

Bioremedijacijski potencijal aktivnog mulja u obradi farmaceutске otpadne vode

Janton, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:149:072964>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Janton

**BIOREMEDIJACIJSKI POTENCIJAL AKTIVNOG MULJA U
OBRADI FARMACEUTSKE OTPADNE VODE**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Dr. sc. Dajana Kučić, znan. sur.

Doc. dr. sc. Miroslav Jerković

Zagreb, srpanj 2017.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac na ukazanoj pomoći i stručnom vođenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala za sve savjete, motivaciju, podršku i pružene prilike zbog kojih sam stekla dodatna znanja i vještine.

Hvala Moniki Šabić, mag. ing. oecoing. na velikom strpljenju i pomoći pri izradi eksperimentalnog rada čak i u prekovremenim satima. Hvala za sve brojne sugestije, usmjeravanje, razumijevanje i ponajviše na prijateljskim savjetima u trenucima kada je to bilo najpotrebnije.

Zahvaljujem dr. sc. Dajani Kučić i gospođi Marijani Vidaković na stručnoj pomoći tijekom rada u laboratoriju.

Mojim prijateljima i kolegama hvala na potpori i strpljenu tijekom cijelog školovanja.

Hvala mojim roditeljima na svemu jer bez njihove podrške ne bih ovoliko postigla.

Hvala ti Martina što si svojim prisutstvom u laboratoriju stvarala pozitivnu atmosferu koja je rad učinila lakšim.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za industrijsku ekologiju u suradnji s Pliva Hrvatska d.o.o.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. OTPADNE VODE.....	3
2.2. FARMACEUTICI.....	4
2.3. FARMACAUTSKE OTPADNE VODE	6
2.4. OBRADA FARMACEUTSKE OTPADNE VODE.....	7
2.4.1. Biološka obrada farmaceutskih otpadnih voda	8
2.5. BIOREMEDIJACIJA.....	11
2.6. BIOAUGMENTACIJA	13
2.6.1. <i>Pseudomonas putida</i>	14
2.7. BIOSORPCIJA	15
2.7.1. Biosorpcijski potencijal.....	16
2.8. Biorazgradnja	17
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. MATERIJALI	19
3.1.1. Farmaceutska otpadna voda	19
3.1.2. Aktivni mulj	19
3.2. MJERNI INSTRUMENTI I OPREMA	19
3.3. METODE RADA.....	20
3.3.1. Priprema aktivnog mulja.....	20
3.3.2. Proces biosorpcije	20
3.3.3. Identifikacija bakterijske kulture <i>Pseudomonas putida</i>	21
3.3.4. Proces biorazgradnje	21
3.3.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika	23
3.3.6. Određivanje suspendirane tvari.....	23
3.3.7. Određivanje toksičnosti farmaceutske otpadne vode.....	23
3.3.8. Određivanje aktivnosti aktivnog mulja	24
3.3.9. Mikroskopska analiza aktivnog mulja	24
3.4. OBRADA PODATAKA.....	25

4. REZULTATI.....	26
4.1. PROCES BIOSORPCIJE.....	26
4.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE <i>Pseudomonas putida</i>	27
4.3. PROCES BIORAZGRADNJE	28
4.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA	33
5. RASPRAVA	36
5.1. PROCES BIOSORPCIJE.....	36
5.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE <i>Pseudomonas putida</i>	37
5.3. PROCES BIORAZGRADNJE	38
5.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA	42
6. ZAKLJUČAK	43
7. POPIS SIMBOLA	44
8. LITERATURA.....	45

SAŽETAK

Povećanje svjetske populacije i urbanizacija, posebno u zemljama u razvoju, dovodi do nastajanja veće količine otpadnih voda. U današnje vrijeme, emisija industrijskih otpadnih voda predstavlja sve veći problem. Posebno se ističu farmaceutske otpadne vode koje su visoko opterećene i toksične. Prije ispuštanja u okoliš potrebno ih je obraditi u svrhu sprječavanja negativnih učinaka na okoliš.

Jedan od učinkovitih načina obrade je biološka obrada. Bioremedijacija je postupak u kojem se iskorištava potencijal mikroorganizama za uklanjanje onečišćujućih tvari u kontroliranim uvjetima te se dodatno može ubrzati bioaugmentacijom. Sve više na značaju dobiva biosorpcija zbog pojave sve otpornijih ksenobiotika. Općenito je proces biosorpcije fizikalno-kemijski proces uklanjanja onečišćujućih tvari iz otpadne vode sorbiranjem na biološki materijal.

U ovom radu provedena je bioremedijacija farmaceutske otpadne vode primjenjujući tehnike biosorpcije i bioaugmentacije aktivnog mulja. Određen je biosorpcijski kapacitet aktivnog mulja iz postrojenja za obradu otpadnih voda. Početna koncentracija aktivnog mulja, s veličinom čestica 90-125 μm , kretala se između 2,11 i 5,62 g L^{-1} , dok je početna koncentracija supstrata iznosila 5,41 $\text{g O}_2 \text{L}^{-1}$. Rezultati pokusa opisani su Langmuirovom izotermom čije su konstante, K_L i q_m , iznosile 0,40 $\cdot 10^{-3} \text{ L g}^{-1}$ i 100,25 mg g^{-1} . Provedena su tri pokusa s različitim početnim koncentracijama aktivnog i bioaugmentiranog aktivnog mulja. Tijekom pokusa određivane su vrijednosti KPK i pH te koncentracije otopljenog kisika i biomase. Proces biorazgradnje je opisan Endo-Haldaneovom modelom. Dobivene vrijednosti biokinetičkih parametara μ_{max} , K_S , K_i i k_d iznosile su 0,34 h^{-1} , 113,23 g L^{-1} , 157,91 g L^{-1} , 0,0016 h^{-1} za aktivni i 0,44 h^{-1} , 65,53 g L^{-1} , 143,63 g L^{-1} , 0,0071 h^{-1} za bioaugmentirani aktivni mulj.

Ključne riječi: aktivni mulj, biosorpcija, Langmuirova izoterma, bioaugmentacija, *Pseudomonas putida*

SUMMARY

Increase in the world's population and urbanization, especially in developing countries, leads to higher amount of wastewater. Nowadays, emission of industrial wastewater represents an increasing problem. Pharmaceutical wastewater is generally characterized by high organic load and toxicity. Their discharging without prior treatment can easily cause environmental pollution issues.

One of the most effective processes for wastewater treatment is biological process. Bioremediation is a process in which the potential of microorganisms is used to remove pollutants under controlled conditions and it can be improved by bioaugmentation. Nowadays, biosorption is increasingly gaining importance due to the appearance of biologically resistant xenobiotics. Generally, biosorption is a physico-chemical process for removal of substances from wastewater by biological material.

In this study, the bioremediation of pharmaceutical wastewater was carried out by biosorption and bioaugmentation of activated sludge. The biosorption capacity of activated sludge from pharmaceutical wastewater treatment plant was determined. The initial concentration of activated sludge, with particle sizes 90-125 μm , ranged between 2.82 to 5.98 g L^{-1} while the initial concentration of substrate was 5.41 $\text{g O}_2 \text{L}^{-1}$. Three experiments with different initial concentrations of activated, and bioaugmented activated sludge, were conducted. During the experiments, COD, pH value, concentration of dissolved oxygen and biomass were measured. The biodegradation process was described by the Endo-Haldane model. The obtained values of biokinetic parameters μ_{max} , K_S , K_i i k_d were 0.34 h^{-1} , 113.23 g L^{-1} , 157.91 g L^{-1} , 0.0016 h^{-1} for activated and 0.44 h^{-1} , 65.53 g L^{-1} , 143.63 g L^{-1} , 0.0071 h^{-1} for bioaugmented activated sludge.

Key words: activated sludge, biosorption, Langmuir isotherm, bioaugmentation, *Pseudomonas putida*

1. UVOD

Voda je esencijalni resurs koji ima veliku važnost za život ljudske populacije. Porastom broja stanovništva, urbanizacijom i promjenom standarda življenja smanjuju se kapaciteti dostupne pitke vode te njezina kvaliteta postaje upitna.¹ Doprinos u narušavanju njezine kvalitete pridodaju otpadne vode s visokim razinama organskih i anorganskih onečišćujućih tvari.^{2,3} Posljednjih dvadesetak godina mnoga znanstvena istraživanja navode pojavu "novih onečišćujućih tvari" u okolišu čije djelovanje na ljudsko zdravlje nije u potpunosti poznato.⁴ U tu skupinu ubrajaju se i farmaceutske djelatne tvari iz različitih skupina lijekova. Njihova prisutnost u vodenim površinama, posebno u vodi za piće, postaje zabrinjavajuća zbog mogućeg negativnog utjecaja na ekosustav i kroničnog djelovanja na ljudsko zdravlje.^{5,6} Kao jedan od većih izvora farmaceutika u okolišu navodi se farmaceutska industrija koja se zbog velike potražnje za lijekovima sve više razvija.⁷

Farmaceutske otpadne vode nastale u proizvodnji sadrže specifična onečišćenja poput neizreagiranih reaktanata, organskih otapala, međuprodukata te ostataka pomoćnih i farmaceutskih djelatnih tvari.⁸ Proizvodnja različitih farmaceutika generira otpadne tokove različitog sastava te je sastav otpadne vode varijabilan ovisno o polaznoj sirovini te proizvodnim operacijama i tehnološkom procesu.⁹ Kako bi se zadovoljile zakonom propisane granične vrijednosti emisija, otpadne vode se moraju prije ispuštanja obraditi. Poznavanje sastava farmaceutskih otpadnih voda omogućuje njihovu ciljanu obradu.¹⁰ One se mogu obraditi biološki i različitim fizikalno-kemijskim postupcima. Konvencionalna biološka obrada je aerobna obrada s aktivnim muljem, koja je učinkovita i ekonomski isplativa.⁷⁻¹¹ Negativna strana navedene obrade očitava se u nemogućnosti učinkovitog uklanjanja onečišćujućih tvari koje su otporne na biološku razgradnju kao što su to neki farmaceutici.^{12,13} Tako se u težnji za pronalaskom najboljeg mogućeg rješenja sve više naglasak stavlja na proces bioremedijacije koji uključuje iskorištenje metaboličkog potencijala mikroorganizama za uklanjanje širokog spektra ksenobiotika u kontroliranim uvjetima.^{10,14} Segment mogućnosti utjecaja na procesne uvjete razlikuje navedeni proces od procesa biorazgradnje u okolišu.¹⁰

Za dodatno poboljšanje učinkovitosti obrade farmaceutskih otpadnih voda može se primijeniti postupak bioaugmentacije. To je postupak inokulacije selektivnih

mikroorganizama za koje su istraživanja pokazala da imaju sposobnost biorazgradnje ciljanih onečišćujućih tvari. Sve češće nalazi primjenu pri obradi otpadnih voda, opterećenih teže razgradivim spojevima, kako bi se biorazgradnja dodatno ubrzala.^{15,16} Također, na sve većem značenju dobiva proces sorpcije onečišćujućih tvari na adsorbens biološkog podrijetla, pri čemu se taj proces naziva biosorpcija. Biosorpcija je učinkovita kod uklanjanja teško razgradivih spojeva koje su za mikroorganizme teže razgradive.^{17,18}

U ovom radu provedena je bioremedijacija farmaceutske otpadne vode. Istražen je biosorpcijski kapacitet aktivnog mulja kao sorbensa u šaržnim uvjetima. Za opis procesa korištena je Langmuirova izoterma. Ispitana je i učinkovitost procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode aktivnim i bioaugmentiranim aktivnim muljem bakterijskom kulturom *Pseudomonas putida*. Proces biorazgradnje opisan je Endo-Haldaneovim modelom.

2. OPĆI DIO

2.1. OTPADNE VODE

Kvaliteta voda predstavlja jedan od najvećih problema i izazova današnjice. Porastom broja stanovnika te sve većom industrijalizacijom pitka voda postaje vrijednim prirodnim resursom. Poznato je kako su prirodni resursi neravnomjerno raspoređeni pa tako su i količine vode različite s obzirom na dijelove svijeta.² Ukupni volumen vode na Zemlji je oko 1,39 milijarde km³, volumen slatkovodnih resursa je oko 35 milijuna km³, a od tih slatkovodnih resursa oko 24 milijuna km³, odnosno 68,9 % je u obliku leda i stalnog snijega. Podzemna voda, koja je najveći raspoloživi resurs slatke vode za ljude, čini oko 8 milijuna km³ ili 30,8 %. Zanimljivo je kako se manje od 3 % svjetskih zaliha pitke vode nalazi se na području Mediterana gdje ujedno živi 7 % svjetske populacije ljudi.³ Mediteransko područje je jedno od poželjnih mjesta za život, no svake godine dolazi i veliki broj turista čime se dodatno povećava pritisak na okoliš.

Jedan od najvećih izvora onečišćujućih tvari koje mogu narušiti kvalitetu vode jesu otpadne vode. Prema Zakonu o vodama¹⁹ otpadne vode se definiraju kao sve potencijalno onečišćene tehnološke, sanitarne, oborinske i druge vode. One se općenito prema svom porijeklu mogu podijeliti na:¹⁹

✓ Oborinske otpadne vode

Takva vrsta otpadnih voda nastaje ispiranjem oborinama s površina prometnica, parkirališta ili drugih manipulativnih površina, postupno otapajući onečišćenja na navedenim površinama te otječu u sustave javne odvodnje ili izravno u površinske vode.¹⁹ Kao primjer mogu se navesti kisele kiše koje ugrožavaju šume, građevine i slično, te crvene ili žute kiše koje nastaju kao posljedica ispiranja pustinjske prašine.²⁰

✓ Tehnološke otpadne vode

One predstavljaju sve otpadne vode koje nastaju u tehnološkim postupcima i ispuštaju se iz industrijskih objekata za obavljanje bilo kakve gospodarske djelatnosti.² 20 % od ukupne potrošnje dostupnih resursa slatkih voda, odnosno voda

za piće, koristi se u tehnološkim procesima. Povećanje svjetske populacije zahtjeva veću proizvodnju potrošačkih dobara što doprinosi trendu rasta nestašice pitke vode.²¹

✓ Komunalne otpadne vode

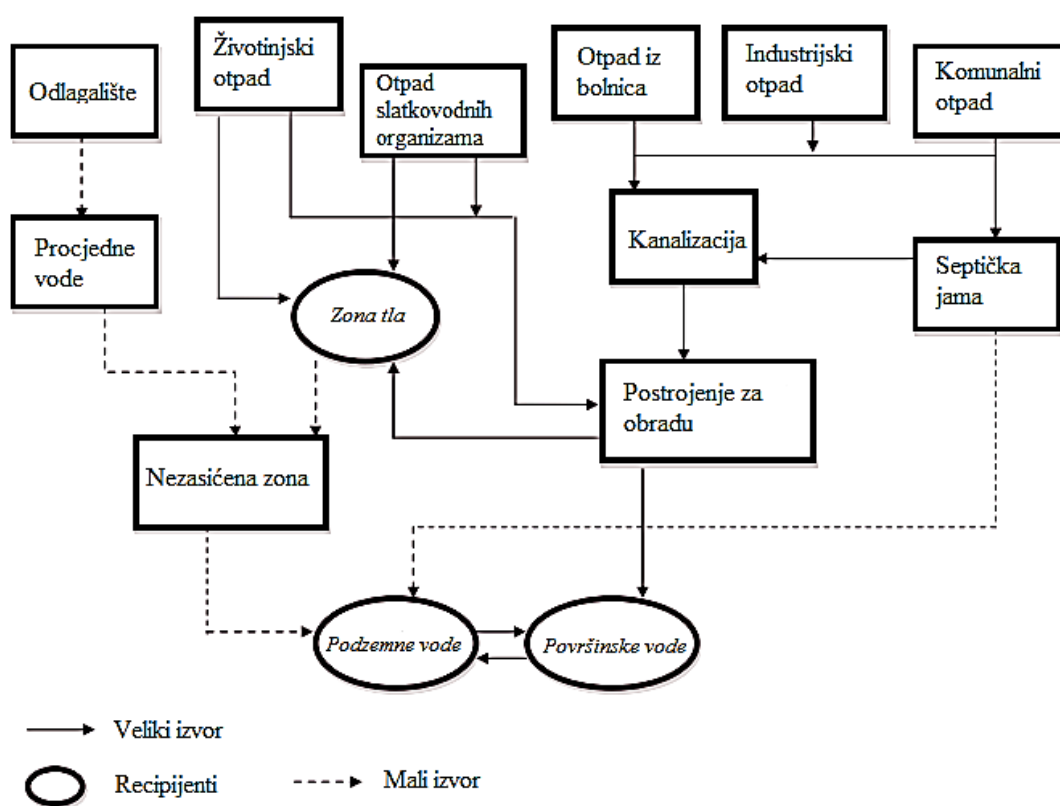
Otpadne vode sustava javne odvodnje koje čine sanitarne, oborinske vode ili otpadne vode koje su mješavina sanitarnih s tehnološkim otpadnim vodama nazivaju se komunalnim otpadnim vodama.¹⁹ Njihova količina se s godinama povećava zbog konstantne urbanizacije i rasta broja stanovništva. Shodno tome mijenja se i životni standard ljudi zbog čega je i sastav komunalnih otpadnih voda varijabilan.²

