

Određivanje ekotoksičnosti ksenobiotika prisutnih u okolišu

Grgurević, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:122607>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karlo Grgurević

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2022.

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

Kandidat **Karlo Grgurević** _____

Predao je izrađen završni rad dana: 5. rujna 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

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

Završni ispit održat će se dana: 8. rujna 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karlo Grgurević

ODREĐIVANJE EKOTOKSIČNOSTI KSENOBIOTIKA PRISUTNIH U
OKOLIŠU

Voditelj rada: doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Članovi ispitnog povjerenstva:
doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović
dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2022.

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na tome što mi je omogućila pisanje ovog rada, kao i na brojnim drugim prilikama koje su popratile izradu cjelokupnog rada. Također, zahvaljujem se svima iz Zavoda za industrijsku ekologiju na velikoj pomoći, a posebice asistenticama Martini Miloloži i Kristini Bule koje su boravak u Zavodu činile nevjerovatno zabavnim i zanimljivim.

Želio bih se zahvaliti svojim roditeljima na neizmjerljivoj potpori tijekom cijelog studija i na svakoj pruženoj pomoći oko životnih briga. Zahvaljujem se svojem bratu Bruni, što je bez pogovora trpio upaljeno svjetlo u sobi tijekom mojeg kasnonoćnog učenja.

Veliko hvala mojoj djevojci Suzani što je uvijek uz mene i što svaki naš zajednički trenutak čini posebnim.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima na lijepim druženjima, zajedničkim učenjima i dugim ispijanjima kave. Posebno se zahvaljujem prijatelju Marku Rukavini na безусловnoj pomoći oko studija i uloženom trudu oko zajedničkih radova.

Za kraj, zahvaljujem se samom sebi što sam izdržao sve slatke muke koje fakultet nosi i što nisam odustajao.

SAŽETAK

U današnje vrijeme, zbog brzog rasta broja stanovništva dolazi i do sve veće ljudske potražnje za brojnim organskim i anorganskim tvarima. Velika proizvodnja farmaceutika, pesticida, proizvoda za osobnu njegu i dr. zahtjeva zbrinjavanje velike količine otpadnih tvari. Iako postoje uspješni načini zbrinjavanja otpada, uslijed rada metabolizma živih bića te nekontrolirane ljudske aktivnosti, u okoliš svakodnevno dopijevaju brojne sintetske tvari u vrlo niskim koncentracijama. Budući da u okoliš dopijevaju antropogenim putem, te tvari nazivamo ksenobiotcima. Nažalost, zbog toga što se u okolišu i nalaze u vrlo malim koncentracijama, često se dugo zadržavaju u okolišu, a mogu imati jaki ekotoksičan učinak na pojedine članove ekosustava. Ovim se radom ispituje upravo njihov negativan učinak na pojedine mikroorganizme, kako bi se utvrdila njihova prava štetnost i kako bi se potencijalno našao način njihova zbrinjavanja. Ksenobiotici ispitivani u ovom radu su farmaceutici diklofenak i pantoprazol radnih koncentracija od 0,125 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, 8 mg L⁻¹ i 16 mg L⁻¹. Ispitivane su i njihove smjese u omjerima diklofenaka i pantoprazola 1:1, 1:2 i 2:1 kako bi se odredilo njihovo međudjelovanje. Mikroorganizmi na kojima su se testovi provodili su morska bakterija *Vibrio fischeri*, bakterija *Pseudomonas putida*, mikroalga *Chlorella* sp. i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati su pokazali kako čisti ksenobiotici, kao i njihove smjese imaju snažan ekotoksikološki utjecaj na *Vibrio fischeri* i *Saccharomyces cerevisiae*, dok čisti diklofenak negativno utječe na samo 5% populacije *Pseudomonas putida* s efektivnom koncentracijom od 9,3 mg L⁻¹ te na 5% populacije *Chlorella* sp. s efektivnom koncentracijom od 0,8 mg L⁻¹.

KLJUČNE RIJEČI: ksenobiotik, mikroorganizmi, diklofenak, pantoprazol, međudjelovanje

ABSTRACT

Nowadays, due to the rapid growth of the population, there is an increasing human demand for numerous organic and inorganic substances. Large-scale production of pharmaceuticals, pesticides, personal care products and the like requires the disposal of a large amount of waste. Although there are successful ways of disposing the waste, as a result of the metabolism of living beings, as well as the uncontrolled human activity, numerous synthetic substances in very low concentrations reach the environment every day. Since they reach the environment anthropogenically, these substances are called xenobiotics. Unfortunately, due to the fact that they are found in the environment in very small concentrations, they often remain in the environment for a long time, and can have a strong ecotoxic effect on individual members of the ecosystem. This study examines their negative effect on individual microorganisms, in order to determine their true harmfulness and to potentially find a way of their disposal. The xenobiotics tested in this work are pharmaceuticals diclofenac and pantoprazole, with working concentrations of 0.125 mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, 8 mg L⁻¹ and 16 mg L⁻¹. Their mixtures were also tested in diclofenac and pantoprazole ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 to determine their interaction. The microorganisms on which the tests were carried out were marine bacteria *Vibrio fischeri*, bacteria *Pseudomonas putida*, microalgae *Chlorella* sp. and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that pure xenobiotics, as well as their mixtures, have a strong ecotoxicological impact on *Vibrio fischeri* and *Saccharomyces cerevisiae*, while pure diclofenac has a fatal effect on only 5% of the population of *Pseudomonas putida* with an effective concentration of 9.3 mg L⁻¹ and on 5% of the population *Chlorella* sp. with an effective concentration of 0.8 mg L⁻¹.

KEY WORDS: xenobiotic, microorganisms, diclofenac, pantoprazole, interaction

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Ksenobiotici.....	2
2.1.1. Diklofenak.....	4
2.1.2. Pantoprazol.....	7
2.2. Ispitivanje ekotoksičnosti.....	10
2.2.1. Morska bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	13
2.2.3. Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	17
2.2.4. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.3. Međudjelovanje kemijskih spojeva na organizam	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	24
3.1. Materijali	24
3.1.1. Ksenobiotik – diklofenak	24
3.1.2. Ksenobiotik – pantoprazol	24
3.1.3. Smjesa ksenobiotika diklofenaka i pantoprazola.....	24
3.1.4. Morska bakterija <i>Vibrio fischeri</i>	25
3.1.5. Bakterijska kultura <i>Pseudomonas putida</i>	26
3.1.6. Zelena mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	27
3.1.7. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.3. Metode rada.....	31
3.3.1. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	31
3.2.2. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	32
3.2.3. Određivanje ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.	33
3.2.4. Određivanje ekotoksičnosti primjenom kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
4. REZULTATI	36
4.1. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	36
4.1.1. Diklofenak.....	36

4.1.2. Pantoprazol.....	37
4.1.3. Smjese diklofenaka i pantoprazola.....	37
4.2. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	38
4.3. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.....	40
4.4. Test ekotoksičnosti primjenom kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
5. RASPRAVA	45
5.1. Test ekotoksičnosti primjenom <i>Vibrio fischeri</i>	46
5.1.1. Krivulja koncentracija-inhibicija	46
5.1.2. Vrijednosti efektivne koncentracije, EC _x	47
5.1.3. Smjese diklofenaka i pantoprazola.....	48
5.2. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	50
5.2.1. Krivulja vrijeme – optička gustoća	50
5.2.2. Krivulja vrijeme – logCFU	51
5.2.3. Krivulja doza-odgovor	51
5.3. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp.....	52
5.3.1. Krivulja vrijeme – optička gustoća	52
5.3.2. Krivulja vrijeme – logCFU	52
5.3.3. Krivulja doza-odgovor	53
5.3.4. pH-vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika	54
5.4. Test ekotoksičnosti primjenom kvasca <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
6. ZAKLJUČAK.....	56
7. LITERATURA	57
8. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	66
9. ŽIVOTOPIS.....	68

1. UVOD

Otpadne vode su jedan od najvećih izvora onečišćujućih tvari koje narušavaju kvalitetu i čistoću prirodnih voda, tla i okoliša u cjelini.¹ Prema Zakonu o vodama² otpadne se vode prema svojem porijeklu mogu podijeliti na oborinske, tehnološke i komunalne otpadne vode.² Farmaceutička industrija široko je rasprostranjen i kompleksan sustav koji za proizvodnju koristi brojne reaktante, katalizatore, otapala, a između ostalog i vodu kao ulaznu i izlaznu sirovinu. Voda se koristi prilikom obrade, formuliranja i proizvodnje lijekova te iz tog razloga dolazi do nastanka otpadnih voda čiji sastav i količina ovisi o vrsti procesa u kojem se koriste. Najčešće sadržavaju neizreagirane reaktante, međuprodukte, ostatke djelatnih tvari, katalizatore i slično te se zbog toga i farmaceutičke otpadne vode mogu svrstati u zasebnu kategoriju.¹

Budući da njihovo nekontrolirano ispuštanje u okoliš može izazvati gotovo isključivo negativne učinke, farmaceutike i ostale organske tvari sadržane u otpadnim vodama nužno je pravilno zbrinuti. U tu svrhu primjenjuju se brojni fizikalno – kemijski i biološki postupci obrade kao što su membranski procesi, adsorpcija, kemijska oksidacija i slično. Zbog visoke učinkovitosti obradnih procesa visoke koncentracije farmaceutika ne predstavljaju toliki problem za okoliš.¹ Ono što je potencijalno opasno za sve članove ekosustava jesu farmaceutici u tragovima, koji se ponekad ne mogu detektirati, a imaju sposobnost akumulacije u okolišu i organizmima koji u njemu obitavaju..³ Spoznaje o ekotoksikološkim utjecajima farmaceutika u niskim koncentracijama na organizme i mikroorganizme u tlu i vodi nisu potpuna, zbog čega je nužno njihovo dodatno istraživanje. Mikroorganizmi su prijeko potrebni za održavanje funkcionalnosti ekosustava jer razgradnjom organskih tvari osiguravaju hranjiva tvari za druge organizme u hranidbenom lancu. Iako imaju sposobnost vrlo brze prilagodbe na novonastale okolišne uvjete, zbog prevelike količine farmaceutika ili tzv. ksenobiotika u njihovoj prehrani, može doći do velike i štetne promjene u cjelokupnom ekosustavu, što se u konačnici odražava i na čovjeka.⁴

U ovom znanstvenom radu ispitaio se ekotoksični utjecaj ksenobiotika, odnosno farmaceutika diklofenaka i pantoprazola, na četiri mikroorganizma: morsku bakteriju *Vibrio fischeri*, bakteriju *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp. te na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Na kulturama *Vibrio fischeri* i *Saccharomyces cerevisiae* ispituje se i ekotoksičnost smjese dvaju spomenutih farmaceutika, kako bi se ustanovilo njihovo međudjelovanje, odnosno pojava sinergističkog, antagonističkog ili aditivnog učinka te na taj način dobila slika o njihovom mogućem utjecaju na okoliš.

2. OPĆI DIO

2.1. Ksenobiotici

U današnje vrijeme, procesi poput urbanizacije, industrijalizacije, globalizacije, kao i porasta ljudske populacije imaju snažan utjecaj na cjelokupno društvo i okoliš. Iako su navedeni procesi doveli do nevjerojatnog ekonomskog i tehnološkog napretka, utjecaj na cjelokupni ekosustav u velikoj je mjeri negativan. Potreba za prolongiranjem i poboljšanjem ljudskog života, primarno proizvodnjom i korištenjem raznih lijekova, pesticida, aditiva hrani i slično, povećala je mogućnost onečišćenja okoliša, odnosno namjernog i nenamjernog otpuštanja raznih supstancija u okoliš.⁵ Upravo se takve, biološki aktivne tvari koje antropogenim putem dopijevaju u određeni ekološki sustav, odnosno ne sintetiziraju se u okolišu prirodnim putem, nazivaju ksenobiotici⁶ (grč. *xenos*-stran, *bios*-život).⁷ Druga, također valjana definicija ksenobiotika podrazumijeva njihovu prisutnost u živućim organizmima, iako ih organizmi metaboličkim putem ne mogu sami sintetizirati.⁸

Ksenobiotici se mogu kategorizirati na temelju više različitih kriterija, a najčešći su njihova struktura, uporaba, agregatno stanje i patofiziološki učinak. Tako ksenobiotike dijelimo na 6 glavnih skupina: pesticidi, farmaceutici, proizvodi za osobnu higijenu, zabranjene droge, nuklearni otpad i drugi industrijski produkti.⁵ U navedene kategorije mogu se svrstati i određene podkategorije koje su prikazane u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Podjela ksenobiotika⁵

Ksenobiotici					
Pesticidi	Farmaceutici	Proizvodi za osobnu higijenu	Zabranjene droge	Nuklearni otpad	Drugi industrijski produkti
Insketici, baktericidi, herbicidi, fungicidi	Farmaceutici širokog spektra, esencijalni lijekovi, antibiotici, nesteroidni protuupalni lijekovi, psihoaktivni lijekovi	Parfemi, antiseptici, šamponi, dezinficijensi, detergentsi	Halucinogene droge, stimulansi, enzimski inhibitori		Organski otpad, anorganski otpad, teški metali

Kao što je već rečeno, ksenobiotici su najčešće tvari sintetičkog podrijetla te u okoliš mogu dospjeti iz različitih izvora.

Najveći izvori ksenobiotika su farmaceutska i kemijska industrija, rudarska industrija, postrojenja za izbjeljivanje papira, fosilna goriva te intenzivna poljoprivreda.⁶ Zbog izvora iz kojeg dospijevaju u okoliš, ksenobiotici mogu biti specifične i kompleksne strukture, koje otežavaju procese njihova uklanjanja i biorazgradnje.⁷ Ovisno o strukturi, ksenobiotici mogu biti policiklički aromatski ugljikovodici, ciklički bifenili, nitroaromatski spojevi, alifatski i aromatski halogenirani spojevi, triazini, azo spojevi, polimeri, ali i brojni anorganski spojevi.⁹ Takve strukture prirodno postojani mikroorganizmi onečišćenog područja teško mogu metabolizirati, što omogućuje daljnje postojanje i akumulaciju ksenobiotika u okolišu.⁷

Ksenobiotici u okolišu mogu biti prisutni u iznimno niskim, ali i izuzetno visokim koncentracijama.⁵ Visoke koncentracije ksenobiotika prisutne u raznim oblicima industrijskog otpada relativno se lako zbrinjavaju pročišćavanjem područja u kojem se nalazi sam izvor otpada.¹⁰ Međutim, ksenobiotici prisutni u okolišu u niskim koncentracijama predstavljaju veći problem jer ne postoji učinkoviti biotehnološki način njihova zbrinjavanja.¹¹ Danas postoje određene fizikalno – kemijske metode uklanjanja ksenobiotika iz okoliša (tablica 2.2.), međutim sve je popularnija metoda bioremedijacije pomoću „prirodnih“ ili genetski modificiranih mikroorganizama.¹²

Tablica 2.2. Učinkovitost uklanjanja farmaceutika konvencionalnim i naprednim procesima obrade.⁹

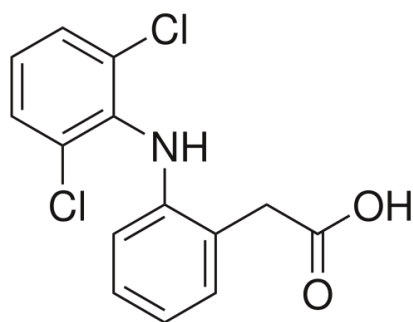
	Proces obrade	Učinkovitost uklanjanja ksenobiotika / %
Konvencionalni procesi	Aktivni mulj	7-100
	Biološka filtracija	6-71
	Primarno taloženje	3-45
	Koagulacija, filtracija i taloženje	5-36
Napredni procesi	Ozonizacija	1-100
	Ozonizacija i katalitička ozonizacija	9-100
	Fotoliza	29
	Fotooksidacija (UV/H ₂ O ₂)	52-100
	Fotokataliza (UV/TiO ₂)	<95
	Biomembrana	23-99
	Mikrofiltracija i reverz. osmoza	91-100
	Reverzna osmoza	62-97
Ultrazvuk	24-100	

Zbog konstantne izloženosti ksenobioticima, svake godine premine više od 13 milijuna ljudi, a smatra se da je 24% svjetskih bolesti uzrokovano upravo onečišćivalima okoliša. Zdravstveni problemi koje ksenobiotici uzrokuju su brojni, od poremećaja endokrinog sustava i pojave raznih autoimunih bolesti do otkazivanja rada centralnog živčanog sustava i pojave karcinoma. Osim ljudi, od negativnih učinaka izloženosti onečišćivalima okoliša pate i životinje i biljke, posebno one koje žive u vodi te zbog toga brojnim vrstama prijete izumiranje.¹²

2.1.1. Diklofenak

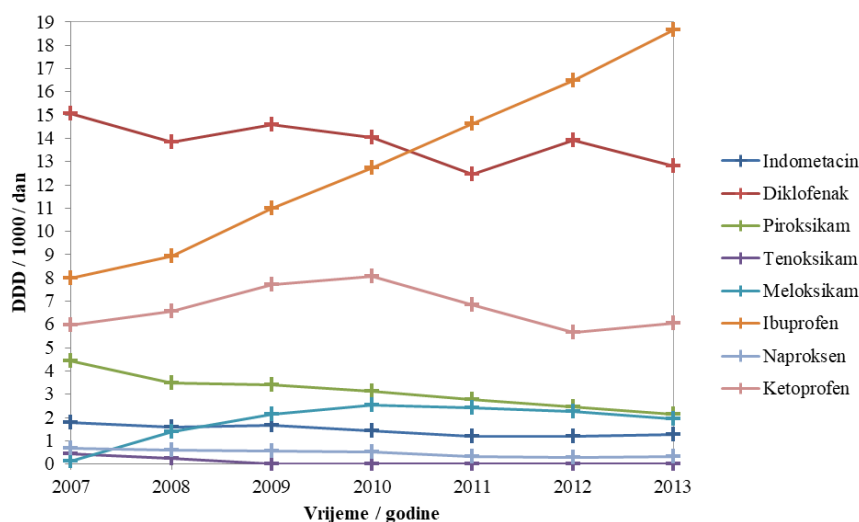
Analgetici se mogu definirati kao tvari koje umanjuju osjećaj boli u nekom organizmu bez trajnih psihoaktivnih učinaka.¹³ Postoje tri glavne skupine analgetika, a to su neopioidni, opioidni¹⁴ i pomoćni analgetici.¹⁵ Svi neopioidni analgetici osim paracetamola spadaju u nesteroidne protuupalne lijekove. To znači da djeluju na način da se upliću u sustav prostaglandina, sustav tvari odgovoran za osjet boli i tako smanjuju upalu, oteknuće, nadražljivost i sam osjećaj boli.¹⁵ Opioidni analgetici kemijski su povezani s morfijem, prirodnom tvari dobivenom iz cvijeta maka, ali i nekim drugim supstancijama dobivenih iz drugih biljaka ili sintetiziranim u laboratoriju. Vrlo su učinkoviti u suzbijanju boli, međutim mogu uzrokovati niz nuspojava kao što su mučnina, pospanost, otežano disanje pa čak i ovisnost.¹⁶ Pomoćni analgetici su obično lijekovi koji se ne koriste konkretno za ublažavanje boli, nego u neke druge svrhe. Primjer pomoćnih analgetika jesu lijekovi protiv depresije koji ujedno mogu ublažiti i bol, zbog čega se koriste za liječenje kronične boli u leđima, glavobolje i neuropatske boli.¹⁵

Jedan od najčešće korištenih analgetika (slika 2.1.) je diklofenak.⁹ Diklofenak (2-[2-(2,6-diklorfenilamino)fenil]octena kiselina)¹⁷ spada u nesteroidne protuupalne analgetike¹⁸ i koristi se za ublažavanje boli u zglobovima, mišićima i kostima. Može se konzumirati u obliku tableta, kaspula i gelova, međutim pacijentima se daje i injekcijom.¹⁹ Struktura diklofenaka (slika 2.1.) omogućava mu sposobnost inhibicije enzima ciklooksigenaze-1 i ciklooksigenaze-2 koji su odgovorni za sintezu prostaglandina, tvari koja uzrokuje osjet boli.²⁰



Slika 2.1. Strukturna formula molekule diklofenaka²¹

U literaturnom istraživanju,²² ispitivala se učestalost konzumiranja nesteroidnih protuupalnih lijekova u Hrvatskoj, a među njima bio je i diklofenak (slika 2.2.). Godine 2007. diklofenak je bio jedan od najčešće korištenih nesteroidnih protuupalnih lijekova s prosječnom konzumiranom dnevnom dozom od 15,06 DDD (engl. *Defined Daily Dose*). Tijekom godina konzumacija diklofenaka polako se smanjivala, a 2013. godine prosječna konzumirana dnevna doza iznosila je 12,82 DDD. U istom istraživanju, jedina supstancija koja se konstantno sve više koristila bila je ibuprofen, dok je ketoprofen pokazivao rast u konzumaciji do 2010. godine i od tad nadalje lagani pad. Indometacin i naproksen te piroksikam i tenoksikam pokazivali su konstantni pad u konzumaciji tijekom perioda istraživanja, za razliku od metoksikama čija je konzumacija rasla, ali u relativno niskim prosječnim dnevnim dozama.²²



Slika 2.2. Grafički prikaz promjene konzumacije pojedinih analgetika u Hrvatskoj od 2007. do 2013. Godine²²

Zbog konstantnog unosa diklofenaka u prirodu i prirodna staništa životinja i biljaka, diklofenak postaje pseudotrajan onečišćivač okoliša.²³ Pseudotrajni onečišćivači su tvari koje su biološki razgradive, međutim uslijed kontinuiranih emisija u okoliš mogu se u njemu trajno akumulirati.²⁴ Brojne kopnene i morske biljne i životinjske vrste imaju sposobnost razgradnje diklofenaka.²³ U životinja razgradnja se uglavnom odvija pomoću hepatobilijarnog sustava, odnosno jetrom,²⁵ a nakon toga se akumulira u krvnoj plazmi i urinu preko čega se izlučuje iz organizma.²³ Uslijed razgradnje u jetri, diklofenak može dovesti do jetrenog oštećenja koje može biti akutno ili kronično.²⁵ Iz tog se razloga diklofenak smatra hepatotoksičnim.¹⁷

Biljna razgradnja ksenobiotika u današnje se vrijeme detaljno proučava. Konkretno govoreći o diklofenaku, nakon razgradnje metaboliti mogu biti brojni, a koji će nastati ovisi o biljci koja ga razgrađuje. Prema literaturnom istraživanju²³ biljke poput *Typha latifolia*, *Populus alba* i *Phalaris arundinacea* razgrađuju diklofenak do metabolita poput 4-hidroksidiklofenaka i 5-hidroksidiklofenaka te 4-glukopiranosiloksidiklofenaka i 5-glukopiranosiloksidiklofenaka.²³ Isti metaboliti mogu se naći i u životinjama. Što se tiče zadržavanja diklofenaka i njegovih metabolita u organizmu biljke, prema literaturnom istraživanju²⁶ u kojem se ispitala brzina apsorpiranja i metaboliziranja diklofenaka na biljnim vrstama *Hordeum vulgare* i *Armoracia rusticana*, već nakon tri sata izloženosti ksenobiotiku svi biljni organi bili su onečišćeni njime.²⁶ Uz brzo dospijevanje u svaki dio biljke, u drugom eksperimentu zabilježen je usporen rast kao i teže obavljanje procesa fotosinteze zbog izloženosti diklofenaku.²⁷

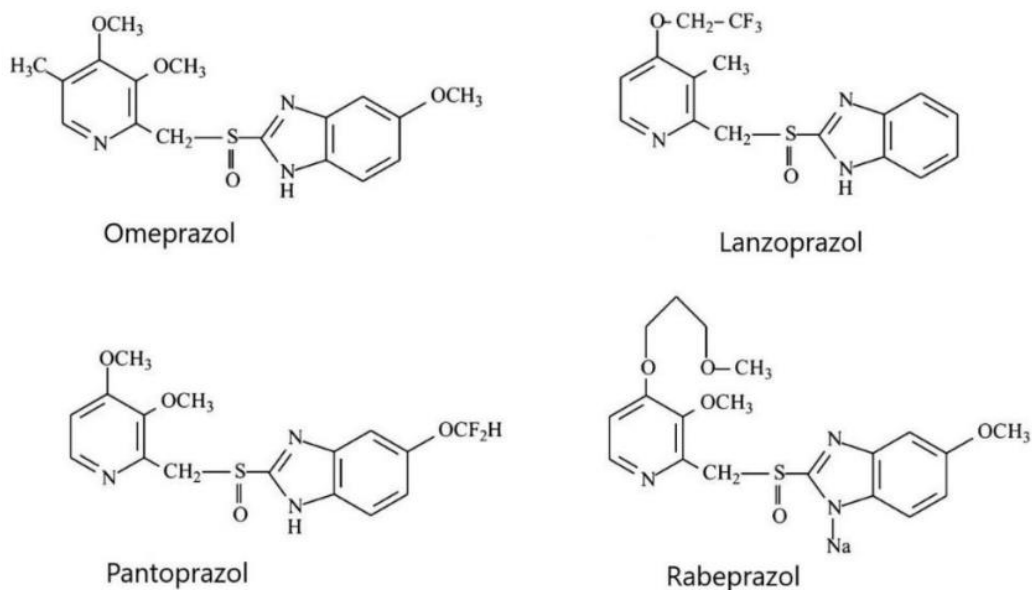
Na slične metabolite diklofenak mogu razgraditi i mikroorganizmi. Zbog njihove sposobnosti razgradnje ksenobiotika kao i njihove cijene i dostupnosti, mikroorganizmi se često koriste u testovima ekotoksičnosti.²³ Testovi ekotoksičnosti nužni su prilikom razvoja novih supstancija kako bi se utvrdila njihova maksimalna dozvoljena koncentracija koja se može otpustiti u prirodu. Između ostalog na taj se način utvrđuje kakvoća vode, tla i zraka, ali i negativni utjecaji ksenobiotika raznih koncentracija koji već i postoje u okolišu.²⁸ U tablici 2.3. dani su mikroorganizmi koji su primjenjeni u određenim testovima ekotoksičnosti diklofenaka.

