego u 16. satu vidljivi su na slici 4.18. za  $\gamma_{E01}$ . Pri izloženosti *Pseudomonas putide* najvišoj koncentraciji eritromicina, u 24. satu i dalje prevladavaju vrlo dugačke i tanke stanice, ali vidljivo je i njihovo uvijanje (slika 4.19.). Nisu ravni štapići, već zavnuti i međusobno isprepleteni.<sup>135</sup> U ovome sustavu je, također u 24. satu, zamijećeno stvaranje nakupina.<sup>138</sup> Vanjska membrana je dobra barijera za hidrofobne molekule, ali dolazi do modifikacije svojstva površine promjenom sastava vanjskog sloja lipopolisaharida Gram negativnih bakterija.<sup>93</sup> U prisutnosti toksičnih tvari može doći do porasta hidrofobnosti stanice i promjene naboja. Promjena površine stanice objašnjava se porastom adhezije na površinu slabije topljivih molekula, što vodi do povećanja biodostupnosti takvih molekula. Hidrofobna površina djeluje kao izvor akumulacije za molekule i na taj se način olakšava njihov ulaz u stanicu. Posljedično se povećava lučenje EPS-a, koji pomaže u formiranju pahuljica, odnosno povezivanju bakterijskih stanica.<sup>139</sup>

Slike 4.20.-4.22. prikazuju bakterijske stanice *Pseudomonas putide* u 36. satu. U kontroli su vidljivi sitni štapići, slični onima iz 8. sata. Uz  $\gamma_{E01}$  eritromicina uočavaju brojni sitni štapići koji su vrlo onima u kontroli. No s obzirom na one u 16. satu, vidno su prisutni manji štapići, nego u 36. satu. Pri višoj koncentraciji eritromicina i dalje su vidljivi jako izduženi štapići koji su najduži uspoređujući ih s



ostala dva sustava u 36. satu. No nakon ovoga sata, primjećeni su sitni štapići za sva tri sustava. Bakterija *Pseudomonas putida* preživljava u uvjetima s eritromicinom što joj omogućuje kratko generacijsko vrijeme te mogućnost prilagodbe nepovoljnim uvjetima. Osim navedenih utjecaja eritromicina na bakteriju, zabilježeno je i da eritromicin djeluje na pokretljivost bakterije roda *Pseudomonas* jer smanjuje lučenje alginata (proteina koji sudjeluje u izgradnji flagele ili biča) utječe na pile, stvaranje biofilma. Također, djeluje na QS tako da deaktivira autoinduktore, molekule zadužene za kemijske signale koji sudjeluju u staničnoj komunikaciji.<sup>112,120,133,137</sup>

### 5.7. Aktivnost enzima esteraze

Provedeni su pokusi uzgoja bakterije bez i uz dodatak eritromicina,  $\gamma_{E01}$  i  $\gamma_{E04}$ , kako bi se odredilo u kojoj fazi rasta bakterije *Pseudomonas putida* dolazi do najveće aktivnosti enzima esteraze.

Na slici 4.23. prikazan je graf promjene aktivnosti enzima tijekom 312 sati. Uočava se da porastom vremena dolazi do porasta aktivnosti enzima do 72 sata te se daljnjim porastom vremena uočava pad aktivnosti enzima. Aktivnost enzima najviša je za kontrolnu tikvicu u 168. satu. Trend ponašanja aktivnosti enzima isti je za sva tri sustava, ali najniže vrijednosti aktivnosti enzima, tijekom 312 sati, uočavaju se za sustav s  $\gamma_{E04}$  eritromicina. Za početne sate uočava se porast aktivnosti enzima, kako je vidljiv i rast optičke gustoće prema slici 4.7. Iako optička gustoća pada nakon 48. sata, aktivnost enzima raste do 72. sata. Najveća aktivnost enzima postignuta je u 72. satu za sva tri sustava. Postignuta je aktivnost od 20308,94 U u kontrolnoj tikvici, što je za 39,02 U veća aktivnost u odnosu na sustav s  $\gamma_{E01}$  eritromicina, a u sustavu s  $\gamma_{E04}$  eritromicina V.A. je iznosila 16648,78 U. Mnogi enzimi pokazuju veći raspon mogućih supstrata, a u ovome se radu *p*-NPB pokazao kao dobar supstrat za određivanje aktivnosti enzima esteraze.<sup>87</sup> Esteraze hidroliziraju estere višemasnih kiselina s kratkim lancima i preferiraju supstrate topive u vodi. Upotrebljavanje takvih supstrata ima prednosti zbog kratkog reakcijskog vremena i lakog očitavanja rezultata pomoću spektrofotometra. S obzirom da na aktivnost enzima utječu razni čimbenici, navedeni u poglavlju 2.4.4., potrebno je sagledati i te uvjete. Maksimalna aktivnost enzima esteraze je pri temperaturi od 35 °C bez obzira na upotrebljeni supstrat. Smanjenjem temperature na oko 20 °C, dolazi do pada (20-35 %) aktivnosti esteraze, a pri 55 °C dolazi do denaturacije enzima. Također, ponašanje enzima ovisi i o vrsti