Na mediteranskom području u najvećoj količini nastaju tehnološke i komunalne otpadne vode. Strogi zakonski propisi nalažu kako se otpadne vode prije ispuštanja moraju obraditi u svrhu sprječavanja štetnog utjecaja na okoliš. Tako u Republici Hrvatskoj, koja je dio Mediterana, na godišnjoj razini nastaje $324,8 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ otpadne vode od čega se približno 63 % obrađuje prije ispuštanja.³ Projektiranje i građenje sustava odvodnje i pročišćavanja otpadnih voda u Hrvatskoj temelji se na pravnim normama, zakonskim i podzakonskim aktima (uredbama, pravilnicima, planovima). Hrvatska kao kandidat za članstvo u Europskoj uniji 2004. godine, te država članica 2013. godine, preuzela je obvezu vodno-gospodarske suradnje s Europskom komisijom i državama članicama kao i potpunog usklađenja vodnog zakonodavstva s pravnom stečevinom Europske unije.²² Osim same obrade sve poželjnija je i ponovna uporaba obrađene vode u poljoprivredne svrhe ili u različitim tehnološkim procesima kako bi se smanjilo korištenje zaliha vode za piće.¹¹

2.2. FARMACEUTICI

Proizvodi farmaceutske industrije danas su široko rasprostranjeni i često korišteni. Farmaceutici su dio ljudske svakodnevnice te općenito predstavljaju kemijske tvari sa specifičnim djelovanjem na biološke sustave. Koriste se u svrhu liječenja, dijagnosticiranja i sprječavanja nastanka bolesti kod ljudi, ali i životinja. Kontinuirano se proizvode te je potražnja za njima sve veća. Drugom polovicom dvadesetog stoljeća dokazana je i njihova prisutnost u okolišu.^{8,23} Koncentracije u kojima su prisutni u okolišu, kreću se u redu veličine od nekoliko ng L^{-1} do nekoliko

$\mu\text{g L}^{-1}$ što dodatno otežava dokaz njihove prisutnosti.⁵ Jednom kada dospiju u okoliš farmaceutici mogu biti akumulirani u tlu²⁴ ili prenošeni površinskim i podzemnim vodama do krajnjih korisnika ljudi i životinja. Otkriće prisutnosti različitih analgetika, antibiotika te citostatskih lijekova u površinskim vodama diljem Europe i svijeta očitalo se u obliku negativnih učinaka na okolišne organizme što je potaknulo zabrinutost znanstvenika diljem svijeta.⁸ Jedan od poznatijih negativnih učinaka jest uginuće populacije *Gyps* supova na području Indije indirektnim utjecajem diklofenaka.²⁵ Nadalje, poznato je i njihovo djelovanje na druge organizme kao što su i oni u vodenim ekosustavima.^{26,27}



Slika 2.1. Izvori i putevi dospjeća farmaceutika u okoliš.²⁷

Farmaceutici iz različitih izvora mogu dospjeti u okoliš kao što su odlagališta otpada, industrije, preko komunalnog otpada te bolničkog otpada.^{27,28} U slici 2.1. vidljivo je kako s odlagališta otpada u okoliš dospjeva manje farmaceutskih tvari u odnosu na druge izvore upravo zbog podizanja svijesti stanovništva o važnosti zbrinjavanja lijekova koji su van upotrebe. Problem se pojavljuje upravo u njihovim

svojstvima fotostabilnosti, dobre topivosti u vodi, sposobnosti adsorpcije što im omogućuje postojanost u okolišu. Akutno i kronično su toksični za neciljane organizme što dodatno povećava razinu zabrinutosti.¹³ Zbog toga potrebno je spriječiti njihovo dospjeće u okoliš djelovanjem na samom izvoru.

2.3. FARMACAUTSKE OTPADNE VODE

Farmaceutska industrija predstavlja kompleksan sustav unutar kojeg se proizvode visoko vrijedni proizvodi u više različitih proizvodnih jedinica. U takvom sustavu se za proizvodnju koristi širok spektar različitih reaktanata, katalizatora i otapala, a kao važna ulazna sirovina ubraja se i voda. Ona se koristi prilikom obrade, formuliranja i same proizvodnje lijekova, djelatnih tvari te intermedijera. Na taj način dolazi do nastanka otpadnih voda čiji sastav i količina ovisi o vrsti procesne jedinice iz koje dolazi te ulaznim sirovinama.^{7,9} Većina proizvodnje odvija se u šaržnim reaktorima što znači da je tijek proizvodnje varijabilan i nestalan što također uvelike utječe na sastav izlaznih otpadnih tokova.⁸ Otpadne vode mogu nastati i pranjem međuprodukata i konačnog produkta te kao rezultat pranja opreme i površina tijekom određenih procesa proizvodnje farmaceutika. U svom sastavu najčešće sadrže neizreagirane reaktante, međuprodukte, ostatke djelatnih tvari, katalizatore te različite aditive u organskom otapalu. Okarakterizirane su kao visoko opterećene organskim tvarima s varijabilnom pH-vrijednosti.⁷ Rasponi vrijednosti karakterističnih pokazatelja za farmaceutske otpadne vode dani su u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Karakterizacija farmaceutske otpadne vode.^{7,8,29}

<i>Pokazatelji</i>	<i>Vrijednosti</i>
pH / -	3,6 - 11,5
TOC / mg L ⁻¹	29,7 - 1202
TDS / mg L ⁻¹	136 - 26 880
BPK₅ / mg L ⁻¹	1,3 - 21 000
KPK / mg L ⁻¹	250 - 60 000
Ukupni dušik / mg L ⁻¹	49 - 370
Ukupni fosfor / mg L ⁻¹	1 - 250

Specifičan sastav farmaceutskih otpadnih voda omogućuje ciljanu obradu u svrhu uklanjanja karakterističnih onečišćenja. Zbog sve strožih zakonskih propisa i mogućih negativnih utjecaja na okoliš potrebno ju je obraditi na odgovarajući način.¹⁰

2.4. OBRADA FARMACEUTSKE OTPADNE VODE

Pojava farmaceutika u okolišu pokrenula je niz istraživanja na temu njihovog uklanjanja. Njihovo ulazak u okoliš može uzrokovati negativne učinke na organizme koji tamo obitavaju kao i na samog čovjeka. U tu svrhu razvijaju se različiti postupci i uvode poboljšanja u tehnologije za obradu farmaceutskih otpadnih voda koje predstavljaju jedan od izvora farmaceutika u okolišu.^{6,7}

Najčešće se primjenjuju fizikalno-kemijski i biološki postupci obrade farmaceutske otpadne vode. S obzirom na njihovu složenost i sadržaj teže razgradivih komponenata, u sklopu fizikalno-kemijskih postupaka, primjenjuju se membranski procesi, adsorpcija i procesi kemijske oksidacije (napredni oksidacijski procesi).³⁰ Membranski procesi uključuju korištenje polupropusnih pregrada različitih veličina pora čijim se pravilnim odabirom može ukloniti široki spektar onečišćenja različitih veličina čestica.^{7,31} Membrane s manjom veličinom pora iziskuju veće financijske izdatke kao na primjer nanofiltratske i reverzno osmotske membrane. One se koriste za terciarnu obradu otpadnih voda ili za obradu slanih podzemnih voda. Poznato je kako se reverzno osmotskim membranama mogu ukloniti neke vrste antibiotika, hormona, anelgetika i antiepileptika iz vodenih medija.¹¹

S obzirom da farmaceutici imaju i dobra sorpcijska svojstva njihovo se uklanjanje postiže vezanjem na aktivni ugljen, glinu, zeolite i sintetičke polimere. Aktivni ugljen se često koristi zbog svojstva visoke poroznosti. Može se primijeniti u praškastom i granuliranom obliku. Granulirani aktivni ugljen koristi se kao zamjena za antracitni medij u uobičajenim filtrima, osiguravajući adsorpciju i filtriranje.¹¹ Općenito, učinkovitost adsorpcije uvelike ovisi o površinskom afinitetu sorbensa i sorbata, strukturi adsorbensa te pH-vrijednosti i temperaturi vode koja se obrađuje. Problemi se stvaraju kod odabira postupka izdvajanja obrađene vode od čvrstog sorbensa, a da prilikom toga ne dođe do desorpcije onečišćujućih tvari.^{7,23}

Napredni oksidacijski procesi pogodni su za obradu pri blagim procesnim uvjetima sobne temperature i atmosferskog tlaka. Organska tvar prisutna u otpadnoj

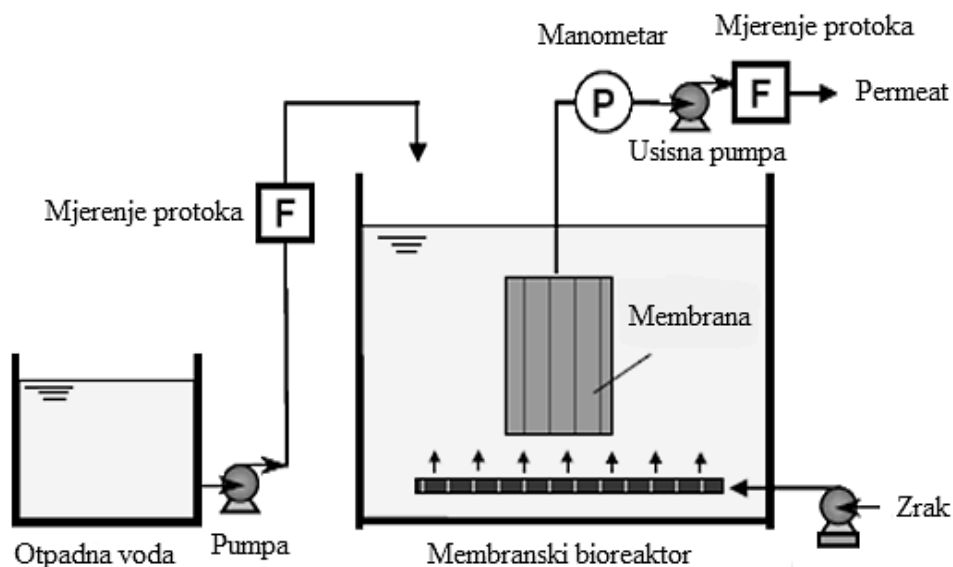
vodi oksidira se djelomično ili potpuno uz pomoć hidroksil radikala ($\bullet\text{OH}$). Radikal $\bullet\text{OH}$ je snažan i neselektivan kemijski oksidans i reagira $10^6 - 10^{12}$ puta brže od oksidansa kao što je O_3 . Agresivno napada gotovo sve organske molekule i u kratkom vremenu dovodi do mineralizacije. Napredni oksidacijski procesi predstavljaju učinkovite metode za obradu voda onečišćenih aromatskim spojevima, halogeniranim ugljikovodicima, nitrofenolima i pesticidima.^{31,32} Fizikalno-kemijski postupci su učinkoviti, no zahtijevaju investicije u posebnu opremu, reagense i energetski su zahtjevne što ih čini ekonomski manje isplativijima.^{11,33} Biološki postupci, najčešće obrada s aktivnim muljem, su ekonomični i učinkoviti procesi čijim se konstantnim unaprjeđenjem nadilaze ograničenja biorazgradnje poput složenijih i teže biorazgradivih organskih molekula.³⁴

2.4.1. Biološka obrada farmaceutskih otpadnih voda

Biološka obrada otpadnih voda temelji se na enzimatskoj aktivnosti mikroorganizama u svrhu uklanjanja otopljenih organskih onečišćujućih tvari.³⁵ Može se provoditi u uvjetima bez kisika, anaerobno, te u uvjetima uz prisutnost kisika, aerobno. Anaerobna obrada je manje zastupljena vrsta obrade za navedeni sustav zbog osjetljivosti procesa na promjene nekih parametara, poput pH-vrijednosti i temperature.^{7,36} Klasično se obrada farmaceutskih otpadnih voda provodi s aktivnim muljem. Kao što je ranije navedeno, sastav otpadnih voda je varijabilan, značajno ovisi o vrsti proizvodnje te osim farmaceutika sadrži i druge tvari poput različitih međuprodukata i otapala. Aktivni mulj kao zajednica mikroorganizama omogućava proizvodnju više različitih enzima za uklanjanje šireg spektra onečišćujućih tvari iz kompleksnog sustava poput farmaceutske otpadne vode. Upravo tu leži najveća prednost biološke obrade nad ostalim postupcima kod kojih je najčešće moguće uklanjanje jedne vrste ksenobiotika u jednome koraku. S obzirom na to kako je veći broj farmaceutika biološki nerazgradiv¹³ i neke tvari djeluju inhibitorno na metabolizam mikroorganizama,³¹ u tom slučaju može doći do smanjenja učinkovitosti obrade.

Obrada se provodi u bioreaktoru uz aeraciju sustava s aktivnim muljem i otpadnom vodom te mješanje uz osiguravanje dostupnosti otopljenog kisika mikrobnj zajednici.³⁷ S obzirom da tijekom procesa biorazgradnje dolazi do stvaranja ugljikovog dioksida, vode i povećanja biomase, višak aktivnog mulja se

odvodi nakon taloženja na zbrinjavanje.³⁸ Kao tehnološki napredniji sustav koristi se membranski bioreaktor prikazan na slici 2.2. Integrirana membrana unutar reaktora sprječava prolaz aktivnom mulju te omogućava izlaz pročišćenoj otpadnoj vodi, permeatu.^{39,40} Ovakav sustav omogućava sadržaj veće koncentracije aktivnog mulja unutar reaktora te zbog membrane nije potreban sekundarni taložnik za odvajanje aktivnog mulja od pročišćene vode.²⁹



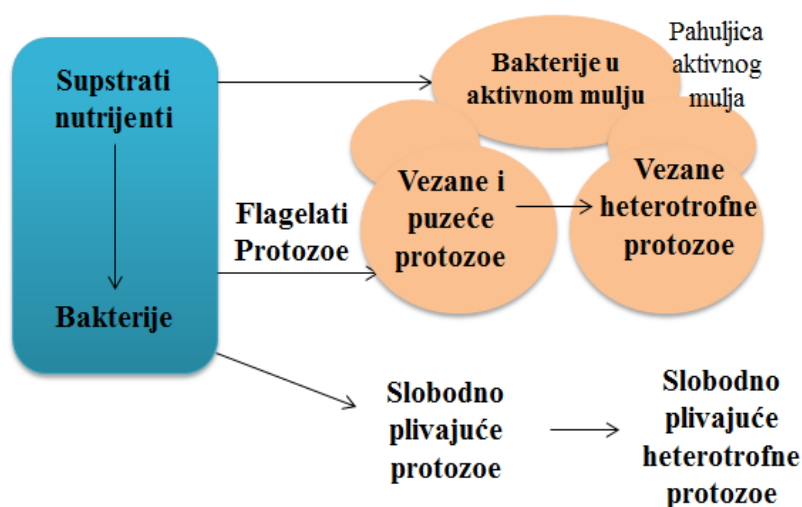
Slika 2.2. Membranski bioreaktor.

Membranski bioreaktor je učinkovit za uklanjanje većine farmaceutskih spojeva te se samim odabirom membrane određene veličine pora može regulirati učinkovitost procesa. Membrane zahtijevaju određene financijske izdatke, stoga odabir biološkog procesa ovisi o ekonomskim utjecajima i zahtijevanoj kvaliteti obrađene vode.