Tablica 2.3. Testovi ekotoksičnosti čistog diklofenaka i dobiveni rezultati testova

Testovi ekotoksičnosti	Ispitivane koncentracije, $\gamma / \text{mg L}^{-1}$	EC ₅₀ / mg L^{-1}	Ostale nuspojave	Literatura
<i>Raoultella</i> sp. DD4	0,0 - 3000,0	1950,0	Nema mutagenih učinaka na mikroorganizme, bakterija je sposobna metabolizirati 0,6 mg L^{-1} u 28 dana.	29
<i>Daphnia magna</i>	43, 54, 68, 86, 108, 136	96,6	Povećana lipidna i glutation peroksidacija, oštećenje molekule DNA oksidacijom purinskih baza.	30
<i>Vibrio fischeri</i>	-	11,45	-	31
<i>Parachlorella kessleri</i>	0,1 - 0,5	-	55,7% ukupnog diklofenaka u ispitivanim uzorcima bilo je razgrađeno od strane mikroalge.	32

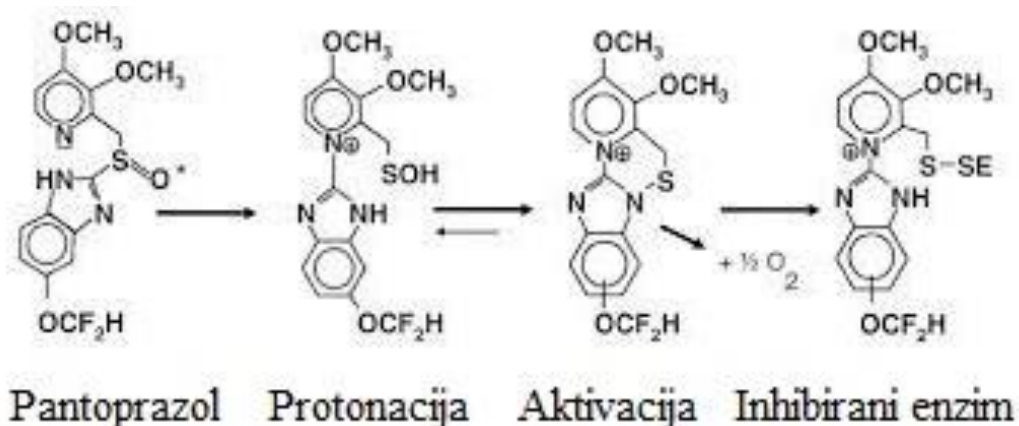
2.1.2. Pantoprazol

Pantoprazol ((*RS*)-5-(difluormetoksi)-2-[(3,4-dimetokspiridin-2-il)metilsulfinil]-3*H*-benzoimidazol)³³ spada u lijekove koji se nazivaju inhibitorima protonske pumpe, a djeluju na način da smanjuju količinu proizvedene želučane kiseline.³⁴ Inhibitori protonske pumpe najčešće se konzumiraju oralno u obliku tableta ili kapsula i danas spadaju u jednu od najpropisivanijih skupina lijekova diljem svijeta. Koriste se pri liječenju ulkusne bolesti želuca i dvanaesnika te pri prevenciji refluksnog ezofagitisa i Zollinger-Ellisonova sindroma. Učinkoviti su i pri liječenju lezija želučane sluznice prilikom konzumiranja nesteroidnih protuupalnih lijekova. Na slici 2.3. prikazane su strukture nekih najčešće konzumiranih inhibitora protonske pumpe.³⁵



Slika 2.3. Strukture najčešće korištenih inhibitora protonske pumpe³⁶

Kao što je vidljivo na slici 2.3., svi inhibitori protonske pumpe dijele zajedničku strukturu supstituiranog benzimidazolskog prstena. Primjenjuju se u obliku neaktivnih acidorezistentnih prolijekova. Nakon oralne konzumacije, inkapsulirani inhibitor protonske pumpe prolazi kroz želudac do alkalnog medija tankog crijeva gdje se prolijeak apsorbira i prelazi u aktivan oblik. Zatim se veže na enzim $H^+/K^+ - ATP$ –azu stanica želučane sluznice čime se djelovanje enzima ireverzibilno inhibira. Mehanizam djelovanja pantoprazola nakon akumulacije u kiselom okolišu želuca prikazan je na slici 2.4.³⁵



Slika 2.4. Mehanizam djelovanja pantoprazola³⁵

Nakon konzumacije, ljudski organizam izlučuje oko 70 – 95% pantoprazola u obliku farmaceutski aktivnih i neaktivnih metabolita.

Međutim, ostatak koji ostaje nerazgrađen može se izlučivanjem izbaciti u okoliš. Drugi način njegova dolaska u okoliš je direktnim odlaganjem otpadne vode iz kućanstva koja je onečišćena pantoprazolom. Iz tog razloga pantoprazol, kao i ostali inhibitori protonske pumpe i njihovi metaboliti mogu se naći u raznim vrstama vode, tlu i sedimentu, ali mogu biti i akumulirani u biljkama. Budući da se inhibitori protonske pumpe u okolišu mogu razgraditi i nebiološkim putem, stvarni negativan utjecaj pantoprazola na okoliš je upitan, ali i još uvijek nedovoljno istražen. Iz tog razloga bitno je provoditi ekotoksikološke testove kako bi se utvrdila njegov stvaran utjecaj na cjelokupni živi svijet.³⁶ Neki od provedenih ekotoksikoloških testova prikazani su u tablici 2.4.

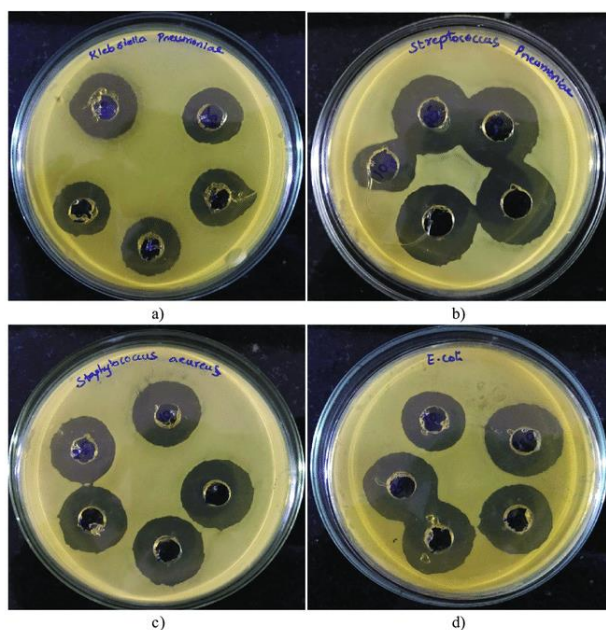
Tablica 2.4. Testovi ekotoksičnosti čistog pantoprazola i dobiveni rezultati testova

Testovi ekotoksičnosti	Ispitivane koncentracije, γ / mg L^{-1}	EC_{50} / mg L^{-1}	Ostale nuspojave	Literatura
<i>Campylobacter jejuni</i>	4000,0-20000,0	-	Izloženost pantoprazolu utjecala je na rast i morfologiju bakterija te na njihovo stvaranje biofilмова, pojava smanjene mogućnosti akumulacije kisika.	37
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Eubacterium ventriosum</i> , <i>Dorea longicatena</i> , <i>Escherichia coli</i>	0,005, 0,05, 0,5, 5	-	Osjetljivost bakterija <i>Bifidobacterium adolescentis</i> i <i>Eubacterium ventriosum</i> već pri koncentraciji pantoprazola od $0,005 \text{ mg L}^{-1}$, smanjen rast bakterija <i>Escherichia coli</i> i <i>Dorea longicatena</i> pri koncentraciji od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$	38
<i>Lactobacillus</i>	2,5-2500	-	Pantoprazol je smanjio pH vrijednost kulture što je značajno utjecalo na rast i morfologiju bakterije.	39
<i>Blastocystis</i> , <i>Candida albicans</i>	0,06-0,1	-	Iznimna inhibicija rasta bakterija; pantoprazol je potencijalno dobar lijek za liječenje od navedenih bakterija.	40

2.2. Ispitivanje ekotoksičnosti

Ekotoksikologija je grana toksikologije, odnosno znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem toksičnog utjecaja prirodnih i sintetskih tvari na cjelokupni ekosustav koji uključuje mikroorganizme, biljke, životinje i ljude.⁴¹ Tako ju je definirao René Truhaut 1977. godine prilikom njenog uvođenja kao novu znanstvenu disciplinu.⁴² Moderna definicija ekotoksikologije određuje ju kao znanost koja proučava izravni ili neizravni učinak ksenobiotika na ekosustav, to jest njihov odnos sa živućim organizmima i njihovom organizacijom, odnos sa neživom prirodom te odnos s čovjekom. Ekotoksikologija sama po sebi obuhvaća i druge znanosti poput ekologije, fiziologije, molekularne biologije i analitičke kemije. Krajnji cilj znanstvenih istraživanja u vidu ekotoksikologije jest mogućnost točnog predviđanja raznih utjecaja ksenobiotika na ekosustav. Isto tako na temelju tih istraživanja moguće je i osmisлити najučinkovitiji način saniranja ekosustava u slučaju ekoloških nesreća.⁴³

Testovi ekotoksičnosti podrazumijevaju eksperimente provedene u laboratoriju. Svi testovi provode se prema normama koje su propisane od strane Internacionalne organizacije za standardizaciju (ISO) i Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD).⁴⁴ Na samom početku razvoja ekotoksikologije, testovi ekotoksičnosti provodili su se prvenstveno na sisavcima. S vremenom su se počele u tu svrhu koristiti i biljke, međutim u današnje vrijeme najčešće korišteni organizmi za provođenje ovih testova su mikroorganizmi.⁴² Takav oblik testova, odnosno testovi koji se odrađuju na živućim organizmima nazivaju se *in vivo* (lat. unutar živog)⁴⁵ testovi.⁴⁶ Vrsta testnog organizma odabire se na temelju potreba i ciljeva eksperimenta. Testni organizam može biti i čovjek ukoliko se radi o kliničkim ispitivanjima na izabranim skupinama ljudi uz strogo propisane uvjete. Zbog čestih slučajeva trpljenja boli tijekom eksperimenta kod ljudi, ali i životinja, takvi oblici testova ne smatraju se etičnima.⁴⁷ S druge strane postoje i tzv. *in vitro* testovi (lat. u staklu). Takav tip testa podrazumijeva ispitivanje izvan živog organizma, odnosno uključuje ispitivanja na izoliranim tkivima, organima ili stanicama.⁴⁸ *In vitro* testovi u današnje su vrijeme sve popularniji zbog jednostavnosti i kratkog vremena izvođenja testa te njegove niske cijene. Isto tako, sve veći rast svijesti o moralnim načelima svakog živog bića na planetu Zemlji ide u korist *in vitro* testovima.⁴⁹ Primjer *in vitro* testa antibakterijskog djelovanja biljne komponente prikazan je na slici 2.5. U kontekstu ovog rada provedeni su isključivo *in vitro* testovi na određenim mikroorganizmima.



Slika 2.5. Literaturni primjer⁵⁰ *in vitro* testa antibakterijskog djelovanja vodenog ekstrakta biljke *Cucumis sativus* na bakterijskim kulturama a) *Klebsiella pneumoniae*, b) *Streptococcus pneumoniae*, c) *Staphylococcus aureus* i d) *Escherichia coli*⁵⁰

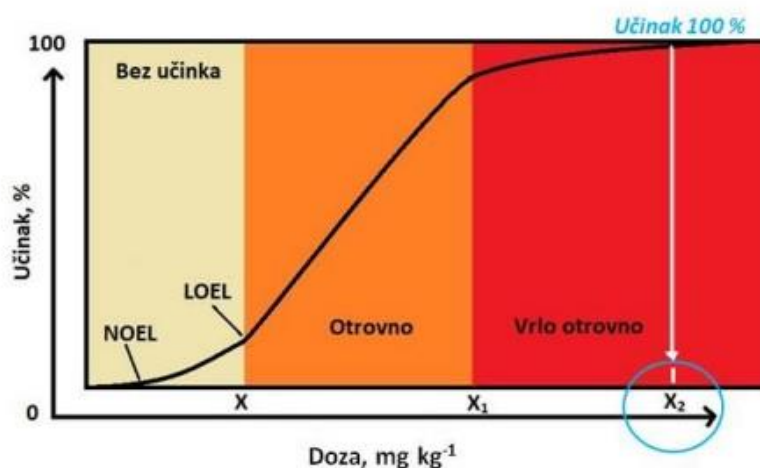
Ekotoksikologija razlikuje dva načina djelovanja ekotoksičnih tvari na organizme, a to su akutna i kronična ekotoksičnost. Akutna ekotoksičnost tvari uzrokuje brzu smrt organizma, nedugo nakon njegova izlaganja toj tvari.⁴² Testovi kojima se ispituje ovakva vrsta ekotoksičnosti mogu trajati 24 sata do 14 dana. Relativno su jednostavni za izvođenje i jeftini te se mogu primijeniti na brojnim organizmima. Rezultati ovakvih testova najčešće su prikazani u obliku LC₅₀ ili LD₅₀ vrijednosti te u obliku EC₅₀ vrijednosti⁴⁴. Kratice rezultatnih vrijednosti objašnjene su kasnije u ovom poglavlju. Kronična ekotoksičnost tvari uzrok je smrti organizma nakon dužeg vremenskog perioda u kojem je organizam izložen ekotoksičnoj tvari.⁴² Testovima kronične ekotoksičnosti ispituje se utjecaj niskih, subletalnih doza ekotoksičnih tvari na organizam. Nedostatak ovakvih testova ekotoksičnosti je njihovo dugo trajanje, ponekad čak 4 do 7 tjedana, ovisno o korištenom organizmu. Međutim, test kronične ekotoksičnosti daje preciznije rezultate koji se smatraju legitimnima za predviđanje utjecaja ksenobiotika na cjelokupne ekosustave.⁴⁴

Doze u ekotoksikološkom smislu predstavljaju količinu otrovne tvari koja se unosi u organizam u određenim vremenskim intervalima. One mogu uzrokovati određene odgovore koji označavaju udio populacije koja pokazuje određenu fiziološku promjenu kao posljedicu djelovanja ekotoksičnih tvari.

Doze se mogu opisivati na više načina, a najčešće kao smrtonosna ili letalna doza (engl. *lethal dose*, LD), gdje je odgovor smrt populacije, toksična doza (engl. *toxic dose*, TD), gdje je odgovor štetan učinak, ali ne i smrt te sentinel doza (engl. *sentinel dose*, SD), pri kojoj odgovor pokazuje minimalnu štetnost ispitivane tvari. Pored kratice za dozu, u indeksu se piše broj koji predstavlja postotak populacije na koju je ekotoksična tvar utjecala, npr. LD₅₀ predstavlja dozu koja uzrokuje smrt u 50% populacije.⁵¹ U kontekstu ovog rada doza koja se koristila za opisivanje ekotoksičnog učinka ksenobiotika bile su EC₂₀ i EC₅₀ (engl. *effective concentration*), odnosno efektivne koncentracije koje smanjuju određenu fiziološku osobinu u 20% i 50% populacije.⁵² Prema Globalnom harmoniziranom sustavu klasifikacije i označavanja kemikalija (engl. *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*), na temelju EC₅₀ vrijednosti tvari se mogu klasificirati kao visoko toksične ($EC_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$), srednje toksične ($1 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 10 \text{ mg L}^{-1}$), slabo toksične ($10 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 100 \text{ mg L}^{-1}$) te netoksične ($100 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50}$) tvari.⁵³

Odnos doza-odgovor ima veliki značaj u ekotoksikologiji jer predstavlja povezanost između količine ekotoksične tvari kojemu je neki organizam izložen u nekom vremenu i odgovora na tu dozu, odnosno učinka te tvari na organizam.⁵⁴ Osim toga, za određivanje ekotoksičnosti tvari može se koristiti i odnos vrijeme-odgovor koji predstavlja ovisnost promjene određene fiziološke osobine mikroorganizma o vremenu njegove izloženosti toj tvari.

55



Slika 2.6. Primjer idealne „S“ krivulje⁵⁴

Na slici 2.6. prikazana je krivulja koja objašnjava odnos doze i odgovora (tzv. krivulja doza-odgovor, karakteristična „S“ krivulja).

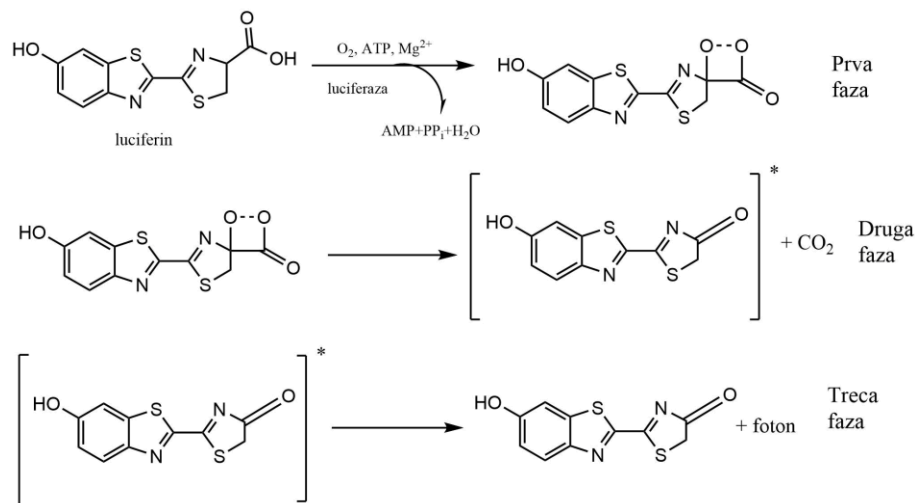
Na samom početku krivulje očituju se i doze NOEL (engl. *No Observed Effect Level*)⁵⁴ ili NOEC (engl. *No Observed Effect Concentration*)⁵⁶, što predstavlja najvišu dozu bez učinka te LOEL (engl. *Lowest Observed Effect Level*) ili LOEC (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*)⁵⁶, što predstavlja najnižu izmjerenu dozu s odgovorom. Područje dijela grafa od 0 do X ili doze LOEC pokazuje spori rast krivulje, što ukazuje na slabu ili beznačajnu ekotoksičnost tvari. Srednji dio grafa (od X do X₁) ukazuje na srednju ekotoksičnost tvari, što se može vidjeti i u naglom rastu krivulje, odnosno inhibicije. U zadnjem dijelu grafa (od X₁ do X₂) može se uočiti sve sporiji rast, ali u visokim vrijednostima inhibicije do 100%, što označava koncentraciju tvari koja uzrokuje visoku ekotoksičnost tvari.⁵⁴

Uz navedene bakterije u opisu slike 2.5. postoje brojni drugi mikroorganizmi i organizmi koji se koriste u *in vitro* ispitivanjima ekotoksičnosti. Neki od primjera su morske alge (*Vibrio fischeri*), brojne plijesni (*Aspergillus niger*, *Mucor circinelloides*) i kvasci (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*) i sl. Jedan od primjera organizama je i vodenbuha *Daphnia magna*. Pomoću nje često se provode testovi akutne imobilizacije i reproduktivne ekotoksičnosti. Test akutne imobilizacije podrazumijeva izlaganje vodenbuha (mlađih od 24 sata) nizu koncentracija ispitivane tvari u razdoblju od 48 sati. U tom periodu (nakon 24 i 48 sati) bilježi se nepokretnost vodenbuha, odnosno njihova smanjena sposobnost plivanja, a rezultati se iskazuju pomoću EC₅₀ („Effective Concentration“) vrijednosti. S druge strane, testom reproduktivne ekotoksičnosti ispituje se učinak kemikalija na reproduktivnu uspješnost vodenbuhe, također mlađe od 24 sata. U ovom slučaju ispitivanje traje 21 dan, a na kraju ispitivanja o ocjenjuje se ukupni broj živih potomaka po roditeljskoj životinji koja je živa na kraju ispitivanja. Rezultati se prikazuju pomoću LOEC i NOEC vrijednosti. Testovi ekotoksičnosti mogu se provoditi u svrhu određivanja učinka ekotoksičnih tvari na rast vrsta jednostaničnih zelenih algi. Takva vrsta testa provodi se u relativno kratkim periodima (najčešće 72 sata) prilikom čega se mogu ocijeniti učinci kroz nekoliko generacija, što se provodi izravnim brojanjem živih stanica pomoću mikroskopa, komorica za brojanje i sl. Rezultati se prikazuju pomoću EC₅₀ ili NOEC vrijednosti.⁵⁷