mikroorganizma iz kojeg je enzim izoliran. Primjerice, esteraza iz *Bacillus* sp. stabilna je na 65 °C, što je čini prikladnom za primjenu u industrijskim procesima. Prihvatljivi raspon pH-vrijednosti za hidrolizu <sup>14</sup>C makrolida je 6-9, no optimalna pH-vrijednost za esterazu je 7,5. Porastom pH-vrijednosti na 10, aktivnost enzima drastično pada. Relativna aktivnost enzima viša je od 70 % pri pH-vrijednosti od 7,4 do 8 na *p*-NPB.<sup>140,141</sup> S obzirom na osjetljivost enzima na pH-vrijednost, uzgoj stanica se provodio pri pH 7,0; a mjerenja aktivnosti enzima pri pH 7,5, kako je opisano u poglavlju 3.2.8. Esteraze čine raznoliku skupinu hidrolaza koje su široko rasprostranjene u životinjama, biljkama i mikroorganizmima, primjerice, *Pseudomonas* spp. Većinom se ovi enzimi koriste u prehrambenoj, agronomskoj industriji, no malo je informacija koje podrazumijevaju ove enzime u razgradnji estera onečišćujućih tvari prisutnih u okolišu. No to je moguće jer prema literaturi,<sup>87</sup> jedna stanica bakterije roda *Pseudomonas* ima oko 1380 molekula eritromicin esteraze, što joj omogućuje razgradnju 90000 molekula eritromicina A. Makrolidi inhibiraju sintezu proteina tvoreći stabilni kompleks s bakterijskom 50S podjedinicom ribosoma, tako da eritromicin esteraza ima ključnu ulogu u razgradnji makrolida unutar stanice. Vanjska se membrana Gram negativnih bakterija ponaša kao primarna prepreka pasivnom transportu makrolida u stanicu, a enzimatska razgradnja makrolida može biti ometana uslijed interferencije s kompetativnim vezanjem makrolida na ribosome. To označava da bakterije roda *Pseudomonas* trebaju imati ne samo visoku razinu eritromicin esteraze, već bi se enzim trebao vezati i na unutarnji sloj membrane s obzirom na hidrofobnu interakciju. Ovi podaci predstavljaju dobar temelj za buduća istraživanja.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja navedene procjene utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putidu* može se zaključiti sljedeće:

- ❑ Testovi toksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri* klasificiraju eritromicin kao slabo toksičan prema vrijednostima  $EC_{50} = 428,80 \text{ mg L}^{-1}$  i  $TU = 0,23$  uz mogući rizik po okoliš.
- ❑ Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* izolirana je iz otpadne farmaceutske vode.
- ❑ Testovi osjetljivosti pokazuju da eritromicin ne djeluje na bakteriju *Pseudomonas putidu* s obzirom na izostanak zona inhibicija.
- ❑ Pokusom biorazgradnje eritromicina bakterijom *Pseudomonas putidom* nije postignuta inhibicija kulture jer je postotak od kontrole za najveću koncentraciju eritromicina iznosio 91,73 %.
- ❑ *Pseudomonas putida* preživljava u uvjetima s eritromicinom, a najviša vrijednost  $\mu_{\max}$  upućuje na njen brži rast pri koncentraciji eritromicina od  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ .
- ❑ Gompertz model dobro opisuje promjenu rasta živih stanica bakterije s vrijednostima F-testa višim od 0,93.
- ❑ Mikroskopskom analizom je utvrđeno da pri koncentraciji eritromicina od  $200 \text{ mg L}^{-1}$  dolazi do morfoloških promjena stanica *Pseudomonas putide*.
- ❑ Aktivnost enzima esteraze bakterijske kulture *Pseudomonas putide*, za sustave bez i uz dodatak eritromicina uz uzgoj na TSB-u, najveća je u 72. satu.

## 7. LITERATURA

1. Wilkinson, L. J., Hooda, S. P., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., Ecotoxic Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Other Emerging Contaminants: A Review of Environmental, Receptor-Mediated Developmental, and Epigenetic Toxicity with Discussion of Proposed Toxicity to Humans, *Critical Reviews in Environmental Science and Tehnology*, **46** (2016) 336-381.
2. Li, W. C., Occurrence, Sources, and Fate of Pharmaceuticals in Aquatic Environment and Soil, *Environmental Pollution*, **187** (2014) 193-201.
3. Bebianno, M. J., Gonzalez-Rey, M., Ecotoxicological Risk of Personal Care Products and Pharmaceuticals, *Aquatic Ecotoxicology*, **10** (2015) 383-416.
4. Kümmerer, K., Resistance in the Environment, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **38** (2004) 311-320.
5. Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment, A Review, *Environmetal Technology*, **22** (2001) 1383-1394.
6. Harris, J. S., Cormican, M., Cummins, E., Antimicrobial Residues and Antimicribial-Resistant Bacteria: Impact on the Microbial Environment and Risk to Human Health-A Review, *Human and Ecological Risk Assessment*, **18** (2012) 767-809.
7. Kümmerer, K., The Presence of Pharmaceuticals in the Environment due to Human Use – Present Knowledge and Future Challenges, *Journal of Environmental Management*, **90** (2009) 2354-2366.
8. Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D., Herranz, S., Rodriguez, E., An Overview of Sample Preparation Procedures for LC-MS Multiclass Antibiotic Determination in Environmental and Food Samples, *Analytic and Bioanalytic Chemistry*, **395** (2009) 921-946.
9. Kümmerer, K., Pharmaceuticals in the Environment, *Annual Review of Environment and Resources*, **35** (2010) 57-75.
10. Caracciolo, A. B., Topp, E., Grenni, P., Pharmaceuticals in the Environment: Biodegradation and Effects on Natural Microbial Communities. A Review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **14** (2014) 1-35.