2.4.1.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj je zajednica aerobnih mikroorganizama od koji 95 % čine bakterije, a ostalo su kvasci, alge, protozoe te metazoe. Sastav mikrobne zajednice ovisi o vrsti supstrata, koncentraciji otopljenog kisika i opterećenosti otpadne vode koja se obrađuje. Oni se razvijaju u tzv. *pahuljicama* aktivnog mulja koje omogućuju mikroorganizmima da se na njih pričvrste te da ostvare bolji kontakt sa

supstratom.^{41,42} Pahuljice, dakle, čine tvari organskog (oko 70 %) i anorganskog porijekla (10-30 %) te se njihova veličina kreće u rasponu od 10 do 300 μm .³⁷ Bakterije, posebice gram negativne, čine većinu mikrobne zajednice te su zbog toga u većem mjerilu odgovorne za oksidaciju ili transformaciju većine organskih tvari i proizvodnju ekstracelularne polimerne substance koja omogućava stvaranje aglomerata, pahuljica. Ekstracelularna polimerna substancia sastoji se od ugljikohidrata, proteina, lipida, uronske kiseline i manje količine nukleinske kiseline zbog čega je otporna na biorazgradnju.⁴²



Slika 2.3. Mikrobna zajednica aktivnog mulja.⁴¹

Pahuljica aktivnog mulja sastoji se od tri sloja: vanjski sloj dobro opskrbljen kisikom i supstratom, srednji aerobni sloj dobro opskrbljen kisikom, ali manje hranjivim tvarima te unutrašnji anaerobni sloj slabije opskrbljen hranjivim tvarima i kisikom. U anaerobnom sloju su zbog toga najčešće smještene metanogene i sulfonirajuće bakterije.⁴¹ Na vanjske slojeve pahuljica vezane su protozoe i ostali viši mikroorganizmi kao što je vidljivo u slici 2.3. Osim vezanih, protozoe se još klasificiraju na puzeće i slobodno plivajuće.⁴¹ One predstavljaju predatore za bakterije dok se metazoe, poput rotifera, hrane suspendiranim česticama i bakterijama koje nisu vezane za pahuljicu aktivnog mulja čime pridonose formiranju pahuljica.^{37,41}

2.5. BIOREMEDIJACIJA

Remedijacija općenito označava uklanjanje onečišćujućih tvari u okolišu odnosno obnavljanje onečišćenog okoliša.^{14,43} Pojam bioremedijacije prvi se puta spominje i primjenjuje u kontekstu sanacije naftom onečišćenih područja. Dugi niz godina sa stajališta otpada, tehnike remedijacije, pogotovo bioremedijacija, smatrale su se ekonomski neisplativima u odnosu na odlagališta. Uvođenjem propisa o zaštiti okoliša te uviđanjem kako je veliki udio otpada biorazgradiv, pokrenulo je sve učestalije korištenje remedijacijskih postupaka posebice u sferi tla.¹⁴

Bioremedijacija podrazumijeva korištenje metaboličkog potencijala mikroorganizama u svrhu uklanjanja širokog spektra onečišćujućih tvari, ksenobiotika, u kontroliranim uvjetima što joj daje prednost nad biorazgradnjom u okolišu.³⁸⁻⁴³ Navedenim procesom koriste se autohtoni mikroorganizmi izolirani iz onečišćenih područja za koje se pretpostavlja da su već prilagođeni na dostupan supstrat. Kasnije je navedeni proces detaljnije istraživani i za druge vrste onečišćenja poput farmaceutika u otpadnim vodama iz industrijske proizvodnje lijekova. U većini slučajeva moguća je potpuna mineralizacija ksenobiotika dok se složenije tvari biotransformacijom prevode u druge, netoksične produkte.¹⁴ Općenito postoje dvije vrste bioremedijacije s obzirom na mjesto obrade. Ona se može provoditi *in situ*, na mjestu samog onečišćenja, te *ex situ*, izvan onečišćenog područja.^{14,44,45} Odabir vrste obrade ovisi isključivo o specifičnosti situacije, dometu onečišćenja i raspoloživim financijskim sredstvima.⁴³ Ukoliko se radi o onečišćenju većih razmjera koje se brzo širi na okolna područja primjenjuju se brzi *in situ* postupci kao na primjer postavljanje brana u svrhu sprječavanja daljnjeg širenja. U slučajevima kada razgradnjom ksenobiotika mogu nastati toksičnije tvari primjenjuje se *in situ* bioremedijacija.¹²

Biorazgradnja ksenobiotika ne ovisi samo o vrsti enzima koje stvara određeni mikroorganizam već je proces kompleksniji i ovisi o različitim čimbenicima navedenim u tablici 2.2.⁴⁶ Prije nego što se onečišćujuća tvar razgradi stanica je mora moći unijeti u svoj metabolizam. Navedeno svojstvo naziva se biorasploživost.⁴³

Ukoliko se radi o tvarima koje su dobro topive u vodi, kao što je većina farmaceutika, stanici je olakšan unos određene tvari u metabolizam u svrhu razgradnje.⁴⁵ Ako se bioremedijacija provodi bakterijskim kulturama, bitan parametar je pH-vrijednost čije izrazito visoke ili niske vrijednosti mogu uvelike utjecati na

učinkovitost procesa.¹⁴ Osim toga, toksičnost onečišćujućih tvari može također smanjiti djelotvornost bioremedijacije što se može spriječiti prilagođavanjem mikroorganizama na takav supstrat.⁴⁸ Mikroorganizmi visokog genetskog potencijala uspješno će se prilagoditi.^{45,46}

Tablica 2.2. Čimbenici bioremedijacije.^{14,45,47}

<i>Čimbenici</i>	<i>Svojstva</i>
<i>Bioraspoloživost</i>	✓ slaba topljivost onečišćenja u vodi ✓ sklonost sorpciji u tlu i sedimentu
<i>Toksičnost</i>	✓ inhibitorno djelovanje onečišćujuće tvari na metabolizam stanice
<i>Struktura onečišćujuće tvari</i>	✓ elektronski i sferički učinak
<i>pH-vrijednost</i>	✓ optimalni raspon vrijednosti za bakterije je 5-9 ✓ kiselo područje pogodno je za rast gljiva
<i>Genetski potencijal mikroorganizama</i>	✓ prisutnost specifičnih gena za mogućnost razgradnje određenih tvari
<i>Temperatura</i>	✓ razgradnja je moguća pri temperaturama od 0 °C do 50 °C ✓ u rasponu od 20 °C do 30 °C postiže se najoptimalnija aktivnost enzima i najveća učinkovitost biorazgradnje

Optimizacijom navedenih čimbenika dodatno se potiče rast mikroorganizama radi učinkovitije biorazgradnje te se taj proces naziva biostimulacijom.¹⁶ Rast mikroorganizama može se, dakle, stimulirati dodavanjem minerala, hranjivih tvari, kisika (ubrizgavanjem zraka ili dodavanjem kisika u otopljenom obliku) i/ili promjenom već ranije navedenih vrijednosti pH i temperature. Onečišćujuću tvar mogu razgraditi enzimi mikroorganizama ili se ona razgrađuje indirektno, kometaboličkim procesima u kojima enzimi nastali za primarni supstrat razgrađuju i ostale prisutne supstrate.^{12,49} Ukoliko aktivnost mikroorganizama nije zadovoljavajuća, može se primijeniti postupak bioaugmentacije.

2.6. BIOAUGMENTACIJA

Bioaugmentacija je postupak dodavanja mikroorganizama za koje su istraživanja pokazala da imaju sposobnost biorazgradnje ciljane onečišćujuće tvari. Tehnika se uglavnom koristi u slučajevima bioremedijacije onečišćenog tla, ali se sve češće koristi pri obradi otpadnih voda, posebno za vode opterećene spojevima otpornim na biorazgradnju, kako bi se ona dodatno ubrzala.^{12,16,48} Učinkovitost procesa ovisi o aktivnosti i stabilnosti izoliranih mikroorganizama kada su inokulirani u onečišćeno područje.¹⁵ Bioaugmentaciju možemo podijeliti prema specifičnosti na:⁵⁰

- ✓ nespecifičnu gdje su mikroorganizmi dodani u obliku aktivnog mulja, komposta ili tla bez prethodnog ispitivanja mikrobioloških karakteristika,
- ✓ visoko specifičnu gdje se mikroorganizmi dodaju kao čisti sojevi ili definirana mikrobiološka zajednica za koje se zna da imaju sposobnost razgradnje određene onečišćujuće tvari.

Visoko specifična bioaugmentacija često daje bolje rezultate od prethodno navedene tehnike, te prema podrijetlu kultura mikroorganizama može biti:⁵⁰

- ✓ autohtona, jer su mikroorganizmi su izolirani iz onečišćenog tla ili vode, ali uzgojeni u povoljnijim uvjetima, te ponovno uneseni u onečišćeni okoliš,
- ✓ alohtona, mikroorganizmi su izolirani iz drugih medija te inokulirani u onečišćeno područje,
- ✓ bioaugmentacija s genetički modificiranim organizmima.

Također, bitan čimbenik bioaugmentacije je kemijski sastav i koncentracija prisutnih onečišćujućih tvari te enzimatski potencijal mikroorganizama.³⁸⁻⁴⁶ Mikrobno stvaranje specifičnih enzima omogućuje uspješno uklanjanje ksenobiotika iz onečišćenih područja. U tablici 2.3. vidljivo je kako se jedan enzim može primijeniti u više različitih industrija bilo u proizvodnji ili za potrebe remedijacije; samim time veći je i broj supstrata na koje djeluje. Često korištene bakterijske kulture u svrhu bioaugmentacije su one iz roda *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Streptomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* i *Klebsiella* za uklanjanje onečišćenja različitih vrsta među kojima se ubrajaju i farmaceutici.^{51,52}

Tablica 2.3. Primjena enzima.⁴⁶

<i>Enzimi</i>	<i>Supstrat</i>	<i>Primjena</i>
<i>Lakaze</i>	Orto i paradifenoli, aminofenoli, polifenoli, lignin, poliamini	Prehrambena industrija, proizvodnja papira, tekstilna industrija, kozmetička industrija, bioremedijacija
<i>Lignin peroksidaze</i>	Halogenirani fenoli, policiklički aromatski spojevi	Prehrambena industrija, proizvodnja papira tekstilna industrija, farmaceutska industrija, bioremedijacija
<i>Mangan peroksidaze</i>	Lignin, fenolni spojevi	Prehrambena industrija, proizvodnja papira tekstilna industrija, farmaceutska industrija, bioremedijacija
<i>Dioksidaze</i>	Aromatski spojevi	Kemijska sinteza, farmaceutska industrija, bioremedijacija
<i>Lipaze</i>	Organska onečišćenja	Proizvodnja detergenata i papira, kozmetička industrija, sanacija naftom onečišćenih područja

2.6.1. *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida je gram negativna, štapičasta bakterija, iz porodice *Pseudomonadaceae* izolirana iz okoliša.⁵³ Bakterija je aerobna i pokretljiva uz pomoć flagelata. Vrlo se lako može uzgojiti i izolirati na hranjivoj podlozi pri temperaturi 25-30 °C.

Bakterije iz roda *Pseudomonas* dosta su poznate po svojoj metaboličkoj aktivnosti zbog čega se koriste za istraživanja u laboratorijske svrhe. Brojne vrste koriste se u bioremedijaciji za uklanjanje onečišćujućih tvari kao što su različiti aromatski, policiklički ugljikovodici: ksilen, toluen, fenol, naftalen i antracen te specifičnih farmaceutika.⁵⁴ *Pseudomonas putida* učinkovita je u razgradnji pirena s učinkovitošću do 96,6 %.^{55,56} Također je poznato kako izlučuje enzim deoksigenazu za razgradnju naftalena do cis-1,2-dihidrodiola.⁵⁷ Navedeni enzim primjenjuje se i u farmaceutskoj industriji, tablica 2.3., te se time ukazuje potencijal bakterije za bioremedijaciju farmaceutskih otpadnih voda.

Sve veću važnost u farmaceutskoj industriji dobiva enzim esteraza.⁵⁸ Zbog svojstva stereoselektivnog katalizatora koristi se u sintezi optički čistih molekula. Katalitički mehanizam esteraza vrlo je sličan onome serinskih proteaza koji uključuje

nukleofilni napad katalitičnog serinskog hidroksila na karbonilni ugljik.⁵⁸ Esteraze su široko rasprostranjenje kod bakterija roda *Pseudomonas*. One izolirane iz bakterijske vrste *Pseudomonas putida* mogu katalizirati stereoselektivnu hidrolizu DL-MATI (metil DL-acetiltioisobutirat) za proizvodnju DAT kiseline (D- β -acetiltioisobutirična kiselina) visoke optičke čistoće. DAT kiselina ima veliku važnost u procesu sinteze kaptoprila za liječenje hipertenzije i kongestivnog zatajenja srca.^{58,59} Osim u biotehnologiji, esteraze se koriste i u procesu bioremedijacije područja onečišćenim pesticidima. S obzirom na to da su pesticidi većinom organske molekule, enzim se potencijalno može koristiti i u bioremedijaciji farmaceutskih otpadnih voda.

2.7. BIOSORPCIJA

Pojavom sve većeg broja ksenobiotika, biosorpcija, počinje dobivati na važnosti u obradi otpadnih voda. Sorpcija je fizikalno-kemijski proces vezanja onečišćujućih tvari na sorbens, kao što je aktivni ugljen. Suprotan proces naziva se desorpcijom. Sorpcijom su objedinjeni procesi adsorpcije i absorpcije. Adsorpcijom se podrazumijeva vezanje tvari na površinu sorbensa stvaranjem kemijskih veza, dok se pod absorpcijom misli na prijelaz iz jednog stanja u drugo poput prijelaza otopljene tvari vezanjem na sorbens u čvrsto stanje.¹⁷

U biosorpciji se kao sorbens koristi biološki materijal poput biomase mikroorganizama, biljaka i životinja. Mikroorganizmi koji pripadaju istoj grupaciji podržavaju sličan kemijski sastav stanične stijenke zbog čega mogu imati i slična biosorpcijska svojstva.⁶⁰ Tako je na primjer biomasa kvasaca i gljiva sastavljena od hitina i hitozana zbog kojih se na površini stanica nalaze amino, amido i hidroksilne skupine pogodne za vezanje kationa i aniona. Fosforilne i hidroksilne skupine mogu se pronaći na površini stijenka gram pozitivnih i gram negativnih bakterijskih vrsta koje su sastavljene od organske makromolekule, peptidoglikana.^{17,60} Aktivni mulj, kao zajednica različitih vrsta mikroorganizama, također može biti sorbens na koji se veže sorbat, odnosno onečišćujuće tvari iz otpadne vode.^{18,61} Važan čimbenik procesa sorpcije predstavlja pH-vrijednost zbog utjecaja na promjenu strukture površine mulja odnosno može izazvati promjenu površinskog naboja.⁶² U ostale čimbenike ubrajaju se temperatura, početna koncentracija onečišćujućih tvari i koncentracija biomase.

Poznato je kako se biosorpcijom mogu iz vodenog medija ukloniti sorbati poput metala, suspendiranih čestica, koloida, organometalnih, anorganskih i organskih spojeva, uključujući bojila, fluoride, ftalate i farmaceutske djelatne tvari. Najveći broj istraživanja proveden je za uklanjanje metala iz voda no zbog ranije navedenih razloga u vodenom se okolišu pojavljuje sve više sintetskih organskih molekula koje mogu dovesti do različitih negativnih učinaka. Organske tvari različitih su kemijskih struktura te učinkovitost biosorpcije takvih onečišćujućih tvari ovisi o veličini molekula, njihovom naboju, topivosti, hidrofobnosti i reaktivnosti.¹⁷

Biosorpcija je kao interdisciplinarna grana znanosti nastala u težnji za pronalaskom ekonomski i ekološki prihvatljivim postupkom za uklanjanje ksenobiotika. Osim niskih operativnih troškova kao prednosti navodi se i visoka učinkovitost te se korištenjem otpadnog aktivnog mulja smanjuje njegov volumen. Unatoč neupitnom napretku, većina biosorpcijskih procesa još uvijek se koristi u laboratorijskom mjerilu.

2.7.1. Biosorpcijski potencijal

Biosorpcija je brz proces gdje se ravnoteža uspostavlja unutar nekoliko minuta. Zbog toga je teško odrediti točan redoslijed reakcija i zbivanja unutar takvog sustava. No kako bi se proces mogao primijeniti u industriji potreban je matematički opis. Biosorpcijski potencijal prikazuje kao biosorpcijski kapacitet koji je izražen u mg g^{-1} , a ovisan je o uvjetima temperature, pH-vrijednosti te koncentraciji sorbata i sorbensa. Maksimalan sorpcijski kapacitet određuje najpovoljniji sorbens.⁶⁰ Ravnotežni kapacitet biosorpcije aktivnog mulja q_e (mg g^{-1}) prikazan je jednadžbom 2.1.:

$$q_e = \frac{S_0 - S_e}{X_0} \quad (2.1.)$$

gdje je S_0 – početna koncentracija supstrata, mg L^{-1} , S_e – ravnotežna koncentracija supstrata, mg L^{-1} , a X_0 – koncentracija aktivnog mulja, mg L^{-1} .

Za opis procesa biosorpcije najčešće se koristi Langmuirova izoterma. Langmuirova izoterma izvedena je teorijski na temelju pretpostavki da se adsorpcija odvija tako dugo dok površinu sorbensa potpuno ne prekrije monomolekularni sloj adsorbirane tvari, odnosno dok sorbens ne sadrži konačni broj identičnih mjesta.

Model, dakle, pretpostavlja jednoliku energiju adsorpcije na površinu te da nema migracije sorbata po ravnina površine.^{63,64} Na temelju navedenih pretpostavki izvedena je sljedeća jednadžba:

$$q_e = \frac{q_m \cdot K_L \cdot S_e}{1 + K_L \cdot S_e} \quad (2.2.)$$

gdje je q_e – ravnotežna koncentracija sorbata na sorbentu, mg g^{-1} , K_L – Langmuirov biosorpcijski koeficijent, L g^{-1} , q_m – maksimalna koncentracija sorbata na sorbentu, mg g^{-1} i S_e – ravnotežna koncentracija sorbata u otopini, mg L^{-1} . Langmuirova izoterma se može prikazati i u linearnom obliku (jednadžba 2.3.)

$$\frac{q_e}{S_e} = q_m \cdot K_L - q_e \cdot K_L \quad (2.3.)$$

gdje se iz nagiba pravca izračunava Langmuirov biosorpcijski koeficijent, K_L , te iz odjsečka, $q_m \cdot K_L$, vrijednost maksimalne koncentracije sorbata na sorbentu.