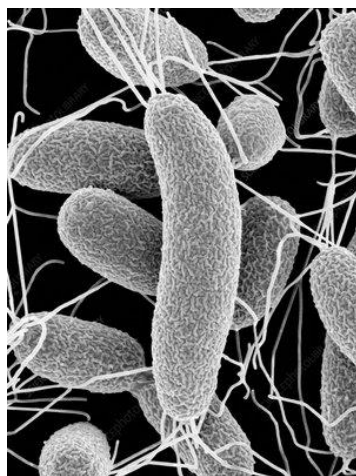
2.2.1. Morska bakterija *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri ili *Aliivibrio fischeri* (slike 2.8.) je gram – negativna, nepatogena, morska bakterija.⁵⁸ U prirodi se može naći kao slobodna, ali i u simbiozi s određenim lignjama i ribama.⁵⁹

Specifična je po svom svojstvu bioluminiscencije⁵⁹ koje se temelji na kemijskoj reakciji oksidacije molekule luciferina u prisutnosti enzima luciferaze (slika 2.7.). Na taj se način emitira svjetlost plave ili zelene boje.⁶⁰



Slika 2.7. Mehanizam stvaranja svjetlosti pomoću svojstva bioluminiscencije



Slika 2.8. Morska bakterija *Vibrio fischeri* snimljena pomoću SEM-a⁶¹

Bioluminiscencijom bakterije uspostavljaju komunikaciju, a ta se pojava zove *quorum sensing*. *Quorum sensing* podrazumijeva minimalnu, kritičnu koncentraciju bakterijskih stanica u populaciji potrebnih da se dogodi zajednička genska ekspresija i koordinirani odgovor na promjene u njihovu okolišu. Ova pojava otkrivena je prilikom proučavanja simbiotskog odnosa bakterije *Aliivibrio fischeri* i havajske kratkorepe lignje *Euprymna scolopes* (slika 2.9.). Bakterije žive u lignjinom svjetlosnom organu i štite je od grabežljivaca oponašajući vanjsku, noćnu svjetlost, a lignja im zauzvrat omogućuje šećere i aminokiseline kao hranu.⁶²



Slika 2.9. Havajska kratkorepa lignja *Euprymna scolopes*⁶³

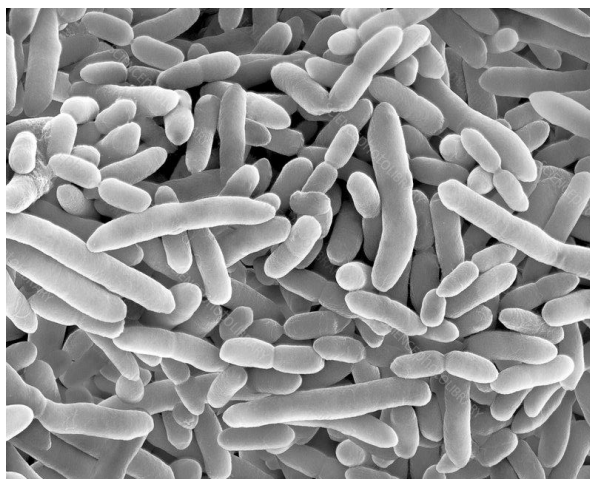
Upravo svojstvo bioluminiscencije, međustanične komunikacije i mogućnosti individualnog i simbiotskog života čini ovu bakteriju iznimno pogodnom za izvođenje ekotoksikoloških testova.⁵⁹ Tipičan oblik testa s bakterijama *Vibrio fischeri* uključuje mjerenje intenziteta bioluminiscentne svjetlosti prije i nakon izlaganja ekotoksičnoj tvari. Vrijeme izlaganja ekotoksičnoj tvari može varirati, najčešće iznosi 5, 10, 15, 20 ili 30 minuta, a sam test može se primijeniti za ispitivanje organskih ili anorganskih tvari, odnosno antibiotika, herbicida, teških metala, atmosferskih onečišćivača i sl. Ovakav tip testa omogućava ispitivanje akutne i kronične toksičnosti te je primarna metoda ispitivanja ekotoksičnosti prvenstveno zbog svoje niske cijene i brzine izvođenja, ali i jednostavnosti ponovljivosti rezultata. Test ispitivanja inhibicije intenziteta bioluminiscentne svjetlosti pokazuje najvišu osjetljivost, u usporedbi s drugim tipičnim testovima na vodenim organizmima poput respirometrije, ispitivanja inhibicije nitrifikacije i inhibicije enzimske aktivnosti. Također, sama bakterija *Vibrio fischeri* pokazuje izrazito dobru osjetljivost prema niskim koncentracijama određenih teških metala i organskih spojeva u usporedbi s drugim bioluminiscentnim bakterijama poput *Pseudomonas fluorescens*.⁶⁴ U tablici 2.5. prikazani su rezultatne vrijednosti literaturnog ispitivanja⁶⁵ ekotoksičnosti teških metala i fenola na bakterijama *Vibrio fischeri* i *Pseudomonas fluorescens*. Rezultati pokazuju niske vrijednosti EC₅₀ dobivenih u testu s *Vibrio fischeri* u odnosu na test s *Pseudomonas fluorescens*, što ukazuje na veću osjetljivost bakterije *Vibrio fischeri*.

Tablica 2.5. Usporedba utjecaja teških metala i fenola na bakterijske kulture *Vibrio fischeri* i *Pseudomonas fluorescens*⁶⁵

Ekotoksična tvar	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	EC ₅₀ / mg L ⁻¹	EC ₅₀ / mg L ⁻¹
Zn ²⁺	0,87	1,27
Cu ²⁺	0,44	1,00
Ni ²⁺	3,64	1,86
Cd ²⁺	1,36	0,085
Fenol	15,4	210

2.2.2. Bakterija *Pseudomonas putida*

Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* (slika 2.10.) gram – negativna je, štapičasta i nefermentirajuća bakterija. Najčešće se može izolirati iz vode i tla.⁶⁶ Zbog velikog broja enzima koji bakterijski rod *Pseudomonas* posjeduje, ova bakterija ima dobru sposobnost bioremedijacije brojnih ksenobiotika u okolišu. Iz tog razloga koristi se za uklanjanje teških metala i brojnih organskih sintetičkih spojeva kojima je neki dio ekosustava onečišćen. Bakterija *Pseudomonas putida* otporna je na široki raspon antibiotika i na ekstremne uvjete poput niske temperature i nedostatak hranjivih tvari.⁶⁷



Slika 2.10. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* snimljena pomoću SEM-a⁶⁸

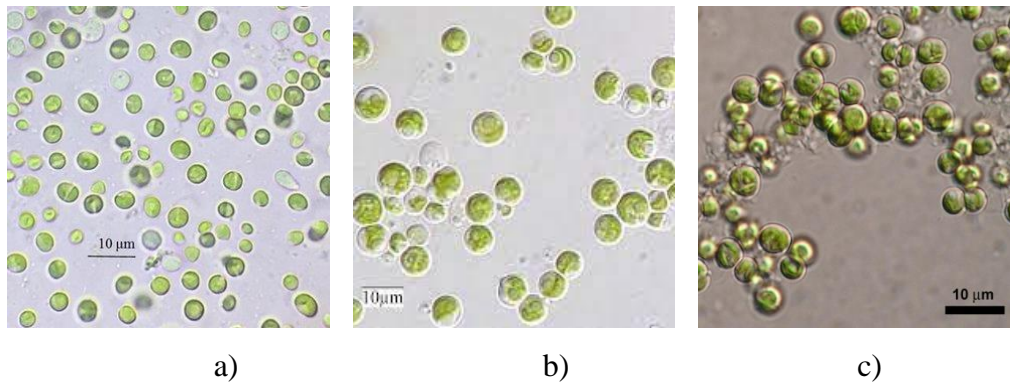
Upravo zbog otpornosti ove bakterije, ako i njezine dobre mogućnosti probavljanja brojnih ksenobiotika, *Pseudomonas putida* ima široku primjenu u ekotoksikološkim istraživanjima. Najčešća vrsta testa koja uključuje ovu bakteriju temelji se na promatranju njihova rasta tijekom izloženosti ekotoksičnoj tvari.

Ispituje se više koncentracija ekotoksične tvari na suspenziji bakterijske kulture, a rezultati se prikupljaju svakih 16-24 sata.⁶⁴ Rezultati podrazumijevaju određivanje broja bakterijskih stanica, kao i spektrofotometrijsko određivanje optičke gustoće bakterijske suspenzije prilikom prolaska zrake svjetlosti određene valne duljine kroz nju. Optička gustoća definira se kao mjera sposobnosti optičke komponente neke otopine da uspori širenje svjetlosti. Taj pojam često se zamjenjuje s apsorbancijom koja označava sposobnost optičke tvari da apsorbira svjetlost. Optička gustoća najčešće se mjeri kako bi se dobila informacija o količini bakterija u određenoj suspenziji, dok se mjerenje apsorbancije koristi za utvrđivanje veličine bakterijskih molekula u suspenziji,⁶⁹ kao što su enzimi, metaboliti, plinovi i sl.⁷⁰ Mjerenje ovih dviju svojstava mogu se mjeriti za isti sustav kako bi se dobila potpuna slika bakterijske suspenzije,⁶⁹ međutim u kontekstu ovog rada mjerila se samo optička gustoća za određivanje inhibicije rasta bakterija i mikroalgi.

CFU (engl. *Colony Forming Units*) je jedinica koja se koristi za izražavanje ukupnog broja živih stanica u testnom uzorku.⁷¹ To je ukupan broj živih stanica, tj. ukupan broj kolonija u 1 mL ili 1 L uzorka. Tehnika određivanja CFU koja se koristila u testu primjenom bakterije *Pseudomonas putida* podrazumijevala je izravno brojanje izraslih kolonija bakterije na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama i to je klasična metoda koja se koristi u mikrobiologiji.⁷² Rezultati također mogu biti prikazani kao postotak inhibicije rasta bakterija ili u obliku EC_x vrijednosti.⁷³ Ovakav tip testa izrazito je pogodno osjetljivosti u slučaju korištenja bakterije *Pseudomonas putida*. U literaturnom istraživanju⁷⁴ u kojem se provodio test inhibicije rasta na bakterijskim kulturama *Pseudomonas putida* i *Vibrio fischeri*, ispitala se ekotoksičnost određenih teških metala, a test se pokazao osjetljivijim i pogodnijim uz korištenje bakterije *Pseudomonas putida*, nego *Vibrio fischeri*.⁷⁴

2.2.3. Mikroalga *Chlorella* sp.

Jednostanične mikroalge roda *Chlorella* (slika 2.11.) česti su mikroorganizmi prisutni prvenstveno u slatkoj vodi, ali i u vodi, zraku i tlu. Ovisno o njihovom staništu, njihove morfološke i fiziološke karakteristike se mijenjaju, zbog čega je ovaj rod mikroalgi vrlo teško identificirati. Iznimno se brzo razmnožavaju nespolnim putem, a njihovo svojstvo vršenja procesa fotosinteze, redukcije nitrata te njihova fiziološka i biokemijska svojstva čine ih idealnim kandidatima za ekotoksikološka istraživanja u kojima se ispituje utjecaj ksenobiotika na navedena svojstva. Ima široku primjenu u agrikulturni, prehrambenoj industriji, ali i biotehnologiji.⁷⁵ U današnje vrijeme dosta se istražuje njeno svojstvo sinteze biodizela.⁷⁶



Slika 2.11. Vrste mikroalgi roda *Chlorella*: a) *Chlorella vulgaris*⁷⁷, b) *Chlorella sorokiniana*⁷⁸, c) *Chlorella minutissima*⁷⁹

Upravo kao i test s bakterijom *Pseudomonas putida*, ekotoksikološki testovi s mikroalgama najčešće podrazumijevaju ispitivanje inhibicije njihova rasta. Metode kojima se provodi ovakva vrsta testa zahtijevaju strogo određene uvjete poput temperature, količine hranjivih tvari, pH, izbor medija te količine svjetlosti. Metode se temelje na brojanju stanica mikroalgi tijekom izloženosti ekotoksičnoj tvari, kao i na određivanju optičke gustoće bakterijske suspenzije.⁸⁰ Za određivanje CFU vrijednosti mikroalge *Chlorella* sp. koristila se druga tehnika kojom se pomoću Thominove komorice i svjetlosnog mikroskopa izravno određuje broj stanica mikroalge. Postoje još brojne komorice koje se koriste u istu svrhu, kao npr. poboljšana Neubauerova, Buerkerova, Buerker-Tuerkova, Fuchs-Rosenthalova, Nageotteova i Malassezova komorica. Svaka od njih sastoji se od određenog broja kvadrata pomoću kojih se određuje ukupan broj stanica.⁸¹ Međutim, ova metoda brojanja nije potpuno pouzdana, zbog irelevantnog broja stanica koje se nalaze na komorici, ali i potencijalno netočnih fizičkih dimenzija komorice.⁸²

Budući da veći laboratoriji farmaceutskih korporacija zahtijevaju brže, efikasnije i točnije rezultate, razvijene su i druge, računalne metode brojanja mikroorganizama. Literaturno istraživanje koristilo se tzv. automatskim brojačima kolonija, koji su prepoznavali i brojali kolonije bakterije *Streptococcus pneumoniae* obojane tetrazolijevim bojama.⁸³ Takvo mjerenje temelji se na analizi slika izraslih kolonija. Druge popularne metode također podrazumijevaju i kvantitativni PCR test, fluorescentno markiranje i sondiranje genoma.⁷²

Rezultati se najčešće prikazuju u obliku EC₅₀ vrijednosti, a mogu varirati ovisno o osjetljivosti određenih vrsta mikroalgi na ekotoksičnu tvar pri različitim uvjetima. Najčešće korištena vrsta mikroalge u testovima ekotoksičnosti je *Selenastrum capricornutum*. To je vrsta „srednje“ otpornosti, zbog čega ju je lako uzgojiti, održavati i koristiti pri ispitivanjima. Njoj slična vrsta je mikroalga *Scenedesmus subspicatus* i približno je iste osjetljivosti.

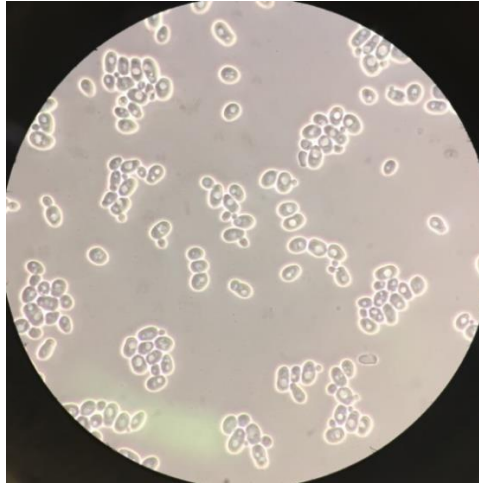
U ekotoksikološkim testovima također se koriste i već spomenute mikroalge roda *Chlorella* sp., koje su još općenito otpornije nego prethodno navedene mikroalge, što onemogućuje detekciju izrazito malih koncentracija određenih ekotoksičnih tvari.⁸⁴ Literaturno istraživanje⁸⁵ pokazalo je upravo slabiju osjetljivost mikroalge *Selenastrum capricornutum* na određene koncentracije supstituiranih fenola u odnosu na mikroalgu *Chlorella vulgaris* (tablica 2.6.).

Tablica 2.6. Utjecaj različitih klorofenola na mikroalge *Selenastrum capricornutum* i *Chlorella vulgaris*⁸⁵

Ekotoksična tvar	<i>Selenastrum capricornutum</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
	EC ₅₀ / mg L ⁻¹	EC ₅₀ / mg L ⁻¹
fenol	150	370
2-klorfenol	70	170,00
3-klorfenol	29	-
4-klorfenol	38	29
2,3-diklorfenol	5	-
2,4-diklorfenol	14	9,2
2,6-diklorfenol	29	9,7
3,4-diklorfenol	3,2	-
3,5-diklorfenol	2,3	-
2,3,4-triklorfenol	2	-
2,4,6-triklorfenol	3,5	10
2,3,4,6-tetraklorfenol	1,3	10,1
pentaklorfenol	0,42	10,3

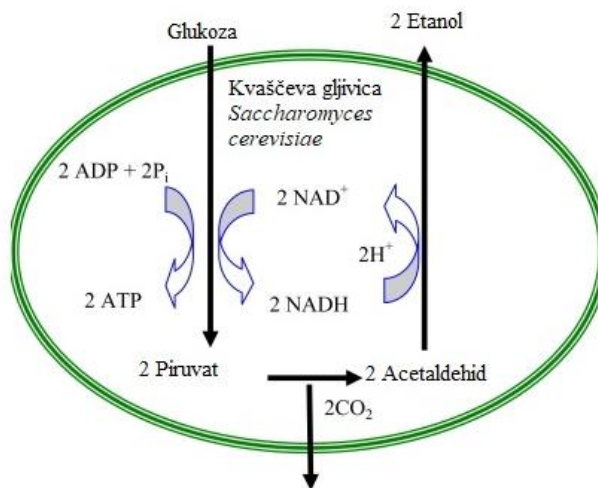
2.2.4. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasci su jednostanične gljive ovalnog ili kuglastog oblika. Postoje brojne vrste kvasca među kojima je najpoznatiji i najviše se koristi kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (grč. *saccharomyces* – šećerna plijesan, lat. *cerevisia* – pivo) (slika 2.12.). To je mikroorganizam čiji je genom prvi eukariotski potpuno sekvencioniran genom. Zbog korijena svojeg imena često se naziva i pivskim, odnosno pekarskim kvascem. Razmnožava se pupanjem, a hrani se uglavnom različitim vrstama šećera. Njihova prehrana šećerom predstavlja proces fermentacije koji se koristi najviše u prehrambenoj industriji. Proces fermentacije koristio se pri pravljenju kruha još u staroj egipatskoj civilizaciji prije 5000 godina. Vjeruje se da je prvi put izoliran s opne bobice grožđa.⁸⁶



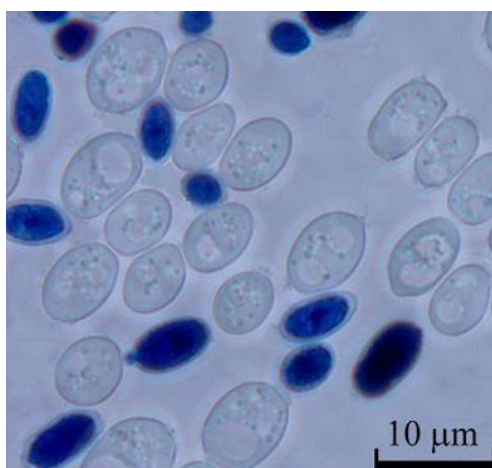
Slika 2.12. Stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae* snimljene pod mikroskopom⁸⁷

U današnje vrijeme kvaščeva sposobnost fermentacije upotrebljava se pri proizvodnji brojnih alkoholnih pića, kao i pekarskih proizvoda. Sam proces fermentacije temelji se na probavljanju različitih šećera poput glukoze, maltoze i slično. U anaerobnim uvjetima, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* procesom glikolize metabolizira šećer do formiranja piruvatne kiseline. Pomoću enzima piruvatne dekarboksilaze, piruvatna kiselina prelazi u oblik acetaldehida i ugljikova dioksida. Acetaldehid je naposljetku reduciran do etanola pomoću enzima alkoholne dehidrogenaze, a pri tome se ispušta i molekula NAD^+ . Dakle, ugljikov dioksid, CO_2 , i etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, glavni su produkti fermentacije⁸⁸ (slika 2.13.).



Slika 2.13. Reakcije procesa fermentacije koji izvodi kvaščeva gljivica *Saccharomyces cerevisiae*

Test koji se najčešće koristi za ispitivanje ekotoksičnih tvari na kvaščevim gljivicama je tzv. YTT (engl. *Yeast Toxicity Test*). Takva vrsta testa podrazumijeva dvije metode rada, a to su orijentacijski test bojanjem metilenskim modrilom te fermentacijski test s injekcijskim štrcaljkama. Za orijentacijski test bojanjem metilenskim modrilom koristi se kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* inkubirana 40 sati pri 25°C. Pomoću kulture napravi se suspenzija čija optička gustoća iznosi 0,55 do 0,60 pri svjetlosti valne duljine 550 nm. Određeni volumen suspenzije prenese se u otopinu tvari čija se ekotoksičnost ispituje te se nakon toga inkubira 6 sati pri 25°C. U suspenziju se zatim doda metilensko modriilo, nakon čega se stanice kvasca broje pod mikroskopom. Sve neobojene stanice kvasca predstavlja žive, fiziološki aktivne stanice kvasca, dok su one obojene mrtve, stare ili fiziološki oslabljene stanice (slika 2.14.). Računajući postotak neobojenih stanica i uspoređujući ga s referentnim uzorkom, dobiva se rezultatna vrijednost EC₅₀ ili LC₅₀.⁸⁹



Slika 2.14. Neobojene (žive) i obojane (mrtve) stanice kvasca *Saccharomyces cerevisiae*⁸⁹

Za još preciznije određivanje ekotoksičnosti tvari može se provesti fermentacijski test s injekcijskim štrcaljkama. Ovaj test temelji se na kvaščevoj sposobnosti fermentacije saharoze, odnosno proizvodnji ugljikova dioksida uslijed procesa fermentacije. Pomoću kulture kvasca inkubirane 6 sati pri 25°C te otopine saharoze i ekotoksične tvari napravi se suspenzija koja se ulije u injekcijske štrcaljke te stavi na inkubaciju u trajanju od 16 sati pri 25°C. Rezultatne vrijednosti volumena proizvedenog ugljikova dioksida očitavaju se na štrcaljki te se dalje obrađuju do vrijednosti inhibicija ili LC₅₀.⁸⁹ Fermentacijski test s injekcijskim štrcaljkama koristio se i u ovom radu, a postavljen eksperiment prikazan je kasnije u radu, u poglavlju 3.2.4. na slici 3.9.