11. Küster, A., Adler, N., Pharmaceuticals in the Environment: Scientific Evidence of Risks and its Regulation, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **369** (2014) 1-8.
12. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda; NN 80/13, 43/14, 27/15, 3/16
13. Zrnčević, S., Farmaceutici i Metode Obrade Otpadne Vode iz Farmaceutске Industrije, *Hrvatske Vode*, **96** (2016) 119-136.
14. Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemoller, M., Tobin, J., Morrissey, A., Treatment Options for Wastewater Effluents from Pharmaceutical Companies, *International Journal Environmental Scientist Technology*, **8** (2011) 649-666.
15. Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., Human Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Processes, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **35** (2005) 401-427.
16. Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J., Schöll, A., Standardized Tests Fail to Assess the Effects of Antibiotics on Environmental Bacteria, *Water Research*, **38** (2004) 2111-2116.
17. Vrček, V., Farmakoekologija – Okolišna Sudbina Lijekova, *Kemija u Industriji*, **66** (2017) 135-144.
18. Méndez, E., González-Fuentes, M. A., Rebollar-Perez, G., Méndez-Albores, A., Torres, E., Emerging Pollutant Treatments in Wastewater: Cases of Antibiotics and Hormones, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **0** (2016) 1-19.
19. Elder, D. P., Kuentz, M., Holm, R., Pharmaceutical Excipients – Quality, Regulatory and Biopharmaceutical Considerations, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12** (2015) 1-56.
20. Kim, S., Aga, D. S., Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **10** (2007) 559-573.
21. Lin, A., Y., Yu, T., Lateef, S., K., Removal of Pharmaceuticals in Secondary Wastewater Treatment Processes in Taiwan, *Journal of Hazardous Materials*, **167** (2009) 1163-1169.

22. Li, S., Liu, J., Sun, M., Ling, W., Zhu, X., Isolation, Characterization, and Degradation Performance of the 17 $\beta$ -Estradiol-Degrading Bacterium *Novosphingobium* sp. E2S, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14** (2017) 1-115.
23. Tran, N. H., Yew-Hoong Gin, K., Occurrence and Removal of Pharmaceuticals, Hormones, Personal Care Products, and Endocrine Disruptors in a Full-Scale Water Reclamation Plant, *Science of the Total Environment*, **599-600** (2017) 150-1516.
24. Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, Z. M., Watson, T. R., Meteyer, U. C., Rideout, A. B., Shivaprasad, L. H., Ahmed, S., Chaudhry, I. J. M., Arshad, M., Mahmood, S., Ali A., Khan, A. A., Diclofenac Residues as the Cause of Vulture Population Decline in Pakistan, *Nature*, **427** (2004) 630-633.
25. Tiwari B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R., Buelna, G., Review on Fate and Mechanism of Removal of Pharmaceutical Pollutants from Wastewater using Biological Approach, *Bioresource Technology*, **224** (2017) 1-12.
26. Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., Silva, A. M. T., Occurrence and Removal of Organic Micropollutants: An Overview of the Watch List of EU Decision, **94** (2016) 257-279.
27. Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., Couillerot, O., Panigoni, K., De Gunzburg, J., Bayer, S., Czaja, R., Barceló, D., Identification of New Transformation Products During Enzymatic Treatment of Tetracycline and Erythromycin Antibiotics at Laboratory Scale by an On-line Turbulent Flow Liquid-chromatography Coupled to a High Resolution Mass Spectrometer LTQ-Orbitrap, *Chemosphere*, **119** (2015) 90-98.
28. Botelho, R. G., Monteiro, S. H., Tornisiolo, V. L., Veterinary Antibiotics in the Environment, Chapter 5, *IntechOpen*, **10** (2015) 105-146.
29. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Pregled podataka o medicinskom otpadu u 2015, 2016, 1-16.
30. Cuong, D. M., Kim, K., Toan, T. Q., Phu, T. D., Review: Source, Fate, Toxicological Effect and Removal Technology of Pharmaceuticals in the Environment, *Geosystem Engineering*, **14** (2011) 35-42.

31. Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., Toxic and Genotoxic Evaluation of Six Antibiotics on Non-target Organisms, *Science of the Total Environment*, **346** (2005) 87-98.
32. Qian, S., Jun, H., ShuBo, D., Gang, Y., Rapid Determination of Pharmaceuticals from Multiple Therapeutic Classes in Wastewater by Solid-phase Extraction and Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Chinese Science Bulletin*, **54** (2009) 4633-4643.
33. Ledda, C., Rapisarda, V., Bracci, M., Proietti, L., Zuccarello, M., Fallico, R., Fiore, M., Ferrante, M., Professional Exposure to Basaltic Rock Dust: Assessment by the *Vibrio Fischeri* Ecotoxicological Test, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, **8** (2013) 1-5.
34. Hernando, M. D., De Vettori S., Martínez Bueno, M. J., Fernández-Alba, A. R., Toxicity Evaluation with *Vibrio fischeri* Test of Organic Chemicals Used in Aquaculture, *Chemosphere*, **68** (2007) 724-730.
35. Ivask, A., Rõlova, T., Kahru, A., A Suite of Recombinant Luminiscent Bacterial Strains for the Quantification of Bioavailable Heavy Metals and Toxicity Testing, *BMC Biotechnology*, **9** (2009) 1-15.
36. Froehner, K., Backhaus, T., Grimme, L. H., Bioassays with *Vibrio fischeri* for the Assessment of Delayed Toxicity, *Chemosphere*, **40** (2000) 821-828.
37. Farré, M., García, M-J., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barceló, D., Waterwater Toxicity Screening of Non-ionic Surfactants by Toxalert<sup>®</sup> and Microtox<sup>®</sup> Bioluminescence Inhibition Assays, *Analytica Chimica Acta*, **427** (2001) 181-189.
38. Bose, J. L., Kim, U., Bartkowski, W., Gunsalus, R. P., Overley, A. M., Lyell, N. L., Visick, K. L., Stabb, E. V., Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is Controlled by the Redox-Responsive Regulator ArcA, *Molecular Microbiology*, **65** (2007) 538-553.
39. Mansour, B. H., Mosrati, R., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Bioremediation of Industrial Pharmaceutical Drugs, *Drug and Chemical Toxicology*, **35** (2012) 235-240.
40. Onesios, K., M., Yu, J. T., Bouwer, E. J., Biodegradation and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Treatment Systems: A Review, *Biodegradation*, **20** (2009) 441-466.

41. Kümmerer, K., Henninger, A., Promoting Resistance by the Emission of Antibiotics from Hospitals and Households into Effluent, *Clinical Microbiology Infection*, **9** (2003) 1203-1214.
42. Zhang, R., Tang, J., Li, J., Zheng, Q., Liu, D., Chen, Y., Zou, Y., Chen, X., Luo, C., Zhang, G., Antibiotics in the Offshore Waters of the Bohai Sea and Yellow Sea in China: Occurrence, Distribution and Ecological Risks, *Environmental Pollution*, **174** (2013) 71-77.
43. Frédéric, O., Yves, P., Pharmaceuticals in Hospital Wastewater: Their Ecotoxicity and Contribution to the Environmental Hazard of the Effluent, *Chemosphere*, **10** (2014) 2-9.
44. Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A. B., Pharmaceuticals as Priority Water Contaminants, *Toxicological & Environmental Chemistry*, **92** (2010) 549-565.
45. Diab, A. M., Al-Turk, I. M., Ibrahim, M. K., Al-Zhrany, K. D., Tracing of Gram-negative Antibiotic-resistant Bacteria in Hospitals Final Effluent at Al-Madinah Al-Mounwwarah, *Journal of Taibah University for Science*, **1** (2008) 24-34.
46. Radjenovic, J., Petrovic, M., Barceló, D., Analysis of Pharmaceuticals in Wastewater and Removal using a Membrane Bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387** (2007) 1365-1377.
47. Watkinson, A. J., Murby, E. J., Costanzo, S. D., Removal of Antibiotics in Conventional and Advanced Wastewater Treatment: Implications for Environmental Discharge and Wastewater Recycling, *Water Research*, **41** (2007) 4164-4176.
48. Dębska, J., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J., Fate and Analysis of Pharmaceutical Residues in the Aquatic Environment, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **34** (2004) 51-67.
49. Kar, S., Roy, K., Risk Assessment for Ecotoxicity of Pharmaceuticals – an Emerging Issue, *Expert Opinion Drug Safety*, **11** (2012) 235-274.
50. Santos, H. M. H. M. L., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barcelo, D., Conceição, M., Contribution of Hospital Effluents to the Load of Pharmaceuticals in Urban Wastewaters: Identification of Ecologically Relevant Pharmaceuticals, *Science of the Total Environment*, **461-462** (2013) 302-316.