2.8. Biorazgradnja

Mikrobiološka razgradnja onečišćujućih tvari predstavlja kompleksan sustav. Za lakše razumijevanje bioloških procesa i prikaz pojedinih procesnih zbivanja ili skupine tih zbivanja koriste se kinetički modeli.¹⁰ Često korišten kinetički model je Monodov kojim se opisuje ovisnost specifične brzine rasta o koncentraciji biomase (2.4.):^{9,31}

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad (2.4.)$$

gdje je μ – specifična brzina rasta, h^{-1} , μ_{\max} – maksimalna specifična brzina rasta, h^{-1} , S – koncentracija supstrata, g L^{-1} i K_S – konstanta zasićenja supstratom, g L^{-1} . Rast biomase je rezultat biorazgradnje supstrata opisanim jednadžbama (2.5.) i (2.6.):

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (2.5.)$$

$$r_s = \frac{dS}{dt} = \mu \cdot \left(\frac{X}{Y_{X/S}} \right) \quad (2.6.)$$

gdje su r_x i r_s – brzine rasta biomase i potrošnje supstrata, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, X – koncentracija aktivnog mulja, g L^{-1} , t – vrijeme, h^{-1} i $Y_{X/S}$ – koeficijent iskorištenja, g g^{-1} . Kako se proces privodi kraju, koncentracija supstrata se smanjuje i nastupa faza odumiranja stanica.⁶⁵ Zbog toga se u Monodov model (2.4.) uvodi konstanta odumiranja, k_d , te jednačba poprima sljedeći oblik (2.7.):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} - k_d \quad (2.7.)$$

Ukoliko dolazi i do inhibicije supstratom, Monodov model se modificira dodatkom konstante inhibicije, K_i , g L^{-1} , kao što je prikazano jednačbom (2.8.);

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + S^2 / K_i} \quad (2.8.)$$

Tako dobiven oblik jednačbe naziva se Haldaneovim modelom uz pomoć kojeg se mjeri osjetljivost procesa na inhibitorno djelovanje supstrata.⁶⁵ Ako se u ovakav oblik još uključi konstanta odumiranja biomase, k_d , dobiva se modificirani Haldaneov model, poznatiji kao Endo-Haldaneov model:¹⁰

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + S^2 / K_i} - k_d \quad (2.9.)$$

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Farmaceutska otpadna voda

Farmaceutska otpadna voda s lokacije Savski Marof, Pliva Hrvatska d.o.o. u ovom radu korištena je za biološku obradu u šaržnim uvjetima. Koncentracija otpadne vode, S , koja predstavlja ukupno onečišćenje otpadne vode iz proizvodnje, izražena je preko vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK , $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$).

3.1.2. Aktivni mulj

Aktivni mulj, koji je korišten u pokusima bioremedijacije, dopremljen je iz Uređaja za obradu otpadnih voda, Pliva Hrvatska d.o.o. Priređena početna koncentracija aktivnog mulja, izražena je preko vrijednosti suspendirane tvari odnosno koncentracije aktivnog mulja (X).

3.2. MJERNI INSTRUMENTI I OPREMA

U radu je korištena rotacijska tresilica Heidolph Unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka, za provedbe pokusa bioremedijacije farmaceutske otpadne vode u šaržnim uvjetima. Kod pripreme aktivnog mulja korištena je centrifuga Sigma 3K15, Njemačka, za ispiranje i ugušćivanje, sušionik Termo-Medicinski aparati, Hrvatska, za sušenje te planetarni kuglični mlin Pulverisette 6, Fritsch, Njemačka, za usitnjavanje suhog aktivnog mulja. Raspon veličina čestica usitnjenog mulja određen je prosijavanjem kroz sita po ASTM standardu (American Standard Sieve Series) uređajem Vibratory sieve shaker (Retsch GmbH, Haan, SR Njemačka). Pomoću prijenosnog mjerača koncentracije kisika WTW Multi 340i, Njemačka, određivana je koncentracija otopljenog kisika u otpadnoj vodi. Vrijednost pH određivana je pH-metrom Sentix® 940, Multi 3430, WTW, Njemačka. Kemijska potrošnja kisika je određivana spektrofotometrijski, Hach, Model DR/2400, SAD. Sušionik Termo-Medicinski aparati, Hrvatska, korišten je za određivanje suhe tvari u uzorcima. Za

precizno vaganje upotrijebljena je vaga Sartorius AG, Njemačka. Test toksičnosti je proveden na Lumistox 300, Dr Lange GmbH, Njemačka. Uzorak aktivnog mulja je pregledavan pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema aktivnog mulja

Aktivni mulj korišten u pokusima biosorpcije ugušćen je taloženjem tijekom pola sata i odekantiran je supernatant. Postupak je ponovljen tri puta, pri čemu je nakon dekantiranja, mulj ispran vodovodnom vodom da bi se uklonili ostaci supstrata i odumrle stanice mikroorganizama. Tako isprani mulj je centrifugiran pri 0°C i 5500 min⁻¹ u svrhu smanjenja njegovog volumena i izdvajanja viška vode. Ugušćeni mulj sušen je potom 24 sata pri 60°C do konstantne mase.^{61,62} Usitnjavanje suhog aktivnog mulja je provedeno uz pomoć tarionika i planetarnog kugličnog mlina u suhim uvjetima. Za usitnjavanje u kugličnom mlinu korištene su kuglice od korunda; 15 komada veličine 20 mm i jedna kuglica veličine 15 mm. Usitnjavanje je provedeno pri vremenskim intervalima i brzini vrtnje kako slijedi: 5 minuta na 100 min⁻¹, zatim 5 minuta na 250 min⁻¹ i 12 minuta na 400 min⁻¹. Veličina čestica osušenog i usitnjenog aktivnog mulja određena je prosijavanjem kroz sita promjera očica 500 μm, 355 μm, 200 μm, 125 μm i 90 μm. Prosijavanje je provedeno na automatskoj tresilici 10 minuta uz amplitudu 1,5 mm.

Za proces biorazgradnje aktivni mulj je ispran i ugušćen pomoću centrifuge pri 5500 min⁻¹, 10 min, pri 0°C, tri puta. Priređena početna koncentracija aktivnog mulja, izražena je preko vrijednosti suspendirane tvari, X . Organski udio u suspendiranoj tvari aktivnog mulja predstavlja koncentraciju biomase, X_v .

3.3.2. Proces biosorpcije

Pokusi biosorpcije, X1-X4, provedeni su u Erlenmeyerovim tikvicama od 1 L, radnog volumena 500 mL, na rotacijskoj tresilici s brzinom vrtnje 160 min⁻¹, pri

temperaturi $22,4 \pm 0,8$ °C, tijekom 30 minuta. Erlenmeyerove tikvice sadržavale su po 1,2; 1,5; 2,5 i 3,5 g suhog usitnjenog aktivnog mulja raspodjele veličine čestica 90–125 μm te farmaceutsku otpadnu vodu početne koncentracije $S_0 = 5413 \text{ mg L}^{-1}$. Početne vrijednosti koncentracije aktivnog mulja iznosile su $X_{01} = 2,11 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$, $X_{02} = 2,59 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$, $X_{03} = 4,13 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$ i $X_{04} = 5,62 \pm 0,22 \text{ g L}^{-1}$. Tijekom provedbe pokusa određivani su: pH–vrijednost, KPK–vrijednost, koncentracija i aktivnost aktivnog mulja te je provedena mikroskopska analiza.

3.3.3. Identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putida*

Za provedbu bioaugmentacije aktivnog mulja, u ovom radu, korištena je bakterijska kultura *Pseudomonas putida*. Navedeni mikroorganizam je pohranjen u „Zbirci mikroorganizama Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije“ gdje se čuva u hladnjaku pri $+4$ °C. Za uzgoj bakterije priređen je hranjivi agar u Petrijevim zdjelicama koje su inkubirane pri 37 °C, 24-48 sati.

U svrhu identifikacije bakterijske kulture ispitana je enzimska aktivnost biokemijskim testovima; oksidaza, katalaza i nitrataza. Za određivanje roda i vrste bakterije korišten je API strip (eng. *Analytical profile index*) koji se sastoji iz više različitih biokemijskih testova temeljenih na enzimatskoj aktivnosti kulture mikroorganizma. Čista bakterijska kultura inokulirana je na propisani način u za to predviđene jažice stripa. Tako pripremljen strip inkubiran je u termostatu pri 37 °C tijekom 18-24 sati. Očitavanje rezultata provedeno je uz pomoć dopunskih reagensa i tablice s rezultatima.⁶⁶

3.3.4. Proces biorazgradnje

Provedena je više pokusa (P1-P3) pri čemu je korištena farmaceutska otpadna voda početne koncentracije onečišćujućih tvari, izraženih preko KPK-vrijednosti, $S_0 = 4949,6 \text{ mg L}^{-1}$. Pokusi P1-1, P2-1 i P3-1 su provedeni pomoću aktivnog mulja (AM), a P1-2, P2-2 i P3-2 bioaugmentiranim aktivnoim muljem sa suspenzijom izolirane bakterijske kulture *Pseudomonas putida* (BAM). Početne koncentracije aktivnog mulja navedene su u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Početne vrijednosti koncentracija aktivnog i bioaugmentiranog aktivnog mulja u pokusima od P1-1 do P3-2.

Pokus #	AM			BAM		
	P1-1	P2-1	P3-1	P1-2	P2-2	P3-2
$X_0 / \text{g L}^{-1}$	3,79	4,51	5,82	3,72	4,80	5,84

Svi pokusi su provedeni u Erlenmeyerovim tikvicama od 1 L na rotacijskoj termostatiranoj tresilici s brzinom vrtnje od 160 min^{-1} i temperaturi od $23 \pm 1^\circ\text{C}$ tijekom 36 sati (slika 3.1.).



Slika 3.1. Rotacijska termostatirana tresilica.

U pokusima P1-P3 Erlenmeyerove tikvice sadržavale su 17,0; 20,5; i 25,0 g pripremljenog aktivnog mulja i 491 mL otpadne vode te po 9 mL suspenzije *P. putida* početne optičke gustoće 0,2. Tijekom pokusa u uzorcima su praćeni: pH-vrijednost, koncentracija otopljenog kisika (DO), kemijska potrošnja kisika, suspendirana tvar, organski udio u suspendiranoj tvari. Mikroskopskom analizom praćena je kakvoća aktivnog mulja. Uzorci su analizirani tijekom 36 sati. Dobivene vrijednosti su izražene uz srednje kvadratno odstupanje:

$$SD = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_e - y_i)^2} \quad (3.1.)$$

gdje su y_e i y_t eksperimentalne i teorijski izračunate vrijednosti određene zavisne varijable y , a n broj eksperimentalnih točaka.

3.3.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Kemijska potrošnja kisika, KPK, je pokazatelj ukupnog organskog opterećenja u uzorku otpadne vode. Postupak određivanja vrijednosti KPK se temelji na principu oksidacije organskih tvari u uzorku s kalijevim bikromatom u sumporno kiselom mediju uz srebrov sulfat kao katalizator. Analiza se provodi u zatvorenim kivetama kuhanjem 2 sata u bloku za digestiju pri temperaturi 150 °C, a količina utrošenog kalijevog bikromata mjeri se spektrofotometrijski pri $\lambda = 670$ nm. KPK vrijednost se izražava kao ekvivalent kisika koji je proporcionalan utrošku kalijevog bikromata.⁶⁷

3.3.6. Određivanje suspendirane tvari

Suspendirana tvar predstavlja mješavinu suspenzije aktivnog mulja i otpadne vode. Određivana je standardnom metodom.⁶⁷ Ukupna suspendirana tvar (X) određivana je filtriranjem 5 mL uzorka kroz membranski filtar veličina pora 0,45 μm te sušenjem u sušioniku pri 105 °C do konstantne mase. Spaljivanjem i žarenjem suhe tvari pri 550 °C, 2 sata određuje se ukupna anorganska tvar. Razlika ukupne suspendirane i anorganske tvari daje organski udio u suspendiranoj tvari (X_v).

3.3.7. Određivanje toksičnosti farmaceutske otpadne vode

U uzorku otpadne vode proveden je test toksičnosti pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Inhibicija bioluminiscencije izmjerena je nakon inkubacije od 30 min prema standardnoj metodi EN ISO 11348-3, 1998.⁶⁸ Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari. Kao mjera fiziološke aktivnosti koristi se prirodno svojstvo luminiscencije ove vrste bakterija. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 min. Instrument očitava dva rezultata efektivne koncentracije: EC_{20} i EC_{50} koji predstavljaju volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20 %-tnog i 50 %-tnog pada luminiscencije. Indeks utjecaja toksičnosti (TII) se izračunava prema

jednadžbi $TII_{50} = 100 \times (EC_{50})^{-1}$. Prema definiranoj skali, uzorci su klasificirani kao ‘netoksični’ (0, NT), ‘blago toksični’ (<1, BT), ‘toksični’ (1–10, T), ‘vrlo toksični’ (11–100., VT), i ‘ekstremno toksični’ (>100, ET).⁶⁹

3.3.8. Određivanje aktivnosti aktivnog mulja

Određivanje aktivnost aktivnog mulja provodi se respiracijskim testovima.⁶² U Winkler bocu od 300 mL doda prethodno aerirani uzorak aktivnog mulja, uroni se kisikova elektroda i otvor boce se dodatno zatvara parafilmom te se mjeri koncentracija kisika kroz 15 minuta. Na temelju smanjenja koncentracije kisika u vremenu dobiva se pravac iz čijeg se nagiba izračuna brzina potrošnje kisika, OUR izražen u $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$.^{70,71} Aktivnost aktivnog mulja određivana je na kraju procesa biorazgradnje sa i bez dodatka supstrata. Kao supstrat korištena je farmaceutska otpadna voda koncentracije $S_0 = 183 \text{ mg L}^{-1}$.

3.3.9. Mikroskopska analiza aktivnog mulja

Morfološke karakteristike uzoraka suspenzija aktivnog mulja i bioaugmentiranog aktivnog mulja određivane su mikroskopskom analizom.



Slika 3.2. Svjetlosni mikroskop sa ugrađenom kamerom.

Uzorci su uzimani svakodnevno i odmah pregledavani pomoću mikroskopa (slika 3.2.). Vlažni preparat pripremljen je nanošenjem kapljice uzorka suspenzije sterilnom pipetom na predmetnicu. Preparat je pokriven pokrovnicom i promatran pod mikroskopom pri povećanjima od 100 i 400×. Snimane su mikroskopske fotografije, tzv. mikrofotografije u prolaznoj svjetlosti. Fotografiran je reprezentativni uzorak pomoću mikroskopa opremljenog kamerom te su uočene značajne karakteristike aktivnog mulja.

3.4. OBRADA PODATAKA

Proces biosorpcije opisan je Langmuirovim modelom (jednadžba 2.2.). Vrijednosti parametara modela procijenjeni su linearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata u MS Office Excel programu. Na temelju eksperimentalnih podataka, u procesu biorazgradnje, procijenjeni su kinetički parametri modela Endo-Haldaneovog modela. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom primjenom simpleksne metode i metode najmanjih kvadrata sadržane u programskom paketu Scientist.⁷² Rezultati dobiveni simulacijom pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih podataka i vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s rezultatima pokusa.

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

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (3.2.)$$

gdje su s_1^2 i s_2^2 varijance koje se uspoređuju. Test se provodi uz pretpostavku da je s_1^2 manje od s_2^2 , čime se dobiva vrijednost F-testa u rasponu između 0 i 1. Približno ista vrijednost varijanci rezultira vrijednostima F bližim 1 i ukazuje na valjanost nulte hipoteze.⁶⁵

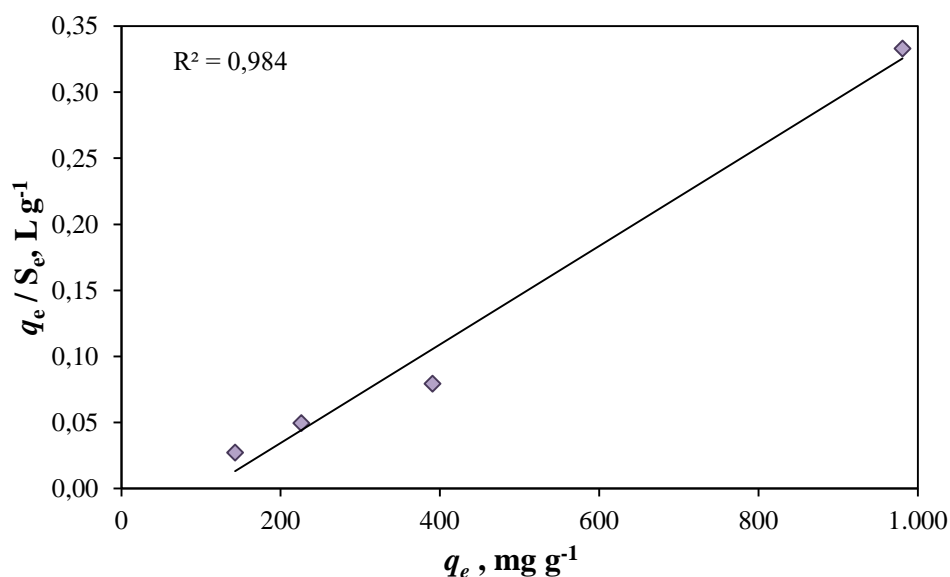
4. REZULTATI

4.1. PROCES BIOSORPCIJE

Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.2. provedena je biosorpcija farmaceutske otpadne vode s aktivnim muljem. Rezultati su prikazani tablicama 4.1.-4.2. te slikom 4.1.