2.3. Međudjelovanje kemijskih spojeva na organizam

Ekotoksikološko međudjelovanje ksenobiotika je posljedica izlaganja organizma prema više različitih ksenobiotika istovremeno, prilikom čega dolazi do biološke reakcije organizma drugačije od reakcije do koje bi došlo prilikom izlaganja samo jednom ksenobiotiku. Međudjelovanja mogu biti različita ovisno o tome radi li se o istovremenoj izloženosti ksenobioticima ili postupnoj i individualnoj izloženosti. Prilikom istovremene izloženosti, ksenobiotici se „natječu“ za ista molekularna mjesta adsorpcije, aktivacije, detoksifikacije i slično. Ksenobiotici u tom slučaju mogu međudjelovati sinergistički, antagonistički ili aditivno.⁹⁰

Sinergistički efekt u ekotoksikologiji podrazumijeva povećanje ekotoksičnih posljedica, poput inhibicije nekog svojstva organizma, prilikom izlaganju dvama ili više ksenobiotika. Inhibicija je u tom slučaju veća nego ona koju uzrokuju ksenobiotici pojedinačno. Antagonistički efekt je potpuna suprotnost sinergističkog, što znači da se kombinacijom efekata dvaju ili više ksenobiotika smanjuje njihovo ekotoksikološko djelovanje. Aditivni efekt se javlja kada je učinak dvaju ili više ksenobiotika jednak sumi učinaka koje uzrokuju pojedinačni ksenobiotici.⁹¹

S druge strane, u slučaju izlaganja dvama ili više ksenobiotika u različitim vremenskim periodima, prvi od njih može uzorkovati određene molekularne i stanične promjene što može promijeniti biološki odgovor sljedećeg ksenobiotika kojem je organizam izložen. Ovisno o metaboličkim reakcijama, ovakav tip međudjelovanja ksenobiotika može pojačati ili smanjiti ekotoksičnost.⁹²

Budući da su ljudi i cjelokupni ekosustav konstantno izloženi ne samo individualnim ksenobioticima, nego i njihovim smjesama, nužno je provoditi ekotoksikološke testove na samim smjesama. Tako se razlikuju dva tipa ekotoksikoloških ispitivanja: testiranje kombiniranih efekta čistih ksenobiotika u smjesi za koju se smatra da će povećati njihov ekotoksikološki učinak te testiranje „stvarnih“ kompleksnih smjesa ksenobiotika uzetih iz različitih bioloških sustava.⁹³ U kontekstu ovog rada ispitivali su se učinci smjesa diklofenaka i pantoprazola različitih omjera prilikom istovremenog izlaganja. U tablici 2.5. prikazani su ekotoksikološki testovi za smjese diklofenaka, pantoprazola i nekih drugih ksenobiotika, ako i njihovi rezultati.

Tablica 2.5. Testovi ekotoksičnosti smjese ksenobiotika i dobiveni rezultati testova

Smjesa	Testni organizam	γ / mg L ⁻¹	EC ₅₀ / mg L ⁻¹	Ostale nuspojave	Literatura
Diklofenak, ibuprofen, naproksen, acetilsalicilna kiselina	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	Diklofenak: 11,1, 12,3, 14,0, 18,0, 23,1	-	Ekotoksičnost smjese bila je povećana čak i pri koncentracijama ksenobiotika koje individualno nisu pokazivale negativne učinke.	94
		Ibuprofen: 18,2, 25,7, 38,9, 85,6, 188,3			
		Naproksen: 66,5, 80,4, 101,1, 156,4, 241,9			
		Acetilsalicilna kiselina: 21,6, 22,6, 24,0, 26,7, 29,7			
	<i>Daphnia magna</i>	Diklofenak: 2,5, 3,8, 6,4, 17,0, 45,3			
		Ibuprofen: 14,6, 16,5, 19,1, 25,3, 33,5,			
		Naproksen: 6,6, 9,9, 16,2, 41,6, 106,7			
		Acetilsalicilna kiselina: 9,5, 11,5, 14,4, 22,0, 33,8			
Diklofenak, sulfametoksazol	<i>Aliivibrio fischeri</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Lemna minor</i>	-	<i>Vibrio fischeri</i> : 15,91 ± 0,99	Smjesa ima aditivni učinak na <i>Aliivibrio fischeri</i> , aditivni do sinergistički učinak na <i>Daphnia magna</i> te čisti sinergistički efekt na <i>Lemna minor</i> .	95
			<i>Daphnia magna</i> : 13,59 ± 0,70		
			<i>Lemna minor</i> : 12,56 ± 4,48		
Pantoprazol, doksorubicin	<i>Homo sapiens</i>	Pantoprazol: 80 mg, 160 mg, 240 mg, 360 mg	-	Visoke koncentracije pantoprazola (240 mg) u kombinaciji pojačavaju antitumorska svojstva doksorubicina. Neki od pacijenata dobili su određene negativne nuspojave.	96
		Doksorubicin: 60 mg m ⁻²			

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Ksenobiotik – diklofenak

Za ispitivanje ekotoksičnosti na različitim kulturama mikroorganizama koristio se ksenobiotik diklofenak. Proizveden je u njemačkoj tvrtci SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH te se koristio u obliku natrijeve soli visoke čistoće ($\geq 98\%$). Masene koncentracije diklofenaka označene su oznakom $\gamma_D / \text{mg L}^{-1}$.

Koncentracija temeljne otopina diklofenaka iznosila je $\gamma_D = 32 \text{ mg L}^{-1}$. Iz temeljne otopine napravljen je niz od 5 otopina nižih koncentracija: $\gamma_{D1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{D2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{D3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{D4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{D5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$, u kojima se ispitala ekotoksičnost. Za provedbu testa pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*, pripremljena je još i otopina diklofenaka masene koncentracije $\gamma_D = 24 \text{ mg L}^{-1}$.

3.1.2. Ksenobiotik – pantoprazol

Uz diklofenak, za ispitivanje ekotoksičnosti koristio se ksenobiotik pantoprazol. Korišten je kao natrijev pantoprazol seskvihidrat, a proizveden je u njemačkoj tvrtci SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH. Masene koncentracije pantoprazola označene su kao $\gamma_P / \text{mg L}^{-1}$.

Za ispitivanje ekotoksičnosti pantoprazola, pripremila se njegova temeljna otopina, koncentracije $\gamma_P = 32 \text{ mg L}^{-1}$. Iz temeljne otopine napravljen je niz od 5 otopina nižih koncentracija: $\gamma_{P1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{P2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{P3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{P4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_{P5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$. Za provedbu testa pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*, pripremljena je još i otopina pantoprazola masene koncentracije $\gamma_P = 24 \text{ mg L}^{-1}$.

3.1.3. Smjesa ksenobiotika diklofenaka i pantoprazola

Za pripremu smjesa diklofenaka i pantoprazola koristile su se njihove temeljne otopine koncentracija $\gamma_D = 32 \text{ mg L}^{-1}$ te $\gamma_P = 32 \text{ mg L}^{-1}$. Smjese diklofenaka i pantoprazola pripremljene su u njihovim volumnim omjerima 1:1 (označeno kao 1), 2:1 (označeno kao 2) i 1:2 (označeno kao 3). Za pripremu smjese 1 u odmjernu tikvicu od 100 mL dodani su volumeni obiju temeljnih otopina od 50 mL. Za smjese 2 i 3, izmjereni su i pomiješani volumeni od 67 mL, odnosno 33 mL temeljne otopine diklofenaka te 33 mL, odnosno 67 mL temeljne otopine pantoprazola.

3.1.4. Morska bakterija *Vibrio fischeri*

Ekotoksičnost diklofenaka i pantoprazola te njihovih smjesa određivala se pomoću kulture morske bakterije *Vibrio fischeri* prema metodi mjerenja smanjenja intenziteta bioluminiscentne svjetlosti objašnjenom u poglavlju 2.2.1. te kasnije u poglavlju 3.3.1.

3.1.4.1. Hranjiva podloga

Za pripremu i održavanje čiste bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (slika 3.1.) koristila se odgovarajuća kruta hranjiva podloga. Pripremala se otapanjem 30,0 g NaCl (GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska), 10,0 g glicerola (Kemika, Hrvatska), 5,0 g CaCO₃ (Merck-Alkaloid, Makedonija), 5,0 g peptona (Biolife Italiana s.r.l., Italija), 3,0 g kvašćevog ekstrakta (Biolife Italiana s.r.l., Italija) te 15,0 g agara (Liofilchem s.r.l., Italija) u 1 L deionizirane vode. Tako pripremljena hranjiva podloga sterilizirala se u autoklavu vlažnom sterilizacijom. Kultura se na takvoj podlozi uzgajala u termostatu pri 20°C.



Slika 3.1. Uzgojena kultura morske bakterije *Vibrio fischeri* na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama.

3.1.4.2. Resuspendiranje

Za resuspendiranje bakterijske kulture koristila se hranjiva izosmotska otopina pripremljena otapanjem 20,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,5 g CaCl₂, 0,2 g MgSO₄, 10,0 g glukoze, 10,0 g rafinoze te 0,5 mL glicerola u 1 L vode. Tako pripremljena otopina se prokuha i ohladi. Budući da pH-vrijednost otopine za resuspenziju mora biti između 6,8 i 7,2, po potrebi doda se još nekoliko kapi 1 mol L⁻¹ otopine HCl (Honeywell International Inc., UK) ili 1 M otopine NaOH (Lach-Ner, s.r.o., Češka). Nakon pripreme, otopina se čuva u zamrzivaču.

3.1.4.3. Otopina NaCl

Budući da se bakterija *Vibrio fischeri* prirodno nalazi u moru, otopinom natrijeva klorida simuliraju se njoj prirodni uvjeti. Otopina se pripremila otapanjem 2 g NaCl u 100 mL deionizirane vode, čime se dobiva otopina s masenim udjelom NaCl od 2%. Kao i otopina za resuspenziju, otopina natrijevog klorida mora imati pH-vrijednost između 6,8 i 7,2, koja se po potrebi podesila s već spomenutim otopinama HCl i NaOH.

3.1.4.4. Provjera valjanosti bakterijske kulture

Kao radni standard za provjeru valjanosti bakterijske kulture, koristila se otopina kalijeva bikromata, K_2CrO_7 , masene koncentracije $\gamma = 0,0187 \text{ g L}^{-1}$. Otopina se pripremila dodavanjem točno 0,0187 g kalijeva bikromata u 1000 mL deionizirane vode.

3.1.5. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida*

Ekotoksičnost čistog diklofenaka određivala se pomoću bakterijske kulture *Pseudomonas putida* mjerenjem inhibicije rasta bakterija, što je objašnjeno u poglavljima 2.2.2. i 3.2.1.

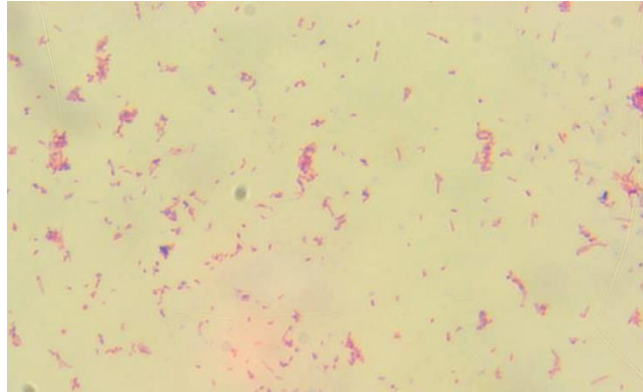
3.1.5.1. Hranjiva podloga

Za hranjivu podlogu potrebnu za uzgoj čiste bakterijske kulture *Pseudomonas putida* (slika 3.2.) bilo je potrebno pripremiti tri različite otopine. Prva otopina pripremljena je otapanjem 10,0 g $NaNO_3$ (Alkaloid AD Skopje, Makedonija), 2,40 g K_2HPO_4 (VWR International bv, Belgija), 1,20 g KH_2PO_4 (GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska) te 1,0 g kvašćevog ekstrakta u 500 mL deionizirane vode. Sljedeća otopina pripremljena je otapanjem 40,0 g D(+) glukoza monohidrata (GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska) u 500 mL deionizirane vode. Posljednja otopina pripremljena je otapanjem 4,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Kemika d.d., Hrvatska) i 0,01 g željezova (III) citrata (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Njemačka). Kako bi se pripremila temeljna otopina, pomiješalo se 50 mL prve otopine, 125 mL druge i 100 mL treće te se razrijedilo deioniziranom vodom do 1000 mL. Prije vlažne sterilizacije u otopinu se dodalo 18 g hranjivog agara kako bi se dobila čvrsta hranjiva podloga. Nakon sterilizacije, 6 do 10 mL hranjive podloge prelilo se u epruvete koje su se ohladile u kosom položaju. Na takvim kosim hranjivim podlogama uzgajala se bakterijska kultura.

3.1.5.2. Priprema bakterijske suspenzije

Nakon uzgoja u trajanju od 24 sata, kultura se stavila na preduzgoj, nakon čega se izuzimala za pripremu suspenzije.

Suspenzija se razrjeđivala na način da njena izmjerena optička gustoća bude u rasponu od 0,1 do 0,4. Optička gustoća mjerila se na spektrofotometru pri valnoj duljini $\lambda = 436$ nm. Nakon pripreme suspenzije, preduzgoj se provodio na rotacijskoj tresilici tijekom $5 \pm 0,5$ h.



Slika 3.2. Mikrofotografija trajnog preparata bakterije *Pseudomonas putida* obojenog po Gramu uslikana svjetlosnim mikroskopom opremljenim kamerom pri povećanju $P = 1000\times$.

3.1.5.2. Mineralni medij

Za provedbu testa koristio se mineralni medij u kojem je otopljen diklofenak u već spomenutim masenim koncentracijama. Mineralni medij pripremljen je otapanjem 500 mg NaNO_3 , 120 mg K_2HPO_4 , 60 mg KH_2PO_4 , 200 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ te 0,5 mg željezova (III) citrata u 1 L deionizirane vode. pH-vrijednost medija treba biti u neutralnom području, 7,2.

3.1.6. Zelena mikroalga *Chlorella* sp.

Pomoću mikroalge *Chlorella* sp. određivala se ekotoksičnost mjerenjem inhibicija rasta mikroalgi prema metodi spomenutoj u poglavlju 2.2.3. te kasnije u poglavlju 3.2.3.

3.1.6.1. Bazalni medij

Za provođenje eksperimenta korištene su brzorastuće vrste zelenih mikroalgi uzgojenih u bazalnom mediju uz aeraciju i izmjenu 12/12 h dan/noć (slika 3.2.).



Slika 3.3. Uzgoj mikroalge *Chlorella* sp. u bazalnom mediju uz aeraciju.

Bazalni medij proizveden je u Njemačkoj u tvrtci SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH. Sastav bazalnog medija prikazan je u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Sastav bazalnog medija.

Tvar	Masa / mg (po
Formula spoja	1L vode)
NH ₄ Cl	15,00
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15,00
KH ₂ PO ₄	1,60
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,08
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,10
H ₃ BO ₃	0,19
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,42
ZnCl ₂	3,00·10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,50·10 ⁻³
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1,00·10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,00·10 ⁻³
NaHCO ₃	50,00

3.1.7. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

Za ispitivanje ekotoksičnosti diklofenaka, pantoprazola i njihovih smjesa koristila se kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, a metoda izvođenja testa bila je fermetacijski test s injekcijskim štrcaljkama koji je opisan u poglavlju 2.2.4. te kasnije u poglavlju 3.2.4.

3.1.7.1. Čvrsta hranjiva podloga

Za uzgoj čiste kulture pivskog kvasca (slika 3.4.) koristila se čvrsta hranjiva podloga (engl. *Yeast Medium* „YM“ agar). Pripremila se otapanjem 3,0 g ekstrakta kvasca, 3,0 g ekstrakta sladi, 5,0 g peptona iz sojinog zrna, 10,0 g glukoze i 15,0 g agara u 1 L vode. Nakon 15 minuta bubrenja agara, podloga se zagrijavala do vrenja te sterilizirala vlažnom sterilizacijom u autoklavu. Na toj se podlozi kvasac uzgajao u termostatu, 10-12 sati pri 28 °C.



Slika 3.4. Uzgojeni kvasac *Saccharomyces cerevisiae* na čvrstoj hranjivoj podlozi.

3.1.7.2. Tekuća hranjiva podloga

Za provođenje testova ekotoksičnosti koristila se tekuća hranjiva podloga pripremljena otapanjem saharoze peptona i ekstrakta kvasca u deioniziranoj vodi. Otopilo se 4,0 g saharoze, 2,0 g peptona te 1,7 g ekstrakta kvasca u 100 mL deionizirane vode. Prije upotrebe, hranjiva podloga sterilizirala se vlažnom sterilizacijom. pH-vrijednost podloge treba biti u rasponu od 6,9 do 7,1.

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

Pri provođenju eksperimenta koristilo se standardno stakleno laboratorijsko posuđe za pripremu otopina, čuvanje otopina, mjerenje i slično.

Za vaganje ksenobiotika i soli za pripreme navedenih otopina koristile su se vage Sartorius AG, Njemačka te KERN & SOHN GmbH, Njemačka. Za vlažnu sterilizaciju koristio se autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Mjerenje pH-vrijednosti otopina provodilo se pomoću pH-elektrode SenTix® 940 njemačke tvrtke Xylem Inc, dok se za mjerenje koncentracije otopljenoga kisika koristila kisikova elektroda FDO® 925 pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Za test ekotoksičnosti s kulturom *Vibrio fischeri* koristili su se luminometar LUMISTOX 300 te termostat LUMIStherm, njemačke tvrtke Dr Lange GmbH. Za homogeniziranje suspenzija koristio se homogenizator (EV-100, Tehnica, Slovenija). Spektrofotometar Hach Lange GmbH, SAD, koristio se za mjerenje optičke gustoće suspenzija. Pri provođenju eksperimenta koristila se i rotacijska tresilica (Unimax 1010, Heidolph, Njemačka) (slika 3.5.).



Slika 3.5. Rotacijska tresilica korištena za provedbu pokusa.

U radu je korišten svjetlosni mikroskop Olympus BX50 japanske tvrtke Olympus Optical Co. Ltd., a mikroskop je opremljen i kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10) (slika 3.6.). Za uzgoj pojedinih kultura koristili su se termostati tvrtke Memmert GmbH, Njemačka i tvrtke Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić, Dugo Selo – Zagreb, Hrvatska.



Slika 3.6. Svjetlosni mikroskop Olympus BX50 opremljen kamerom.

3.3. Metode rada

3.3.1. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*

Prilikom provođenja testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*, promatrala se inhibicija njezinog fiziološkog svojstva bioluminiscencije. Test se provodio na luminometru (slika 3.7.) u skladu s normom HRN/EN ISO 11348-1:2000⁹⁶, a temeljio se na mjerenju intenziteta bioluminiscentne svjetlosti prije i 30 minuta nakon dodavanja spomenutih ksenobiotika. Mjerenje se provodilo geometrijskim nizom razrjeđenja na 5 koncentracija diklofenaka, pantoprazola te tri smjese tih dvaju ksenobiotika spomenutih u poglavljima 3.1.3., 3.1.4. i 3.1.5. Za svako razrjeđenje otopine ksenobiotika, mjerenje intenziteta provodilo se dva puta, a rezultati su se računali upotrebljavajući srednje vrijednosti intenziteta. Rezultati su podrazumijevali izračunatu inhibiciju prema formuli:

$$INH = \frac{Lu_{30,kontrola} - Lu_{30,uzorak}}{Lu_{30,kontrola}} \times 100 \quad (1)$$

gdje je INH inhibicija, $Lu_{30, kontrola}$ intenzitet bioluminiscencije kontrolnog uzorka nakon 30 minuta, a $Lu_{30, uzorak}$ intenzitet bioluminiscencije uzorka s ispitivanim ksenobiotikom nakon 30 minuta. Rezultati dobiveni za svaku koncentraciju ksenobiotika prikazali su se krivuljom ovisnosti inhibicije o razrjeđenju pojedine otopine te krajnjim grafičkim prikazom („S“ krivuljom) ovisnosti maksimalnih inhibicija i određenih koncentracija.



Slika 3.7. Provođenje testa ekotoksičnosti na luminometru primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Na kraju mjerenja, instrument je prikazao dvije vrijednosti efektivne koncentracije: EC_{20} te EC_{50} s mjernom jedinicom $mg L^{-1}$, što označava koncentraciju ekotoksične tvari koja uzrokuje smanjenje intenziteta bioluminiscentne svjetlosti na 20%, odnosno na 50% izložene populacije *V. fischeri*. Na temelju tih vrijednosti, tvari se mogu klasificirati kao:

- ✓ visoko toksične ($EC_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$),
- ✓ srednje toksične ($1 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 10 \text{ mg L}^{-1}$), te
- ✓ slabo toksične tvari ($10 \text{ mg L}^{-1} < EC_{50} \leq 100 \text{ mg L}^{-1}$).

U slučaju da instrument nije uspio izračunati EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, grafički su se određivale EC_x vrijednosti.

3.2.2. Određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Test ekotoksičnosti primjenom gram-negativne bakterije *Pseudomonas putida* temeljio se na određivanju inhibicijskog utjecaja ispitivanih tvari mjerenjem rasta bakterije prema standardu ISO 10 712:1995⁹⁷. Inhibicijski utjecaj određenih koncentracija ksenobiotika uspoređivao se pri istim uvjetima s kontrolnim uzorcima koji ne sadrže ispitivanu tvar. Prije početka izvođenja testa, odredili su se početni uvjeti pokusa prikazani u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Početni uvjeti testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

Početni uvjeti pokusa					
OG _{0sr.}	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH-vrijednost ₀ / -	$\gamma(O_2)_0$ / mg L ⁻¹	T / °C
0,22	$4,6 \cdot 10^6$	6,66	7,20	7,86	25,90

Uzorci s ispitivanim tvarima sadržavali su otopine čistog diklofenaka i pantoprazola, ali ne i njihove smjese. Eksperiment se provodio u Erlenmeyerovim tikvicama volumena od 100 mL uz radni volumen od 25 mL. Tikvice su sadržavale bakterijsku suspenziju te određene volumene temeljne otopine diklofenaka u mineralnom mediju. Mjerenja su se provodila svakih 24 sata tijekom 3 dana, a očitovala su se u mjerenju optičke gustoće (OG) na spektrofotometru pri valnoj duljini od 436 nm.

Svakih 24 sata, 1 mL suspenzije izuzeo se iz Erlenmeyerovih tikvica s uzorcima te dodao u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nakon homogenizacije, 1 mL uzorka izuzeo se iz te epruvete te dodao u novu epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Postupak se ponovio još četiri puta, dok se na kraju nije dobio niz razrjeđenih suspenzija. Razrjeđenja su iznosila od 10^{-1} do 10^{-6} . Za daljnji rad izuzeo se po 1 mL suspenzija razrjeđenja 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} te se otpipetirao na Petrijeve zdjelice sterilnom tehnikom rada. Uzorci su se zalili hranjivom podlogom te se sadržaj Petrijevih zdjelica homogenizirao u obliku broja osam. Petrijeve zdjelice stavile su se u termostat na inkubaciju tijekom 24 do 48 h na 37 °C. Nakon uzgoja bakterija, na hranjivoj podlozi bile su vidljive izrasle bakterijske kolonije, koje su se izbrojale.