51. Melvin, S. D., Cameron, M. C., Lanctôt, C. M., Individual and Mixture Toxicity of Pharmaceuticals Naproxen, Carbamazepine, and Sulfamethoxazole to Australian Striped Marsh Frog Tadpoles (*Limnodynastes peronii*), *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **77** (2014) 337-345.
52. Džidić, S., Šušković, J., Kos, B., Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects, *Food Technology and Biotechnology*, **46** (2008) 11-21.
53. Nemeth, J., Oesch, G., Kuster, P. S., Bacteriostatic Versus Bactericidal Antibiotics for Patients with Serious Bacterial Infections: Systematic Review and Meta-Analysis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70** (2015) 382-395.
54. Pan, M., Chu, L. M., Fate of Antibiotics in Soil and Their Uptake by Edible Crops, *Science of the Total Environment*, **599-600** (2017) 500-512.
55. Eraković Haber, V., Makrolidi – Više od Antibiotika, *Croatian Journal of Infection*, **31** (2011) 29-39.
56. Sutcliffe, J. A., Leclercq, R., Mechanisms of Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Ketolides, *Macrolide Antibiotics*, **0** (2002) 281-315.
57. Zuckerman, J. M., Macrolides and Ketolides: Azithromycin, Clarithromycin, Telithromycin, *Infectious Disease Clinics of North America*, **18** (2004) 621-649.
58. Pengelly, K. L., Characterization of Erythromycin Esterases: a Genomic Enzymology Approach to Macrolide Resistance, *Master of Science*, (2010) 1-97.
59. Fan, C., Lee, P. K. H., Ng, W. J., Alvarez-Cohen, L., Brodie, E. L., Influence of Trace Erythromycin and Erythromycin-H<sub>2</sub>O on Carbon and Nutrients Removal and on Resistance Selection in Sequencing Batch Reactors (SBRs), *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85** (2009) 185-195.
60. Gaynor, M., Mankin, A. S., Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **3** (2003) 949-960.
61. Katri, N., Garber, N. C., Kilfin, G., Gilboa-Garber, N., Abrogation of the Resistance of Choline-induced *Pseudomonas aeruginosa* Virulence to sub-MIC Erythromycin by Ethanol, *International Society for Microbial Ecology*, **2** (2008) 1243-1246.
62. Jelić, D., Antolović, R., From Erythromycin to Azythromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials, *Antibiotics*, **5** (2015) 1-13.

63. O'Hara, K., Kanda, T., Ohmiya, K., Ebisu, T., Kono, M., Purification and Characterization of Macrolide 2'-Phosphotransferase from a Strain of *Escherichia coli* That Is Highly Resistant to Erythromycin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **33** (1989) 1354-1357.
64. Kim, Y., Heinze, T. M., Beger, R., Pothuluri, J. V., Cerniglia, C. E., A Kinetic Study on the Degradation of Erythromycin A in Aqueous Solution, *International Journal of Pharmaceutics*, **271** (2004) 63-76.
65. Brisaert, M., Heylen, M., Plaizier-Vercammen, J., Investigation on the Chemical Stability of Erythromycin in Solutions using an Optimization System, *Pharmacy World & Science*, **18** (1996) 182-183.
66. Nakajima, Y., Mode of Action and Resistance Mechanisms of Antimicrobial Macrolides, Chapter 10, *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice*, Second Edition, 2003., str. 453-499.
67. Vasquez, I. M., Active Pharmaceutical Ingredients in Aqueous Matrices: An Integrated Approach for Assessing Effects, A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy at the University of Cyprus, 2012., str. 47,73.
68. Kim, Y., Pak, K., Pothuluri, J. V., Cerniglia, C. E., Mineralization of Erythromycin A in Aquaculture Sediments, *FEMS Microbiology Letters*, **234** (2004) 169-175.
69. Voigt, M., Jaeger, M., On the Photodegradation of Azithromycin, Erythromycin and Tylosin and Their Transformation Products – A Kinetic Study, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **5** (2017) 131-140.
70. Gadipelly, C., Perez Gonzalez, A., Yadav, G. D., Ortiz, I., Ibanez, R., Rathod, V. K., Marathe, K. V., Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **53** (2014) 11571-11592.
71. Briški, F., Zaštita okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Element, Zagreb, 2016., str. 34-52.
72. Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, J., Park, H., Occurrence and Removal of Antibiotics, Hormones and Several Other Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Plants of the Largest Industrial City of Korea, *Science of the Total Environment*, **409** (2011) 4351-4360.