Tablica 4.1. Rezultati procesa biosorpcije farmaceutske otpadne vode s aktivnim muljem.

Pokus	$X_0 / \text{g L}^{-1}$	$S_e / \text{mg L}^{-1}$	$q_e / \text{mg g}^{-1}$
X1	2,11	3343,3	1113,0
X2	2,59	4408,7	394,1
X3	4,13	4478,9	220,7
X4	5,62	4780,8	129,8



Slika 4.1. Grafički prikaz linearnog oblika Langmuirove izoterme u procesu biosorpcije za $S_0 = 5413 \text{ mg L}^{-1}$ pri temperaturi, $T = 22,4 \pm 0,8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 4.2. Vrijednosti konstanti Langmuirove izoterme u pokusima biosorpcije farmaceutske otpadne vode s aktivnim muljem.

$K_L \cdot 10^3 / \text{L g}^{-1}$	$q_{\max} / \text{mg g}^{-1}$	R^2
0,40	100,25	0,984

4.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE *Pseudomonas putida*

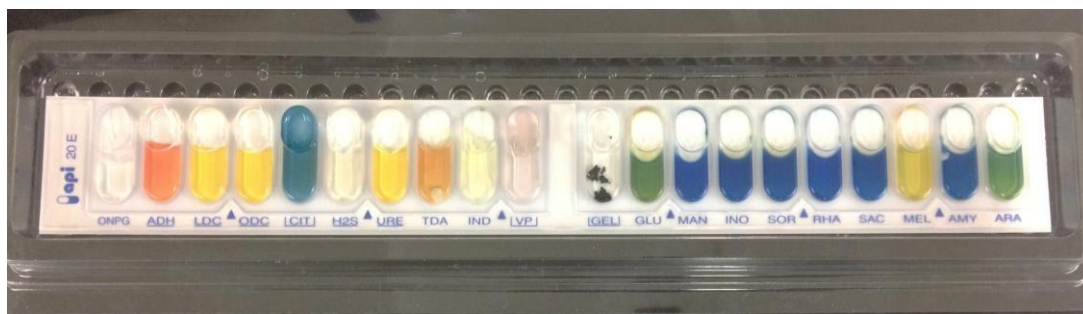
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.3. provedena je identifikacija bakterijske kulture *Pseudomonas putide*. Rezultati su prikazani slikama 4.2. i 4.3. te tablicom 4.3.



Slika 4.2. Fotografiska snimka izrasle bakterijske kulture *Pseudomonas putida* na hranjivom agaru dobivene tehnikom iscrpljivanja pri 37 °C tijekom 24–48 h.

Tablica 4.3. Rezultati provedenih biokemijskih testova za bakterijsku kulturu *Pseudomonas putidu*.

<i>Oksidaza</i>	<i>Katalaza</i>	<i>Nitrataza</i>	<i>KOH</i>
+	+	-	+



Slika 4.3. Fotografiska snimka API 20E stripa nakon 24–48 sata inkubacije za bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* pri 37°C.

4.3. PROCES BIORAZGRADNJE

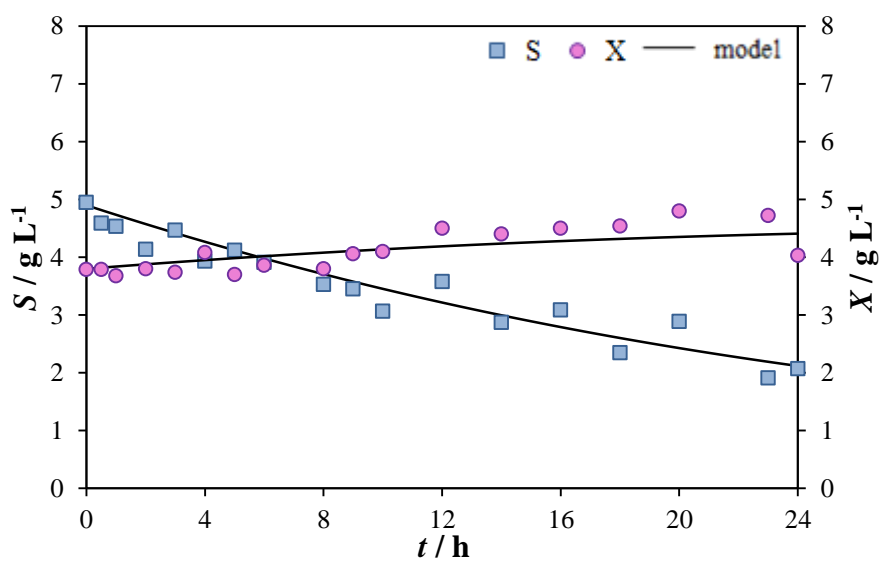
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.4.-3.2.7. provedena je bioremedijacija farmaceutске otpadne vode pomoću aktivnog mulja i bioaugmentiranog aktivnog mulja s bakterijskom kulturom *Pseudomonas putida*. Rezultati pokusa prikazani su tablicama 4.4. i 4.5. te slikama 4.4.- 4.12.

Tablica 4.4. Rezultati pokusa bioremedijacije farmaceutске otpadne vode.

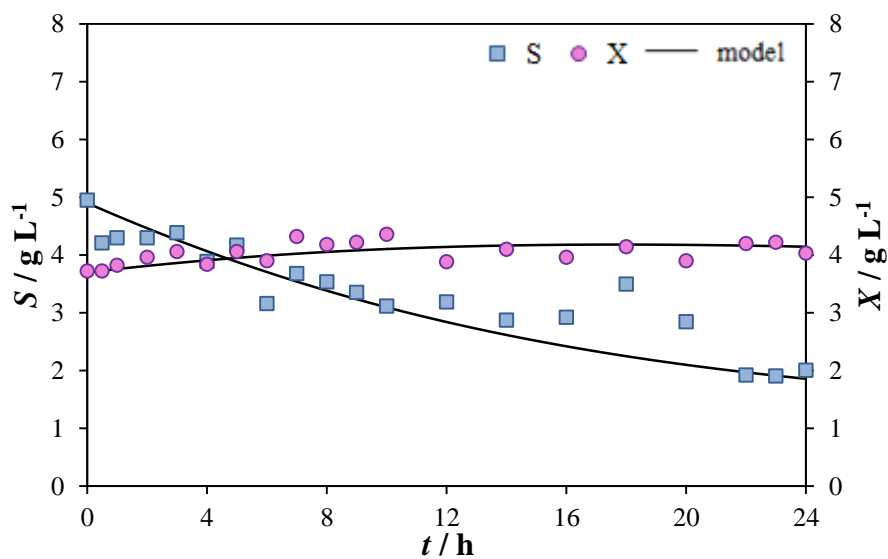
Pokus #	AM	BAM	AM	BAM	AM	BAM
	P1-1	P1-2	P2-1	P2-2	P3-1	P3-2
DO / mg L ⁻¹	2,63	1,68	1,80	1,36	1,28	1,29
	± 1,14	± 0,76	± 1,55	± 1,43	± 1,36	± 1,46
pH / -	7,55	7,50	7,50	7,53	7,47	7,55
	± 0,14	± 0,19	± 0,14	± 0,18	± 0,13	± 0,11
ΔX / %	9,11	10,70	12,26	10,45	8,92	12,18
	± 0,38	± 0,20	± 0,26	± 0,32	± 0,33	± 0,31
X _v / X	0,91	0,90	0,98	0,98	0,93	0,93
	± 0,09	± 0,05	± 0,05	± 0,05	± 0,03	± 0,04

Tablica 4.5. Biokinetički parametri Endo-Haldaneovog modela.

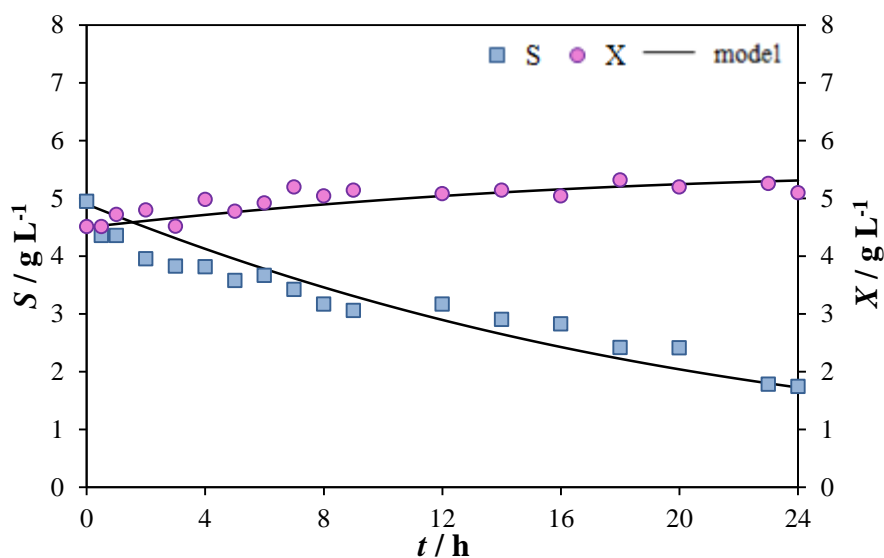
Pokus	AM	BAM
$\mu_{\max} / \text{h}^{-1}$	0,34±0,05	0,44±0,09
$K_S / \text{g L}^{-1}$	113,23±7,21	65,53±5,15
$Y / \text{g g}^{-1}$	0,30±0,02	0,45±0,03
$K_i / \text{g L}^{-1}$	157,91±8,96	143,63±4,06
$k_d \cdot 10^2 / \text{h}^{-1}$	0,0016±0,0002	0,0071±0,0027
$F - \text{test}$	0,69±0,25	0,67±0,23



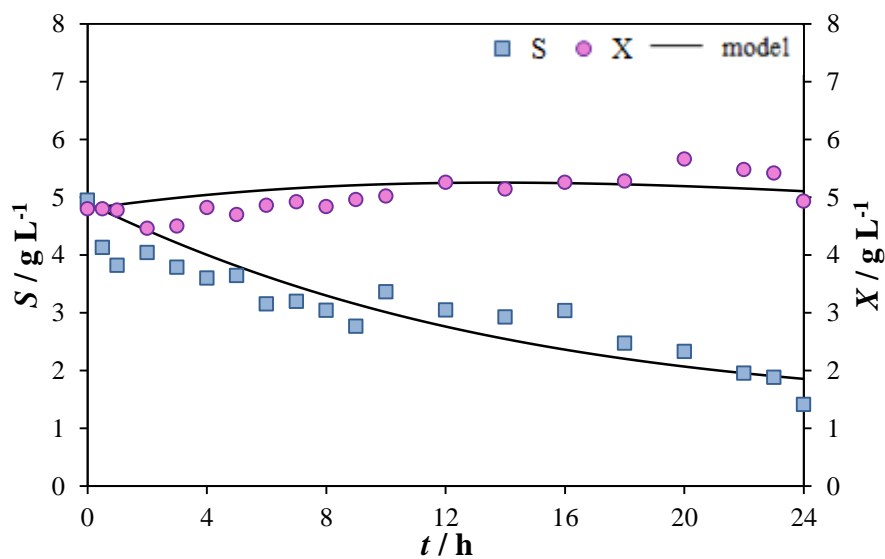
Slika 4.4. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i aktivnog mulja za $X_o = 3,8 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P1-1. Usporedba rezultata pokusa i modela.



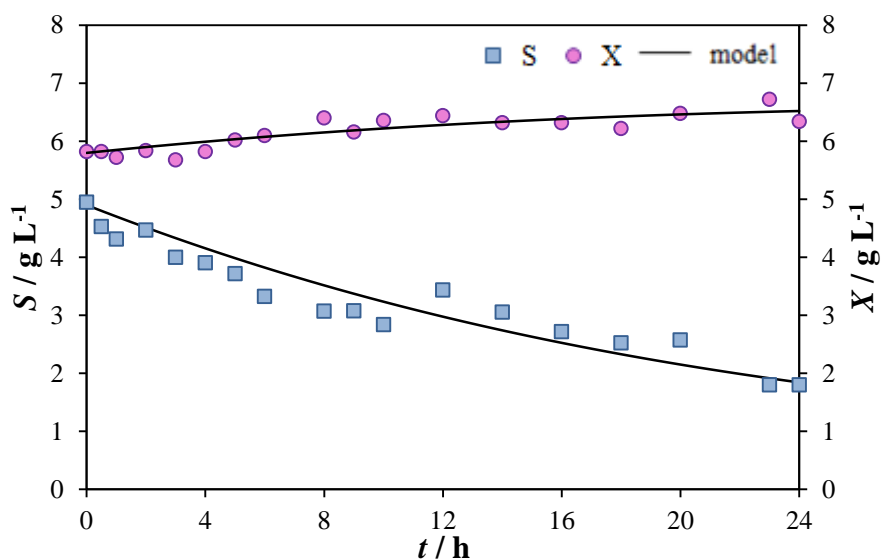
Slika 4.5. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i bioaugmentiranog aktivnog mulja za $X_o = 3,7 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P1-2. Usporedba rezultata pokusa i modela.



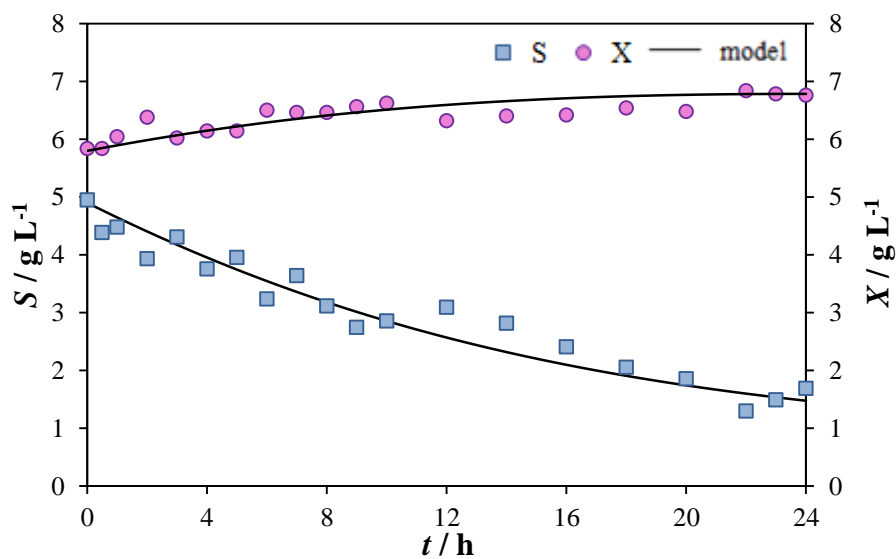
Slika 4.6. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i aktivnog mulja za $X_o = 4,5 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P2-1. Usporedba rezultata pokusa i modela.



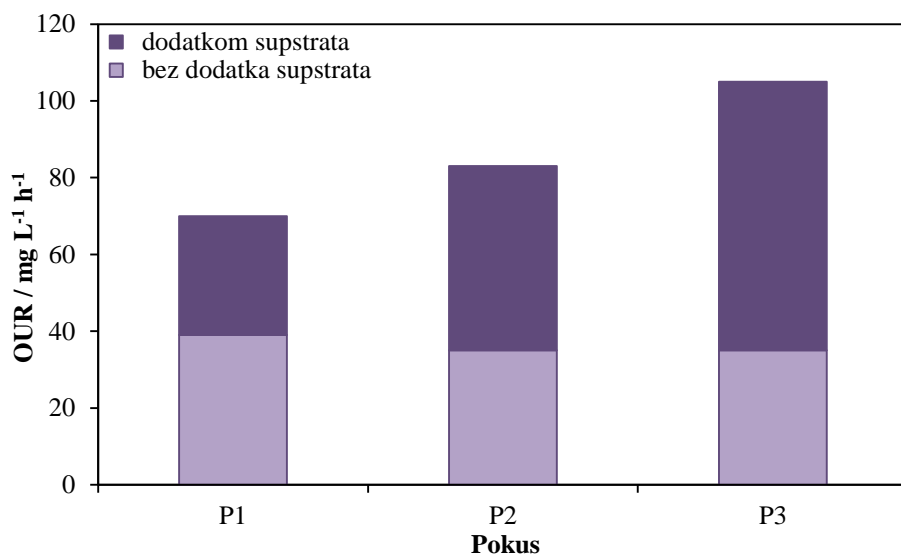
Slika 4.7. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i bioaugmentiranog aktivnog mulja za $X_o = 4,8 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P2-2. Usporedba rezultata pokusa i modela.