Razrjeđenja onih Petrijevih zdjelica koje su sadržavale 30 do 300 kolonija, koristila su se za određivanje CFU (engl. *Colony Forming Units*) vrijednosti pomoću formule:

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad (2)$$

Na temelju toga napravio se graf ovisnosti logaritamske vrijednosti CFU o vremenu u danima. Pomoću logaritamske vrijednosti CFU ($\log CFU$) izračunala se i inhibicija rasta bakterije koja se računa prema sljedećoj formuli:

$$INH = \frac{\log CFU_{kontrola} - \log CFU_{uzorak}}{\log CFU_{kontrola}} \times 100 \quad (3)$$

gdje je $\log CFU_{kontrola}$ logaritamska vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica u kontrolnoj tikvici, a $\log CFU_{uzorak}$ logaritamska vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica u uzorku. Naposljetku, napravio se graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji ksenobiotika u uzorcima za sva tri dana provođenja testa.

3.2.3. Određivanje ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Ispitivanje toksičnosti primjenom mikroalgi (slika 3.8.) temeljilo se na mjerenju inhibicije njihovog rasta prema normi OECD 201:1984⁹⁸. Prije provođenja testova mjerila se pH-vrijednost medija te koncentracija otopljenog kisika pomoću kisikove elektrode. Početni uvjeti prikazani su u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Početni uvjeti testa ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Početni uvjeti pokusa					
OG _{0sr.}	CFU ₀ / st/mL	logCFU ₀ / -	pH-vrijednost ₀ / -	$\gamma(O_2)_0$ / mg L ⁻¹	T / °C
0,29	1,2 · 10 ⁶	6,07	7,70	8,35	23,40

Pokus se provodio u Erlenmeyerovim tikvicama od 100 mL s radnim volumenom uzorka od 25 mL koji se sastojao od određenih volumena temeljne otopine diklofenaka, određenih volumena bazalnog medija te suspenzije mikroalgi. Test se provodio u periodu od 72 sata prilikom čega su se povoljni fiziološki uvjeti za mikroalge konstantno održavali miješanjem na rotacijskoj tresilici. Temperatura se održavala između 21 °C i 25 °C.

Svakih 24 sata na spektrofotometru mjerila se optička gustoća, tri puta za pojedini uzorak iz čega se računala srednja vrijednost optičke gustoće. Srednja vrijednost koristila se za grafički prikaz optičke gustoće u odnosu na vrijeme u danima.

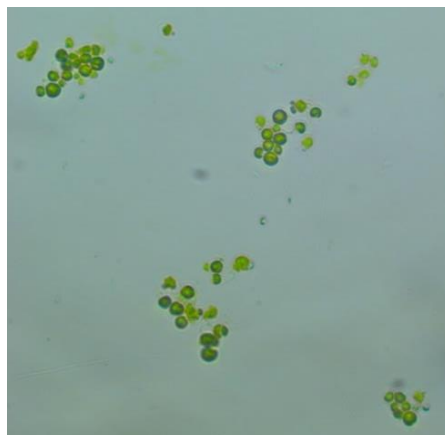
Broj ukupnih stanica mikroalgi određivao se pomoću Thominove komorice i svjetlosnog mikroskopa. Na Thominovu komoricu stavila se kap suspenzije algi koja se pokrila pokrovnim stakalcem. CFU vrijednost određivala se brojanjem stanica mikroalgi na tri nasumično odabrana kvadratića vidljivih na Thominovoj komorici, anadalje se CFU vrijednost računala se prema formuli:

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} \quad (4)$$

gdje je N (ili CFU) ukupan broj stanica u 1 mL, m ukupan broj pobrojanih stanica, 16 ukupan broj velikih kvadrata u Thominovoj komorici, 10^4 korekcija volumena i K broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje. Nadalje, određene su vrijednosti logCFU koje su korištene za crtanje grafičkog prikaza logCFU u ovisnosti o vremenu u danima te računanje inhibicije pomoću formule:

$$INH = \frac{\log CFU_{kontrola} - \log CFU_{uzorak}}{\log CFU_{kontrola}} \times 100 \quad (5)$$

Rezultati testa takvih uzoraka uspoređivali su se s kontrolnim uzorcima u kojima nisu bili prisutni ksenobiotici. Pomoću dobivenih vrijednosti napravljeni su grafovi ovisnosti inhibicije o koncentracijama ksenobiotika („S“ krivulje).



Slika 3.8. Mikrofotografija mikroalge *Chlorella* sp. snimljena svjetlosnim mikroskopom opremljenim kamerom uslikana pri povećanju $P = 400\times$.

3.2.4. Određivanje ekotoksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Test ekotoksičnosti primjenom pivskog kvasca (engl. *Yeast Toxicity Test*, YTT) temeljio se na fiziološkom svojstvu kvasca da fermentira saharozu do etanola, C₂H₅OH, te ugljikovog dioksida, CO₂. U sterilizirane staklene bočice ukupnog volumena 30 mL, ulilo se 5 mL sterilizirane tekuće hranjive podloge, 0,6 mL suspenzije kvasca te odgovarajući volumeni otopina čistog diklofenaka i pantoprazola te njihovih smjesa. Bočice su se hermetički zatvorile gumenim i metalnim čepom. Kroz gumeni čep uronila se sterilizirana igla na koju se stavila graduirana šprica. Uzorci su se čuvali u termostatu pri 28 °C. Svakih 24 sata tijekom 3 dana očitavao se volumen istisnute tekućine u šprici, koju je iz bočice istisnuo plin nastao fermentacijom. Uzorci s ispitivanim ksenobioticima uspoređivali su se s kontrolnim uzorcima bez ispitivanih ksenobiotika. Izmjereni volumeni poslužili su za dobivanje inhibicije koja se računala prema formuli:

$$INH = \frac{V_{kontrola} - V_{uzorak}}{V_{kontrola}} \times 100 \quad (6)$$

gdje je INH inhibicija stvaranja ugljikovog dioksida, $V_{kontrola}$ volumen istisnute tekućine u kontrolnim bočicama, V_{uzorak} volumen istisnute tekućine u bočicama s ispitivanim ksenobioticima. Naposljetku, napravio se graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji ksenobiotika za sva tri dana te graf ovisnosti inhibicije dobivene iz ukupnog istisnutog volumena tijekom sva tri dana o koncentracijama ksenobiotika.



Slika 3.9. Provođenje testa ekotoksičnosti diklofenaka primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

4. REZULTATI

4.1. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*

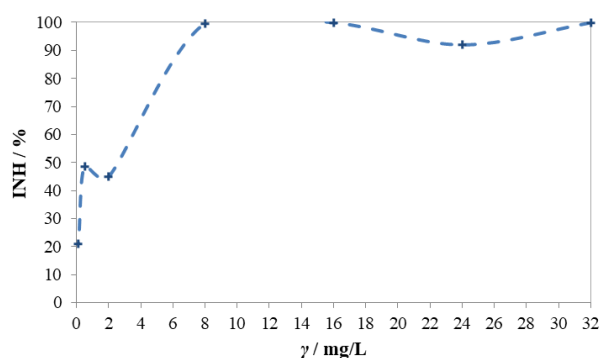
Nakon provedbe testa ekotoksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*, dobivene su rezultante vrijednosti intenziteta bioluminiscentne svjetlosti prije i nakon dodavanja otopine ksenobiotika. Pomoću tih vrijednosti računata je inhibicija te su napravljeni grafovi ovisnosti inhibicije o razrjeđenju pojedinih otopina ksenobiotika te graf sa krivuljom doza-odgovor, odnosno krivuljom koncentracija-inhibicija. Pomoću luminometra dobivene su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, međutim ukoliko ih instrument nije mogao izračunati, po mogućnosti su iste vrijednosti određene grafički.

4.1.1. Diklofenak

Test ekotoksičnosti diklofenaka proveden je na otopinama diklofenaka navedenim u poglavlju 3.1.3. Rezultati su prikazani u sljedećim tablicama i grafom.

Tablica 4.1. Dobivene EC vrijednosti za pojedine ispitivane koncentracije diklofenaka.

$\gamma_D / \text{mg L}^{-1}$	$\text{EC}_x / \text{mg L}^{-1}$	
	EC ₂₀	EC ₅₀
32	0,32	0,97
16	0,31	0,72
8	0,36	0,77
2	0,89	/
0,5	/	/
0,125	0,12	/



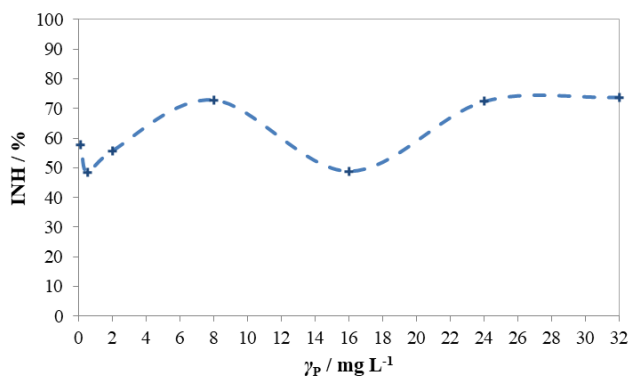
Slika 4.1. Krivulja koncentracija-inhibicija za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*.

4.1.2. Pantoprazol

Za ispitivanje ekotoksičnosti pantoprazola koristile su se otopine čije su koncentracije navedene u poglavlju 3.1.4. Rezultati mjerenja prikazani su tablično i grafički.

Tablica 4.2. Dobivene EC vrijednosti za pojedine ispitivane koncentracije pantoprazola.

$\gamma_P / \text{mg L}^{-1}$	$\text{EC}_x / \text{mg L}^{-1}$	
	EC_{20}	EC_{50}
32	3,48	9,23
16	2,55	7,77
8	1,40	2,68
2	0,06	1,27
0,5	0,41	0,83
0,125	0,35	0,86



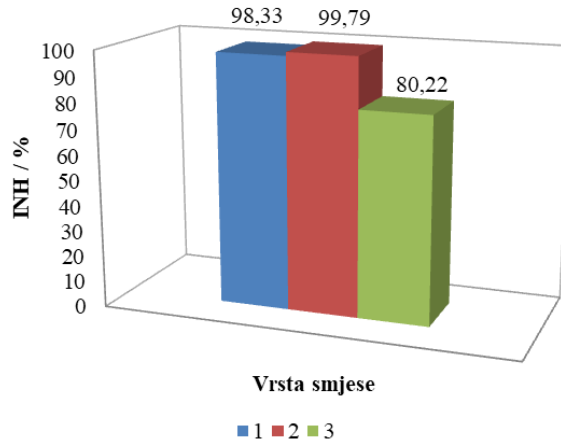
Slika 4.2. Krivulja koncentracija-inhibicija za pantoprazol dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*.

4.1.3. Smjese diklofenaka i pantoprazola

Prilikom provedbe eksperimenta koristile su se i smjese otopina diklofenaka i pantoprazola u omjerima navedenim u poglavlju 3.1.5. Rezultati su prikazani u tablicama i na stupčastom dijagramu.

Tablica 4.3. Dobivene EC vrijednosti za smjese diklofenaka i pantoprazola.

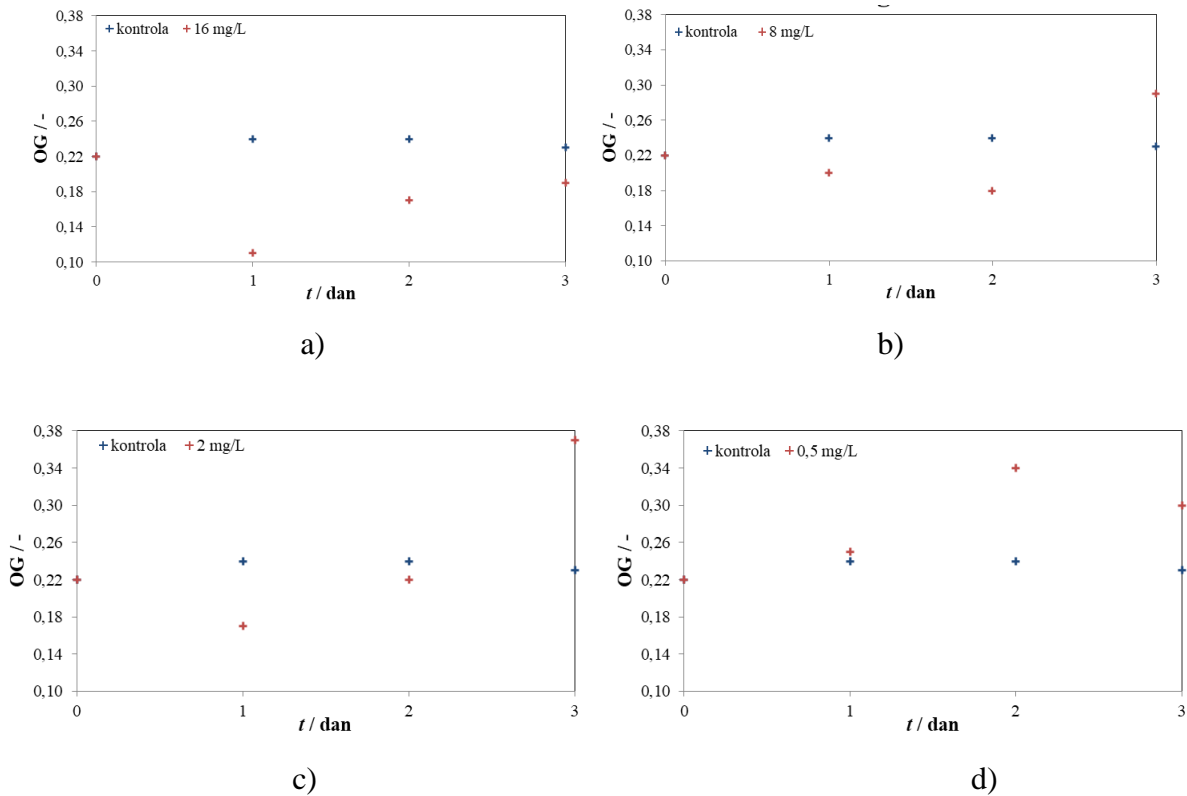
D : P	$\text{EC}_x / \%$	
	EC_{20}	EC_{50}
1	0,66	3,56
2	0,78	2,86
3	3,44	12,14

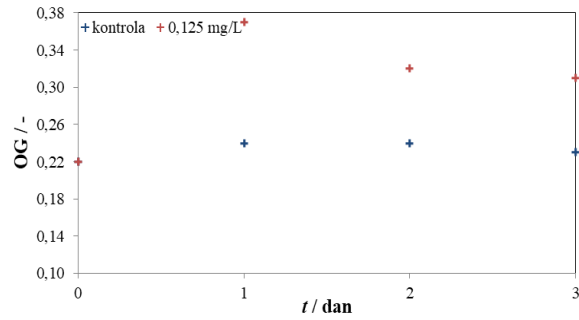


Slika 4.3. Stupčasti dijagram ovisnosti inhibicije o vrsti smjese diklofenaka i pantoprazola.

4.2. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Provedbom testa toksičnosti pomoću bakterije *Pseudomonas putida* dobivene su vrijednosti optičke gustoće za pojedine koncentracije diklofenaka tijekom tri dana mjerenja. Dobivene vrijednosti uspoređivale su se s vrijednostima kontrolnog uzorka, a usporedbe su vidljive na sljedećim grafovima.

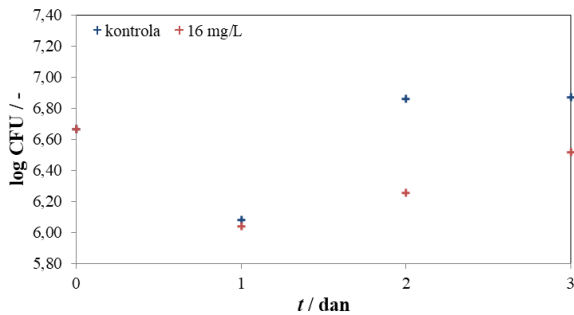




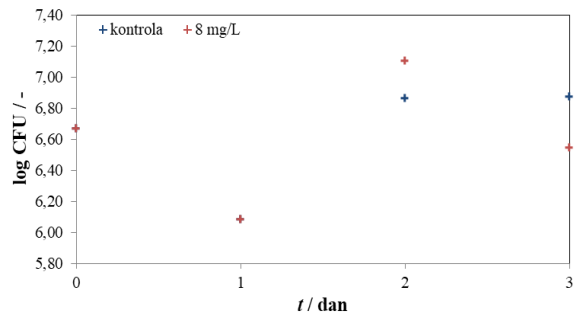
e)

Slika 4.4. Grafički prikazi promjene optičke gustoće kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama diklofenaka od a) $\gamma_{D1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{D2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{D3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{D4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{D5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

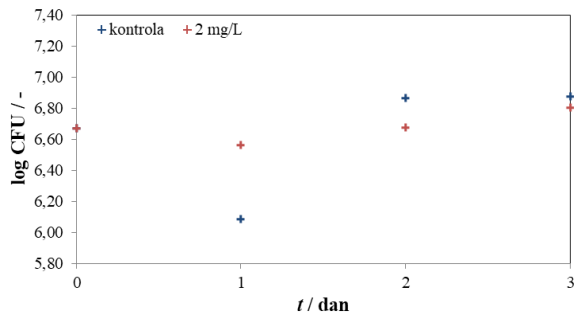
Brojanjem nastalih kolonija na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama određene su CFU vrijednosti kontrolnog uzorka te uzorka s otopinama diklofenaka za svaki od tri dana provođenja testa. Pomoću određenih vrijednosti CFU izračunate su vrijednosti logCFU čije su promjene tijekom tri dana prikazane u sljedećim grafovima.



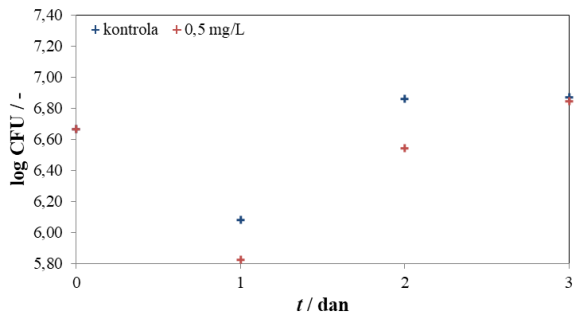
a)



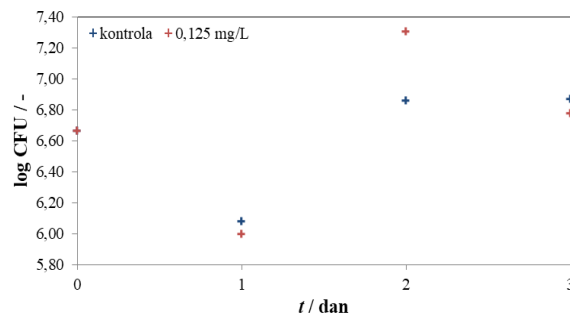
b)



c)



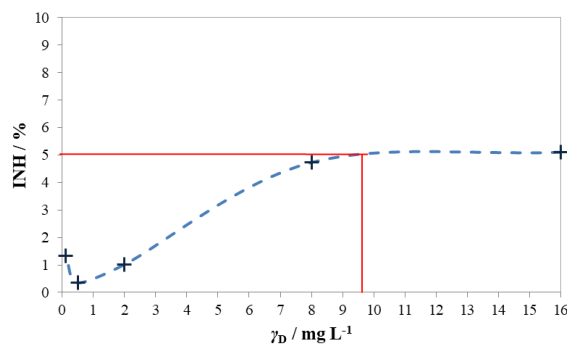
d)



e)

Slika 4.5. Grafički prikazi promjene logCFU kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama diklofenaka od a) $\gamma_{D1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{D2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{D3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{D4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{D5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

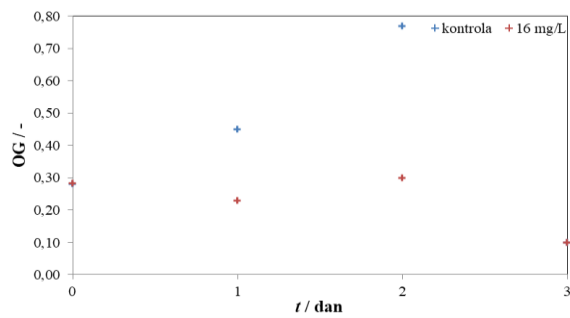
Pomoću vrijednosti logCFU također su izračunate vrijednosti inhibicije te je nacrtan graf ovisnosti inhibicije o koncentraciji diklofenaka (slika 4.14.). Grafički je određena EC_{50} vrijednosti i ona iznosi $9,3 \text{ mg L}^{-1}$.



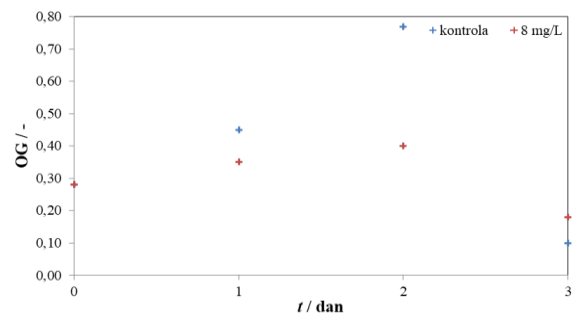
Slika 4.6. Krivulja koncentracija-inhibicija za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*.

4.3. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

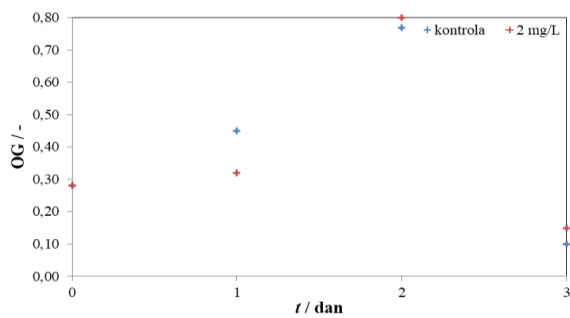
Kao što je već rečeno u poglavlju 3.2.3., tijekom provođenja testa ekotoksičnosti pomoću mikroalge *Chlorella* sp. dobiveni su rezultati optičke gustoće kontrolnog uzorka te uzoraka s određenim koncentracijama diklofenaka u periodu od tri dana. Vrijednosti optičke gustoće za uzorke s diklofenakom uspoređivale su se s vrijednostima optičke gustoće kontrolnog uzorka, što je prikazano na sljedećim grafovima.