73. Gauthier, G., Yargeau, V., Cooper, D. G., Biodegradation of Pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by Co-metabolism, *Science of the Total Environment*, **408** (2010) 1701-1706.
74. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*, A John Wiley & Sons, New Jersey, 2011., str. 52-54., 71-74.
75. Pasquini, L., Merlin, C., Hassenboehler, L., Munoz J., Pons, M., Görner, T., Impact of Certain Household Micropollutants on Bacterial Behaviour. Toxicity Tests/Study of Extracellular Polymeric Substances in Sludge, *Science of the Total Environment*, **463-464** (2013) 355-365.
76. Kraigher, B., Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B., Mandic-Mulec, I., Influence of Pharmaceutical Residues on the Structure of Activated Sludge Bacterial Communities in Wastewater Treatment Bioreactors, *Water Research*, **42** (2008) 4578-4588.
77. Lin, B., Lyu, J., Lyu, X., Yu, H., Hu, Z., Lam, J. C., W., Lam, P. K. S., Characterization of Cefalexin Degradation Capabilities of Two *Pseudomonas* Strains Isolated from Activated Sludge, *Journal of Hazardous Materials*, **282** (2015) 158-164.
78. Pala-Ozkok, I., Orhon, D., Chronic Effect of Erythromycin on Substrate Biodegradation Kinetics of Activated sludge, *Biochemical Engineering Journal*, **81** (2013) 29-39.
79. Louvet, J. N., Giammarino, C., Potier, O., Pons, M. N., Adverse Effects of Erythromycin on the Structure and Chemistry of Activated Sludge, *Environmental Pollution*, **158** (2010) 688-693.
80. Guleria, A., Biodegradation of Pharmaceutical Waste 4-Nitrophenol by *Pseudomonas putida*, *Indian Journal of Research*, **3** (2014) 127-130.
81. Fendri, I., Chaari, A., Dhouib, A., Jlassi, B., Abousalham, A., Carriere, F., Sayadi, S., Abdelkafi, S., Isolation, Identification and Characterization of a New Lipolytic *Pseudomonas* sp., Strain AHD-1, from Tunisian Soil, *Environmental Technology*, **82** (2010) 87-95.
82. Kostal, J., Suchanek, M., Klierova, H., Demnerova, K., Kralova, B., McBeth, D., L., *Pseudomonas* C12B, an SDS Degrading Strain, Harbours a Plasmid Coding for Degradation of Medium Chain Length *n*-alkanes, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **42** (1998) 221-228.

83. Meade, M. J., Waddell, R. L., Callahan, T. M., Soil Bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* Inactivate Triclosan in Liquid and Solid Substrates, *FEMS Microbiology Letters*, **204** (2001) 45-48.
84. Martínez-García, E., De Lorenzo, V., Engineering Multiple Genomic Deletions in Gram-negative Bacteria: Analysis of the Multi-resistant Antibiotic Profile of *Pseudomonas putida* KT2440, *Environmental Microbiology*, **13** (2011) 2702-2716.
85. Ruiz-Manzano, A., Yuste, L., Rojo, F., Levels and Activity of the *Pseudomonas putida* Global Regulatory Protein Crc Vary According to Growth Conditions, *Journal of Bacteriology*, **187** (2005) 3678-3686.
86. Poole, K., Efflux-mediated Multiresistance in Gram-negative Bacteria, *Clinical Microbiological Infect*, **10** (2004) 12-26.
87. Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., Wright, G. D., Mechanism and Diversity of the Erythromycin Esterase Family of Enzymes, *Biochemistry*, **51** (2012) 1740-1751.
88. Wright, G., D., Bacterial Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57** (2005) 1451-1470.
89. Sun, J., Deng, Z., Yan, A., Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Mechanisms, Physiology and Pharmacological Exploitations, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **453** (2014) 254-267.
90. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996., str. 365.
91. Findrik, Z. B., Bioreakcijska tehnika, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2013., str 1-10.
92. Cornish-Bowden, A., Current IUBMB Recommendations on Enzyme Nomenclature and Kinetics, *Perspectives in Science*, **1** (2014) 74-87.
93. Neumann, G., Cornelissen, S., Van Breukelen, F., Hunger, S., Lippold, H., Loffhagen, N., Wick, Y. L., Heipieper, J. H., Energetics and Surface Properties of *Pseudomonas putida* DOT-T1E in a Two-Phase Fermentation System with 1-Decanol as Second Phase, *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (2006) 4232-4238.
94. Ozaki, E., Sakimae, A., Purification and Characterization of Recombinant Esterase from *Pseudomonas putida* MR-2068 and Its Application to the Optical

- Resolution of Dimethyl Methylsuccinate, *Journal od Fermentation and Bioengineering*, **83** (1997) 535-539.
95. HRN EN ISO 11348-3:2010, Kvaliteta vode – Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 3.dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju liofilizirane bakterije.
96. Leboeffe, M. J., Pierce, B. E., *Microbiology: Laboratory Theory and Application*, Second Edition, Morton Publishing, United States of America, 2012., str. 39-42., 169-177., 237-267., 360-363.
97. Vuković Domanovac, M., *Mikrobiologija, Skripta za laboratorijske vježbe*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017., str. 14-16.
98. APHA, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 20th Edition, APHA, Washington DC, USA, 1995.
99. Beesoo, R., Bhagooli, R., Neergheen-Bhujun, V. S., Li, W., Kagansky, A., Bahorum, T., *Antibacterial and Antibiotic Potentiating Activities of Tropical Marine Sponge Extracts*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **4** (2017) 1-37.
100. Coyle, B. M., *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, American Society for Microbiology, University of Washington, Seattle, 2005., str. 39-52.
101. Šabić, M., Čižmek, L., Vuković Domanovac, M., Meštrović, E., *Biodegradation of Erythromycin with Environmental Microorganism *Pseudomonas aeruginosa* 3011*, *Chemical and Biochemical Engineering*, **29** (2015) 367-373.
102. Alsop, G. M., Waggy, G. T., Conway, R. A., *Bacterial Growth Inhibition Test*, *Journal WPCF*, **52** (1980) 2452-2456.
103. Kim, Y., Cha, C., Cerniglia, C. E., *Purification and Characterization of an Erythromycin Esterase from an Erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp.*, *FEMS Microbiology Letters*, **210** (2002) 239-244.
104. Leko, J., *Aktivnost Esteraze u Stanicama *Pseudomonas* sp. u Uvjetima Bez i Uz Indukciju Eritromicinom*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Diplomski rad, 2018.
105. Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L. H., *The Single Substance and Mixture Toxicity of Quinolones to the Bioluminescent Bacterium *Vibrio fischeri**, *Aquatic Toxicology*, **49** (2000) 49-61.