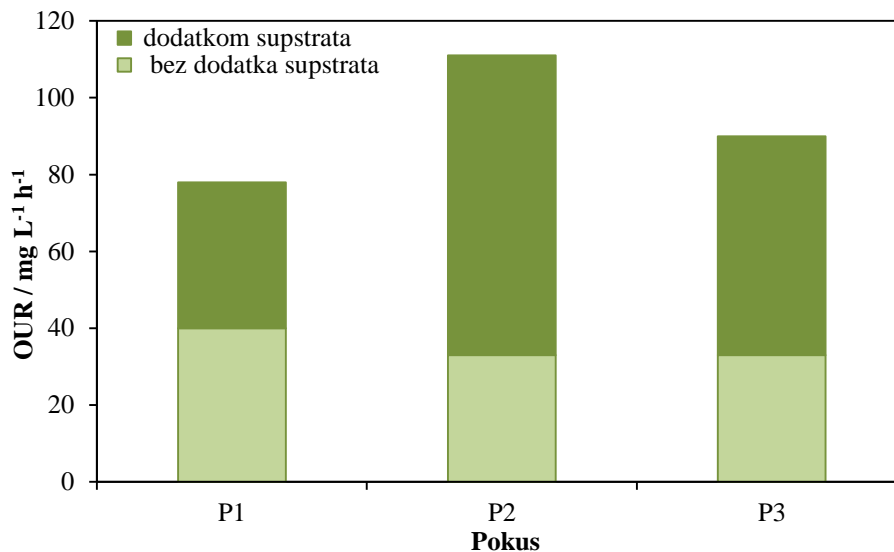
Slika 4.8. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i aktivnog mulja za $X_o = 5,8 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P3-1. Usporedba rezultata pokusa i modela.



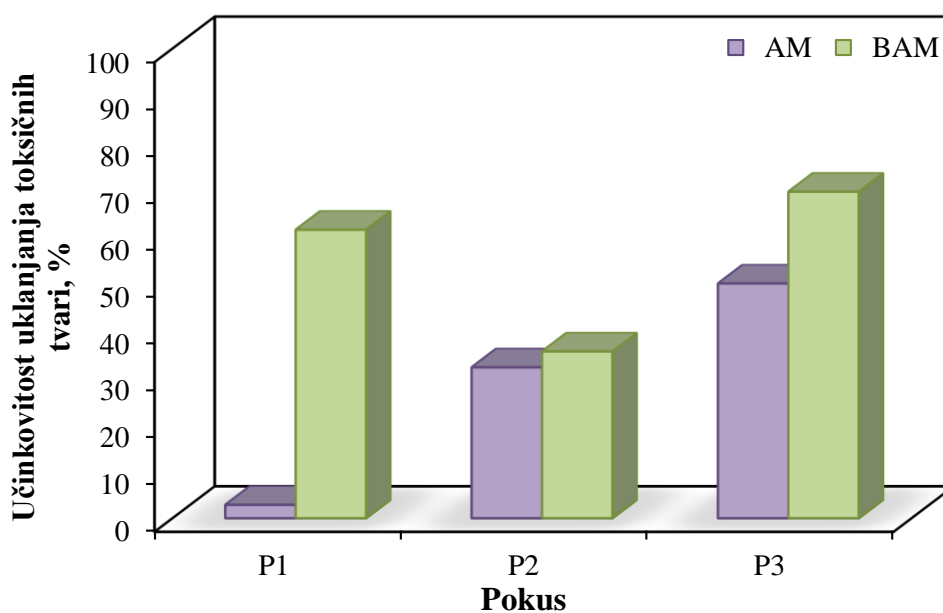
Slika 4.9. Grafički prikaz promjene koncentracije supstrata i bioaugmentiranog aktivnog mulja za $X_o = 5,8 \text{ g L}^{-1}$, $S_o = 4,9 \text{ g L}^{-1}$ u P3-2. Usporedba rezultata pokusa i modela.



Slika 4.10. Grafički prikaz brzine potrošnje kisika u 24. satu za provedene pokuse u procesu biorazgradnje s aktivnim muljem.



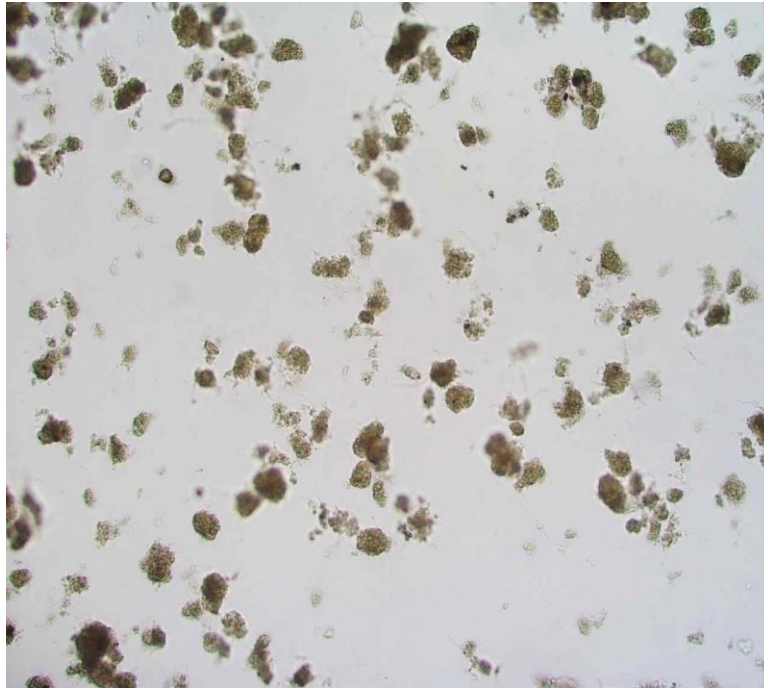
Slika 4.11. Grafički prikaz brzine potrošnje kisika u 24. satu za provedene pokuse u procesu biorazgradnje s bioaugmentiranim aktivnim muljem.



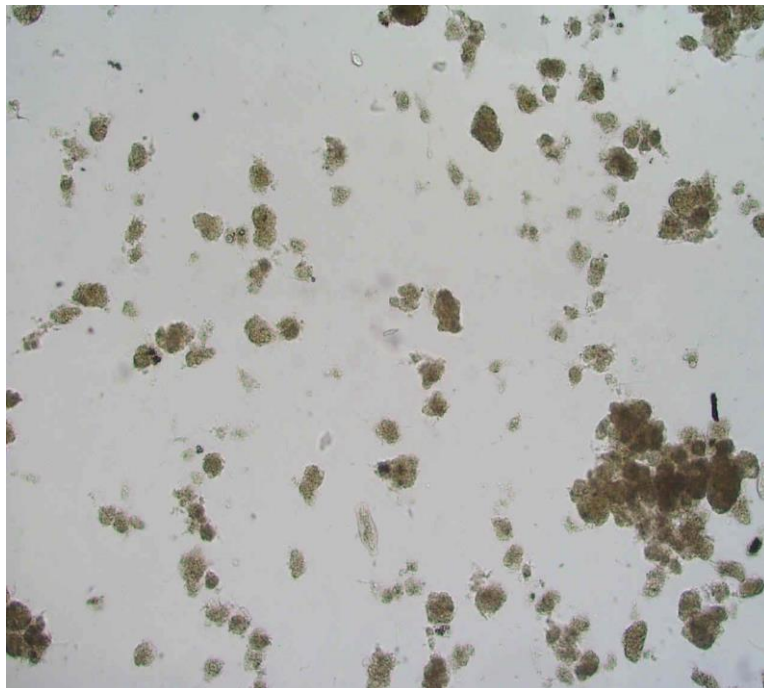
Slika 4.12. Grafički prikaz učinkovitosti uklanjanja toksičnih tvari u 24. satu.

4.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA

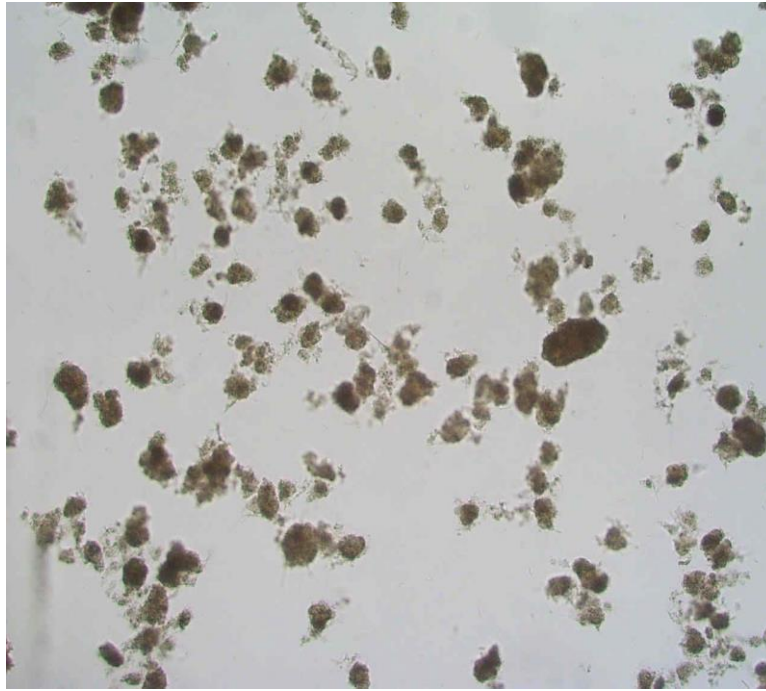
Postupkom opisanim u poglavlju 3.2.9. provedena je mikrobiološka analiza aktivnog muja i aktivnog mulja bioaugmentiranog bakterijskom kulturom *Pseudomonas putidom*. Rezultati su prikazani slikama 4.13.- 4.16.



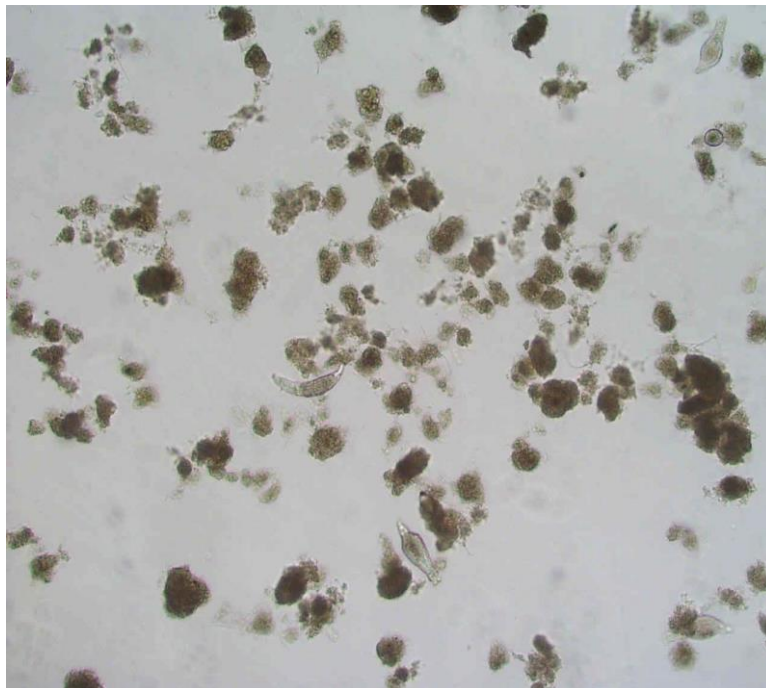
Slika 4.13. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja na početku provedbe procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode, P = 100× u P1-1.



Slika 4.14. Mikrofotografija pahuljica bioaugmentiranog aktivnog mulja na početku provedbe procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode, P = 100× u P1-2.



Slika 4.15. Mikrofotografija aktivnog mulja u 24. satu provedbe procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode, P = 100× u P1-1.



Slika 4.16. Mikrofotografija bioaugmentiranog aktivnog mulja u 24. satu provedbe procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode, P = 100× u P1-2.

5. RASPRAVA

Zbog sve bržeg razvoja farmaceutske industrije i rasta proizvodnje farmaceutika javlja se potreba izbora odgovarajućeg postupka pri obradi otpadnih tokova poštivajući načela zaštite okoliša. Farmaceutska otpadna voda predstavlja potencijalni problem za okoliš zbog sadržaja neizreagiranih reaktanata, intermedijera te farmaceutskih djelatnih tvari. Bioremedijacija se sve češće primjenjuje u obradi otpadnih voda. Učinkovitost procesa³⁻¹⁰ uvelike ovisi o mikroorganizmima čiji enzimi mogu prevesti onečišćujuće tvari u bezopasne ili manje štetne produkte.¹²⁻¹⁴ Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju za bioaugmentiranje moraju biti aktivni, kompatibilni i otporni na određenu vrstu onečišćenja.

5.1. PROCES BIOSORPCIJE

Tablicom 4.1. prikazani su rezultati procesa biosorpcije farmaceutske otpadne vode s aktivnim muljem različitih početnih koncentracija. Vidljivo je kako se povećanjem početnih koncentracija aktivnog mulja od $2,11 \text{ g L}^{-1}$ do $5,62 \text{ g L}^{-1}$ povećavaju vrijednosti ravnotežne koncentracije supstrata od $3343,0 \text{ mg L}^{-1}$ do $4780,0 \text{ mg L}^{-1}$. Ravnotežni kapacitet biosorpcije, q_e , ovisi o koncentracijama supstrata i aktivnog mulja.⁷³ Prema jednadžbi 2.1. izračunata je vrijednost ravnotežnog kapaciteta biosorpcije koji se kretao u rangu od $129,8 \text{ mg g}^{-1}$ do $1113,0 \text{ mg g}^{-1}$. Povećanjem koncentracije aktivnog mulja vrijednosti q_e se smanjuju jer se smanjuje i količina sorbirane tvari po jedinici mase sorbensa odnosno aktivnog mulja. S obzirom na to da je aktivni mulj suspendiran u otpadnoj vodi, pretpostavlja se da u miješanim uvjetima interakcijom uslijed sudara čestica aktivnog mulja dolazi do desorpcije što utječe na smanjenje učinkovitosti procesa.

Slika 4.1. prikazuje linearni oblik Langmuirove izoterme (jednadžba 2.5.) u procesu biosorpcije. Lineariziranjem jednadžbe 2.2. dobiva se jednadžba pravca iz kojeg se izračunavaju Langmuirove konstante K_L i q_m . U tablici 4.2. prikazane su vrijednosti konstanti Langmuirove izoterme u pokusu biosorpcije. Vrijednost K_L ukazuje na afinitet sorbensa prema sorbatu i što je ona veća, veći je i biosorpcijski kapacitet, dok q_m predstavlja maksimalni biosorpcijski kapacitet.^{64,74} Dobivene vrijednosti K_L i q_m iznose $0,40 \cdot 10^{-3} \text{ L g}^{-1}$ i $100,25 \text{ mg g}^{-1}$ niže su od vrijednosti

dobivenih prema literaturi za aktivni mulj.⁶² Farmaceutska otpadna voda kompleksan je sustav s različitim vrstama onečišćujućih tvari koje se različito vežu na površinu aktivnog mulja što može rezultirati smanjenim biosorpcijskim kapacitet aktivnog mulja. Proces biosorpcije može se opisati Langmuirovim modelom što pokazuje vrijednost R^2 koja iznosi 0,984.

5.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKE KULTURE *Pseudomonas putida*

Primjenom tehnike iscrpljivanja te inkuacijom na 37 °C, 24-48 h dobivene su zasebne i čiste kolonije ispitivane bakterijske kulture prikazane slikom 4.2. Tako pročišćena kultura dalje je korištena za provođenje biokemijskih testova. Tablicom 4.2. prikazani su rezultati provedenih testova koji ukazuju na prisutnost enzima oksidaze, katalaze i nitrataze u istraživanom mikroorganizmu dok je potvrđan rezultat testa s kalijevim hidroksidom pokazatelj kako je bakterija gram negativna. Općenito je zajednička karakteristika gram negativnih bakterija tanka stanična stijenka koja se sastoji od 5-12 % peptidoglikana, a s vanjske strane je obavijena lipopolisaharidnim slojem. Rezultatom se potvrdilo kako se radi o ranije navedenoj bakterijskoj kulturi za koju je poznato kako je ona gram negativna.^{53,56}

Rod i vrsta ispitivane bakterijske kulture potvrđeni su API 20E stripom koji je prilagođen gram negativnim bakterijama. Metoda se temelji na određivanju prisutnosti ili odsutnosti različitih enzima na temelju reakcija sa prisutnim specifičnim supstratima. Nakon inkubacije, na temelju promjene obojenja i dodatka dopunskih reagensa, određuje se da li je došlo do razgradnje supstrata ili nastanka specifičnih produkata metabolizma. Prema slici 4.3. vidljive su značajnije promjene obojenja određenih jažica stripa te je utvrđeno kako ispitivana bakterijska kultura koristi trinatrijev citrat i šećer D-melibiozu kao supstrat. Negativni rezultati testova ureaze i indola ukazuju na odsustvo enzima ureaze i triptofanaze za razgradnju aminokiseline triptofan do indola. Dobiveni rezultati API 20E stripa pokazuju da se radi o bakterijskoj kulturi *Pseudomonas putida*^{53,56} te su vrsta i rod potvrđeni s visokom vjerojatnošću od 96,7 %.

5.3. PROCES BIORAZGRADNJE

Bioremedijacija farmaceutске otpadne vode provedena je s aktivnim i bioaugmentiranim aktivnim muljem s bakterijskom kulturom *Pseudomonas putida*, različitih početnih koncentracija kao što je prikazano u tablici 3.1.