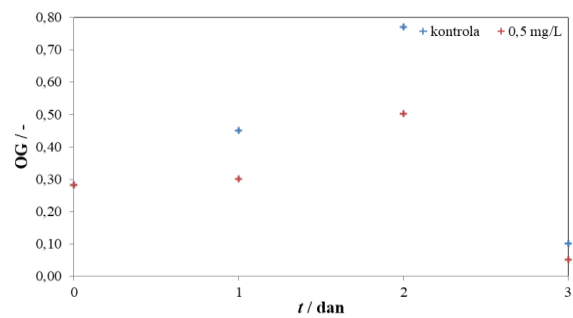
a)



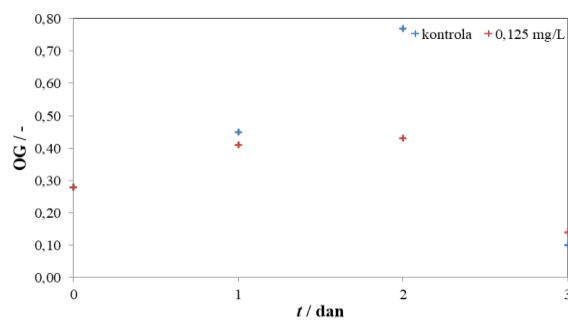
b)



c)



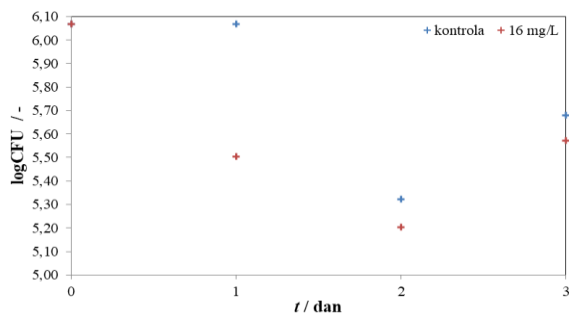
d)



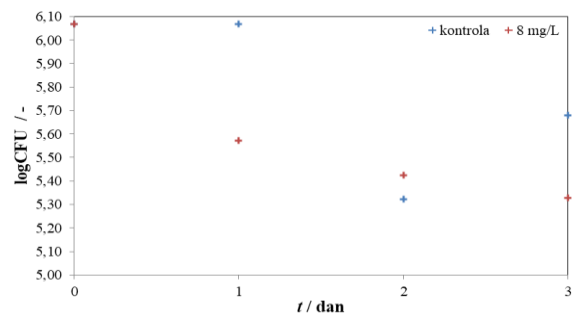
e)

Slika 4.7. Grafički prikazi promjene optičke gustoće kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama diklofenaka od a) $\gamma_{D1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{D2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{D3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{D4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{D5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

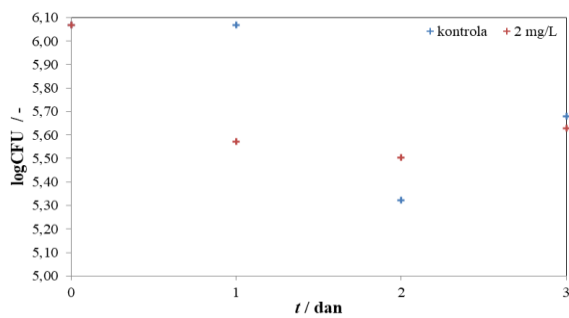
Nakon određivanja optičke gustoće, pomoću Thominove komorice te svjetlosnog mikroskopa određivala se i vrijednost CFU. Za grafički prikaz promjene CFU tijekom tri dana izračunate su vrijednosti logCFU koje su upotrijebljene za crtanje sljedećih grafova.



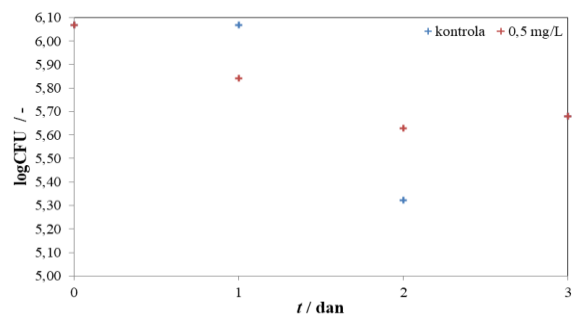
a)



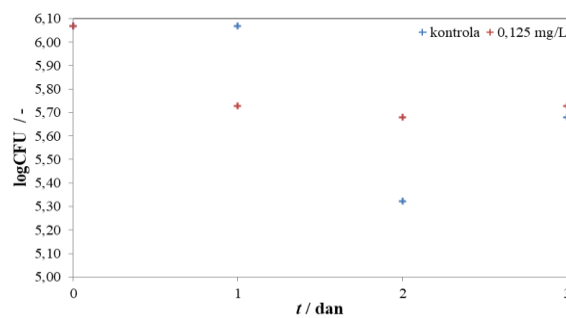
b)



c)



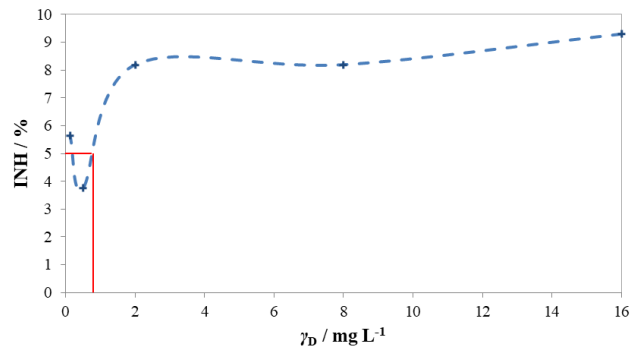
d)



e)

Slika 4.8. Grafički prikazi promjene logCFU kontrolnog uzorka i uzorka s otopinama diklofenaka od a) $\gamma_{D1} = 16 \text{ mg L}^{-1}$, b) $\gamma_{D2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, c) $\gamma_{D3} = 2 \text{ mg L}^{-1}$, d) $\gamma_{D4} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$, e) $\gamma_{D5} = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$, tijekom tri dana provedbe testa ekotoksičnosti.

Na temelju vrijednosti logCFU izračunate su vrijednosti inhibicije. Pomoću njihovih vrijednosti napravljen je graf ovisnosti inhibicije o koncentracijama diklofenaka u otopinama (slika 4.25.). Grafički je određena vrijednost $EC_{50} = 0,8 \text{ mg L}^{-1}$.



Slika 4.9. Krivulja koncentracija-inhibicija za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

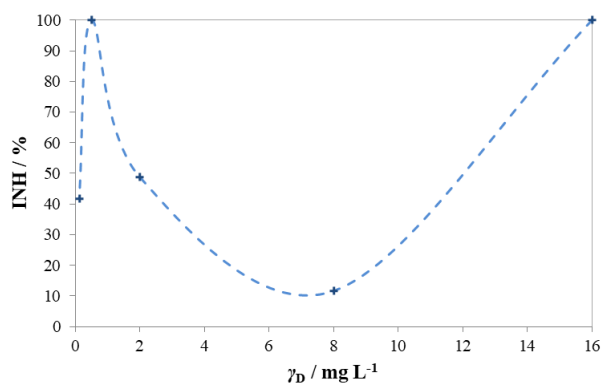
Naposljetku, pomoću elektroda izmjerene su pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika, kao i temperature za sve uzorke. Vrijednosti su prikazane u tablici 4.7.

Tablica 4.7. Prikaz vrijednosti pH-vrijednosti, koncentracije otopljenoga kisika te temperature uz vrijednosti istih parametara za 3. dan provedbe pokusa.

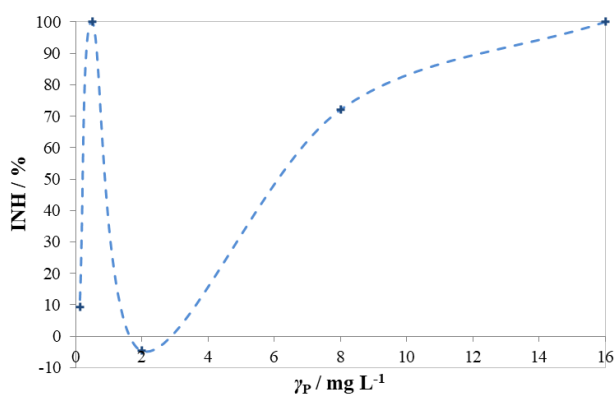
	γ / mg/L	pH-vrijednost / -	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	T / °C
T ₁	16	7,35	7,90	26,30
T ₂	8	7,40	7,92	26,20
T ₃	2	7,40	7,72	26,60
T ₄	0,5	7,34	7,84	26,40
T ₅	0,125	7,29	7,75	26,70
SP	kontrola	7,45	8,08	25,90

4.4. Test ekotoksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Prilikom provođenja testova ekotoksičnosti pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, na graduiranim špicama očitavani su volumeni istisnute tekućine pod utjecajem plina nastalog fermentacijom. Test se provodio na otopinama diklofenaka, otopinama pantoprazola te smjesama tih dvaju ksenobiotika. Pomoću vrijednosti volumena za pojedine uzorke s ksenobioticima i vrijednosti kontrolnog uzorka izračunate su inhibicije te su napravljeni grafovi ovisnosti inhibicije o koncentracijama ksenobiotika u uzorcima (slike 4.26. i 4.27.). Rezultati testova sa smjesama tijekom tri dana prikazani su u tablici 4.7.



Slika 4.10. Krivulja koncentracija-odgovor za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 4.11. Krivulja koncentracija-odgovor za pantoprazol dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Tablica 4.7. Vrijednosti inhibicija za pojedine i ukupne volumene istisnute tekućine tijekom tri dana za određene smjese i kontrolni uzorak (SP).

	INH / %			
D : P	1. dan	2. dan	3. dan	V _{uk} / mL
1	100,00	100,00	100,00	100,00
2	100,00	100,00	100,00	100,00
3	100,00	100,00	100,00	100,00
SP	0,00	0,00	0,00	0,00

5. RASPRAVA

Kroz posljednja dva stoljeća ljudska aktivnost ostavila je veliki značaj na okoliš svugdje u svijetu. Njezin je utjecaj uzrokovao negativne i nepovratne posljedice na sve dijelove biosfere, i to primarno kroz razvoj različitih grana industrije.⁹⁹ Međutim, razvitak industrije popratio je i razvoj svijesti o ekološkim problemima, a samim time i potreba za njihovim rješavanjem.¹⁰ Pojava zelene kemije omogućila je iskorištavanje prirodnih resursa u kemijskoj industriji čiji su proizvodi ljudima prijeko potrebni. Također, naglasila je važnost proizvodnje kemikalija koje nisu toliko opasne za okoliš, ali i pažljivo zbrinjavanje onih opasnih.¹¹

Zbrinjavanje ekotoksičnih tvari često se temelji na pročišćavanju područja u kojima se nalazi izvor tih tvari. Međutim, na taj način se ne uzima u obzir korištenje kemikalija u svakodnevnom životu ljudi.¹⁰ Korištenje antibiotika i pesticida uzrokuje konstantno otpuštanje ekotoksičnih tvari u okoliš u niskim koncentracijama, a taj problem teško se može riješiti na bilo kakav biotehnološki način. Budući da te tvari, ksenobiotici, nisu prirodni produkti biokemijskih reakcija, brojni mikroorganizmi nemaju sposobnost njihove razgradnje. Na taj način mogu štetno utjecati na cjelokupnu mikrofloru¹¹, ali i na ostale članove hranidbenog lanca.²³

Ksenobiotik diklofenak predstavlja veliki problem jer potrošači konstantno zahtijevaju njegove sve veće količine od farmaceutskih industrija, bolnica, a u okoliš dospijeva u obliku čiste komponente ili njegovih metabolita. Čak 75% iskorištenog diklofenaka dospijeva u vode i tla.²³ Prema literaturi²³, mikroorganizmi poput bakterija *Actinoplanes* sp. i *Raoultella* sp. te gljiva *Epicoccum nigrum* i *Trametes versicolor* imaju mogućnost razgraditi diklofenak na njegove metabolite poput kinona i diklorbenzena. Međutim, mnogi drugi mikroorganizmi nemaju tu mogućnost, kao ni mogućnost razgradnje spomenutih metabolita.²³ Pantoprazol, prema literaturi,⁴⁰ također negativno utječe na bakterijske kulture poput *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* te gljive *Candida albicans*, što se očituje u smanjenju pH-vrijednosti medija u kojem se navedeni mikroorganizmi nalaze. Takva pojava uzrokuje visoku inhibiciju razmnožavanja gljiva, ali i pojačava razmnožavanje bakterija *Escherichia coli*. Prema tom istraživanju ispitivanja su provođena i sa smjesama pantoprazola s drugim vrstama inhibitora protonske pumpe, što je uzrokovalo jači inhibicijski učinak na mikroorganizme.⁴⁰

5.1. Test ekotoksičnosti primjenom *Vibrio fischeri*

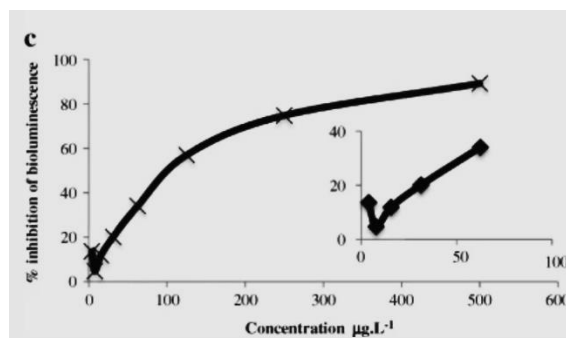
5.1.1. Krivulja koncentracija-inhibicija

Kao što je već rečeno, testom ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* mjerila se inhibicija njezinog svojstva bioluminiscencije. Rezultati su prikazani grafički, odnosno karakterističnom krivuljom doza-odgovor. U usporedbi s grafom na slici 5.1., ovisnost inhibicije o koncentraciji diklofenaka (slika 4.1.) prikazuje samo dijelove krivulje u području srednje i visoke toksičnosti tvari. Krivulja pokazuje inhibiciju od 21,11% pri najnižoj mjerenoj koncentraciji od 0,125 mg L⁻¹, a već pri koncentraciji od 8 mg L⁻¹ pokazuje inhibiciju od 99,66%. U intervalu koncentracija od 8 mg L⁻¹ do 32 mg L⁻¹, na grafu može se uočiti da krivulja ne opada, već ostaje u području visokih vrijednosti inhibicije, od 90% do 100%. Međutim, na grafu se mogu primijetiti određena odstupanja. U rasponu koncentracija od 8 mg L⁻¹ do 16 mg L⁻¹, krivulja prelazi vrijednost inhibicije od 100%, što nije moguće. To se može objasniti time da program Microsoft Excel koristi model koji uzima u obzir rast i pad vrijednosti u ucrtanim točkama i na taj način crta krivulju koja u tom području grafa prirodno prelazi vrijednost od 100%. Takav prijelaz u realnom sustavu nema smisla, međutim točke koje spaja taj dio krivulje imaju vrijednosti inhibicije 99,66% i 99,87%, što je malo ispod 100%.

Druga dva odstupanja od idealno rastuće krivulje jesu točke pri koncentracijama od 2 mg L⁻¹ i 24 mg L⁻¹. To ukazuje na blago pojačanje intenziteta svjetlosti bioluminiscencije, što je rezultat slabijeg djelovanja ksenobiotika na ispitivanu bakteriju. Takva pojava pri 2 mg L⁻¹ može se objasniti efektom hormeze. Hormeza je fenomen odnosa doza-odgovor, koji se temelji na smanjenju inhibicije, čak do negativnih vrijednosti, pri nižim koncentracijama ispitivanih tvari.⁹⁹ Ne zna se točan mehanizam koji uzrokuje hormezu, zbog čega pri istim koncentracijama postoji vjerojatnost da se ona neće dogoditi. Drugim riječima, hormeza se može pojaviti nenadano u raznim uvjetima.⁹⁹ Literaturni primjer¹⁰⁰ izvođenja istog testa primjenom *Vibrio fischeri* na sulfametoksazol, pokazao je slično odstupanje pri nižim koncentracijama (slika 5.1.) što je također objašnjeno hormezom.¹⁰⁰ S druge strane, niža inhibicija pri koncentraciji od 24 mg L⁻¹ može se pripisati pogreškama pri izvođenju eksperimenta ili blago promijenjenim uvjetima u kojima se izvodio eksperiment.

Isti test koji se provodio za pantoprazol kreirao je sličan graf (slika 4.2.) čija se krivulja u usporedbi s krivuljom na slici 5.1. nalazi u području srednje i visoke toksičnosti. Odstupanja od idealnog ponašanja krivulje mogu se očitovati pri koncentraciji od 0,5 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ te 16 mg L⁻¹.

Razlozi odstupanja pri koncentracijama $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ i 2 mg L^{-1} mogu se (kao i kod koncentracije diklofenaka od 2 mg L^{-1}) objasniti hormezom, dok se odstupanje kod koncentracije od 16 mg L^{-1} može objasniti eksperimentalnim pogreškama jer daje manju vrijednost inhibicije od prethodne, niže koncentracije.



Slika 5.1. Literaturni primjer krivulje doza-odgovor sa sličnim odstupanjem inhibicije pri niskim koncentracijama sulfametoksazola (objašnjeno efektom hormeze).¹⁰⁰

Ono po čemu se grafovi na slikama 4.1. i 4.2. također razlikuju je maksimalna inhibicija koja za diklofenak iznosi 99,87% pri koncentracijama od 16 mg L^{-1} i 32 mg L^{-1} , a za pantoprazol 73,73% pri koncentraciji od 32 mg L^{-1} . To ukazuje na činjenicu da je diklofenak kao čisti ksenobiotik ekotoksičniji od čistog pantoprazola.

5.1.2. Vrijednosti efektivne koncentracije, EC_x

Prethodno navedenu tvrdnju također potvrđuju dobivene EC_x vrijednosti čistog diklofenaka i pantoprazola, što je prikazano u tablicama 4.1. i 4.3. Vrijednosti EC_{20} i EC_{50} dobivene su pomoću luminometra nakon provedbe testa ekotoksičnosti. Ukoliko navedene vrijednosti nisu tako dobivene, procjenjivale su se grafički.

Kao što je već rečeno u poglavlju 3.2.1., test ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* provodi se u skladu s normom HRN EN ISO 11348-1:2000⁹⁶ te skladu s istom normom funkcionira i luminometar koji računa EC_x vrijednosti. Model za računanje temelji se na logaritamskoj linearnosti inhibicije i koncentracije te pomoću njega i u skladu s navedenom normom s velikom preciznošću može odrediti tražene vrijednosti. Luminometar pri tome uzima u obzir referentni uzorak s otopinom NaCl i inokulumom te testni uzorak s kalijevim dikromatom i inokulumom za testiranje valjanosti kulture. Međutim, luminometar ne može u obzir uzeti više referentnih uzoraka, kao ni korekciju boje (bez posebno dizajniranih kiveteta) te u tom slučaju nema dovoljno podataka za računanje EC_{20} i EC_{50} vrijednosti.¹⁰¹

Vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ dobivene su za koncentracije diklofenaka od 8 mg L⁻¹ do 32 mg L⁻¹ te su manjih iznosa od vrijednosti dobivenih za iste koncentracije pantoprazola. To je dokaz da je diklofenak ekotoksičniji u odnosu na pantoprazol pri mjerenjima pomoću bakterije *Vibrio fischeri*. Koncentracije pantoprazola od 0,125 mg L⁻¹ do 2 mg L⁻¹ pokazuju relativno niske vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀, dok su za iste koncentracije diklofenaka dobivene samo vrijednosti EC₂₀. Također, na temelju vrijednosti EC₅₀ za temeljne otopine diklofenaka i pantoprazola koncentracije $\gamma = 32 \text{ mg L}^{-1}$, diklofenak se može klasificirati kao visoko toksična tvar, a pantoprazol kao srednje toksična tvar.⁵³

U literaturnom istraživanju¹⁰² utjecaja diklofenaka i drugih farmaceutika na bakteriju *Vibrio fischeri*, primjenom instrumenta ToxAlert 100, njemačke tvrtke Merck određivane su vrijednosti EC₅₀ u $\mu\text{g L}^{-1}$. Rezultati su pokazali vrijednost efektivne koncentracije za diklofenak od 13,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, što je izmjerenim vrijednostima u ovom radu najbliže EC₂₀ = 0,118 mg L⁻¹ za koncentraciju diklofenaka od 0,125 mg L⁻¹. U istraživanju se također može primijetiti da je EC₅₀ vrijednost za diklofenak ispala viša od ibuprofena i gemfibrozila, dok je ispala niža u odnosu na salicilnu kiselinu, ketoprofen i naproksen, što ukazuje na relativno visoku toksičnost diklofenaka među navedenim farmaceuticima.¹⁰²

5.1.3. Smjese diklofenaka i pantoprazola

Istom metodom kao i za čisti diklofenak i pantoprazol, ispitivala se ekotoksičnost smjesa diklofenaka i pantoprazola u omjerima 1:1, 2:1 i 1:2. Za pripremu takvih smjesa koristile su se temeljne otopine oba ksenobiotika koncentracije 32 mg L⁻¹. Cilj ispitivanja ovih smjesa bio je odrediti sinergistički, antagonistički ili aditivni efekt međudjelovanja ksenobiotika u smjesi. Ukoliko rezultati pokazuju višu inhibiciju smjesa od inhibicije čistih komponenata, to znači da je došlo do sinergističkog međudjelovanja ksenobiotika.¹⁰³ U slučaju da smjesa uzrokuje nižu inhibiciju, radi se o antagonističkom djelovanju ksenobiotika. Aditivni efekt podrazumijeva kombinirani efekt dviju ili više komponenata smjese koji je jednak sumi efekata pojedine komponente u smjesi.¹⁰⁴ U literaturi,¹⁰⁵ istraživanja su prije sličnog ispitivanja ekotoksičnosti smjesa uključivala i metode predviđanja ekotoksičnosti smjesa, kao što su metoda adicije koncentracije i metoda neovisne akcije.¹⁰⁶ Međutim, u kontekstu ovog rada predviđanja nisu provedena.

Miješanjem temeljnih otopina ksenobiotika u navedenim omjerima, dobivene su otopine drugačijih koncentracija ksenobiotika. Vrijednosti koncentracija dobivene su jednostavnim proračunom za razrjeđenja, a kasnije su određene i njihove odgovarajuće inhibicije. Smjesa 1 je nakon miješanja sadržavala ksenobiotike jednakih koncentracija, $\gamma = 16 \text{ mg L}^{-1}$.

Smjesa 2 sadržavala je diklofenak koncentracije $\gamma = 21,44 \text{ mg L}^{-1}$ i pantoprazol koncentracije $\gamma = 10,56 \text{ mg L}^{-1}$, dok je smjesa 3 sadržavala iste ksenobiotike, ali suprotnih koncentracija. Vrijednosti inhibicija za koncentracije ksenobiotika smjese 1 dobivene su pomoću luminometra te su već poznate. Međutim, vrijednosti inhibicija za koncentracije ksenobiotika u smjesama 2 i 3 nisu poznate, zbog čega su dobivene računski, linearnom interpolacijom. Sve su vrijednosti prikazane u tablici 5.1. Proračun je nužno provesti kako bi se mogle usporediti dobivene inhibicije smjesa s inhibicijama točnih koncentracija ksenobiotika koje te smjese sadrže.