106. Gusić, I., Statistika - Testiranje Varijance i Očekivanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2008./2009., str. 3-5.
107. Väliälä, P., Kruglova, A., Mikola, A., Vahala, R., Toxicological Impacts of Antibiotics on Aquatic Micro-organisms: A Mini-Review, International Journal of Hygiene and Environmental Health, **16** (2017) 1-40.
108. Zhang, W., Qui, L., Gong, A., Yuan, X., Isolation and Characterization of a High-Efficiency Erythromycin A-degrading *Ochrobactrum* sp. Strain, Marine Pollution Bulletin, **10** (2016) 1-7.
109. Topp, E., Renaud, J., Sumarah, M., Sabourin, L., Reduced Persistence of the Macrolide Antibiotics Erythromycin, Clarithromycin and Azithromycin in Agricultural Soil following Several Years of Exposure in the Field, Science of the Total Environment, **562** (2016) 136-144.
110. Flickinger, M. C., Perlman, D., Microbial Degradation of Erythromycin A and B, The Journal of Antibiotics, **27** (1975) 307-311.
111. Ge, B., Domesle, K. J., Yang, Q., Young, S. R., Rice-Trujillo, C. L., Bodeis Jones, S. M., Gaines, S. A., Keller, M. W., Li, X., Piñeiro, S. A., Whitney, B. M., Harbottle, H. C., Gilbert, J. M., Effects of Low Concentrations of Erythromycin, Penicillin, and Virginiamycin on Bacterial Resistance Development *in vitro*, Scientific Reports, **7** (2017) 1-11.
112. Almofti, Y. A., Dai, M., Sun, Y., Hao, H., Liu, Z., Cheng, G., Yuan, Z., The Physiologic and Phenotypic Alterations due to Macrolide Exposure in *Campylobacter jejuni*, International Journal of Food Microbiology, **151** (2011) 52-61.
113. Ortiz de García, S., García-Encina, P. A., Irusta-Mata, R., Dose-Response Behavior of the Bacterium *Vibrio fischeri* Exposed to Pharmaceuticals and Personal Care Products, Ecotoxicology, **23** (2015) 1-23.
114. Callahan, S. M., Dunlap, P. V., LuxR- and Acyl-Homoserine-Lactone-Controlled Non-lux Genes Define a Quorum-Sensing Regulation in *Vibrio fischeri*, Journal of Bacteriology, **182** (2000) 2811-2822.
115. Wan, J., Guo, P., Peng, X., Wen, K., Effect of Erythromycin Exposure on the Growth, Antioxidant System and Photosynthesis of *Microcystis Flos-aquae*, Journal of Hazardous Materials, **283** (2015) 778-786.
116. Ranjitha, P., Purification and Partial Characterization of Esterase from Marine *Vibrio fischeri*, Modern Applied Science, **3** (2009) 73-82.

117. Ji, K., Kim, S., Han, S., Seo, J., Lee, S., Park, Y., Choi, K., Kho, Y-L., Kim, P-G., Park, J., Choi, K., Risk Assessment of Chlortetracycline, Oxytetracycline, Sulfamethazine, Sulfathiazole, and Erythromycin in a Aquatic Environment: Are the Current Environmental Concentrations Safe?, *Ecotoxicology*, **21** (2012) 2031-2050.
118. Dash, C., Payyappilli, J. R., KOH String and Vancomycin Susceptibility Test as an Alternative Method to Gram Staining, *Journal of International Medicine and Dentistry*, **3** (2016) 88-90.
119. Gao, P., Wei, X., Gu, C., Wu, X., Xue, G., Shi, W., Sun, W., Isolation and Characterization of an Erythromycin-Degrading Strain and Application for Bioaugmentation in a Biological Aerated Fliter, *Water, Air and Soil Pollution*, **226** (2015) 1-10.
120. Kanoh, S., Rubin, B. K., Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications, *Clinical Microbiology Reviews*, **23** (2010) 590-615.
121. Mao, J. C.-H., Putterman, M., Accumulation in Gram-positive and Gram-negative Bacteria as a Mechanism of Resistance to Erythromycin, *Journal of Bacteriology*, **95** (1968) 1111-1117.
122. Ocampo, P. S, Lázár, V., Papp, B., Arnoldini, M., Abel zur Wiesch, P., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pál, C., Ackermann, M., Bonhoeffer, S., Antagonism Between Bacteriostatic and Bactericidal Antibiotics is Prevelent, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58** (2014) 4573-4582.
123. Georgieva, T., Nikolova, D., Evstatieva, Y., Licheva, Ts., Savov, V., Growth Characteristics of *Pseudomans putida* Strains and Effect of Humic Substances on Cell Density During Batch Cultivation, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **20** (2014) 82-86.
124. Tjørve, K. M. C., Tjørve, E., The Use of Gompertz Models in Growth Analyses, and New Gompertz-model Approach: An Additon to the Unified-Richards Family, *PLoS ONE*, **12** (2017) 1-17.
125. Shen, J., Zhu, J., Development of General Gompertz Models and Their Simplified Two-Parameter Forms Based on Specific Microbial Growth Rate for Microbial Growth, Bio-Products and Substrate Consumption, *Biotechnology & Microbiology*, **4** (2017) 2474-763 1-11.

126. Kim, H. W., Lee, K., Kim, S. H., Rhee, M. S., Predictive Modeling of Bacterial Growth in Ready-to-Use Salted Napa Cabbage (*Brassica pekinensis*) at Different Storage Temperatures, *Food Microbiology*, **70** (2018) 129-136.
127. Davis, M. L., Mounteer, L. C., Stevens, L. K., Miller, C. D., Zhou, A., 2D Motility Tracking of *Pseudomonas putida* KT2440 in Growth Phases Using Video Microscopy, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **111** (2011) 605-611.
128. Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van'T Riet, K., Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (1990) 1875-1881.
129. Kim, D. J., Choi, J. W., Choi, N. C., Mahendran, B., Lee, C. E., Modeling of Growth Kinetics for *Pseudomonas putida* During Benzene Degradation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69** (2005) 456-462.
130. Correa, A. P. F., Daroit, D. J., Velho, R. V., Brandelli, A., Hydrolytic Potential of a Psychrotrophic *Pseudomonas* Isolated from Reftigerated Raw Milk, *Brazilian Journal of Microbiology*, **42** (2011) 1479-1484.
131. Aryal, M., Liakopoulou-Kyriakides, M., Phenol Degradation in Aqueous Solutions by *Pseudomonas* sp. Isolated from Contaminated Soil of Mining Industry, *Journal of Water Sustainability*, **5** (2015) 45-57.
132. Khan, S., A., Hamayun, M., Khan, A. L., Ahmad, B., Ahmed, S., Lee, I.-J., Influence of pH, Temperature and Glucose on Biodegradation of 4-aminophenol by a Novel Bacterial Strain, *Pseudomonas* sp. ST-4, *African Journal of Biotechnology*, **8** (2009) 3827-3831.
133. Shryock, T. R., Mortensen, J. E., Baumholtz, M., The Effects of Macrolides on the Expression of Bacterial Virulence Mechanisms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **41** (1998) 505-512.
134. Cushnie, T. P. T., O'Driscoll, N. H., Lamb, A. J., Morphological and Ultrastructural Changes in Bacterial Cells as an Indicator of Antibacterial Mechanism of Action, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **18** (2016) 1-28.
135. Jensen, R. H., Woolfolk, C. A., Formation of Filaments by *Pseudomonas putida*, *Applied and Environmental Microbiology*, **50** (1985) 364-372.
136. Zhanel, G. G., Hoban, D. J., Harding, G. K. M., Subinhibitory Antimicrobial Concentrations: A Review of *in vitro* and *in vivo* Data, *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, **3** (1992) 193-201.



137. Wozniak, D. J., Keyser, R., Effects of Subinhibitory Concentrations of Macrolide Antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*, CHEST, **125** (2004) 62-69.
138. Reardon, K. F., Mosteller, D. C., Rogers, J. D. B., Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1, Biotechnology and Bioengineering, **69** (2000) 385-400.
139. Hansen, S. K., Haagen, J. A. J., Gjermansen, M., Jorgensen, T. M., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., Characterization of a *Pseudomonas putida* Rough Variant Evolved in a Mixed-Species Biofilm with *Acinetobacter* sp. Strain C6, Journal of Bacteriology, **189** (2007) 4932-4943.
140. Szczyrba, E., Gren, I., Bartelmus, G., Enzymes Involved in Vinyl Acetate Decomposition by *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 Strain, Folia Microbiology, **59** (2014) 99-105.
141. Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., Macedo, G. A., Lipase and Esterase To What Extent Can This Classification be Applied Accurately?, Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas, **31** (2011) 608-613.

## ŽIVOTOPIS

Martina Miloloža [REDACTED] gdje je pohađala Opću gimnaziju. Nakon završene srednje škole, upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a preddiplomski studij Ekoinženjerstva završava uz pohvalu *magna cum laude*. Na istoimenome fakultetu, 2015. godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo. Dobitnica je Rektorove nagrade za akademsku godinu 2016./2017. za individualni znanstveni i umjetnički rad pod nazivom *Potencijal izoliranih bakterijskih kultura u stvaranju aktivnog mulja za bioremedijaciju farmaceutske otpadne vode*. Odrađivala je demonstrature na Zavodu za industrijsku ekologiju na kolegijima *Mikrobiologija, Zaštita okoliša i Bioremedijacija*. Sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih skupova s tri usmena izlaganja i četiri posterska prioćenja. Članica je Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) te je uključena u rad novinarskog tima za službeno glasilo Sekcije časopis *Reaktor ideja*.