Rezultati procesa biorazgradnje navedeni su u tablici 4.4. Koncentracija otopljenoga kisika, DO, ukazuje na aktivnost mikroorganizama jer trošeći kisik razgrađuju prisutne onečišćujuće tvari.⁴¹ U sva tri pokusa, najniža razina otopljenog kisika postignuta je u pokusu P3. Vrijednosti koncentracije kisika su približno jednake i za aktivni i i bioaugmentirani aktivni mulj i iznosile su oko 1,3 mg O₂ L⁻¹. U pokusima P1-2 i P2-2 uočene su niže vrijednosti koncentracije otopljenog kisika u odnosu na pokuse s aktivnim muljem, P1-1 i P2-1. Nadalje, bakterijska kultura *Pseudomonas putida* prema zahtjevima za kisikom spada u striktne aerobe⁷⁵. Osim kisika, na razvoj bakterija utječe i pH-vrijednost. Prosječna vrijednost u sva tri pokusa je bila konstantna, a iznosila je 7,5 što je u neutralnom području koje je optimalno područje za rast bakterija koje i čine oko 95 % aktivnoga mulja.^{37,41} Prirast biomase, bio je veći kod bioaugmentiranog mulja što se, u pokusu P1, slaže s nižom koncentracijom otopljenog kisika nego u aktivnom mulju, a u pokusu P3 s najvećom postignutom učinkovitošću uklanjanja koncentracije supstrata. Srednja vrijednost prirasta iznosila je oko 10,6 %. Sadržaj organskog udjela u ukupnoj suspendiranoj tvari u svim pokusima je veći od 0,9 što ukazuje na stabilnost aktivnog mulja odnosno da se udio biomase održavao tijekom pokusa te da se udio anorganske tvari nije značajno povećavao.⁴¹

Iz Endo-Haldaneove jednadžbe (2.9.) izračunate su vrijednosti biokinetičkih parametara (Tablica 4.5.) koje su korištene za simulaciju procesa bioremedijacije farmaceutске otpadne vode u šaržnom reaktoru (slike 4.4.-4.9.). Vrijednosti parametara za μ_{\max} i Y približne su vrijednostima koje odgovaraju literaturnim podacima.¹⁰ Maksimalna specifična brzina rasta biomase, μ_{\max} , iznosi 0,44 h⁻¹ što je za 0,10 h⁻¹ veća vrijednost kod bioaugmentiranog mulja u odnosu na vrijednost od 0,34 h⁻¹ kod aktivnog mulja, kako je prikazano u tablici 4.5. Koeficijent iskorištenja, Y , jedan je od najvažnijih parametara koji se koristi u biološkim kinetičkim modelima i predstavlja koncentraciju biomase koja se proizvede po jedinici uklonjenog supstrata odnosno učinkovitost konverzije hranjivih tvari u stanični materijal. Viša koncentracija biomase zahtjeva veću potrošnju kisika pri razgradnji supstrata što

utječe na povećan prinos biomase, kao što se može uočiti na slikama 4.5., 4.7. i 4.9. Takav se trend dodatno može potkrijepiti i činjenicom da *Pseudomonas putida* zbog bogatog enzimskog sustava može preživjeti u okolišu u kojem obitavaju teško razgradiva onečišćenja, kao što je farmaceutska otpadna voda.^{53,55-59} Nadalje, da se proces biorazgradnje brže odvija u pokusima s bioaugmentiranim aktivnim muljem ukazuje veća vrijednost konstante odumiranja, k_d , što ujedno ukazuje na bržu izmjenu faza rasta mikroorganizama, kao i kraće vrijeme provedbe procesa biorazgradnje. Konstanta odumiranja, k_d , i koeficijent iskorištenja stanica, Y , ključni su za predviđanje proizvodnje viška aktivnog mulja.³⁵ Konstanta zasićenja supstratom, K_S , predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj specifična brzina rasta iznosi polovicu maksimalne specifične brzine rasta, $\mu=0,5\mu_{max}$.⁴¹ Konstanta K_S je ključni parametar koji pokazuje kompeticiju mikroorganizama u trošenju supstrata pri njenoj niskoj koncentraciji.⁷⁶ Prema jednadžbi 5.1. može se uočiti da specifična brzina rasta, μ , ovisi o koncentraciji supstrata, S , te konstanti zasićenja supstratom, K_S . Pri nižoj koncentraciji supstrata, S , brži je rast onih mikroorganizama koji imaju nižu vrijednost konstante zasićenja supstratom, K_S .⁷⁶ U tablici 4.3. uočava se vrijednost konstante K_S od 65,53 g L⁻¹ kod bioaugmentiranog aktivnog mulja što je za 47,70 g L⁻¹ niža vrijednost u odnosu na iznos konstante K_S kod aktivnog mulja. Vrijednost K_S kod bioaugmentiranog aktivnog mulja ukazuje na veći afinitet aktivnog mulja prema supstratu.⁴¹ Konstanta inhibicije, K_i , ukazuje da je u sustavu prisutna inhibicija, odnosno da je zbog mogućeg toksičnog utjecaja supstrata ili prisutnosti razgradnih produkata došlo do smanjenja rasta biomase odnosno do smanjenja aktivnosti enzima.⁴¹ Nešto viša vrijednost konstante inhibicije, K_i , od 14,28 g L⁻¹ uočava se kod aktivnog mulja.

Na slikama 4.4.-4.9. vidljivo je kako su eksperimentalni podaci opisani Endo-Haldaneovim modelom te se uočava se pad koncentracije supstrata te rast koncentracije biomase. Vrijednosti F-testa (jednadžba 3.2.), su prikazane u tablici 4.5. i za proces s aktivnim muljem iznose 0,69±0,25, a za proces s bioaugmentiranim aktivnim muljem 0,67±0,23. Vrijednosti F-testa nalaze se iznad 0,6 što je prema statistici prihvatljivo i na temelju čega se može ustanoviti kako odabrani model približno jednako opisuje kinetiku procesa u oba pokusa.⁷⁷

Promjena koncentracija supstrata i aktivnog mulja tijekom 24 sata prikazana je slikom 4.4. Početna koncentracija aktivnoga mulja u P1 bila je najniža u odnosu na provedene pokusa. U pokusu P1-1 početne vrijednosti biomase i supstrata iznosile su

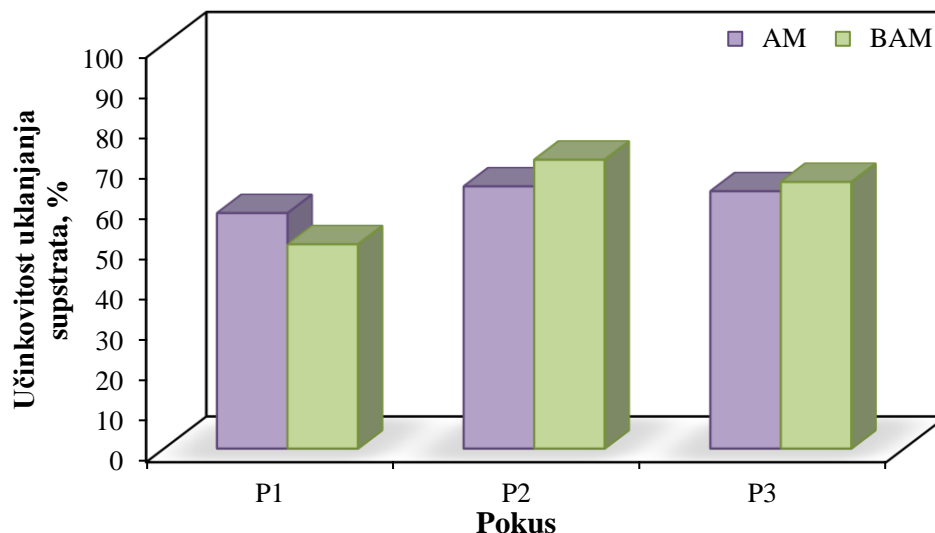
$X_0 = 3,8 \text{ g L}^{-1}$ i $S_0 = 4,9 \text{ g L}^{-1}$. Iz grafičkog prikaza je vidljivo kako se povećanjem koncentracije aktivnog mulja postepeno smanjivala koncentracija supstrata. U 20. satu postignuta je učinkovitost uklanjanja supstrata od 41,7 % i zabilježen je porast biomase za 26,6 % u odnosu na početnu koncentraciju aktivnog mulja.

U pokusu P1-2 aktivni mulj početne koncentracije $X_0 = 3,7 \text{ g L}^{-1}$ bioaugmentiran je suspenzijom bakterijske kulture *Pseudomonas putida*. U slici 4.5. vidljiv je veći pad koncentracije supstrata te je već u 16. satu postignuta učinkovitost u iznosu od 41,7 %. Porast biomase je u tom periodu bio značajno manji u odnosu na prethodni pokus te je iznosio svega 6,5 %.

Slikom 4.6. prikazan je tijek promjene koncentracije supstrata i biomase u pokusu P2-1. Početne vrijednosti iznosile su $X_0 = 4,5 \text{ g L}^{-1}$ i $S_0 = 4,9 \text{ g L}^{-1}$. Povećanjem početne koncentracije aktivnog mulja postignuto je ubrzanje procesa za 6 sati u odnosu na pokus P1-1. Pad koncentracije supstrata je i u ovom slučaju popraćen rastom biomase čiji je prirast na kraju procesa iznosio oko 13,1 %. Bioaugmentacijom aktivnog mulja, početne koncentracije $X_0 = 4,8 \text{ g L}^{-1}$ u pokusu P2-2, nakon 24. sata postignuta je visoka učinkovitost uklanjanja supstrata od 71,4 %. Brža razgradnja vidljiva je u slici 4.8., a prirast biomase se uz blage promjene održavao na 10,5 % tijekom cijelog procesa.

U pokusu P3-1 korištena je najveća početna koncentracija aktivnog mulja, $X_0 = 5,8 \text{ g L}^{-1}$ (slika 4.8.). Zabilježen je brži pad koncentracije supstrata uz porast koncentracije biomase u odnosu na pokuse P1-1 i P2-1. Samim time je vidljivo kako promjena početne koncentracije biomase utječe na brzinu i učinkovitost procesa biorazgradnje. U navedenom pokusu na kraju procesa postignuta učinkovitost od oko 63 %. Slika 4.9. pokazuje promjenu koncentracija supstrata i bioaugmentiranog aktivnog mulja u P3-2, za $X_0 = 5,8 \text{ g L}^{-1}$. Iz grafičkog prikaza vidljiv je sličan trend promjene koncentracije biomase i supstrata kao i u prethodnom pokusu s aktivnim muljem. Nakon 24. sata postignuta je učinkovitost bioremedijacije od oko 66 %.

Na temelju analize ukupne učinkovitosti procesa biorazgradnje može se vidjeti kako se početnom koncentracijom aktivnog mulja u P2 postiže najveća učinkovitost što je i vidljivo u slici 5.1. Također je vidljivo kako se učinkovitost u P2 i P3 dodatno povećava bioaugmentacijom. Bioaugmentacija se navodi kao obećavajuća zbog brojnih prednosti poput jednostavne primjene i mogućnosti mineralizacije i detoksikacije različitih onečišćujućih tvari.¹²



Slika 5.1. Učinkovitost procesa biorazgradnje u 24. satu.

Na kraju procesa biorazgradnje farmaceutске otpadne vode aktivnim muljem ispitana je njegova aktivnost nakon 24 sata provedbe pokusa. Slikama 4.10. i 4.11. dana je usporedba vrijednosti OUR samog aktivnog mulja te vrijednosti izmjerene uz dodatak supstrata kako je opisano u poglavlju 3.3.8. Vrijednosti OUR kretale su se u rasponu od 33 do 105 mg L⁻¹ h⁻¹ za aktivni mulj i od 35 do 111 mg L⁻¹ h⁻¹ za bioaugmentirani aktivni mulj. Manje vrijednosti, do 40 g L⁻¹ h⁻¹, su zabilježene kod aktivnog mulja iz obrade komunalnih otpadnih voda.⁷⁸ Aktivnost se uvelike razlikuje ovisno o vrsti i porijeklu aktivnog mulja.⁷⁸ Vrijednost OUR približno je jednaka u svim pokusima u 24. satu provedbe pokusa. U slici 4.10. može se primijetiti porast aktivnosti aktivnog mulja sukladno sa povećanjem njegove početne koncentracije. U provedenim pokusima najveća je aktivnost zabilježena u pokusu P2 s bioaugmentiranim aktivnim muljem.

Toksičnost farmaceutске otpadne vode ispitana je bakterijom *Vibrio fischeri*. Toksičnost se može definirati kao mjera kojom se određuje štetan utjecaj uslijed interakcije s ciljanom tvari. Dakle, ova metoda određivanja toksičnog utjecaja temelji se na mjerenju smanjenja prirodne luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* uslijed interakcije s toksičnim tvarima prisutnim u otpadnoj farmaceutskoj vodi. Prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7. iz dobivenih vrijednosti EC₅₀ računa se indeks utjecaja toksičnosti TII₅₀, prema izrazu danom u 3.2.7. Indeks, TII₅₀, se koristi kada se radi o uzorku nepoznatog sastava i izravno je proporcionalan s toksičnošću te upućuje na utjecaj otpadne vode na prirodne vode.⁶⁹ TII₅₀ vrijednost farmaceutске otpadne

vode na početku pokusa iznosila je 14,3 te se otpadna voda ubraja u vrlo toksičnu i kao takva se ne smije ispuštati u prirodne recipijente bez prethodne obrade.⁷⁹ Ova kategorizacija otpadne vode može se objasniti visokim opterećenjem organskom tvari, nastalim razgradnim metabolitima i međuproduktima aktivnih farmaceutskih tvari, što ujedno ovisi i o vrsti proizvodnog procesa, kao i upotrjebljenim sirovinama.²³ Uklanjanje toksičnih tvari moguća je bioremedijacijom s aktivnim, kao i bioaugmentiranim aktivnim muljem. Veća učinkovitost uklanjanja toksičnih tvari postignuta je u sva tri pokusa kod bioaugmentiranog aktivnog mulja, kao što je prikazano na slici 4.10. U pokusu P3 s bioaugmentiranim aktivnim muljem postiže se najveća učinkovitost od 70 %. Bioaugmentacijom aktivnog mulja bakterijskom kulturom *Pseudomonas putida* postiglo se i učinkovitije uklanjanje toksičnih tvari. Poznato je kako bakterijske kulture iz roda *Pseudomonas* mogu ukloniti toksične tvari poput fenola i kloriranih spojeva koji se također mogu naći u farmaceutskim otpadnim vodama.⁵⁰

5.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA

Mikroskopska analiza uzoraka aktivnog i bioaugmentiranog aktivnog mulja provodila se kako bi se pratio tijek procesa biorazgradnje i kakvoća aktivnoga mulja. Na početku pokusa pahuljice aktivnog mulja su bile relativno čvrste, kompaktne te pravilnog i zaobljenog oblika što prikazuju mikrofotografije prikazane na slikama 4.12. i 4.13. U 24. satu provedbe procesa bioremedijacije vidljiv je porast koncentracije aktivnog i bioaugmentiranog mulja što ukazuje povećanje gustoće pahuljica aktivnog mulja kako je prikazano u slikama 4.14. i 4.15. Bioaugmentacija ne utječe na izgled pahuljica aktivnog mulja, što je vidljivo na slikama 4.12. i 4.13. Utjecaj na oblik, veličinu i raspodjelu pahuljica imaju hidrodinamički uvjeti te dobra opskrbljenost sustava kisikom.¹⁰ Pahuljice aktivnog mulja se sastoje od velikog broja u više slojeva raspoređenih bakterija od kojih neke izlučuju ekstracelularnu polimernu tvar, EPS, koja pomaže pri bioflokulaciji, tj. stvaranju pahuljica aktivnog mulja, te tako omogućuje međusobno povezivanje mikroorganizama.⁴² Svojstvo izlučivanja EPS-a ima i korištena bakterijska kultura za bioaugmentaciju aktivnog mulja *Pseudomonas putida*.⁸⁰

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih ispitivanja bioremedijacije farmaceutske otpadne vode može se zaključiti sljedeće:

1. Početno opterećenje farmaceutske otpadne vode iznosilo je $4,9 \text{ g L}^{-1}$, a toksičnost iskazana preko TII_{50} iznosila je 14,3 prema čemu se takva otpadna voda svrstava u vrlo toksične otpadne vode.
2. Proces biosorpcije može se opisati Langmuirovim modelom što pokazuje vrijednost R^2 . Dobivene vrijednosti konstanti Langmuirovog modela, K_L i q_m , iznose $0,40 \cdot 10^{-3} \text{ L g}^{-1}$ i $100,25 \text{ mg g}^{-1}$.
3. Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* korištena je u postupku bioaugmentacije aktivnog mulja.
4. Endo-Haldaneov model korišten je za opis procesa biorazgradnje farmaceutske otpadne vode. Dobivene vrijednosti parametara ukazuju da bioaugmentirani mulj pokazuje veći afinitet prema supstratu u odnosu na aktivni mulj.
5. Najveća učinkovitost uklanjanja supstrata iznosila je 71,4 % u pokusu P2-2.
6. U 24. satu u procesu biorazgradnje vrijednost OUR koja ukazuje na aktivnost aktivnog mulja prosječno je iznosila $35,83 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ za sve provedene pokuse.
7. Sustav s bioaugmentiranim muljem pokazao se učinkovitiji u uklanjanju toksičnih tvari s vrijednošću od 70,0 %.
8. Mikroskopskom analizom mulja utvrđeno je da bioaugmentacija ne utječe na morfologiju pahuljica aktivnog mulja i bioaugmentiranog aktivnog mulja.
9. Bioremedijacijom se ubrzava proces biorazgradnje i povećava učinkovitost obrade otpadne vode što utječe na ekonomičnost procesa te daje doprinos u području zaštite okoliša.