Tablica 5.1. Vrijednosti EC_{50} za čiste ksenobiotike preračunate postotke

$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	INH / %	
	Diklofenak	Pantoprazol
10,56	99,73	72,78
16,00	99,87	48,85
21,44	94,51	72,44

Dobiveni rezultati inhibicija smjesa prikazani su stupčastim dijagramom na slici 4.3. Najveću inhibiciju uzrokovala je smjesa diklofenaka i pantoprazola u omjeru 2:1 (smjesa 2) i ona iznosi 99,79%. Budući da inhibicija uzrokovana koncentracijom čistog pantoprazola od $10,56 \text{ mg L}^{-1}$ iznosi 72,78%, a inhibicija čistog diklofenaka koncentracije $21,44 \text{ mg L}^{-1}$ iznosi 94,51%, može se zaključiti da u tom omjeru diklofenak pojačava ekotoksična svojstva pantoprazola te da zajedno daju jaki sinergistički učinak. Druga smjesa po iznosu inhibicije je smjesa 1, odnosno smjesa diklofenaka i pantoprazola u omjeru 1:1, a inhibicija iznosi 98,33%. Takva smjesa u suštini pokazuje aditivna svojstva, jer je njena inhibicija manja od inhibicije čistog diklofenaka (99,87%), a veća od inhibicije čistog pantoprazola (48,85%). Međutim, već je navedeno da je inhibicija pantoprazola za koncentraciju od 16 mg L^{-1} preniska i zbog toga predstavlja eksperimentalnu pogrešku te stoga međudjelovanje ksenobiotika u smjesi 1 nije u potpunosti relevantno. Najmanju inhibiciju pokazuje smjesa 3, omjera diklofenaka i pantoprazola 1:2 te ona iznosi 80,22%. Budući da ta smjesa sadrži dvostruko veću količinu pantoprazola u odnosu na diklofenak, može se zaključiti da pantoprazol blago snižava ekotoksičnost diklofenaka, dok diklofenak blago pojačava ekotoksičnost pantoprazola te u tom slučaju dolazi do aditivnog efekta.¹⁰⁶ To se također može zaključiti na temelju toga što je inhibicija smjese 3 manja od inhibicije čistog diklofenaka ($\gamma = 10,56 \text{ mg L}^{-1}$) vrijednosti 99,73%, a veća od inhibicije čistog pantoprazola ($\gamma = 21,44 \text{ mg L}^{-1}$) vrijednosti 72,44%,

Kao i za čiste ksenobiotike, instrumentom su dobivene EC_{20} i EC_{50} za pojedine smjese.

Rezultati efektivne koncentracije prikazane u tablici 4.5. prilično su niskih vrijednosti izraženih u postotcima. Smjesa 1 pokazuje vrijednosti $EC_{20}= 0,66\%$ i $EC_{50}= 3,56\%$, smjesa 2 vrijednosti $EC_{20}= 0,78\%$ i $EC_{50}= 2,86\%$, a smjesa 3 $EC_{20}= 3,44\%$ i $EC_{50}= 12,14\%$. Po uzoru na literaturu²⁴, promatrajući samo EC_{50} vrijednosti može se zaključiti da je smjesa 2, odnosno smjesa omjera ksenobiotika 2:1 u korist diklofenaka najekotoksičnija, a smjesa 3 najmanje ekotoksična, što se podudara sa zaključcima temeljenim na vrijednostima inhibicija.

Rezultati literaturnog ispitivanja⁹⁴ smjese diklofenaka i sulfametoksazola na bakterijskoj kulturi *Aliivibrio fischeri* pokazuju aditivna svojstva do blago sinergistička svojstva jer je EC_{50} smjese približno jednak vrijednosti EC_{50} diklofenaka, koja je niska u odnosu na visoku vrijednost sulfametoksazola.⁹⁴ Prema prethodno navedenim zaključcima, smjese s diklofenakom ukazuju na sinergistička i/ili aditivna svojstva te se stoga poklapaju s literaturnim podacima.

5.2. Test ekotoksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

5.2.1. Krivulja vrijeme – optička gustoća

Kao što je već rečeno, za potrebe određivanja smanjenja rasta bakterijske kulture *Pseudomonas putida* u prisutnosti čistog ksenobiotika diklofenaka, na spektrofotometru je mjerena optička gustoća te je određivana CFU vrijednost tijekom 3 dana izvođenja pokusa. Rezultati uzoraka s otopinom diklofenaka određenih koncentracija uspoređivali su se s rezultatima kontrolnog uzorka koji nije sadržavao ksenobiotik. Prikazani su na grafovima na slici 4.4. Kao što se na slici može vidjeti, pri ispitivanju uzorka s koncentracijom diklofenaka od 16 mg L^{-1} , optička gustoća uzorka je tijekom tri dana konstantno bila manja od optičke gustoće kontrolnog uzorka. Takvi rezultati upućuju na relativno visoku ekotoksičnost te koncentracije diklofenaka.¹⁰⁷

Uzorci koncentracija 8 mg L^{-1} i 2 mg L^{-1} pokazuju manju optičku gustoću od kontrolnog uzorka tijekom dva dana ispitivanja, što ukazuje na pojačanu ekotoksičnost diklofenaka pri toj koncentraciji. Međutim, optička gustoća ispitivanog uzorka u trećem danu naglo je povećana te je veća od kontrolnog uzorka. Slično opažanje u literaturi¹⁰⁷ opisano je efektom hormeze koji je potencijalno uzrokovan prilagodbom bakterijske kulture na ekotoksičnu tvar.

Naime, ispitivanje na bakterijskoj kulturi *Escherichia coli* pokazalo je ekotoksičan učinak u početnom periodu provedbe testa, koji je nakon toga bio znatno ublažen.¹⁰⁷

U suprotnosti s koncentracijom diklofenaka od 16 mg L^{-1} , za koncentracije od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ nije uočen ekotoksični učinak jer se optička gustoća uzorka tijekom tri dana povećavala i konstantno je bila viša od optičke gustoće kontrolnog uzorka. Takvi rezultati pokazuju jaki efekt hormeze.

5.2.2. Krivulja vrijeme – logCFU

Za izražavanje inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* korištena je i ovisnost promjene CFU vrijednosti o vremenu. Radi jednostavnosti crtanja grafova, umjesto CFU vrijednosti korištene su njihove vrijednosti umanjene logaritmiranjem, logCFU.¹⁰⁸ Slika 4.4. pokazuje grafičke prikaze ovisnosti logCFU o vremenu za određene koncentracije diklofenaka. Koncentracija diklofenaka od 16 mg L^{-1} uspjela je svojom ekotoksičnošću smanjiti broj kolonija tijekom sva tri dana. Isti utjecaj je uočen i pri koncentraciji od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Međutim, što se tiče koncentracija od 8 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} i $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, vrijednosti optičke gustoće uzorka variraju u odnosu na kontrolni uzorak. Broj kolonija za koncentraciju od 8 mg L^{-1} u prvome danu ne razlikuje se od kontrolnog uzorka, dok je u drugome danu veći i trećega dana manji od njega. Takve varijacije mogu se objasniti nepredvidivošću efekta hormeze koji može ovisiti o raznim eksperimentalnim uvjetima zbog čega se on u drugome danu testa pojavio te u trećemu potpuno nestao.¹⁰⁷ Koncentracija od 2 mg L^{-1} pokazuje efekt hormeze odmah prvoga dana testa, međutim sljedeća dva dana ekotoksičnost diklofenaka prevladava. Ista situacija je i kod koncentracije diklofenaka od $0,125 \text{ mg L}^{-1}$, osim što je nagli porast broja kolonija vidljiv tijekom drugoga dana, dok je u prvom i trećem danu broj kolonija manji od kontrolnog uzorka.

5.2.3. Krivulja doza-odgovor

Pomoću dobivenih vrijednosti logCFU izračunate su inhibicije te je napravljen grafički prikaza ovisnost inhibicije o koncentracijama diklofenaka (slika 4.6.). Dobivena krivulja postepeno raste od nižih koncentracija prema koncentraciji 8 mg L^{-1} , nakon čega je do koncentracije 16 mg L^{-1} donekle usporedna s x-osi. U usporedbi sa slikom 5.1., područje krivulje do 8 mg L^{-1} pokazuje srednju toksičnost diklofenaka, a područje od 8 mg L^{-1} do 16 mg L^{-1} visoku toksičnost. Međutim, rezultati ne pokazuju veliku ekotoksičnost diklofenaka jer najveća vrijednost inhibicije iznosi 5,11% i uzrokovana je najvećom ispitivanom koncentracijom diklofenaka od 16 mg L^{-1} . Na početku krivulje vidljiv je blagi pad inhibicije pri koncentraciji diklofenaka od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ što se pripisuje javljanju efekta hormeze.¹⁰⁰

Istraživanje pronađeno u literaturi³⁸ provodilo se radi utvrđivanja utjecaja diklofenaka iz otpadnih voda na okoliš. Rezultati testa primjenom *Pseudomonas putida* nisu pokazali gotovo nikakav ekotoksičan učinak sve dok se nije primijenila koncentracija od 90 mg L⁻¹.¹⁰⁸ Uspoređujući s eksperimentom ovog rada vidljivo je da diklofenak nema veliki ekotoksičan učinak na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida*.

5.3. Test ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

5.3.1. Krivulja vrijeme – optička gustoća

Pomoću mikroalge *Chlorella* sp. ispitivala se ekotoksičnost otopina čistog diklofenaka. Test se provodio mjerenjem optičke gustoće uzoraka tijekom tri dana, nakon čega su rezultati prikazani grafičkim prikazima ovisnosti optičke gustoće o vremenu u danima (slika 4.6.). Na grafovima se vidi kako optička gustoća kontrolnog uzorka postepeno raste tijekom prva dva dana provođenja testa, međutim naglo opada trećeg dana do vrijednosti od 0,10. Takav nagli pad može se pripisati eksperimentalnim pogreškama, međutim prihvatiti li se ta vrijednost legitimnom, može se objasniti smanjenjem hranjive tvari u uzorku ili promjenom nekih vanjskih uvjeta zbog kojih je mikroalga naglo ugibala. Međutim, ono što se može primijetiti je da uzorci svake koncentracije diklofenaka također tako ponašaju. Optička gustoća svakog uzorka povećava se u prva dva dana testa, uz blage varijacije u odnosu na kontrolni uzorak, a treći dan vrijednost optičke gustoće pada. Jedno od objašnjenja takve stope rasta krivulje je manjak fosfora u bazalnom mediju u kojemu se test provodio.¹⁰⁹ Naime, bazalni medij koji je korišten sadrži KH₂PO₄ koncentracije 1,60 mg L⁻¹, kao jedini izvor fosfora, što potencijalno može predstavljati prenisku količinu fosfora za rast bakterija nakon dva dana provođenja testa. S druge strane, literatura³⁹ navodi kako i temperatura može utjecati na sve slabiji rast mikroalgi. Predstavljeni su grafovi ovisnosti broja stanica mikroalgi o vremenu pri temperaturama od 15 °C, 20 °C i 25 °C. Najbrži pad broja stanica bio je pri temperaturi od 25 °C.¹⁰⁹ Ta se činjenica poklapa s rezultatima dobivenim u ovom radu jer je temperatura pri kojoj se izvodio pokus varirala između 23,4 °C i 26,7 °C.

5.3.2. Krivulja vrijeme – logCFU

Svjetlosnim mikroskopom uz upotrebu Thomine komorice, određene su CFU vrijednosti, zatim su izračunate logCFU vrijednosti koje su grafički prikazane u ovisnosti o vremenu. Kontrolni uzorak pokazuje pad broja kolonija koji varira, odnosno nakon 24 sata provođenja testa broj kolonija ostaje isti kao i prije početka izvođenja testa.

Nakon 48 sati broj naglo pada te se treći dan ponovno blago povećava. Usporedivši kontrolni uzorak s ispitivanim uzorkom koncentracije diklofenaka od 16 mg L^{-1} vidljivo je da od početka testa broj kolonija prati trend opadanja tijekom prva dva dana, međutim u trećem danu testa, logCFU ponovno raste, što je moguće objasniti pojavom efekta hormeze.¹⁰⁶ Slične trendove pokazuju i uzorci koncentracija 2 mg L^{-1} , $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,125 \text{ mg L}^{-1}$, s tim da pokazuju više vrijednosti logCFU u odnosu na uzorke od 16 mg L^{-1} i 8 mg L^{-1} , što se može objasniti jačim efektom hormeze pri nižim koncentracijama,¹⁰⁰ ali i time da su više koncentracije ekotoksičnije od nižih. Što se tiče uzorka koncentracije 8 mg L^{-1} , trend vrijednosti logCFU kontinuirano opada tijekom sva tri dana, što ukazuje na visoku ekotoksičnost te ispitivane koncentracije. Sveukupne varijacije logCFU vrijednosti mogu se, objasniti nepredvidivom mogućnošću mikroorganizama prilagodbe ekotoksičnim tvarima.¹¹⁰

5.3.3. Krivulja doza-odgovor

Na temelju dobivenih vrijednosti logCFU dobivene su vrijednosti inhibicije za svaku definiranu koncentraciju diklofenaka. Rezultati su prikazani grafički na slici 4.9., a trend dobivene krivulje na grafu može se usporediti s krivuljom doza-odgovor na slici 5.1.. Naime, vidljivi rast inhibicije od koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ do 2 mg L^{-1} predstavlja srednju ekotoksičnost diklofenaka, dok blagi rast krivulje od koncentracije 2 mg L^{-1} do 16 mg L^{-1} predstavlja područje krivulje visoke ekotoksičnosti diklofenaka. Međutim, iako takav trend krivulje naizgled pokazuje visoku ekotoksičnost diklofenaka kroz veći niz koncentracija te budući da je maksimalna dobivena inhibicija jednaka 9,30% (za koncentraciju 16 mg L^{-1}), može se zaključiti da diklofenak nema toliko ekotoksičan učinak na mikroalgu *Chlorella* sp. Dodatno je bitno napomenuti kako blago niža vrijednost inhibicije pri koncentraciji od $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, u odnosu na inhibicije koncentracija $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ i 2 mg L^{-1} , predstavlja nepredvidljivu pojavu efekta hormeze.¹⁰⁶

U dostupnoj literaturi¹¹¹ objašnjeno je kako pojedine vrste mikroalgi imaju veliku sposobnost razgradnje određenih ksenobiotika, zbog čega se i koriste za biorazgradnju određenih farmaceutika iz otpadnih voda.¹¹¹ Među brojnim navedenim organizmima, navedena je i mikroalga *Chlorella sorokiniana*. Uz 100%-tnu razgradnju ibuprofena, paracetamola i metoprolola, ova mikroalga je uspjela razgraditi i 30% karbamazepina, 40% trimetoprima te 40-60% diklofenaka.¹¹¹ Potencijalan razlog zašto diklofenak ne djeluje toliko ekotoksično na mikroalgu *Chlorella* sp. je upravo i njena mogućnost razgradnje diklofenaka.

5.3.4. pH-vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika

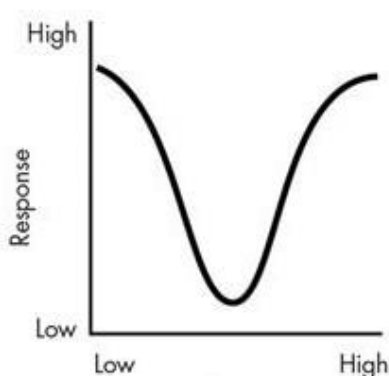
Na samom kraju izvođenja testa, pripadnim elektrodama određene su pH-vrijednosti i zasićenosti kisikom svih uzoraka. Te su vrijednosti u usporedbi s početnim uvjetima (tablica 3.3.) manje kao i u slučaju usporedbe s vrijednostima kontrolne tikvice. Najveća pH-vrijednost jednaka 7,403 izmjerena je za koncentraciju 8 mg L⁻¹, za koju je također izmjerena i najveća koncentracija kisika, iznosa 7,92 mg L⁻¹. Najniža pH-vrijednost iznosi 7,292 i pripada uzorku koncentracije diklofenaka od 0,125 mg L⁻¹, dok je najniža vrijednost koncentracije kisika izmjerena za uzorak koncentracije 2 mg L⁻¹ i iznosi 7,72 mg L⁻¹. Smanjene vrijednosti u odnosu na početnu objašnjavaju se smanjenom mogućnošću odvijanja fotosinteze zbog prisutnosti ksenobitika. U drugom istraživanju¹¹² također je zabilježeno smanjenje intenziteta fotosinteze i respiracije, a samim time i smanjenje koncentracije kisika u uzorku s mikroalgom *Chlorella* sp. u prisutnosti različitih koncentracija diklofenaka¹⁰⁵, što se može usporediti s eksperimentom ovog rada.

5.4. Test ekotoksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Ekotoksičnost diklofenaka i pantoprazola, kao i njihovih smjesa određivana je i primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Test koji to podrazumijeva, YTT (engl. *Yeast Toxicity Test*), temelji se na mjerenju volumena CO₂ nastalim procesom fermentacije. Rezultati su se očitavali tijekom 72 sata svakih 24 sata pri čemu su se očitavali volumeni istisnute suspenzije u utaknute šprice, što predstavlja volumen nastalog CO₂. Nakon toga pomoću njihovih iznosa izračunate su vrijednosti inhibicije za svaki čisti ksenobiotik i njihove smjese, koje su prikazane na grafovima (slike 4.10. i 4.11.) i tablicama (4.7. i 4.8.) u ovisnosti s ispitivanim koncentracijama.

Grafovi ovisnosti inhibicija o koncentracijama diklofenaka i pantoprazola dosta su slični, što se može vidjeti prema 100%-tnoj inhibiciji pri 0,5 mg L⁻¹ i 16 mg L⁻¹ diklofenaka i pantoprazola. Pri niskim koncentracijama diklofenaka od 0,125 mg L⁻¹ i 2 mg L⁻¹ vidljive su dosta visoke vrijednosti inhibicije od čak 41,86%, odnosno 48,84%. Koncentracija od 8 mg L⁻¹ pokazuje najnižu vrijednost inhibicije od samo 11,63%. S druge strane, na grafu kojim se opisuje ekotoksičnost pantoprazola, uočava se najniža inhibicija pri koncentraciji od 2 mg L⁻¹, koja je u blago negativnom području grafa. Navedeno ukazuje na pojavu efekta hormeze pri toj ispitivanoj koncentraciji. U ovom slučaju koncentracija 0,125 mg L⁻¹ daje inhibiciju od 9,30%, što je niže od diklofenaka, te 72,09% za koncentraciju 8 mg L⁻¹, što je više u odnosu na vrijednosti za diklofenak. Naposljetku, u odnosu na diklofenak, koncentracije 0,5 mg L⁻¹ i 16 mg L⁻¹ pokazuju također 100%-tnu inhibiciju.

Zbog inhibicije iznosa 100% pri koncentracijama od 0,5 mg L⁻¹ i 16 mg L⁻¹ oba ksenobiotika, krivulje imaju specifičan oblik doza-odgovor krivulje, a to je „U“ krivulja (slika 5.2.). Taj tip krivulje spada u tzv. „nemonotone odgovore na doze“¹¹³ i nije toliko čest, međutim pojavljuje se u ekotoksikologiji te ga je također potrebno znati interpretirati. Naime, niža vrijednost inhibicije između koncentracije 0,5 mg L⁻¹ te koncentracije 16 mg L⁻¹ mogu upućivati na efekt hormeze.¹¹⁴ Međutim, to ne mora uvijek biti slučaj jer se takav trend krivulje može objasniti nepredvidljivim ponašanjem ekotoskičnosti ksenobiotika pri različitim koncentracijama. Drugim riječima, budući da se pri višim koncentracijama ksenobiotika javljaju i više vrijednosti inhibicija, može se pretpostaviti da niske koncentracije neće štetno djelovati na organizme zbog pojave niskih vrijednosti inhibicija, međutim takve pretpostavke ne moraju se nužno obistinuti u realnom sustavu.¹¹⁴ Upravo u slučaju testa s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*, rezultati su pokazali trend visoke inhibicije pri nižim ispitivanim koncentracijama, snižavanje inhibicije do određene koncentracije, nakon koje je opet zabilježen rast do visokih inhibicija. Također, takav trend može se objasniti i nepredvidivom mogućnošću prilagodbe mikroorganizama na prisutnost jako ekotoksičnih tvari.¹¹⁰



Slika 5.2. Primjer idealne „U“ krivulje¹¹⁵

Smjese diklofenaka i pantoprazola u svim mjerenim omjerima pokazuju maksimalnu toksičnost od 100%. Ta činjenica ukazuje na veliki sinergistički efekt diklofenaka i pantoprazola u smjesi, odnosno ukazuje na to da diklofenak i pantoprazol međusobno pojačavaju ekotoksičnost jedan drugoga u testu primjenom *Saccharomyces cerevisiae*.⁸⁸

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih ispitivanja ekotoksičnosti diklofenaka, pantoprazola i njihovih smjesa primjenom različitih mikroorganizama, može se zaključiti sljedeće:

- inhibicija intenziteta svjetlosti bakterije *Vibrio fischeri* uzrokovana diklofenakom iznosi više od 99%, a pantoprazolom 73,73% što ukazuje na visoku ekotoksičnost oba ksenobiotika
- različite ispitane koncentracije diklofenaka pokazuju niže EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti od pantoprazola, što također ukazuje na ekotoksičniji utjecaj diklofenaka na bakteriju *Vibrio fischeri* od pantoprazola
- temeljem EC₅₀ vrijednosti testa s *Vibrio fischeri* diklofenak se klasificira kao visoko toksična, a pantoprazol kao srednje toksična tvar
- najveća vrijednost inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* uzrokovane diklofenakom iznosi 5,11% što ukazuje na slab ekotoksični učinak na bakterijsku kulturu
- maksimalna inhibicija rasta mikroalge *Chlorella* sp. iznosi 9,30% ($\gamma_D = 16 \text{ mg L}^{-1}$) što ukazuje na slab ekotoksični učinak diklofenaka na mikroalgu
- negativna ili niža inhibicija pri nižim koncentracijama ukazuje na pojavu efekta hormeze koja je nepredvidiva te se može pojaviti pri različitim uvjetima
- kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i bakterija *Vibrio fischeri* osjetljiviji su na diklofenak od alge *Chlorella* sp. te bakterije *Pseudomonas putida*
- bakterija *Vibrio fischeri* osjetljivija je na pantoprazol nego kvasac *Saccharomyces cerevisiae*
- izlaganje smjesi diklofenaka i pantoprazola najčešće izaziva sinergistički i aditivni efekt, ali ne i antagonistički efekt
- smjese diklofenaka i pantoprazola imaju ekotoksičniji utjecaj na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, nego na morsku bakteriju *Vibrio fischeri*

7. LITERATURA

1. Janton, N., Bioremedijacijski potencijal aktivnog mulja u obradi farmaceutske otpadne vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
2. Zakon o vodama, NN 153/09, 130/11.
3. Travis, C. C., Hester, S. T., Global Chemical Pollution, Environ. Sci. Technol., **25** (1991) 815-819.
4. Miloloža, M., Procjena utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
5. Štefanac, T., Grgas, D., Landeka Dragičević, T., Xenobiotics – Division and Methods of Detection: A Review, Journ. of Xenobio., **11** (2021) 130-141.
6. Posavec, D., Ksenobiotici, Završni rad, Međimursko veleučilište u Čakovcu, 2015.
7. Gudelj, I., Nove onečišćujuće tvari – ksenobiotici, Hrv. vode, **95** (2016) 58-61.
8. Qadir, A., Hashmi, M. Z., Mahmood, A., Kumar, V., Varma, A., Xenobiotics, Types and Mode of Action, Xenobio. in the Soil Environ., **49** (2017) 1-7.
9. Baranašić, T., Farmaceutski ksenobiotici u okolišu – izvor, analiza, primjena, utjecaj i tretiranje, Završni rad, Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
10. Travis, C. C., Hester, S. T., Global Chemical Pollution, Environ. Sci. Technol., **25** (1991) 815-819.
11. Rieger P.-G., Meier, H.-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H.-J., Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence, Journ. of Biotechn., **94** (2002) 101-123.
12. Singh, A., Prasad, S. M., Singh, R. P., Environmental Xenobiotics and Its Effects on Natural Ecosystem, Pl. Resp. To Xenobio., **1** (2016) 1-18.
13. Vandam, L. D., Analgetic Drugs, New Eng. Journ. of Med., **286** (1972) 20-23.
14. Mimica Matanović, S., Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika, Medicus, **23** (2014) 31-46.
15. Medicinski priručnik za pacijente, Neopioidni analgetici, <http://www.ms-d-prirucnici.placebo.hr/ms-d-za-pacijente/bolesti-mozga-i-zivcanog-sustava/bol/neopioidni-analgetici> (pristup 13. lipnja 2022.)
16. Medicinski priručnik za pacijente, Liječenje boli, <http://www.ms-d-prirucnici.placebo.hr/ms-d-za-pacijente/bolesti-mozga-i-zivcanog-sustava/bol/lijecenje-boli> (pristup 13. lipnja 2022.)

17. National Library of Medicine, Diclofenac, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (pristup 13. lipnja 2022.)
18. Drugs.com, Diclofenac (Systemic), <https://www.drugs.com/monograph/diclofenac-systemic.html> (pristup 13. lipnja 2022.)
19. NHS, Diclofenac, <https://www.nhs.uk/medicines/diclofenac/> (pristup 13. lipnja 2022.)
20. Drugbank Online, Diclofenac, <https://go.drugbank.com/drugs/DB00586> (pristup 13. lipnja 2022.)
21. Wikipedia, Diklofenak, <https://sh.wikipedia.org/wiki/Diklofenak> (pristup 13. lipnja 2022.)
22. Puljak, L., Krnić, D., Anić-Matić, A., Dosenović, S., Draganić, P., Zezelić, S., National consumption of opioid and nonopioid analgesics in Croatia, *Therap. And Clin. Risk. Manag.*, **11** (2015) 1304-1314.
23. Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F. L., Occurence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota – a review, *Sci. of the Tot. Environ.*, **698** (2020) 1-32.
24. Saicm Knowledge, Pharmaceutical pollutants, <https://saicmknowledge.org/program/pharmaceutical-pollutants> (pristup 13. lipnja 2022.)
25. Hrvatsko kardiološko društvo, Lijekovima uzrokovano oštećenje jetre, <https://www.kardio.hr/2017/02/03/lijekovima-uzrokovano-ostecenje-jetre/> (pristup 13. lipnja 2022.)
26. Huber, C., Bartha, B., Schröder, P., Metabolism of diclofenac in plants – Hydroxylation is followed by glucose conjugation, *Journ. of Hazard. Mater.*, **243** (2012) 250-256
27. Copolovici, L., Timis, D., Taschina, M., Copolovici, D. M., Cioca, G., Bungau, S. G., Diclofenac Influence on Photosynthetic Parameters and Volatile Organic Compound Emission from *Phaseolus vulgaris* L. *Plants*, *Rev. de Chim.*, **68** (2017) 2076-2078
28. Vazquez – Luna, D., del Carmen Cuevas – Diaz, M., Ecotoxicological Tests as a Tool to Assess the Quality of the Soil, *Cont. and Altern. for Sust. Devel.*, **2** (2019) 13-33.
29. Domardzka, D., Guzik, U., Hupert - Kocurek, K., Wojcieszynska, D., Toxicity of Diclofenac and its Biotransformation by *Roultella* sp., *Pol. J. Environ. Stud.*, **5** (2016) 1-6.
30. Gomez – Olivan, L. M., Galar – Martinez, M., Garcia – Medina, S., Valdes – Alanis, A., Isas – Flores, H., Neri – Cruz, Nadia, Genotoxic response and oxidative stress

- induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*, Drug and Chem. Toxicol., **37** (2014) 391-399.
31. Zhang, Y., Geissen, S. U., Gal, C., Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, Chemosph., **73** (2008) 1151-1161.
 32. Jimenez-Bambague, E. M., Florez – Castillo, J. S., Gomez – Angulo, R. D., Morales – Acosta, P. A., Pena – Salamanca, E. J., Machuca – Martinez, F., Madera – Parra, C. A., Cell growth and removal capacity of ibuprofen and diclofenac by *Parachlorella kessleri* at bench scale, Journ. of Chem. Tech. and Biotech., **1** (2021) 1-8.
 33. Wikipedia, Pantoprazol, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Pantoprazol> (pristup 14. lipnja 2022.)
 34. Drugs.com, Pantoprazole, <https://www.drugs.com/pantoprazole.html> (pristup 14. lipnja 2022.)
 35. Milić, C., Potencijalne klinički značajne interakcije inhibitora protonske pumpe, Završni specijalistički rad, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
 36. Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A., Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: A review, Sci. of the Tot. Environ. **570** (2016) 732-750.
 37. Macleod, K., The Effect of the Proton Pump Inhibitor Pantoprazole on the Biology of *Campylobacter jejuni*, Doktorska disertacija, Škola medicine, veterine i životnih znanosti, Sveučilište u Glasgou, 2016.
 38. Guzman Rodriguez, M., Hyde, R., Vanner, S., Allen – Vercoe, E., Sheth, P., Petrof, E. O., A154 Direct bactericidal effect of pantoprazole on bacterial isolates from the gut microbiome, Journ. of the Can. Assoc. of Gastroent., **2** (2019) 305-306.
 39. Altman, K. W., Chhaya, V., Hammer, N. D., Pavlova, S., Vesper, B. J., Tao, L., Radosevich, J. A., Effect of Proton Pump Inhibitor Pantoprazole on Growth and Morphology of Oral *Lactobacillus* Strains, The Laryngosc., **118** (2008) 599-604.
 40. [Lepczyńska](#), M., Dzika, E., Chen, W.-C., Lu, C.-Y., Influence of Proton Pump Inhibitors and Histamine Receptor 2 Antagonists on *Blastocystis* ST3 and Selected Microorganisms of Intestinal Microbiota *In Vitro*, Clin. Transl. Gastroenterol., **12** (2021) 1-7.

41. Truhaut, R., Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives, *Ecotox. and Environ. Safe.*, **1** (1977) 151-173.
42. Newman, M. C., *Fundamentals of Ecotoxicology, The Science of Pollution (Fourth Edition)*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015, str. 22-28.
43. Crnjak, M., Utvrđivanje genotoksičnog potencijala uzoraka sedimenta i površinske vode rijeke Save Ames biotestom, Diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
44. Clasen, B., de Moura Lisboa, R., Ecotoxicological Tests as a Tool to Assess the Quality of the Soil, *S. Contam. and Altern. for Sust. Dev.*, **2** (2019) 1-22.
45. Wikipedia, In vivo, https://hr.wikipedia.org/wiki/In_vivo (pristup 15. lipnja 2022.)
46. Biobide, What is an In Vivo Test?, <https://blog.biobide.com/what-is-an-in-vivo-test> (pristup 15. lipnja 2022.)
47. Vidaković, I., In vivo testovi toksičnosti, Diplomski rad, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
48. European Chemicals Agency, In vitro metode, <https://echa.europa.eu/hr/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods> (pristup 15. lipnja 2022.)
49. Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B., Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story, *In Vitro Toxicol.*, **1** (2018) 1-19.
50. Adnan Tuama, A., Ahmes Mohammed, A., Phytochemical screening and in vitro antibacterial and anticancer activities of the aqueous extract of *Cucumis sativus*, *Saudi Journ. of Bio. Sci.*, **1** (2018) 1-11.
51. Williams, P. L., James, R. C., Roberts, S. M., *Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000, str. 17.
52. Zeomic, Terminology: EC₅₀ (50% Effective Concentration), <https://www.zeomic.co.jp/en/glossary/antibacterial/62> (pristup 8. veljače 2022.)
53. Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), United Nations, 9/2021.
54. Sofilić, T., Makić, H., Toksikologija, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak, 2019, str. 25-26.
55. Gabrielsson, J., Andresson, R., Jirstrand, M., Schulte, S. H. G., Dose-Response-Time Data Analysis: An Underexploited Trinity, *Pharmac. Rev.*, **71** (2019) 89-122.
56. ChemSafetyPRO, What Are EC10, NOEC, LOEC and MATC and How to Use Them in Environmental Risk Assessment,

- [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What_Are_EC10, NOEC, LOEC and MATC in Ecotoxicity and How to Use Them in Risk Assessment.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What_Are_EC10,_NOEC,_LOEC_and_MATC_in_Ecotoxicity_and_How_to_Use_Them_in_Risk_Assessment.html) (pristup 9. veljače 2022.)
57. Ekotoksikologija, Dio C: Metode za određivanje ekotoksičnosti, <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/401410.pdf> (pristup 1. kolovoza 2022.)
58. Christensen, D. G., Visick, K. L., *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage and Common Phenotypic Assays, *Curr. Prot. in Microbio.*, **57** (2020) 1-22.
59. Dunn, A. K., *Vibrio fischeri* metabolism: symbiosis and beyond, *Adv. Microb. Physiol.*, **61** (2012) 37-68.
60. Biologija.com.hr, Bioluminiscencija – fascinantna svjetlost iz morskih dubina, <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8363> (pristup 16. lipnja 2022.)
61. Science Photo Library, *Vibrio fischeri*, symbiotic bacterium, SEM, <https://www.sciencephoto.com/media/873912/view/vibrio-fischeri-symbiotic-bacterium-sem> (pristup 18. lipnja 2022.)
62. Plančak, D., Musić, L., Puhar, I., Međustanična komunikacija parodontopatogenih bakterija, *Acta stomatol Croat.*, **49** (2015) 234-241.
63. Entire Ocean, Twinkling Bobtail Squids, <https://entireocean.com/2020/01/12/twinkiling-bobtail-squids/> (pristup 16. lipnja 2022.)
64. Hydrotox, *Pseudomonas putida* Growth Inhibition Test, <https://www.hydrotox.de/en/services/laboratory-services/ecotoxicity/bacteria/pseudomonas-growth-inhibition-test.html> (pristup 3. kolovoza 2022.)
65. Abbondanzi, F., Cachada, A., Campisi, T., Guerra, R., Raccagni, M., Iacondini, A., Optimisation of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardisation and comparison with Microtox® assay, *Chemosph.*, **53** (2003) 889-897.
66. Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nickel, P. I., Wittman, C., Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects, *App. Microbio. and Biotech.*, **104** (2020) 7745-7766.
67. Miloloža, M., Procjena utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2018.

68. Science Photo Library, *Pseudomonas putida*, Gram – negative, SEM, <https://www.sciencephoto.com/media/873956/view/pseudomonas-putida-gram-negative-sem> (pristup 17. lipnja 2022.)
69. Fluornoy, B., Sciencing, <https://sciencing.com/turbidity-indicate-microbiology-12703.html> (pristup 10. veljače 2022.)
70. Davidson, M. W., Molecular Expressions, <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html> (pristup 10. veljače 2022.)
71. Synbiosis, A Division of the Synoptics Group, <https://www.synbiosis.com/support/glossary/definition/?term=CFU> (pristup 10. veljače 2022.)
72. Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Mols, E., de Vos, W. M., van Hylckama Vlieg, J. E. T., A simple and fast method for determining colony forming units, *Lett. in Appl. Microbio.*, **47** (2008) 275-278.
73. Slabbert, J. L., Oosthuizen, J., Venter, E. A., Hill, E., du Preez, M., Development of Guidelines for Toxicity Bioassaying of Drinking and Environmental Waters in South Africa, *Environmentek.*, **358** (1998) 1-170.
74. Schmitz, R. P., Eisenträger, A., Dott, W., Miniaturized kinetic Growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison), *Journ. Of Microbio. Met.*, **31** (1998) 159-166.
75. Wu, H.-L., Hseu, R.-S., Lin, L.-P., Identification of *Chlorella* sp. isolates using ribosomal DNA sequences, *Grad. Inst. of Agri. Chem.*, **42** (2001) 115-121.
76. Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, J. Z., Ruan, R., Characterisation of a microalga *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production, *Bior. Tech.*, **102** (2011) 5138-5144.
77. Ramaraj, R., Unpaprom, Y., Dussadee, N., Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification, *Intern. Journ. of Sci. and Tech. Re.*, **2** (2016) 1-11.
78. Salbitani, G., Carfagna, S., Extraction and Activity of O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) from Microalga *Chlorella sorokiniana*, *BioProtoc.*, **7** (2017) 1-9.
79. Culture Collection of Autotrophic Organisms, *Chlorella* cf. *minutissima*, <https://ccala.butbn.cas.cz/en/chlorella-cf-minutissima-fott-et-novakova-0> (pristup 18. lipnja 2022.)
80. Nyholm, N., Källqvist, T., Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae, *Environ. Toxic. And Chem.*, **8** (1989) 689-703.

81. Paul Marienfeld GmbH & Co., Counting grids, https://www.dutscher.com/data/pdf_guides/en/AMMARA.pdf (pristup 12. veljače 2022.)
82. Stewart, J. W., Crosland-Taylor, P. J., Cell Counts, Postgrad. Med. Journ., **35** (1959) 502-513.
83. Putman, M., Burton, R., Nahm, M. H., Simplified method to automatically count bacterial colony forming unit, Journ. of Immun. Meth., **302** (2005) 99-102.
84. Shigeoka, T., Sato, Y., Takeda, Y., Yoshida, K., Yamauchi, F., Acute toxicity of chlorophenols to green algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella vulgaris*, and quantitative structure – activity relationships, Environ. Toxicol. And Chem., **7** (1988) 847-854.
85. Lesafre, Okvascu, <https://www.lesaffre.hr/zanimljivosti/o-kvascu/> (pristup 18. lipnja 2022.)
86. Wikimedia Commons, *Saccharomyces cerevisiae* 100x phase contrast microscopy, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces_cerevisiae_100x_phase-contrast_microscopy.jpg (pristup 18. lipnja 2022.)
87. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., Hatziloukas, E., *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications, AIMS Microbio., **6** (2020) 1-31.
88. Stilinović, B., *Saccharomyces cerevisiae* test (YTT) as the water toxicity determination method, Acta Bot. Croat., **40** (1981) 127-131.
89. Witschi, H., The Role of Toxicological Interactions in Chemical Carcinogenesis, Toxic. Path. **12** (1984) 84-89.
90. Canadian Centre for Occupational Health and Safety, Synergism and related terms, <https://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/synergism.html> (pristup 19. lipnja 2022.)
91. Greim, H., Gard Floc'h, A., Autrup, H., Bridges, J., Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures, SCHER, SCENIHR, SCCS, 2011, str. 8-9.
92. Cleuvers, M., Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, Toxicol. lett., **142** (2003) 185-194.
93. Cleuvers, M., Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid, Ecotox. and Environ. Saf., **59** (2004) 309-315.
94. Drzymala, J., Kalka, J., Ecotoxic interaction between pharmaceuticals in mixtures; Diclofenac and Sulfamethoxazole, Chemosphere, **259** (2020) 127-407.
95. Brana, I., Ocana, A., Chen, E. X., Razak, A. R. A., Haines, C., Lee, C., Douglas, S., Wang, L., Siu, L. L., Tannock, I. F., Bedard, P. L., A phase I trial of pantoprazole in

- combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors: evaluation of pharmacokinetics of both drugs and tissue penetration of doxorubicin, *Invest. N. Dr.*, **32** (2014) 1269-1277.
96. HRN EN ISO 11348-1:2000, Kakvoća vode - Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) -- 1. dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju svježe pripremljene bakterije (ISO 11348-1:1998; EN ISO 11348-1:1998)
97. ISO 10 712:1995, Water quality quality - *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test) (ISO 10 712:1995)
98. OECD 201:1984, Test No. 201: Freshwater Algae and Cyanobacteria, Growth inhibition Test
99. Martens, W. J. M., Jetten, T. H., Rotmans, J., Niessen, L. W., Climate change and vector-borne diseases, *Glob. Environ. Change*, **5** (1995) 195-209.
100. Ray, S. D., Farris, F. F., Hartmann, A. C., *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition), Elsevier Inc., 2014, str. 944-947.
101. de Vasconcelos, E. C., Dalke, C. R., de Oliveira, C. M. R., Influence of Select Antibiotics on *Vibrio fischeri* and *Desmodesmus subspicatus* at $\mu\text{g L}^{-1}$ Concentrations, *Environ. Manag.*, **60** (2017) 157-164.
102. Jørgensen, C., Andersson, M. T., LUMIStox 300 Bench Top Luminometer, ECLOX Handheld Luminometer; Joint test report, *DANETV*, **1** (2011) 29-31.
103. la Farre, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barcelo, D., Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*, *Journ. of Chromatogr. A*, **938** (2001) 187-197.
104. Biology Online, Synergistic effect, <https://www.biologyonline.com/dictionary/synergistic-effect> (pristup 8. veljače 2022.)
105. Biology Online, Antagonistic effect, <https://www.biologyonline.com/dictionary/antagonistic-effect> (pristup 8. veljače 2022.)
106. Cleuvers, M., Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicol. lett.*, **142** (2003) 185-194.

107. Fong, C. R., Bittick, S. J., Fong, P., Simultaneous synergist, antagonistic and additive interactions between multiple local stressors all degrade algal turf communities on coral reefs, *Journ. of Ecology*, **160** (2018) 1390-1400.
108. Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Ding, X., Liu, Y., An analogous wood barrel theory to explain the occurrence of hormesis: A case study of sulfonamides and erythromycin on *Escherichia coli* growth, *PloS ONE*, **12** (2017) 1-12.
109. Techni-K Consulting Ltd, the meaning of log cfu and how to read micro lab reports, https://techni-k.co.uk/inspection-testing/log-cfu/#A_log_result (pristup 12. veljače 2022.)
110. Mehinto, A. C., Impacts of the human pharmaceutical diclofenac in the aquatic environment, University of Exeter, 2009, str. 81-184.
111. Pavon-Meza, E. L., Sarma, S. S. S., Nandini, S., Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) food level and temperature on the demography of *Brachionus havanaensis* (Rotifera): a life table study, *Hydrobio.*, **546** (2005) 353-360.
112. Song, C., Liu, Z., Wang, C., Li, S., Kitamura, Y., Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bio-elimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025, *Sci. of the Tot. Environ.*, **723** (2020) 138-146.
113. Xiong, J.-Q., Kurade, M. B., Jeon, B.-H., Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water?, *Trends. in Biotech.*, **36** (2018) 30-44.
114. Gomaa, M., Zien-Elabdeen, A., Hifney, A. F., Adam, M. S., Phycotoxicity of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs to green algae *Chlorella* sp. and *Desmodesmus spinosus*: Assessment of combined toxicity by Box-Behnken experimental design, *Environ. Tech. & Innov.*, **23** (2021) 1-11.
115. Davis, J. M., Svendsgaard, D. J., U-Shaped dose-response curves: Their occurrence and implications for risk assessment, *Journ. of Tox. and Environ. Health*, **30** (1990) 71-83.

8. POPIS KRATICA I SIMBOLA

DDD – engl. *Defined Daily Dose*; prosječna konzumirana dnevna doza

ISO – engl. *International Standardisation Organisation*; Internacionalna organizacija za standardizaciju

OECD – engl. *Organisation for Economic Colaboration and Development*; organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

HRN – hrvatske norme

EN – europske norme

LD – engl. *Lethal Dose*; letalna doza

LD₅₀ – letalna doza za 50% populacije

TD – engl. *Toxic Dose*; toksična doza

SD – engl. *Sentinel Dose*; sentinel doza

EC – engl. *Effective Concentration*; efektivna koncentracija

EC_x – efektivna koncentracija za neodređeni postotak populacije

EC₅ – efektivna koncentracija za 5% populacije

EC₂₀ – efektivna koncentracija za 20% populacije

EC₅₀ – efektivna koncentracija za 50% populacije

LC – engl. *Lethal Concentration*; letalna koncentracija

LC₅₀ – letalna koncentracija za 50% populacije

NOEL/NOEC – engl. *No Observed Effect Level/No Observed Effect Concentration*; koncentracija bez uočenog učinka

LOEL/LOEC – engl. *Lowest Observed Effect Level/Lowest Observed Effect Concentration*; koncentracija najmanjeg uočenog učinka

SEM – engl. *Scanning Electron Microscope*; skenirajući elektronski mikroskop

CFU – engl. *Colony Forming Units*; jedinice koje tvore kolonije

CFU₀ – jedinice koje tvore kolonije u početnim uvjetima

INH – inhibicija

Lu_{30, kontrola} – intenzitet bioluminiscentne svjetlosti kontrolnog uzorka nakon 30 minuta

Lu_{30, uzorak} – intenzitet bioluminiscentne svjetlosti ispitivanog uzorka nakon 30 minuta

γ_D – masena koncentracija diklofenaka, mg L⁻¹

γ_P – masena koncentracija pantoprazola, mg L⁻¹

OG – optička gustoća

OG_{0, sr.} – srednja vrijednosti početne optičke gustoće

$\gamma(\text{O}_2)$ – masena koncentracija kisika, mg L^{-1}

T – temperatura, $^{\circ}\text{C}$

K – broj velikih kvadrata u Thominovoj komorici u kojima su izbrojene stanice

V_{kontrola} – volumen istisnute tekućine u kontrolnim bočicama

V_{uzorak} – volumen istisnute tekućine u bočicama s ispitivanim ksenobioticima

YTT – engl. *Yeast Toxicity Test*; test toksičnosti s kvascem

D : P – omjer diklofenaka i pantoprazola u smjesi

t – vrijeme

9. ŽIVOTOPIS

Karlo Grgurević [REDACTED] Nakon osnovnoškolskog obrazovanja u Osnovnoj školi Trnsko i srednjoškolskog u Prvoj gimnaziji u Zagrebu, upisao je preddiplomski studij Primjenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija radio je kao demonstrator na praktičnim vježbama određenih kolegija na Zavodu za industrijsku ekologiju (Mikrobiologija, Kemija okoliša, Kemija u zaštiti okoliša, Ekotoksikologija). Također, temu svojeg završnog rada predstavio je na Međunarodnom skupu 14. Susreta mladih kemijskih inženjera (SMLKI).