7. POPIS SIMBOLA

k_d – konstanta odumiranja

K_i – konstanta inhibicije, g L^{-1}

K_L – Langmuirov biosorpcijski koeficijent, L g^{-1}

K_S – konstanta zasićenja supstratom, g L^{-1}

q_e – ravnotežna koncentracija sorbata na sorbensu, mg g^{-1}

q_m – maksimalna koncentracija sorbata na sorbensu, mg g^{-1}

R^2 – koeficijent korelacije

S – koncentracija supstrata, mg L^{-1}

S_0 – početna koncentracija supstrata, mg L^{-1}

S_e – ravnotežna koncentracija sorbata u otopini, mg L^{-1}

t – vrijeme, h

X – koncentracija aktivnog mulja, mg L^{-1}

X_v – koncentracija biomase, mg L^{-1}

Y – koeficijent iskorištenja, g g^{-1}

λ – valna duljina, nm

μ – specifična brzina rasta, d^{-1}

μ_{\max} – maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1}

Skraćenice:

AM – aktivni mulj

BAM – bioaugmentirani aktivni mulj

DO – koncentracija otopljenog kisika, mg L^{-1}

KPK – kemijska potrošnja kisika, g L^{-1}

OUR – brzina potrošnje kisika, $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$

TII – indeks utjecaja toksičnosti

8. LITERATURA

1. Samantaray, D., Mohapatra, S., *Microbial Bioremediation of Industrial Effluents, Microbial Biodegradation and Bioremediation*, Elsevier Inc., 2014., 325-340.
2. Mohan, G. R., Speth, T. F., Murray, D., Garland, J. L., *Municipal Wastewater: A Rediscovered Resource for Sustainable Water Reuse*, *Potable Water*. 30 (2014), 37–60.
3. Choukr-Allah, R., Ragab, R., Rodriguez-Clemente, R., *General conclusions. Integrated Water Resources Management in the Mediterranean Region, Dialogue Towards New Strategy*, Springer, 2012, 357-351.
4. Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., *Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature.*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (2011) 442–448.
5. Azuma, T., Mino, Y., *Environmental Analytical Chemistry Determination of Pharmaceutical Pollutants in River Environment by the SPE- LC-MS / MS Method: A Mini Review*, *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2 (2015) 1–5.
6. Zyoud, S. H., Zyoud, S. H., Al-Jabi, S. W., Sweileh, W. M., Awang, R., *Contribution of Arab countries to pharmaceutical wastewater literature: a bibliometric and comparative analysis of research output*, *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 28 (2016) 1-28.
7. Zrnčević, S., *Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije*, *Hrvatske vode*, 24 (2016) 119-136.
8. Doble, M., Kumar, A., *Pharmaceuticals, Biotreatment of Industrial Effluents*, Oxford, Elsevier, 2005., 217-224.
9. Gadipelly, C., Perez-Gonzalez, A., Yadav, D. G., Ortiz, I., Ibanez, R., Rathod, K. V., Marathe, V. K., *Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Tehnologies for Water Treatment and Reuse*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53 (2014) 1157-11592.
10. Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E., *Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode*, *Kemija u industriji*, 64 (5-6) (2015) 229–236.
11. Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemoller, M., Tobin, J., Morrissey, A., *Treatment options for Wastewater Effluents from Pharmaceutical Companies*, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (2011) 649-666.
12. Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., Amrane, A., *Bioaugmentation: Possible Solution in the Treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs)*, *Biochemical Engineering Journal*, 69 (2012) 75-86.
13. Zhou, J. L., Zhang, Z. L., Banks, E., Grover, D., Jiang, J. Q., *Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water*, *Journal of Hazardous Materials*, 166 (2009) 655–661.
14. Edition, S., *Contaminated Land and Bio-Remediation, Environmental Biotechnology: Theory and Application*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2011, 91-113.

15. Ma, F., Guo, J. bo, Zhao, L. jun, Chang, C. chi, Cui, D., Application of bioaugmentation to improve the activated sludge system into the contact oxidation system treating petrochemical wastewater, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 597–602.
16. Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C. C. R., Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes, *Biodegradation*, 22 (2011) 231–241.
17. Fomina, M., Gadd, G. M., Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, 160 (2014) 3–14.
18. Gulnaz, O., Kaya, A., Matyar, F., Arikan, B., Sorption of basic dyes from aqueous solution by activated sludge, *Journal of Hazardous Materials*, 108 (2004) 183–188.
19. Zakon o vodama, NN 153/09, 130/11.
20. Tušar B., Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen d.o.o., Zagreb, 2009. Str.51-69, 73-121.
21. Sharma, S. K., Sanghi, R., Wastewater reuse and management, *Wastewater Reuse and Management*, Springer, 2013, 127-164.
22. Viši, K., Problematika zbrinjavanja i pročišćavanja otpadnih voda - zakonski propisi, *Tekstil*, 64 (2015) 109–121.
23. Krümmerer, K., *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Germany, 2008., 35-44.
24. Diaz-Cruz, M. S., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D., Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 340-351.
25. Taggart, M. A., Cuthbert, R., Das, D., Sashikumar, C., Pain, D. J., Green, R. E., Feltrer, Y., Shultz, S., Cunningham, A. A., Meharg, A. A., Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines, *Environmental Pollution*, 147 (2007) 60-65.
26. Pery, A., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T. A., Garric, J., Fluoxetine Effects Assessment on the Life Cycle of Aquatic Invertebrates, *Chemosphere*, 73 (2008) 300-304.
27. Li, W. C., Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environmental Pollution*, 187 (2014) 193-201.
28. Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A. B., Pharmaceuticals as priority water contaminants, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92 (2016) 549-565.
29. Collivignarelli, M. C., Abba, A., Bertanza, G., Treatment of high strength pharmaceutical wastewaters in a Thermophilic Aerobic Membrane Reactor (TAMR), *Water research*, 63 (2014) 1–9.
30. Gerrity, D., Snyder, S., *Wastewater and Drinking Water Treatment Technologies in:* Straub, J. O., Hutchinson, T. H., *Human Pharmaceuticals in the Environment. Human -Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives*, 4 (2012) 17-48.
31. Qin, W., Song, Y., Dai, Y., Qiu, G., Ren, M., Zeng, P., Treatment of berberine hydrochloride pharmaceutical wastewater by O₃/UV/H₂O₂ advanced oxidation process, *Environmental Earth Science*, 73(2015), 4939–4946.

32. Sirtori, C., Zapata, A., Oller, I., Gernjak, W., Agu, A., Decontamination industrial pharmaceutical wastewater by combining solar photo-Fenton and biological treatment, *Water research*, 43 (2009) 661–668.
33. Baydum, V. P. A., Dantas, R. F., Teixeira, A., Pacheco, J. G. A., Silva, V. L., Pre-treatment of Propranolol Effluent by Advanced Oxidation Processes, 2012, 211–216.
34. Mascolo, G., Balest, L., Cassano, D., Laera, G., Lopez, A., Pollice, A., Salerno, C., Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment, *Bioresource Technology*, 101 (2010) 2585–2591.
35. Derin Orhon, F. G. B., Karahan, O., *Industrial Wastewater Treatment by Activated Sludge*, IWA Publishing, 2009.
36. Zakir Hossain Khan, M., Aerobic treatment of pharmaceutical wastewater in a biological reactor, *International Journal of Environmental Sciences*, 1 (2011) 1797–1805.
37. Pauli, W., Jax, K., Berger, S., Protozoa in Wastewater Treatment : Function and Importance, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2 (2001) 203–252.
38. Ecology, A. M., *Applied Microbial Ecology : Bioremediation in: Environmental Biotechnology: A Biosystems Approach*, Elsevier, 2010, 325-333.
39. Radjenović, J., Petrović, M., Barcelo, D. ,Analysis od Pharmaceuticals in Wastewater and Removal using a Membrane Bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 1365–1377.
40. De Cazes, M., Abejon, R., Belleville, M. P., S.-M. J., *Membrane Bioprocesses for Pharmaceutical Micropollutant Removal from Waters, Membranes (Basel)*, 4 (2014) 692–729.
41. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010., 281-289.
42. Yu, G. H., He, P. J., Shao, L. M., Lee, D. J., Enzyme activities in activated sludge flocs, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (2007) 605–612.
43. Singh, A., Kuhad, R. C., Ward, O. P., *Advances in Applied Bioremediation*, Springer, 2009, 1-16.
44. Amro, M. M., Factors affecting chemical remediation of oil contaminated water-wetted soil, *Chemical Engineering Technology*, 27 (2004) 890–894.
45. Maier, R. M., *Microorganisms and Organic Pollutants. Environmental Microbiology*, Elsevier Inc., 2009.
46. Karigar, C. S., Rao, S. S., Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review, *Enzyme Research*, 11 (2011) 1-11.
47. Dahal, G., Holcomb, J., Socci, D., Surfactant-Oxidation Co-Application for soil and groundwater Remediation, *Remediation Journal*, 26 (2011) 101–108.
48. Wen, D., Zhang, J., Xiong, R., Liu, R., Chen, L., Bioaugmentation with a pyridine-degrading bacterium in a membrane bioreactor treating pharmaceutical wastewater, *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25 (2013) 2265–2271.
49. Fischer, K., Majewsky, M., Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014) 6583–6597.

50. Semrany, S., Favier, L., Djelal, H., Taha, S., Amrane, A., Bioaugmentation: Possible Solution in the Treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochemical Engineering Journal*, 69 (2012) 75-86.
51. Rana, S. R., Singh, P., Kandari, V., Singh, R., Dobhal, R., Gupta, S., A review on characterization and bioremediation of pharmaceutical industries wastewater : an Indian perspective, *Applied water science*, 3 (2014) 1-12.
52. Gauthier, H., *Biodegradation of Pharmaceuticals by Microorganisms*, McGill University, 2008.
53. Guleria, A., Pradesh, H., Biodegradation of Pharmaceutical Waste , 4-Nitrophenol by *Pseudomonas Putida*, *Indian Journal of Research*, 3 (2014) 127–130.
54. Tsang, K.W., Ng, P., Ho, P.L., Chan, S., Tipoe, G., Leung, R., Sun, J., Ho, J.C., Ip, M.S., Lam, W.K., Effects of erythromycin on *Pseudomonas aeruginosa* adherence to collagen and morphology in vitro, *European Respiratory Journal*, 21 (2003) 401–406.
55. Whyte, L. G., Bourbonnière, L., Greer, C. W., Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993.
56. Singh, D., Fulekar, M. H., Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas putida* strain MHF 7109, *Clean - Soil, Air, Water*, 38 (2010) 781–786.
57. O Mahony, M.M., Dobson, A., Barnes, J.D., Singleton, I., The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere*, 63 (2006) 307–314.
58. Elmi, F., Lee, H. T., Huang, J. Y., Hsien, Y. C., Wang, Y. L., Chen, Y. J., Shaw, S. Y., Chen, C. J., Stereoselective Esterase from *Pseudomonas putida* IFO12996 Reveals α / β Hydrolase Folds for D- β -Acetylthioisobutyric Acid Synthesis, *Journal of Bacteriology*, 187 (2005) 8470–8476.
59. Ozaki, E., Sakimae, A., Numazawa, R., Cloning and Expression of *Pseudomonas putida* Esterase Gene in *Escherichia coli* and Its Use in Enzymatic Production of D- β -Acetylthioisobutyric Acid, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58 (1994) 1745–1746.
60. Chojnacka, K., Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications, *Environment International Journal*, 36 (2010) 299–307.
61. Paul Chen, J., Lie, D., Wang, L., Wu, S., Zhang, B., Dried waste activated sludge as biosorbents for metal removal: Adsorptive characterization and prevention of organic leaching, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 77 (2002) 657–662.
62. Aksu, Z., Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modelling, *Biochemical Engineering Journal*, 7 (2001) 79–84.
63. Yang, S. F., Lin, C. F., Yu-Chen Lin, A., Andy Hong, P. K., Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions, *Water Research*, 45 (2011) 3389–3397.
64. Dada, A. O., Olalekan, A. P., Olatunya, A. M., DADA, O., Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of

- Zn²⁺ Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk, IOSR Journal of Applied Chemistry, 3 (2012) 38–45.
65. Ćosić, I., Vuković, M., Gomzi, Z., Briški, F., Comparison of Various Kinetic Models for Batch Biodegradation of Leachate from Tobacco Waste Composting, Chemical Reviews, 63 (2012) 967-971.
66. Leboeffe, M. J., Pierce, B. E., Microbiology: Laboratory Theory and Application , Second Edition, Morton Publishing, United States of America, 2012., 39-42., 169-177., 237-267., 360-363.
67. APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. APHA, Washington DC, USA, 1995.
68. EN ISO 11348-3:1998, Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminiscent Bacteria Test) - Part 3: Method using freeze dried Bacteria.
69. Farre, M., Asperger, D., Kantiani, L., Gonzalez, S., Petrović, M., Barceló, D., Assessment of the Acute Toxicity of Triclosan and Methyl Triclosan in Wastewater based on the Bioluminescence Inhibition of *Vibrio fischeri*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390 (2008) 1999-2007.
70. Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., Merchuk, J. C., Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, Biochemical Engineering Journal, 49 (2010) 289–307.
71. Hagman, M., La, J., Jansen, C., Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants, Vatten, 63 (2007) 131–138.
72. Scientist Handbook, Micromath®, Salt Lake City, 1986–1995.
73. Zhang, X., Li, X., Zhang, Q., Peng, Q., Zhang, W., Gao, F., New insight into the biological treatment by activated sludge: The role of adsorption process, Bioresource Technology, 153 (2014) 160–164.
74. Limousin, G., Gaudet, J. P., Charlet, L., Szenknect, S., Barths, V., Krimissa, M., Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement, Applied Geochemistry 22 (2007) 249–275.
75. Azubuiké, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32 (2016) 1-18.
76. Arnaldos, M., Amerlinck, Y., Rehman, U., Maere, T., Van Hoey, S., Naessens, W., Nopens, I., From the Affinity Constant to the Half-Saturation Index: Understanding Conventional in Novel Wastewater Treatment Processes, Water Research, 70 (2015) 458-470.
77. Gusić, I., Statistika - Testiranje varijance i očekivanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2008./2009.
78. Hagman, M., La, J., Jansen, C., Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants, Vatten, 63 (2007) 131–138.
79. Gunes, E., H., Gunes, Y., Talunli, I., Toxicity evaluation of industrial and land base sources in a river basin, Desalination, 226 (2008) 348-356.
80. Ensley, B. D., Gibson, D. T., Laborde, A. L., Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain, Journal Bacteriology, 149 (1982) 948-954.

ŽIVOTOPIS

Nikolina Janton ██████ ■ ■ ██████ ██████ ■ ██████ Svoje srednjoškolsko obrazovanje stekla je u općoj gimnaziji „Tituš Brezovački“ u Zagrebu. Nakon polaganja ispita državne mature, u rujnu 2012. godine upisala je preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Završni rad „Biološko uklanjanje fenola iz otpadnih voda“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac obranila je 2015. godine te je na istoimenom fakultetu upisala diplomski studij. Sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera s usmenim priopćenjem rada pod nazivom „Izolacija i karakterizacija bakterijskih kultura prisutnih u otpadnoj vodi iz farmaceutske industrije“, Sajmu ideja s posterskim priopćenjem „Od masline do maslinovog ulja uz očuvanje okoliša“, sportsko-znanstvenom natjecanju Tehnologijada s usmenim priopćenjem „Bakterijska kultura *Aeromonas hydrophila* za potencijalno korištenje u bioremedijaciji farmaceutskih otpadnih voda“, Međunarodnom susretu studenata tehnologije u Novom Sadu s usmenim priopćenjem „Povećanje učinkovitosti obrade farmaceutske otpadne vode bioaugmentacijom“ te na 25. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera s posterskim priopćenjem „Biosorpcijski kapacitet aktivnog mulja iz postrojenja za obradu farmaceutskih otpadnih voda“. Kao student radila je u internom laboratoriju Zagrebačkih otpadnih voda - upravljanje i pogon te u Pliva Hrvatska d.o.o. na odjelu Fizikalne karakterizacije. U Zavodu za industrijsku ekologiju radila je kao demonstrator iz kolegija Mikrobiologija, Zaštita okoliša i Bioremedijacija. Dobitnica je Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017. u kategoriji individualni znanstveni i umjetnički rad pod nazivom „Potencijal izoliranih bakterijskih kultura u stvaranju aktivnog mulja za bioremedijaciju farmaceutske otpadne vode“ u suradnji s Martinom Miloložom pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac.