

# Rezistentnost bakterija na farmaceutike prisutne u otpadnim vodama

---

**Bujan, Maja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:149:311754>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Maja Bujan

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, srpanj 2024.

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

Kandidatkinja Maja Bujan

Predala je izrađen završni rad dana: 3. srpnja 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

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

dr. sc. Martina Miloloža, asistentica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

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

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije (zamjena)

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

Završni ispit održat će se dana: 8. srpnja 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
EKOINŽENJERSTVO

Maja Bujan

**Rezistentnost bakterija na farmaceutike  
prisutne u otpadnim vodama**

**ZAVRŠNI RAD**

**Mentorica:** izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

dr. sc. Martina Miloloža

izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović

Zagreb, srpanj 2024.

*Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić, na stručnim savjetima, izdvojenom vremenu te nesebičnoj pomoći tijekom pisanja rada.  
Neizmjereno hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, podršci i motivaciji tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Otpadne vode su korištene vode, onečišćene tvarima koje im mijenjaju fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Nastaju uporabom vode iz kućanstava i industrije ili se mogu onečistiti uslijed oborinskih padalina. Često se u otpadnim vodama nalaze i manje koncentracije farmaceutika. Farmaceutici su kemijski spojevi koji imaju važnu ulogu u liječenju ljudi i životinja, a koriste se i kao promotori rasta. Farmaceutici u otpadne vode dospijevaju većinom ispuštanjem iz farmaceutskih industrijskih postrojenja, bolnica, postrojenja za obradu otpadne vode te nepropisnim odlaganjem lijekova iz kućanstava. Osim štetnih utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje, farmaceutici u otpadnim vodama mogu pridonijeti stvaranju rezistentnosti bakterija. Uslijed prekomjernog korištenja antibiotika, bakterije su stvorile mehanizme rezistencije kojima se odupiru djelovanju antibiotika. U ovom završnom radu spominju se najčešće bakterije koje uzrokuju bolesti kod ljudi i životinja, a koje su stvorile rezistenciju na antibiotike za liječenje istih. Porastom rezistentnosti bakterija na farmaceutike, potrebno je pronaći alternativne lijekove koji će biti učinkovitiji, poput antimikrobnih peptida i bakteriofaga.

***Ključne riječi:*** otpadne vode, farmaceutici, rezistencija, bakterije, antimikrobni peptidi, bakteriofagi

## ABSTRACT

Wastewater is used water contaminated with substances that change its physical, chemical and biological properties. It arises from households and industry or become polluted due to precipitation. Smaller concentrations of pharmaceuticals are often found in wastewater. Pharmaceuticals are chemical compounds that play an important role in treating humans and animals, and they are also used as growth promoters. Pharmaceuticals enter wastewater mostly through discharge from pharmaceutical industrial plants, hospitals, wastewater treatment plants and improper disposal of household medications. This creates an increasing problem of harmful effects on the environment, human health, and bacterial resistance. Due to the excessive use of antibiotics, bacteria have developed resistance mechanisms to antibiotics used for their treatment. This final paper mentions the most common bacteria that cause diseases in humans and animals, and which have developed resistance to antibiotics used for their treatment. With the increase in bacterial resistance to pharmaceuticals, it is necessary to find alternative medicines that will be more effective, such as antimicrobial peptides and bacteriophages.

**Keywords:** wastewater, pharmaceuticals, resistance, bacteria, antimicrobial peptides, bacteriophages

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. Otpadne vode .....	2
2.2. Farmaceutici i farmaceutska industrija .....	3
3. Ekotoksičnost .....	6
3.1. Testni organizmi .....	7
4. PREGLEDNI DIO... ..	11
4.1. Antibiotici .....	11
4.2. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).....	12
4.3. Rezistencija na antibiotike... ..	13
4.3.1. Beta laktami .....	14
4.3.2. Fluorokinoloni.....	14
4.3.3. Aminoglikozidi .....	15
4.3.4. Sulfonamidi.....	15
4.3.5. Makrolidi.....	15
4.4. Bakterije.....	17
4.4.1. Gram-negativne bakterije.....	18
4.4.2. Gram-pozitivne bakterije .....	18
4.5. Bakterije i njihova rezistentnost.....	19
4.5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	19
4.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
4.5.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
4.5.4. <i>Legionella spp</i> .....	23
4.5.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
4.5.6. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	25
5. Razvoj novih farmaceutika .....	27
5.1. Antimikrobni peptidi (AMP).....	27
5.2. Bakteriofagi.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	29
7. LITERATURA... ..	30
8. ŽIVOTOPIS.....	38





# 1. UVOD

Onečišćenju voda doprinose intenzivan razvoj poljoprivrede i industrije, porast stanovništva i urbanizacija te ispuštanje otpadnih voda u okoliš bez njihovog prethodnog pročišćavanja. Voda se smatra onečišćenom ako je količina otpadnih tvari u njoj veća od količine propisane standardima o kvaliteti vode ili ako se zbog vrste prisutnih otpadnih tvari ne može koristiti za određenu namjenu.<sup>1</sup> Sastav otpadnih voda ovisi o vrsti ljudske djelatnosti za koju je voda korištena, stupnju razvoja društva, kulturi i navikama ljudi te brojnim drugim čimbenicima.<sup>2</sup> U otpadnim vodama, osim kemikalija, hranjivih i organskih tvari, teških metala, otopljenih plinova, čvrstih čestica te patogenih organizama, mogu se naći i farmaceutici. Farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju za liječenje bolesti ljudi i životinja. Iako su koncentracije farmaceutika koji dospijevaju u otpadne vode uglavnom niske (u  $\mu\text{gdm}^{-3}$  ili manje), raste zabrinutost zbog mogućeg dugoročnog utjecaja na zdravlje ljudi te kopnene i vodene ekosustave uslijed trajne izloženosti ovim spojevima.<sup>3</sup> Jedan od značajnijih primjera utjecaja farmaceutika na ekosustav je pojava sve učestalije bakterijske rezistencije na antibiotike, koja nastupa uslijed njihove prisutnosti u vodenom okolišu.<sup>4</sup> Najčešće korišteni farmaceutici su antibiotici, analgetici, regulatori masti, beta blokatori, terapijski lijekovi i steroidi. Antibiotike koristimo za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama. Učinkovitost novih i postojećih antibiotika stalno se kompromitira prijenosom postojećih mehanizama i izranjanjem novih mehanizama rezistencije.<sup>5</sup> Procjenjuje se da godišnje najmanje 700 000 ljudi u svijetu umre od infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama, a ako se trend nastavi procijenjeno je da bi do 2050. godine taj broj mogao narasti i na 10 milijuna godišnje.<sup>6</sup> Povećanje broja rezistentnih bakterija povezano je s prekomjernom upotrebom antibiotika u medicini, veterini, proizvodnji hrane i poljoprivredi, ali i s troškovima za ulaganje i razvoj novih antibiotika. Posljednje otkriće nove klase antibiotika koje je stiglo na tržište bilo je davne 1987. godine.<sup>7</sup> Potrebno je ulagati u istraživanja i razvoj novih farmaceutika. Antimikrobni peptidi i bakteriofagi se spominju u radu kao alternativna zamjena antibioticima za uspješnu borbu protiv rezistentnih bakterija. Cilj završnog rada je analizirati rezistenciju najčešćih bakterijskih patogena: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* te podići svijest o važnosti odgovornog korištenja i zbrinjavanja farmaceutika u svrhu očuvanja okoliša, zdravlja ljudi i smanjenja rezistentnosti bakterija.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Otpadne vode

Otpadne vode su korištene vode čija je kakvoća izmijenjena unošenjem onečišćujućih tvari. Nastaju uporabom vode iz vodoopskrbnih sustava pri čemu se mijenjaju njena fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Dijele se na komunalne, industrijske i oborinske otpadne vode. Iskorištena voda postaje onečišćena različitim tvarima, uključujući organske tvari, hranjive tvari, patogene mikroorganizme, kemikalije i druge što doprinosi onečišćenju vodene flore i faune, a uz to su izvor uzročnika bolesti. U Republici Hrvatskoj na sustav javne vodoopskrbe priključeno je oko 76 % stanovništva, na sustave kanalizacije manje od 50 %, a pročišćava se samo 35 % otpadnih voda, od čega na zadovoljavajući način tek nešto više od 10 %.<sup>8</sup> U komunalne otpadne vode ubrajaju se vode iskorištene iz kućanstva i sanitarnih čvorova, smjesa voda od pranja ulica, otpadne vode iz uslužnih djelatnosti i obrtničkih radionica. Industrija koristi velike količine vode u različitim procesima i industrijskim pogonima. Otpadne vode iz industrija mogu sadržavati teške metale ili druge onečišćujuće tvari nastale kao rezultat industrijskog procesa. Obzirom da poljoprivreda za navodnjavanje koristi velike količine vode, otpadna voda koja nastaje može sadržavati nerazgrađene pesticide, herbicide i druge poljoprivredne kemikalije. U cijelom svijetu poljoprivreda čini 70 % ukupne potrošnje vode u usporedbi s 20 % za industriju i 10 % za kućnu upotrebu.<sup>9</sup> Oborinske vode se onečišćuju u kontaktu s krovovima, asfaltiranim površinama te površinama tla. Opasnost predstavljaju kada dospiju u tlo gdje mogu onečistiti podzemne vode koje su osnovna zaliha pitke vode naselja i gradova. Pokazatelji kakvoće mogu biti fizikalni (primjerice boja, miris, temperatura, suspendirane tvari), kemijski (najčešće se određuje biološka potrošnja kisika i kemijska potrošnja kisika te ukupni organski ugljik ) i biološki ( primjer patogeni mikroorganizmi ). U Tablici 1. prikazani su podaci o vrstama i količinama (kg/god) ispuštanja onečišćujućih tvari otpadnim vodama iz sustava javne odvodnje na razini Hrvatske za 2022. godinu. Prema podacima iz Tablice 1. možemo zaključiti da je otpadna voda najviše onečišćena organskim spojevima. Biokemijska potrošnja kisika (BPK) predstavlja mjeru količine kisika koju mikroorganizmi koriste za razgradnju organskih tvari u vodi, a kemijska potrošnja kisika (KPK) je mjera količine kisika potrebna za kemijsku oksidaciju organskih i anorganskih tvari prisutnih u vodi pri kontroliranim uvjetima.<sup>10</sup> Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/20) granične vrijednosti emisija za BPK<sub>5</sub> i KPK koje se ispuštaju u prirodni recipijent iznose 25 mg O<sub>2</sub>/L odnosno 125 mg O<sub>2</sub>/L.<sup>10</sup>

Prije ispuštanja u prirodu ili korištenja u druge svrhe otpadne vode se moraju obraditi tehnološkim procesima pročišćavanja. Razlikujemo tri stupnja pročišćavanja koji uključuju mehaničku, fizikalnu, kemijsku i biološku obradu. Prethodnim stupnjem pročišćavanja uklanjaju se veće čestice koje se nalaze u vodi poput pijeska, šljunka, drva, papira te uključuje postupke rešetanja. U prvom stupnju pročišćavanja odvajaju se raspršene krute čestice otpada iz otpadne vode taloženjem. U drugom stupnju pročišćavanja uklanjaju se biorazgradive tvari što uključuje prozračivanje čime se oksidiraju otopljene tvari ili se na njih djeluje kemikalijama (npr. neutralizacija kiselina ili lužina, kloriranje). Treći stupanj pročišćavanja uključuje uklanjanje dušika i fosfora, postojane organske tvari te uklanjanje teških metala i otopljene anorganske tvari iz otpadne vode. U Europi se obrađuje 71 % otpadnih voda zahvaljujući djelomično visokoj javnoj svijesti o zaštiti okoliša i ljudskog zdravlja, tehnološkom napretku metoda pročišćavanja otpadnih voda te ulaganjima nacionalnih vlada u sustave za pročišćavanje otpadnih voda.<sup>11</sup>

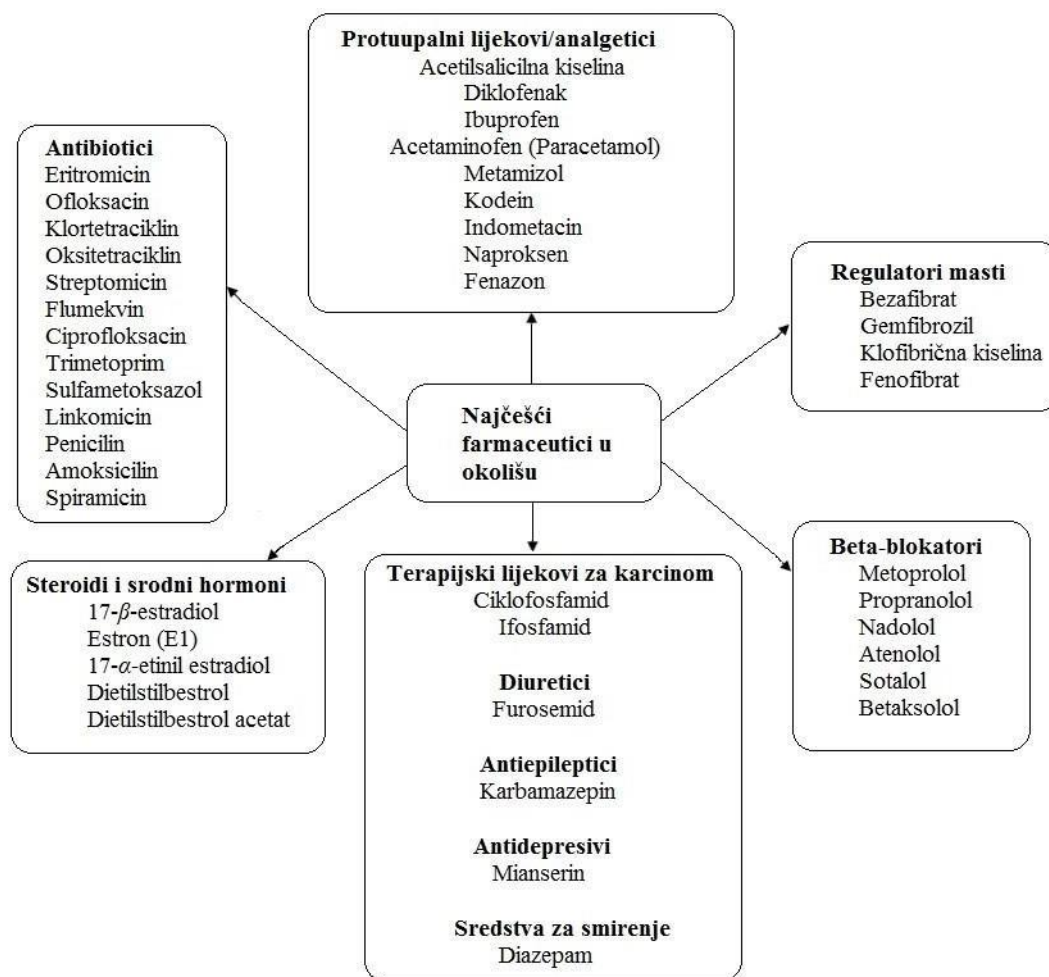
Tablica 1. Podaci o vrstama i količinama (kg/god) ispuštanja onečišćujućih tvari otpadnim vodama iz sustava javne odvodnje prikazani na razini RH za 2022. godinu.<sup>12</sup>

POKAZATELJ/ ONEČIŠĆUJUĆA TVAR	UKUPNA VRIJEDNOST (kg/god)
Ukupna suspendirana tvar	14.601.059,17
Biokemijska potrošnja kisika nakon pet dana (BPK <sub>5</sub> )	18.746.517,41
Kemijska potrošnja kisika- dikromatom (KPK <sub>Cr</sub> )	43.303.670,59
Ukupni organski ugljik (TOC)	4.207.046,19
Nitriti	55.234,43
Nitrati	2.082.667,75
Sulfati	10.007.687,39
Detergenti, neionski	205.008,95
Halogenirani organski spojevi	9.431,54
Živa i spojevi	2,72
Željezo	87.787,81
Ukupni fosfor	803.008,49

## 2.2. Farmaceutici i farmaceutska industrija

Farmaceutici su grupa spojeva koja ima važnu ulogu u liječenju ljudi i životinja, a koriste se i kao promotori rasta u veterinarskoj medicini. Slika 1. prikazuje shematski prikaz podjele farmaceutika. Posljednja dva desetljeća izloženost farmaceutika u okolišu nije se smatrala

velikom brigom jer se mislilo da su sigurni.<sup>13</sup> Strategija sprječavanja onečišćenja voda uključuje popis od 45 prioriternih tvari koje predstavljaju znatan rizik za vodeni okoliš, a među njima su i farmaceutici. Sastav otpadnih voda farmaceutske industrije ovisi o polaznoj sirovini, tehnološkim postupcima i procesima te otpadnim produktima, a specifična onečišćenja koja mogu dospjeti u otpadne vode iz farmaceutske proizvodnje su organska otapala, katalizatori, aditivi, neizreagirani reaktanti, međuprodukti te ostaci aktivnih farmaceutskih tvari (API).<sup>14</sup>



Slika 1. Shematski prikaz podjele farmaceutika.<sup>20</sup>

Farmaceutska industrija pri proizvodnji upotrebljava različite neizreagirane reaktante, katalizatore i organska otapala. Procjenjuje se da gotovo 80% materijala korištenog u farmaceutskoj industriji otpada na otapala čija iskoristivost nakon recikliranja iznosi 50-80%.<sup>3</sup> To su primjerice kardiovaskularni agensi, agensi koji djeluju na središnji živčani sustav, vitamini, kemoterapeutici, antibiotici, antihistaminici i mnogi drugi.<sup>15</sup> Uz njih mogu nastati kiseline, baze, halidi, nitrati, sulfati, cijanidi te različiti metali. U takvom sustavu za proizvodnju važna ulazna sirovina je i voda koja se rabi prilikom obrade i proizvodnje lijekova,

pri čemu dolazi do nastanka otpadnih voda. Farmaceutici su u okolišu prvi put identificirani 60-ih godina u površinskim i otpadnim vodama u SAD-u i Europi. Njihova prisutnost u vodi, posebice antibiotika, izazivala je niz ekoloških i zdravstvenih problema koji uključuju poremećaje fizioloških procesa i reprodukcije organizma kao i razvoj rezistentnih bakterija. Prva znanstvena upozorenja o farmaceutskom onečišćenju voda objavljena su početkom devedesetih godina prošlog stoljeća kad su znanstvenici otkrili masovnu pojavu »feminiziranih« riba mužjaka i to u područjima rijeka koje se nalaze nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda.<sup>16</sup> Procjenjuje se da se otprilike 70% primijenjenih lijekova oslobađa u okoliš u nepromijenjenom obliku.<sup>17</sup> Na tržište dolaze u obliku tableta ili tekućina, a nakon konzumacije aktivne se tvari iz lijekova izlučuju putem urina i fecesa te završavaju u kanalizacijskom sustavu. Upotrebom stajskog gnojiva antibiotici se mogu prenijeti na poljoprivredno zemljište, a ispiranjem zemljišta i u podzemne vode.<sup>3</sup>

Farmaceutike ubrajamo u skupinu novih onečišćivala, odnosno onečišćivala za koje ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. U skupinu novih onečišćivala ubrajaju se i proizvodi koje koristimo u u svakodnevnom životu, primjerice sredstva za osobnu higijenu, humani i veterinarski farmaceutici, elektronika, mikroplastika i dr. Farmaceutici su topljivi u vodi i slabo razgrađivi. Bakterije koje su izložene malim koncentracijama antibiotika postaju rezistentne čime se ugrožava zdravlje ljudi i životinja obzirom da se infekcije ne mogu liječiti postojećim antibioticima. Smatra se da je najviše rezistentnosti stvoreno prema penicilinima, posebice ampicilinu, a zatim tetraciklinima i makrolidima kao što je eritromicin.<sup>18,19</sup> Osim pojave rezistentosti bakterija problem predstavljaju kemijske reakcije antibiotika sa sredstvima za obradu voda, najčešće s klorom. Zbog reakcija s klorom antibiotici se u vodi pregrađuju u druge kemijske tvorbe koje mogu biti mnogo toksičnije od početnoga farmaceutskoga spoja.<sup>21</sup> Za obradu otpadnih voda farmaceutske industrije koriste se biološki procesi. U postrojenjima za obradu voda farmaceutici se djelomično adsorbiraju na mulj gdje se koncentriraju. Mulj se odlaže na deponije ili poljoprivredne površine u svrhu recikliranja organske tvari. Problem nastaje ukoliko mulj sadrži onečišćujuću tvar jer njegovim odlaganjem direktno unosimo tvar u tlo što može dovesti do onečišćenja površinske i podzemne vode. Koncentracije pojedinačnih farmaceutskih spojeva u ispustima postrojenja za obradu otpadnih voda su uobičajeno niže od 1 µg/L, iako su više koncentracije u iznosu od nekoliko mg/L izmjerene u ispustima postrojenja za obradu otpadnih voda farmaceutske industrije.<sup>22</sup> Neki od najpopularnijih spojeva za koje se provode studije i koji su rasprostranjeni u vodenom okolišu su karbamazepin, diklofenak, ibuprofen, gemfibrozil, atenolol, propranolol, eritromicin, ciprofloksacin, ofloksacin, sulfametoksazol i amoksicilin.<sup>23</sup> Antibiotici poput sulfametoksazola, ciprofloksacina,

eritromicina, tetraciklina su povezani s razvojem antimikrobne rezistencije. Tablica 2. prikazuje najčešće farmaceutike prisutne u otpadnim vodama te njihove koncentracije.

Tablica 2. Farmaceutici prisutni u otpadnim vodama te njihove koncentracije.<sup>24</sup>

FARMACEUTIK	VRSTA FARMACEUTIKA	KONCENTRACIJA
Antibiotici	Sulfonamidi: sulfametoksazol Fluorokinoloni: ofloksacin ciprofloksacin Bakteriostatski: trimetoprim Penicilini: penicillin G	0,02-0,58 µg/L 6-52 ng/L 6-60 ng/L 0,11-0,37 µg/L 0,025 µg/L
Analgetici/Antipiretici	Acetaminofen Diklofenak Naproksen Ibuprofen Ketoprofen Karbamazepin	10-23,33 µg/L 0,01-510 µg/L 0,5-7,84 µg/L 0,49-990 µg/L 0,13-3 µg/L 0,1- 1,68 µg/L
CNS stimulansi	Kofein	3,2-11,44 µg/L
Kardiovaskularni lijekovi	Propranolol Atenolol Metoprolol Klofibrinska kiselina Gemfibrozil Fezafibrat	0,05 µg/L 10-730 ng/L 10-390 ng/L 0,47-170 µg / L 0,3-3 µg/L 0,1-7,60 µg/L
Hormoni	17α-etinilestradiol 17β-estradiol	1 µg/L 10 µg/L
Kontrastna sredstva	Jopromid Iomepro	0,026–7,5 µg/L 1,6 µg/L

### 3. Ekotoksičnost

Ekotoksičnost je štetan kemijski, biološki ili fizikalni utjecaj na ekosustav. Istražuje posljedice toksičnih tvari na mikroorganizme, biljni i životinjski svijet te ostale dijelove ekosustava. Razlikujemo akutnu i kroničnu toksičnost. Akutna toksičnost je sposobnost tvari da prilikom kratkoročnog izlaganja testnog organizma ispitivanoj tvari izazove štetan utjecaj na njih unutar 24 do 96 sati. Izražava se dozom otrova koja izaziva smrtnost kod 50% organizama koji su izloženi ispitivanoj tvari tijekom određenog vremenskog razdoblja, tzv. LD<sub>50</sub> („Lethal Concentration 50“). Najčešće se izražava u mg/kg tjelesne težine. Često se koristi i EC<sub>50</sub> („Effective Concentration 50“), predstavlja koncentraciju tvari koja uzrokuje negativan učinak kod 50% populacije, na primjer inhibicija rasta i promjene u reprodukciji.

Kronična toksičnost nastupa nakon duljeg izlaganja testnog organizma ispitivanoj tvari, provodi se najmanje 7 dana. Kod kronične toksičnosti najčešće se određuje smrtnost. Testovi ekotoksičnosti provode se s ciljem utvrđivanja koncentracije onečišćujućih tvari koje mogu uzrokovati štetne učinke kod testiranih organizama. Razlikujemo *in vivo* i *in vitro* testove ekotoksičnosti. *In vivo* testovi toksičnosti provode se na živim organizmima. Primjer su testovi na ribama, pticama i sisavcima te biljkama. Prate se utjecaji toksičnih tvari na njihove biološke, fiziološke i reproduktivne funkcije, a provode se u skladu pravima zaštite životinja, kako bi se patnja organizama svela na minimum. *In vitro* testovi se provode u laboratorijskim uvjetima, koriste izolirana tkiva ili stanice koji simuliraju biološke procese i reakcije koje se događaju u živim organizmima. Primjer su testovi na mikroorganizmima. *In vitro* testovi ne pružaju uvid u stvarne učinke toksičnih tvari na organizam i ekosustav. Provođenjem istraživanja *in vivo* mogu se bolje predvidjeti biološki odgovori organizma.<sup>25</sup>

### 3.1. Testni organizmi

Testovi ekotoksičnosti najčešće se provode na sljedećim organizmima: *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas putida*, alge, *Daphnia magna*, *Danio rerio*. U nastavku će ukratko biti opisan svaki testni organizam. *Vibrio fischeri* (slika 2.) su Gram-negativne, štapičaste bakterije prisutne u morskom ekosustavu. Pripadaju rodu *Vibrio*, heterotrofne su i pokreću se pomoću flagella. Imaju bioluminiscentna svojstva što znači da imaju sposobnost proizvodnje i emitiranja svjetlosti. Akutna toksičnost vode na *Vibrio fischeri* određuje se Microtox testom. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma koje je nastalo kao posljedica djelovanja toksina.<sup>26</sup> Prednosti metode su osjetljivost bakterija na veliki raspon koncentracija onečišćujućih tvari i brzina jer test traje 30 minuta. Nedostatci su slaba osjetljivost na teške metale i kratko trajanje jer je test manje učinkovit za određivanje onečišćujućih tvari poput antibiotika.



Slika 1. Lignja *Euprymna scolopes* u simbiozi s bakterijom *Vibrio fischeri*.<sup>27</sup>



*Pseudomonas putida* (slika 3.) je Gram-negativna nefermentirajuća bakterija. Saprofitski je pokretljivi bacil prirodno prisutan u tlu i vodi.<sup>28</sup> Podnosi ekstremne uvjete poput niske temperature i nedostatak hranjivih tvari pa ima mogućnost enzimske aktivnosti i na Arktiku. Široku primjenu ima u bioremedijaciji jer može razgraditi razne onečišćujuće tvari, a primjenjuje se za ispitivanje toksičnosti otpadnih voda. Jedna od najčešćih metoda određivanja ekotoksičnosti *P. putida* je test inhibicije rasta. Test traje 16 sati, a nije primjenjiv za vode koje sadrže suspendirane tvari.



Slika 2. *Pseudomonas putida* pod elektronskim mikroskopom.<sup>29</sup>

Alge (slika 4.) imaju ključnu ulogu u održavanju ravnoteže ekosustava jer proizvode kisik i hranu drugim organizmima. Općenito se može reći da su testovi s algama vrlo osjetljivi, relativno brzi i jeftini pa se danas sve više koriste u različitim vrstama istraživanja i studijama utjecaja na okoliš.<sup>30</sup> Najčešće se testovi provode na slatkovodnim planktonskim algama poput vrste *Pseudokirchneriella subcapitata*. Test traje 72 sata, a prati se utjecaj onečišćujuće tvari na rast i reprodukciju alge.



Slika 3. *Pseudokirchneriella subcapitata*.<sup>31</sup>

*Daphnia magna* (slika 5.), poznata kao vodenbuha, je vrsta slatkovodnih račića koja živi u slatkovodnim i slanim staništima poput jezera, ribnjaka i močvara. Njihova primarna hrana su zooplankton i fitoplankton, a konzumiraju bakterije te gljivične spore. *D. magna* se može razmnožavati partenogenetski i spolno, ovisno o uvjetima okoliša, a u oba slučaja jajašca

proizvode matične stanice u ovariju.<sup>32</sup> Osjetljive su na promjene u kvaliteti vode pa njihovo prisustvo može ukazivati na stanje i onečišćenje ekosustava te prilagodbu uvjetima u okolišu. Na *D. magna* se provodi test akutne toksičnosti pri čemu se prati utjecaj kemikalija na reprodukciju. Prednosti provođenja testa na *D. magna* su brojnost, uloga u prehranbenom lancu i kratko generacijsko vrijeme. Tablica 3. prikazuje EC<sub>50</sub> vrijednosti određenih farmaceutika na *V. fischeri* i *D. magna*.



Slika 4. *Daphnia magna* s jajašcima.<sup>33</sup>

Tablica 3. EC<sub>50</sub> vrijednosti određenih farmaceutika na *V. fischeri* i *D. magna*.<sup>37</sup>

FARMACEUTIK	PROSJEČNA EC <sub>50</sub> (mg/L)	
	<i>V. fischeri</i>	<i>D. magna</i>
Diklofenak	11,62	59,09
Ibuprofen	14,97	50,07
Sulfometoksazol	51,77	42,74
Naproksen	25,17	74,39

Zebrice (*Danio rerio*) (slika 6.) su slatkovodne ribice koje pripadaju porodici Cyprinidae. Zebrice konzumiraju širok spektar bentoskih i planktonskih rakova te crve i ličinke insekata.<sup>34</sup> Razmnožavanje im ovisi o svjetlosnim ciklusima, mrijeste se u malim skupinama i imaju prozirne embrije.<sup>35</sup> Par zebrica može po mrijestu dati između 100 i 200 embrija.<sup>35</sup> Pogodne su za ispitivanje ekotoksičnosti zbog lakog i jeftinog održavanja u laboratoriju, brzog razvoja i rasta te visoke plodnosti. Embrij zebrice nije zakonski zaštićen stadij što ga čini idealnom zamjenom za *in vivo* ispitivanja na glodavcima.



Slika 5. *Danio rerio*.<sup>36</sup>

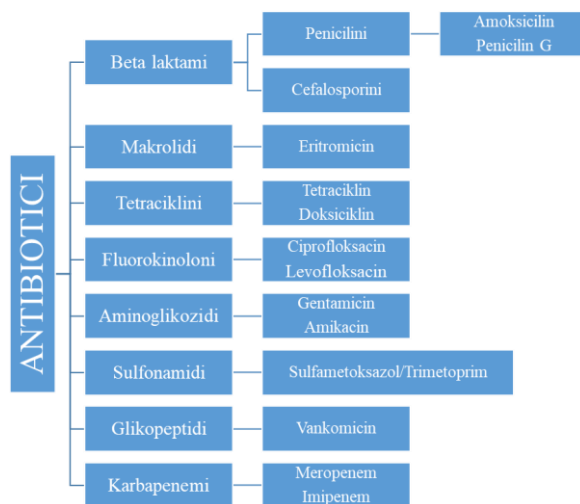
U skladu s Europskom direktivom kemikalije su razvrstane na temelju svojih  $EC_{50}$  vrijednosti. Kemikalije sa vrijednostima  $EC_{50} < 1 \text{ mgL}^{-1}$  smatraju se visoko toksičnim za vodene organizme,  $1-10 \text{ mgL}^{-1}$  su srednje toksične za vodene organizme,  $10-100 \text{ mgL}^{-1}$  su slabo toksične za vodene organizme te one  $> 100 \text{ mgL}^{-1}$  nisu klasificirane kao toksične za vodene organizme. Na temelju ove direktive, farmaceutici koji su prikazani u Tablici 3. za koje je uočen toksični učinak mogu se klasificirati kao slabo toksičnim za vodeni okoliš.

## 4. PREGLEDNI DIO

### 4.1. Antibiotici

Antibiotici su specifični proizvodi mikrobnog metabolizma koji imaju visoku fiziološku aktivnost prema određenim grupama mikroorganizama (bakterije, plijesni, protozoe, virusi) ili zloćudnih tumora, sprječavajući im rast ili uništavajući ih.<sup>38</sup> Krajem 19. stoljeća razvila se teorija o mikroorganizmima kao uzročnicima bolesti. Alexander Fleming, britanski mikrobiolog, zaslužan je za otkriće penicilina kada je proučavao kulturu stafilokoknih bakterija. Godine 1940. otkriveno je da je penicilin odgovoran za izlječenje streptokokne infekcije pa je ušao u široku uporabu. Razdoblje između pedesetih i sedamdesetih godina bilo je zlatno doba otkrića novih vrsta antibiotika, a od tada nije otkrivena nijedna nova vrsta.<sup>39</sup> Danas se primjenjuje oko 200 različitih vrsta antibiotika. Njihovo glavno obilježje je selektivna toksičnost: toksični su za bakterije, a netoksični (ili slabo toksični) za čovjekov organizam.<sup>40</sup> Antibiotike dijelimo prema podrijetlu, obzirom na rast i preživljavanje bakterija, na osnovi antimikrobnog spektra te prema mehanizmu djelovanja kojim utječu na procese u stanicama mikroorganizama. Prema podrijetlu dijele se na prirodne, polusintetičke i sintetičke antibiotike. Prirodni spojevi nastaju kao proizvod metabolizma bakterija, gljivica, plijesni i sl., a danas se sve više modificiraju u laboratoriju i proizvodnim pogonima.<sup>41</sup> Obzirom na rast i preživljavanje bakterija dijelimo ih na baktericide i bakteriostatike. Baktericidi ubijaju bakterije, a bakteriostatiki inhibiraju rast bakterija. Prema osnovi antimikrobnog spektra razlikujemo antibiotike koji djeluju na jednu bakterijsku vrstu (npr. izoniazid) ili na nekoliko bakterijskih vrsta (npr. penicilin). Široki antibakterijski spektar imaju antibiotici koji djeluju na većinu gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (npr. tetraciklini).<sup>41</sup> Prema mehanizmu djelovanja antimikrobnih lijekova svrstavamo ih u četiri skupine odnosno one: koji inhibiraju sintezu stanične stijenke ( $\beta$ -laktami i bacitracin), koji oštećuju citoplazmatsku membranu (polimiksini i polienski antimikrobni lijekovi), koji inhibiraju sintezu proteina (aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi, streptogramini, oksasolidinoni i glicilicini) i koji inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina (sulfonamidi i kinoloni).<sup>42</sup> Antibiotici čiji je mehanizam inhibicija sinteze stanične stijenke aktiviraju enzime koji prekidaju veze peptidoglikanskog sloja patogene bakterije i na taj način izazivaju njenu degradaciju.

Antibiotici čiji je mehanizam inhibicija sinteze proteina onemogućavaju funkciju ribosoma. Antibiotici inhibitori sinteze nukleinske kiseline sprječavaju procese sinteze i replikacije DNA. Slika 7. prikazuje podjelu antibiotika otkrivenih u otpadnim vodama. Neki od antibiotika koji se mogu pronaći u otpadnim vodama koriste se za liječenje infekcija u humanoj i veterinarskoj medicini poput tetraciklina, sulfonamida, fluorokinolona, beta-laktama koji uključuju peniciline i cefalosporine, makrolidi, karbapenemi te glikopeptidi.



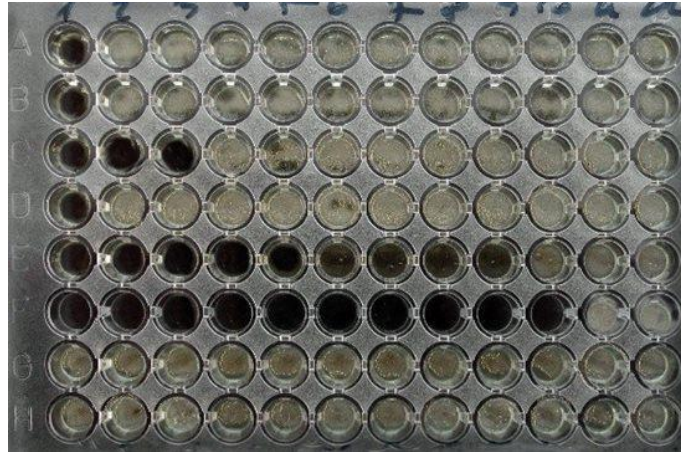
Slika 7. Shematski prikaz podjele antibiotika otkrivenih u otpadnim vodama.

#### 4.2. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je laboratorijski test kojim se određuje najniža koncentracija određenog antibiotika potrebna da bi se zaustavio ili inhibirao rast bakterija, nakon inkubacije pri 37 °C u trajanju od 24 sata. Ova metoda koristi se u dijagnostičkim laboratorijima u svrhu potvrđivanja rezistencije, ali i kao metoda za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije u proučavanju *in vitro* aktivnosti novih spojeva ili ekstrakata.<sup>43</sup> Provođa se na različitim organizmima kao što su bakterije, gljivice i paraziti.<sup>44</sup>

Specifične tehnike za određivanje MIC vrijednosti su mikrodilucijska i makrodilucijska metoda. Metode koriste tekuću podlogu, Muelle-Hinton podlogu, s dodatkom antibiotika u točno određenoj koncentraciji za određivanje prisustva rezistencije. Razlikuju se po volumenu korištenog medija. Mikrodilucijska metoda za određivanje MIC vrijednosti podrazumijeva upotrebu mikrotitracijskih pločica, pri čemu ukupna zapremina u jažici pločice ne prelazi zapreminu od 500 µL.<sup>44,45</sup> Metoda makrodilucije se izvodi u epruvetama, a ispitujući mikroorganizam i antibiotik se dodaju u zapremninu bujona koja treba biti veća od 2 mL.

Rezultat kod mikrodilucijske i makrodilucijske metode je zamućenje bujona. Najmanja koncentracija antibiotika pri kojoj nema vidljivog zamućenja, predstavlja MIC vrijednost za ispitivani izolat.<sup>46</sup> Slika 8. prikazuje mikrotitracijske pločice koje se koriste u metodi mikrodilucijskog bujona. Prema rezultatima MIC testa mikroorganizmi se mogu svrstati u jednu od tri skupine: osjetljivi, srednje osjetljivi ili rezistentni na određeni antibiotik. Pomoću te informacije izabire se odgovarajući antibiotik za liječenje infekcija.



Slika 6. Metoda mikrodilucijskog bujona.<sup>47</sup>

### 4.3. Rezistencija na antibiotike

Usljed neracionalne upotrebe i prekomjernog korištenja antibiotika, bakterije su stvorile mehanizme rezistencije što predstavlja jedan od vodećih problema javnog zdravstva. Rezistentnost bakterija na antibiotike znači da koncentracije antibiotika koje se unesu u ljudski organizam nisu dovoljne da bi djelovale na bakterije. Prema Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) oko 70% bakterijskih infekcija u bolničkom okruženju je rezistentno barem na jedan antibiotik.<sup>48</sup> U zemljama s niskim i srednjim dohotkom poput Indije i Tajlanda, AMR je odgovorna za smrt 58 000 djece i 38 000 odraslih.<sup>49</sup> Neki od mehanizama rezistencije koje su bakterije stvorile prema antibioticima su stvaranje enzima koji mogu inaktivirati antibiotik, smanjenje propusnosti stanične membrane te korištenje efluksne pumpe kojom izbacuju antibiotik iz stanice. Razlikujemo primarnu i sekundarnu rezistenciju.

Primarna rezistencija određuje spektar djelovanja antibiotika, koji znači skupinu, odnosno skupine bakterija na koje neki antibiotik djeluje.<sup>40</sup> Postoje antibiotici užeg i šireg spektra djelovanja. Antibiotici užeg spektra se propisuju kada je bakterija koja je uzročnik poznata. Takvi antibiotici su djelotvorni protiv specifičnih vrsta bakterija, na primjer metronidazol koji

djeluje samo na protozoe i anaerobne bakterije. Antibiotici šireg spektra djeluju na više vrsta bakterija. Propisuju se ukoliko nije poznato koja je bakterija uzrokovala bolest, na primjer tetraciklini djeluju na skoro sve vrste bakterija. Sekundarna rezistencija nastaje kada bakterija stekne rezistenciju na neki određeni antibiotik. Javlja se kao proces slučajnog nastanka gena rezistencije ili prirodnih promjena u genomu bakterija. Bakterije su najveću rezistenciju stvorile prema beta laktamima, fluorokinolonima, aminoglikozidima, sulfonamidima i makrolidima. Tablica 4. prikazuje rezistentnost bakterija na određene antibiotike.

#### 4.3.1. Beta laktami

Beta laktami su antibiotici koji inaktiviraju enzime potrebne pri sintezi bakterijske stanične stijenke. Dije se na peniciline, cefalosporine, monobaktame i karbapeneme. Često se koriste u liječenju lakših i težih infekcija, pridonose 50% globalne potrošnje antibiotika, što je omogućilo stvaranje rezistencije. Postoje tri glavna mehanizma nastanka rezistencije: modifikacija PBP-molekula (proteini koji vežu penicilin), smanjena permeabilnost zbog promjena u proteinima vanjske membrane ili produkcija  $\beta$ -laktamaza.<sup>53</sup> Najčešće dolazi do inaktivacije antibiotika putem bakterijskih enzima beta-laktamaza koje cijepaju beta-laktamski prsten što dovodi do brze hidrolize čime se gubi struktura molekule antibiotika. Modifikacije PBP-molekula rezultiraju nemogućnošću vezanja  $\beta$ -laktamskog antibiotika na ciljne molekule ili dolazi do vezanja, ali nema učinka, tj. ne dolazi do inhibicije sinteze peptidoglikana.<sup>54</sup>

#### 4.3.2. Fluorokinoloni

Fluorokinoloni su skupina sintetskih antibiotika baktericidnog djelovanja. Inhibiraju DNK unutar bakterija, a dijele se na dvije skupine. Pod stariju skupinu spadaju ciprofloksacin, norfloksacin i ofloksacin, a noviju skupinu delafloksacin, gemifloksacin, levofloksacin i moksifloksacin. Koriste se u humanoj i veterinarskoj medicini pri liječenju infekcija kože, mokraćnog sustava, dišnih puteva i dr. Antibakterijska djelotvornost tih lijekova temelji se na inhibiciji sinteze bakterijske DNA, posredstvom inhibicije enzima iz skupine topoizomeraza tipa II važnih za replikaciju, transkripciju, rekombinaciju i popravljavanje bakterijske DNA.<sup>55</sup> Osnovni mehanizmi stvaranja rezistencije bakterija na fluorokinolone su modifikacija ciljane molekule mutacijom i promjena mjesta djelovanja enzima. Promijenjeni enzimi imaju smanjen afinitet prema molekuli fluorokinolona, koja se ne može vezati za njih i time gubi djelovanje.<sup>56</sup>

### 4.3.3. Aminoglikozidi

Aminoglikozidi su baktericidni antibiotici koji inhibiraju sintezu proteina vezanjem na ribosome bakterije. Vezani ribosomi su spriječeni obavljati translaciju mRNA što dovodi do smrti bakterijske stanice. Uključuju amikacin, gentamicin, kanamicin, neomicin, plazomicin, streptomycin, tobramicin. Osim za terapiju bolesti koriste se i kao prehrambeni aditivi ili sintetski promotori rasta životinja kako bi se poboljšala iskoristivost hrane te poticao rast životinja. Posljedice korištenja antibiotika u ishrani životinja obuhvaća kompleksni sustav međusobno povezanih procesa: razvitak rezistentnih bakterija, prijenos ostataka antibiotika, rezistentnih bakterija i gena za rezistenciju s proizvoda životinjskog podrijetla na potrošače.<sup>57</sup> Bakterijska otpornost na aminoglikozide je rezultat enzimske modifikacije antibiotika djelovanjem fosfotransferaza, acetiltransferaza i adeniltransferaza. Ustanovljeno je da subterapijske doze aminoglikozidnih antibiotika mogu inducirati formiranje biofilma kod patogenih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*.<sup>58</sup>

### 4.3.4. Sulfonamidi

Sulfonamidi su sintetički bakteriostatski antibiotici širokog spektra djelovanja koji uključuju mafenide, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfametizole, sulfasalazine i sulfisoksazole. Inhibiraju sintezu folne kiseline te djeluju kao antifolati kod gram-negativnih i gram-pozitivnih bakterija. Na sulfonamide su osjetljive samo bakterije koje same sintetiziraju folnu kiselinu te je spriječen njihov rast i razvoj.<sup>50</sup> Rezistentnost bakterija moguća je i zbog smanjenog prolaska lijekova kroz bakterijsku staničnu membranu.<sup>59</sup>

### 4.3.5. Makrolidi

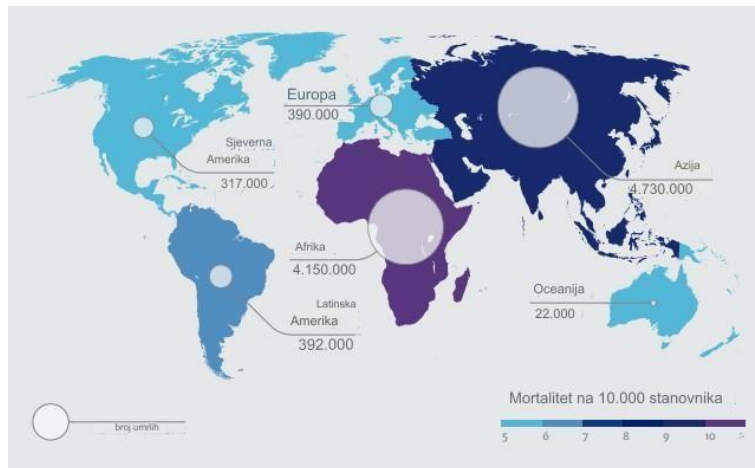
Makrolidni antibiotici imaju važnu ulogu u liječenju zaraznih bolesti jer su relativno širokog spektra antimikrobnog djelovanja. Najčešće se koriste za liječenje bakterijskih infekcija dišnih puteva, gastrointestinalnog sustava, infekcija kože i infekcija spolnog sustava.<sup>60</sup> Pod makrolide ubrajamo azitromicin, klaritromicin i eritromicin. Djeluju tako što se vežu na bakterijske ribosome pri čemu inhibiraju sintezu proteina. Nekoliko je mehanizama kojima bakterije pokazuju otpornost na makrolidne antibiotike od kojih su najčešći preinaka 50S ribosomske podjedinice i izbacivanje antibiotika iz stanice.<sup>61</sup>



Tablica 4. Rezistentne bakterije na antibiotike.<sup>51, 52</sup>

BAKTERIJA	VRSTA ANTIBIOTIKA	KLASA ANTIBIOTIKA
<i>Escherichia coli</i>	Trimetoprim Tetraciklin Ampicilin Ciprofloksacin	inhibitor sinteze folne kiseline Tetraciklini Beta laktami Fluorokinoloni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilin Ceftazidim Meropenem Ciprofloksacin	Beta laktami Cefalosporini Karbapenemi Fluorokinoloni
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ampicillin Cefalosporin Ciprofloksacin Amikacin	Beta laktami Fluorokinoloni Aminoglikozidi
<i>Legionella spp.</i>	Ciprofloksacin Eritromicin Klaritromicin	Fluorokinoloni Makrolidi
<i>Staphylococcus aureus</i>	Eritromicin Azitromicin	Makrolidi
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ampicillin Gentamicin Vankomicin	Beta laktami Aminoglikozidi Glikopeptidi

U Hrvatskoj su aktivnosti praćenja rezistencije na antibiotike započele 1996. godine kada je osnovan Odbor za praćenje rezistencije bakterija na antibiotike na Akademiji medicinskih znanosti Hrvatske. Interdisciplinarna sekcija za kontrolu rezistencije na antibiotike (ISKRA), Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH, bavi se prikupljanjem podataka i analizom rezultata u svrhu smanjenja uporabe antibiotika i kontrole širenja rezistencije. Procjenjuje se da godišnje najmanje 700 000 ljudi u svijetu umre od infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama, a ako se trend nastavi procijenjeno je da bi do 2050. godine taj broj mogao narasti i na 10 milijuna godišnje.<sup>62</sup> Slika 9. prikazuje predviđenu smrtnost u svijetu zbog antimikrobne rezistencije do 2050. godine. Hrvatska pripada skupini zemalja s potrošnjom većom od EU prosjeka. Otprilike 10% od ukupne potrošnje antibiotika se troši u bolnicama, dok se 90% antibiotika potroši u izvanbolničkom liječenju.<sup>63</sup>



Slika 7. Predviđena smrtnost u svijetu zbog antimikrobne rezistencije do 2050.<sup>64</sup>

#### 4.4. Bakterije

Bakterije su jednostanični organizmi koji imaju prokariotsku građu stanice. Veličine su od 0,2 do 10  $\mu\text{m}$ . Prokariotsku stanicu čini prstenasta dvolančana molekula DNK koja je pakirana u nukleoid, ribosomi, stanična membrana, stanična stijenka građena od peptidoglikana te kod nekih bakterija polisaharidna kapsula, pili i bičevi za pokretanje. Rast bakterija podrazumijeva stvaranje kolonija, dijele se svakih 30 do 40 minuta. Prema obliku stanice bakterije dijelimo na koke (kuglaste bakterije), bacile (štapiceaste bakterije) i spirile (spiralne bakterije). Ovisno o izvoru energije razlikujemo autotrofne i heterotrofne bakterije. Autotrofne bakterije imaju sposobnost same proizvoditi hranu koristeći anorganske izvore ugljika, a dušik iz anorganskih spojeva amonijaka, nitrita i nitrata. Energiju dobivaju fotosintezom ili kemosintezom. Heterotrofne bakterije su organizmi koji se koriste gotovom organskom tvari iz okoline. Imaju ključnu ulogu u ekosustavima jer su glavni razlagači organskih tvari. Dijele se na saprofitske, parazitske i simbiotske bakterije. Saprofitske bakterije imaju bitnu ulogu u kruženju tvari u prirodi jer razgrađuju mrtvu organsku tvar čime pročišćavaju onečišćene vode i stvaraju humus. Simbiotske bakterije žive u zajednici s drugim organizmima, primjerice u korijenju biljaka, ljudskom crijevu, morskim organizmima (*Vibrio fischeri*). Parazitske bakterije nazivamo i patogene bakterije jer uzimaju hranu od živih stanica organizama na kojima parazitiraju te mogu inficirati ljude, životinje i biljke, uzrokujući širok spektar bolesti. Nadalje, bakterije možemo razlikovati po boji. Bojanje po Gramu metoda je razlikovanja bakterija po boji, koju je 1884. razvio danski mikrobiolog Hans Christian Gram. Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije imaju različito obojenje na temelju njihove stanične stijenke. Gram-negativne

bakterije imaju veći sadržaj lipida, dok Gram-pozitivne bakterije imaju veći sadržaj peptidoglikana.

#### 4.4.1. Gram-negativne bakterije

Gram-negativne bakterije su skupina bakterija koje se oboje crvenom, kontrastnom bojom u bojanju po Gramu. Uzročnici su infekcija i bolesti životinja, biljaka i ljudi kao što su upala pluća, upala trbušne maramice, infekcije mokraćnog sustava, krvotoka, rana ili meningitisa i dr., a protiv njih su učinkoviti antibiotici. Gram-negativne bakterije obavijene su zaštitnom kapsulom koja se sastoji od vanjske membrane i tanke mreže peptidoglikana. Tanka mreža peptidoglikana daje bakterijskoj stanici oblik dok vanjska membrana štiti bakterije od određenih antibiotika. Kada se ošteti, membrana ispušta endotoksin lipopolisaharid koji doprinosi jačanju simptoma tijekom infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama. Vanjski sloj kapsule čini gram-negativne bakterije otpornijima na određene antibiotike. Gram-negativne bakterije zbog složenije stanične stijenke, u usporedbi s gram-pozitivnim bakterijama, sve više postaju otporne na antibiotike. Otpornost im raste zbog prirodne otpornosti na određene antibiotike, mutacije gena ili stjecanjem gena od bakterija koje su postale otporne. Primjeri gram-negativnih bakterija, o čijoj će rezistentnosti na farmaceutike biti rečeno u nastavku, su *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumonia*.

#### 4.4.2. Gram-pozitivne bakterije

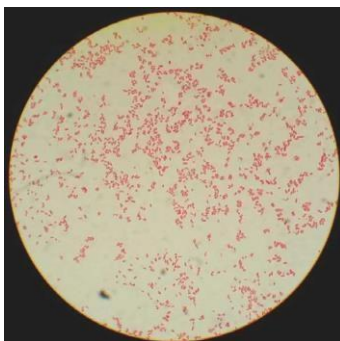
Gram-pozitivne bakterije su skupina bakterija koje zadržavaju primarnu boju pri tehnici bojanja po Gramu i pod optičkim mikroskopom imaju ljubičasto obojenje. Mogu biti koki ili bacili. Za razliku od Gram-negativnih bakterija nemaju vanjsku membranu pa su manje otporne na antibiotike. Stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija sastoji se od debljeg sloja peptidoglikana koji osigurava čvrstoću stanice. U usporedbi sa gram-negativnim bakterijama imaju tanak sloj citoplazmatske lipidne membrane. Sloj peptidoglikana sadrži znatnu količinu teihoične kiseline koja ima ključnu ulogu u prianjanju bakterija na površinu. Uloga Gram-pozitivnih bakterija je doprinos probavi, apsorpciji hranjivih tvari i regulaciji imunološkog sustava. Koriste se i u proizvodnji antibiotika kao što su streptomycin, tetraciklin, eritromicin i vankomicin, a uključene su i u proizvodnju fermentirane hrane i pića, raznih enzima i biogoriva. Imaju sposobnost razgradnje različitih onečišćujućih tvari iz okoliša pa se koriste u procesima bioremedijacije. S druge strane neke bakterije su patogeni te mogu uzrokovati infekcije u ustima, plućima, urinarnog trakta, krvi, sepse i dr. Primjeri Gram-pozitivnih

bakterija, o čijoj će rezistentnosti na farmaceutike biti rečeno u nastavku, su *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*.

#### 4.5. Bakterije i njihova rezistentnost

##### 4.5.1. *Escherichia coli*

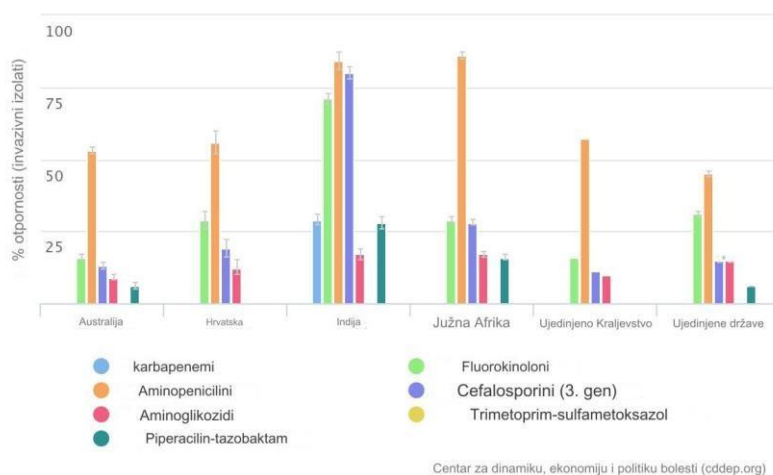
*Escherichia coli* (*E. coli*) je Gram-negativna, fakultativno-anaerobna štapičasta bakterija koja pripada porodici Enterobacteriaceae. Slika 10. prikazuje *E. coli* pod mikroskopom. Ima oblik bacila, stvara okrugle, konveksne i glatke kolonije. Prirodni je stanovnik crijevne flore ljudi i životinja, a koristi se i kao indikator fekalnog onečišćenja pri procjeni kakvoće hrane i vode. *E. coli* je prepoznata kao glavni bakterijski indikator fekalne kontaminacije za praćenje higijensko-sanitarne kakvoće obalne morske vode za rekreacijsku uporabu.<sup>65</sup> U većini slučajeva, *E. coli* je bezopasni mikroorganizam koji kod ljudi ne uzrokuje bolest, međutim neki sojevi ove bakterije dovode do bolesti gastrointestinalnog, mokraćnog ili središnjeg živčanog sustava.<sup>66</sup> Ima sposobnost učestalog nastajanja *de novo* mutacija i prilagodbe različitim uvjetima u okolišu. Najčešće raste u okolišu pri temperaturama nižim od 30°C. Rezistencija *E. coli* odnosi se na tetraciklin (27,5%), ampicilin (18,9%), streptomycin (18,5%), sulfametoksazol – trimetoprim ( 11,3% ), cefotaksim (4,5 %), kanamicin (4,1% ), ceftazidim (3,6 %), kloramfenikol ( 2,3% ), nalidiksinska kiselina (1,8% ) te ciprofloksacin (1,4% ). Zbog široke uporabe kinolona u izvanbolničkoj populaciji došlo je do očitog porasta rezistencije *E. coli* na kinolone u mnogim zemljama Europe.<sup>67</sup> Tablica 5. prikazuje MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *E. coli* na antibiotike. Najveću rezistentnost pokazuje prema ampicilinu koji spada u skupinu aminopenicilina. Prema Tablici 5. MIC vrijednost *E.coli* na ampicilin iznosi više od 32 µg/mL. Slika 11. prikazuje rezistentnost *E. coli* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.



Slika 8. *Escherichia coli*<sup>68</sup> pod mikroskopom (1000x).

Tablica 5. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *E. coli* na antibiotike.<sup>69</sup>

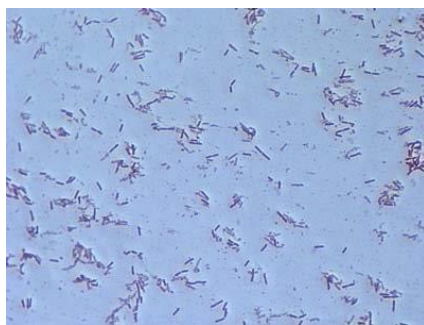
ANTIBIOTIK	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
Trimetoprim	$\geq 16$
Tetraciklin	$\geq 16$
Ampicilin	$\geq 32$
Ciprofloksacin	$\geq 4$



Slika 11. Rezistentnost *E. coli* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.<sup>70</sup>

#### 4.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

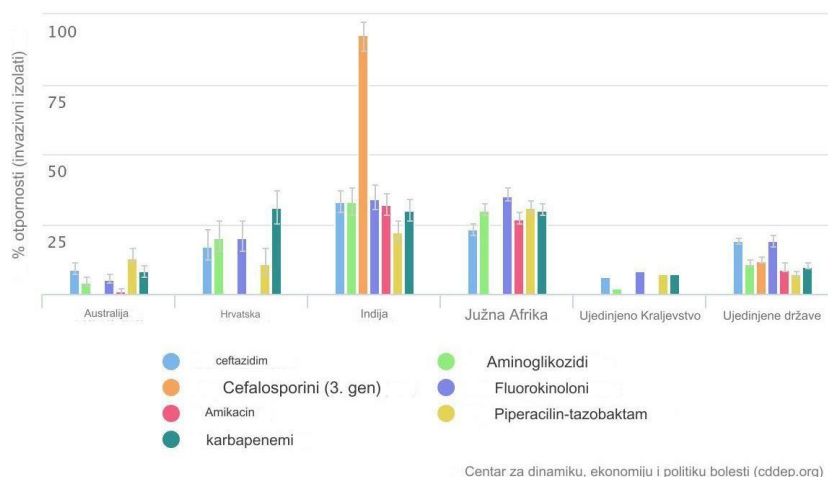
*Pseudomonas aeruginosa* je Gram-negativna, aerobna bakterija koja pripada porodici Pseudomonadaceae (slika 12.). Pokretni je bacil. Često je prisutan u prirodi, vlažnom okruženju i bolničkom okolišu.<sup>71</sup> Bakterija može biti dio normalne crijevne flore, ali je zbog svoje prilagodljivosti postala patogena. Uzrokuje infekcije mokraćnog mjehura, pluća, kože i opekline, sepsu. Može preživjeti u vodi dezinficiranoj klorom, u destiliranoj vodi, i pokazuje veliku otpornost na procese mehaničkog čišćenja.<sup>72</sup> Na površini razvodnog sustava formira biofilm koji je povezan je s korozijom cijevi te prisutnošću različitih elemenata u vodi. Multipla rezistencija na antibiotike kod *P. aeruginosa* diljem svijeta je u stalnom porastu i predstavlja veliku prijetnju jer u mnogim slučajevima ne ostavlja prostor za učinkovitu antimikrobnu terapiju.<sup>73</sup> Tablica 6. prikazuje MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *P. aeruginosa* na antibiotike. MIC vrijednost na piperacilin iznosi više od 128  $\mu\text{g/mL}$ . Slika 13. prikazuje rezistentnost *P. aeruginosa* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu. *P. aeruginosa* pokazuje najveću otpornost na beta laktame (karbapeneme i piperacilin).



Slika 12. *Pseudomonas aeruginosa*<sup>74</sup> pod mikroskopom (1000x).

Tablica 6. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *P. aeruginosa* na antibiotike.<sup>75</sup>

ANTIBIOTIK	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
Piperacilin	$\geq 128$
Ceftazidim	$\geq 32$
Meropenem	$\geq 8$
Ciprofloksacin	$\geq 4$

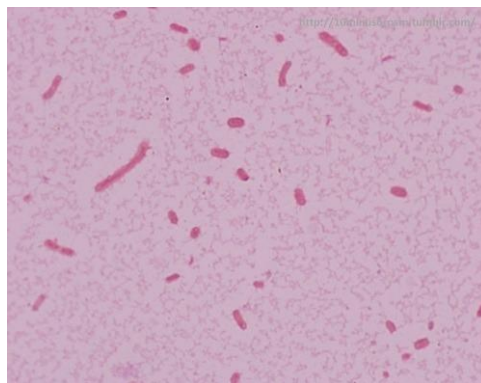


Slika 13. Rezistentnost *P. aeruginosa* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.<sup>70</sup>

#### 4.5.3. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* je Gram-negativna, nepokretna bakterija koja pripada porodici Enterobacteriaceae (slika 14.). Stvara velike sluzave kolonije bijele ili sivkaste boje. Staništa su joj slane i slatke vode, sediment, tlo te vegetacija. Ne pripada skupini halofilnih bakterija, stoga ne može obitavati u područjima s visokom koncentracijom soli.<sup>76</sup> Posjeduje kapsulu - sluzavu opnu koja štiti stanicu od nepovoljnih okolišnih uvjeta te joj omogućuje kolonizaciju. Prisutna je u fecesu zdravih osoba kao dio normalne crijevne flore, ali bakterijski sojevi mogu postati patogeni i izazvati infekcije poput upale pluća, infekcije mokraćnog sustava, infekcije na koži i sepse. Primarno je otporna na ampicilin, antibiotik iz skupine aminopenicilina te

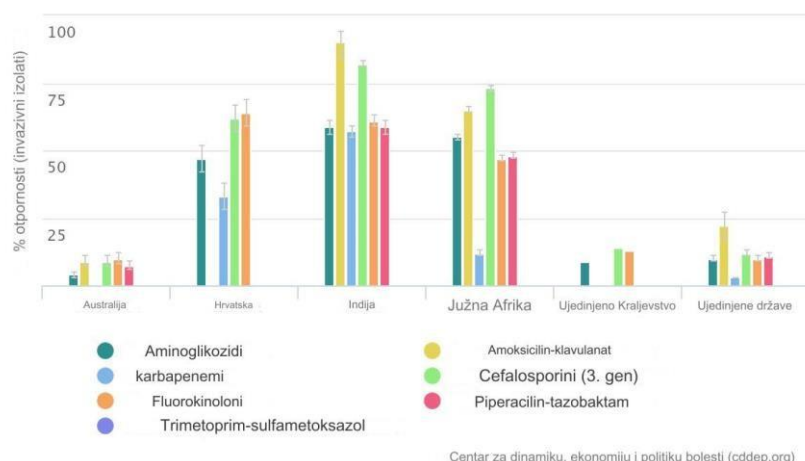
karbenicilin, antibiotik koji pripada karboksipenicilinskoj skupini, dok u bolnicama vrlo lako stječe rezistentnost na velik broj antibiotika koji se primjenjuju u liječenju raznih bolesti.<sup>77</sup> Tablica 7. prikazuje MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *K. pneumoniae* na antibiotike. MIC vrijednost na amikacin je najveća te iznosi više od 64 µg/mL. Slika 15. prikazuje rezistentnost *K. pneumoniae* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu. Najveću rezistentnost ima prema fluorokinolonima.



Slika 14. *Klebsiella pneumoniae*<sup>78</sup> pod mikroskopom (1000x).

Tablica 7. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *K. pneumoniae* na antibiotike.<sup>79</sup>

ANTIBIOTIK	MIC (µg/mL)
Ampicilin	≥ 32
Cefalosporin	≥ 16
Ciprofloksacin	≥ 4
Amikacin	≥ 64



Slika 15. Rezistentnost *K. pneumoniae* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.<sup>70</sup>

#### 4.5.4. *Legionella* spp.

*Legionella* spp. je fakultativna Gram-negativna bakterija koja pripada porodici Legionellaceae (slika 16.). Bakterijska kultura je sivo-bijele boje te raste na mediju uz prisutnost cisteina i topljivog željeza. Infekcija *Legionellom* spp. širi se inhalacijom sitnih kapljica vode koje sadrže bakterije, kao što je slučaj sa klimatizacijom, tuševima, fontanama ili sistemima za prskanje. *Legionella* spp. može preživjeti velik raspon temperature od 0°C do 63°C. Bolest legionelozom se prenosi isključivo udisanjem infektivnog aerosola. Ona se manifestira upalom pluća, a uzrokovana je bakterijom *Legionella* spp., najčešće *Legionella pneumophila* seroskupine 01.<sup>80</sup> Mikroorganizmi u instalacijama koje se koriste za distribuciju pitke vode, pa tako i *Legionella* spp., prijanjaju na površine/stijenke sustava u vodenom okolišu formirajući biofilme.<sup>81</sup> Tablica 8. prikazuje MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *Legionella* spp. na antibiotike. MIC vrijednost prema ciprofloksacinu i klaritromicinu iznosi manje od 1 µg/mL. Slika 17. prikazuje pregled zemalja sa rizikom oboljenja legionelozom u Europi.

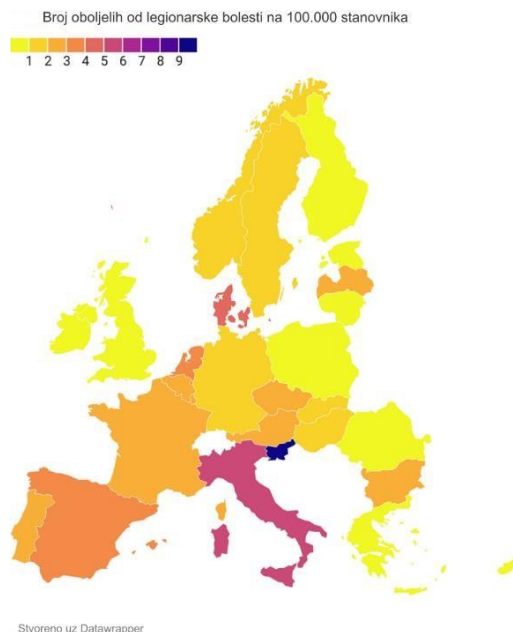


Slika 16. *Legionella* spp.<sup>82</sup> pod mikroskopom.

Tablica 8. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *Legionella* spp. na antibiotike.<sup>83</sup>

ANTIBIOTIK	MIC (µg/mL)
Ciprofloksacin	≤ 1
Eritromicin	≤ 0,5
Klaritromicin	≤ 1

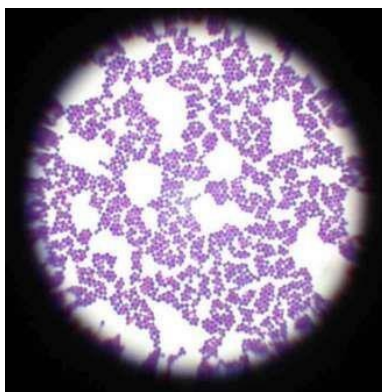




Slika 17. Pregled zemalja sa rizikom oboljenja legionelozom u Europi.<sup>84</sup>

#### 4.5.5. *Staphylococcus aureus*

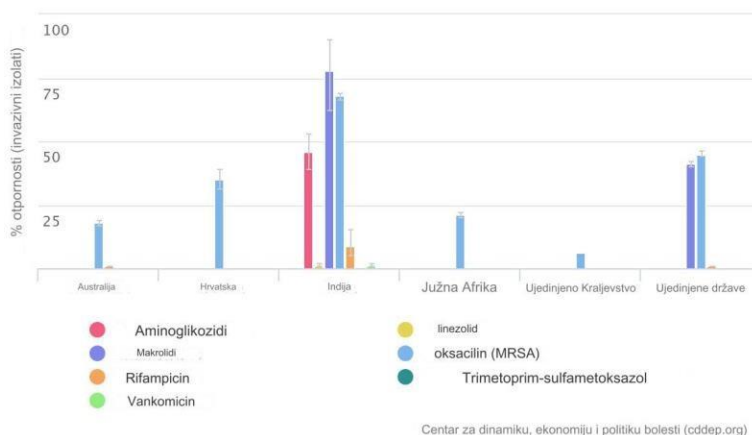
*Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna, kuglasta bakterija koja pripada rodu *Staphylococcus*.<sup>85</sup> (slika 18.). Stvara okrugle, glatke kolonije žute boje. Fakultativni je anaerob, jedan od vodećih uzročnika smrti povezanih s rezistencijom na antibiotike. Stafilocoki brzo razvijaju rezistenciju na antimikrobne lijekove što je stalan terapijski problem.<sup>85</sup> Dio je normalne mikrobiološke flore ljudi i životinja, nalazi se na koži, u nosu, gastrointestinalnom traktu, a može urokovati infekcija kao što su pneumonija, meningitis, sepsa. MRSA je soj *S. aureus* koji nosi gen *mec* na bakterijskom kromosomu što za posljedicu ima otpornost na mnoge vrste antibiotika kao što su meticilin, nafcilin, oksacilin i cefalosporine, odnosno sve beta-laktamske antibiotike.<sup>86</sup> Tablica 9. prikazuje MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *S. aureus* na antibiotike. MIC vrijednosti na eritromicin i azitromicin iznose 8 µg/mL. Slika 19. prikazuje rezistentnost *S. aureus* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu, najveću rezistentnost pokazuje prema oksacilinu.



Slika 18. *Staphylococcus aureus*<sup>87</sup> pod mikroskopom (1000x).

Tablica 9. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *S. aureus* na antibiotike.<sup>88</sup>

ANTIBIOTIK	MIC (µg/mL)
Eritromicin	≥ 8
Azitromicin	≥ 8

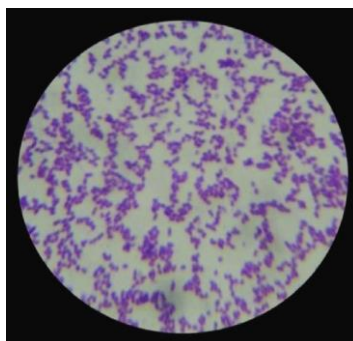


Slika 19. Rezistentnost *S. aureus* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.<sup>70</sup>

#### 4.5.6. *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* je Gram-pozitivna, nepokretna, fakultativno-anaerobna bakterija koja pripada porodici Enterococcaceae (slika 20.). Bakterije iz roda *Enterococcus* nastanjuju različita staništa kao što su tlo, površinske vode, kanalizacija, biljke i gastrointestinalni trakt.<sup>89</sup> Dio je normalne crijevne flore ljudi i životinja, ali može postati patogen i uzrokovati različite infekcije. Enterokoki, kao skupina, su indikatori kontaminacije vode patogenim mikroorganizmima, obično u zajednici s fekalnim koliformima.<sup>90</sup> Enterokoki su urođeno rezistentni na cefalosporine, klindamicin i kombinaciju trimetoprima i sulfametoksazola, a smanjene su osjetljivosti (nizak stupanj rezistencije) na penicilin i ampicilin te

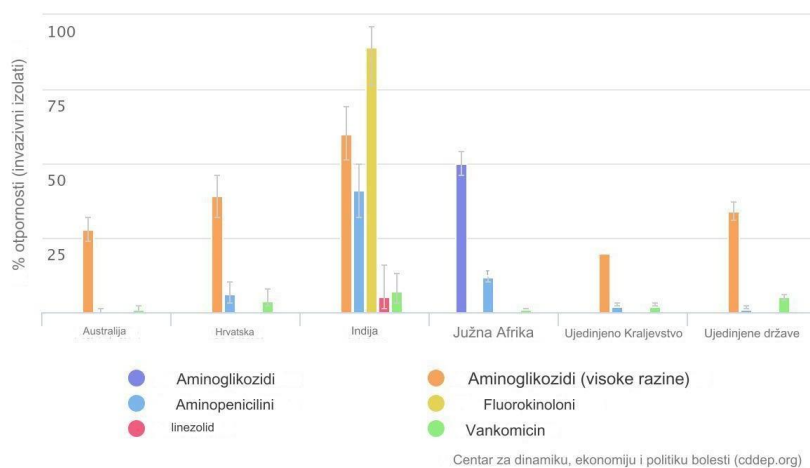
aminoglikozide.<sup>91</sup> Tablica 10. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *E. faecalis* na antibiotike. Najveću MIC vrijednost od 1000 µg/mL pokazuje prema gentamicinu. Slika 21. prikazuje rezistentnost *E. faecalis* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu. *E. faecalis* ima visok stupanj rezistencije na aminoglikozide.



Slika 20. *Enterococcus faecalis*<sup>92</sup> pod mikroskopom (1000x).

Tablica 10. MIC vrijednosti koje pokazuju rezistentnost *E. faecalis* na antibiotike.<sup>93</sup>

ANTIBIOTIK	MIC (µg/mL)
Ampicilin	≥ 16
Gentamicin	≥ 1000
Vankomicin	≥ 32



Slika 21. Rezistentnost *E. faecalis* na antibiotike u Hrvatskoj i svijetu.<sup>70</sup>

## 5. RAZVOJ NOVIH FARMACEUTIKA

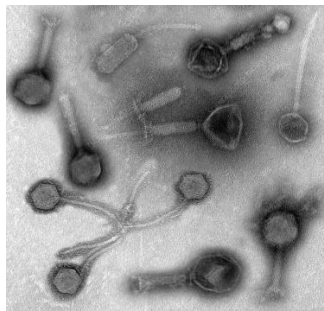
U javnom zdravstvu sve veća zabrinutost je rezistencija na antibiotike i spori napredak u proizvodnji modernih antibiotika koji bi se suprotstavili razvoju rezistencije na antibiotike.<sup>90</sup> Porastom rezistentnosti bakterija na farmaceutike, potrebno je razviti nove koji će biti učinkovitiji. Upravljanje antimikrobnom terapijom predstavlja skup mjera i intervencija koje se provode s ciljem smanjenja pojave rezistencije, poboljšanja sigurnosti bolesnika i ishoda uz istodobno smanjenje troškova liječenja.<sup>94</sup> Proizvodnja novih antibiotika nije profitabilna jer liječenje pacijenata traje kratko vremenski razdoblje stoga se danas koriste isti antibiotici posljednjih 30 godina. Uz smanjenu stopu otkrivanja novih lijekova, glavni pristup razvoju novih lijekova u borbi protiv nastanka i ponovnog pojavljivanja otpornosti patogena na antibiotike, bila je modifikacija postojećih lijekova.<sup>95</sup> Predviđanje velike stope smrtnosti stanovništva zbog rezistencije bakterija koje uzrokuju zdravstvene probleme, znanstvenici rade na otkrivanju novih učinkovitijih farmaceutika, kao što su antimikrobni peptidi i bakteriofagi.

### 5.1. Antimikrobni peptidi (AMP)

Jedna od novih skupina lijekova koji se istražuju su antimikrobni peptidi (AMP). To su peptidni antibiotici koje karakterizira amfipatska priroda izvedena iz njihovih pozitivnih naboja i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka.<sup>96</sup> Građeni su od 20 do 60 aminokiselinskih ostataka. Prvi prijavljeni AMP životinjskog podrijetla je defenzin, koji je izoliran iz leukocita kunića 1956. godine.<sup>97</sup> U našem organizmu su pohranjeni u epitalnim stanicama kože i u stanicama sluznice. Osim antimikrobne aktivnosti, takvi peptidi imaju veliku ulogu u stvaranju i održavanju imuniteta, u sprječavanju upalnih procesa te u zacjeljivanju rana.<sup>98</sup> Prednosti korištenja antimikrobnih peptida kao lijekova su brzo djelovanje i učinkovitost, djeluju protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih patogenih bakterija, mogu biti sintetizirani u inaktivnom obliku. Međutim, postoje i brojni nedostaci vezani uz same antimikrobne peptide koji djeluju solistički: skupa sinteza, skupa visoka proizvodnja, mogućnost toksičnosti, reducirana aktivnost zbog krvnog seruma, određenih soli i pH vrijednosti, osjetljivost na proteaze, osjetljivost i alergije organizma nakon brojnog unošenja, otpornost bakterija, remećenje nekih bioloških funkcija, farmakokinetički i farmakodinamički problemi.<sup>98</sup>

## 5.2. Bakteriofagi

Bakteriofagi (slika 22.) su virusi koji uništavaju bakterijske stanice, vežu se na njih i potom ubrizgavaju svoj genom u stanicu. Genetski promijenjeni bakteriofag može povećati smrtnost bakterije otporne na antibiotike. Nakon ulaska nukleinske kiseline u stanicu bakterijska proizvodnja virusnog genoma ometa njenu sposobnost funkcioniranja te se ne može više razmnožavati. Prednosti takve alternativne terapije je selektivnost prema sojevima bakterija, jeftiniji i brži razvoj od antibiotika, potrebna mala doza zbog porasta koncentracije bakteriofaga na mjestu infekcije. Druge prednosti terapije bakteriofaga uključuju bolju podnošljivost jer se repliciraju samo u ciljnoj bakteriji, ali ne mogu zaraziti stanice sisavaca.<sup>99</sup> Neki nedostaci su potencijalan učinak na imunološki sustav i mogućnost pojave bakterija otpornih na bakteriofage. Bakterije mogu razviti niz obrambenih mehanizama protiv bakteriofaga kao što su promjena ili gubitak receptora, lučenje tvari koje sprječavaju adheziju faga na membranu bakterija i sl.<sup>100</sup>



Slika 22. Bakteriofag pod mikroskopom (1000x).<sup>101</sup>

## 6. ZAKLJUČAK

Razvoj antimikrobne rezistencije u neprestanom je porastu. Poduzimanjem određenih mjera u mogućnosti smo smanjiti stvaranje rezistentnosti bakterija. Ključno je unaprijeđenje postrojenja za obradu otpadnih voda te korištenje napredne tehnologije. Shodno tomu, potrebno je uvesti strože propise o ispuštanju farmaceutskih spojeva u okoliš. Za razvoj novih antibiotika i alternativnih terapija važno je poticati i ulagati u istraživanja novih farmaceutskih spojeva koji su biološki razgradivi i manje štetni za okoliš. Također je bitna prevencija bakterijskih infekcija cjepivom, brigom o higijeni i sanitarnim mjerama. Neophodno je educirati stanovništvo kako odgovorno uzimati i pravilno odlagati farmaceutike te provesti strože propise za upotrebu antibiotika u humanoj medicini, veterini i poljoprivredi.

## 7. LITERATURA

- [1] Štrkalj, A., Onečišćenje i zaštita voda, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak, 2014., str. 2-60
- [2] G. Tchobanoglous, H. D. Stensel, R. Tsuchihashi, F. Burton, M. Abu-Orf, G. Bowden, W. Pfrang, Wastewater engineering treatment and resource recovery, Mc Graw Hill, London, 2014., str. 9.-15., 555.-570, 664.-667., 1492.-1493.
- [3] Zrnčević S., Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode 24 (96) (2016) 119-136.
- [4] D. Povrenović, M. Knežević, Osnove tehnologije pročišćavanju otpadnih voda, Tehnološko-metarulški fakultet, Beograd, 2013., str. 5.-148
- [5] Punda-Polić V. Mehanizmi bakterijske rezistencije na antibiotike. U Punda-Polić V, Bagatin J, Bradarić N. Antibiotici racionalna primjena. Medicinski fakultet Split 2001: 94–101
- [6] Knežević A., Racionalizacija uporabe antimikrobnih lijekova i koncepcija rezervnih antibiotika Medicus, 2000, Vol. 9 (2); 215-220.
- [7] Silver, L. L. Challenges of antibacterial discovery. Clin. Microbiol. Rev. 24, 71–109 (2011)
- [8] Ptiček Siročić A., Fujs N. Glumac N. Ispitivanje fizikalno-kemijskih pokazatelja kvalitete voda, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016) 509–514
- [9] Worldometer, 2021. Xiao, Y., Chen, T., Hu, Y., Wang, D., Han, Y., Lin, Y., Wang, X. (2014): Advanced treatment of semiconductor wastewater by combined MBR–RO technology. Desalination, 336, 168-178.
- [10] Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN (26/2020) preuzeto s: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020\\_03\\_26\\_622.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html) (pristup lipanj 2024.)
- [11] T. Sato, M. Qadir, S. Yamamoto, T. Endo, A. Zahoor, Global, regional, and country level need for data on wastewater generation, treatment, and use, Agricult. Water Manag. 130 (2013) 1–13 doi:10.1016/j.agwat.2013.08.007
- [12] Hrvatska agencija za okoliš i prirodu. (2022). Izvješće o stanju onečišćivača u Republici Hrvatskoj za 2022. godinu. [https://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/022\\_reg\\_oneciscivaca/Izvjesca/Izvje% C5%A1%C4%87e%20ROO\\_2022\\_finalno\\_web.pdf](https://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/022_reg_oneciscivaca/Izvjesca/Izvje% C5%A1%C4%87e%20ROO_2022_finalno_web.pdf) (pristup lipanj 2024.)
- [13] L.R. McDonald, E.L. Roberson, in: L.E. McDonald (Ed.), Veterinary pharmacology and therapeutics, Iowa State University Press, Ames-Iowa, 1991, pp. 897–902.

- [14] A. M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (3) (2013) 649-666.
- [15] EPA (1997.): Profile of the pharmaceutical manufacturing industry, Office of Compliance Sector Notebook Project.
- [16] Jobling S.; Nolan M.; Tyler C.R.; Brighty G.; Sumpter J.P. (1998.): Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology*, 32, 2498–2506.
- [17] Kummerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 1203–1214.
- [18] Kümmerer K. (2010.): Pharmaceuticals in the environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 35, 57- 75.
- [19] Allen H.K.; Donato J.; Wang H.H.; Cloud-Hansen K.A.; Davies J.; Handelsman J. (2010.): Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 251-259.
- [20] Orehovački, P. (2017) Okolišni aspekti primjene nanokompozitnih fotokatalizatora uz simulirano Sunčevo zračenje za uklanjanje farmaceutika iz vode. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [21] Al-Bahry S.N.; Mahmoud I.Y.; Paulson J.R.; Al-Musharafi S.K. (2014.): Survival and growth of antibiotic resistant bacteria in treated wastewater and water distribution system and their implication in human health: A review. *The International Arabic Journal of Anti microbial Agents*, 4, 2-11.
- [22] Fram, M. S., Belitz, K., Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California, *Science of the Total Environment* 409 (2011) 3409-3417
- [23] Despo Fatta-Kassinou, Sureyya Meric, Anastasia Nikolaou (2011.): Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research, *Anal Bioanal Chem* 399, 251–275.
- [24] Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1225-1234
- [25] Truong, L., Harper, S.L., i Tanguay, R.L. 2011. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, 271–279.
- [26] Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji S., A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* 32 (2006) 265-268



- [27] Anonimno. (2022). Symbiotic organs: Extreme intimacy with the microbial world. The Scientist. Preuzeto s <https://www.the-scientist.com/symbiotic-organs-extreme-intimacy-with-the-microbial-world-70493> (pristup lipanj 2024.)
- [28] Guleria, A., Biodegradation of Pharmaceutical Waste 4-Nitrophenol by *Pseudomonas putida*, Indian Journal of Research, 3 (2014) 127-130
- [29] Sciencephotolibrary. (n.d.) *Pseudomonas putida*. Preuzeto s: <https://www.sciencephoto.com/media/798804/view/pseudomonas-putida-gram-negative-sem> (pristup lipanj 2024.)
- [30] Walsh G. E. 1988. Principles of toxicity testing with marine unicelular algae. Environ Toxicol Chem 7, 979-987.
- [31] Gosset, A. (2018.). Evaluation de l'écotoxicité des Rejets Urbains par Temps de Pluie : Développement d'une batterie de bioessais et application à la conception de biocapteurs . Preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Pseudokirchneriella-subcapitata-source-wwwmokkkahu\\_fig10\\_330305216](https://www.researchgate.net/figure/Pseudokirchneriella-subcapitata-source-wwwmokkkahu_fig10_330305216) (pristup lipanj 2024.)
- [32] Zaffagnini, F. (1987): Reproduction in *Daphnia*. *Daphnia*, Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, vol. 45 (ur R. H. Peters & R. de Bernardi), pp. 245-284.
- [33] Kinsman, T. (n.d.). Water Flea, *Daphnia magna*. Preuzeto s <https://fineartamerica.com/featured/water-flea-daphnia-magna-ted-kinsman.html?product=poster> (pristup lipanj 2024.)
- [34] Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., i Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews 83 (1), 13–34.
- [35] Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture 269 (1–4), 1–20.
- [36] A-Z Animals. (n.d.). Zebrafish (Zebra Fish). Preuzeto s <https://a-zanimals.com/animals/zebrafish-zebra-fish/> (pristup lipanj 2024.)
- [37] Grabarczyk L., Mulkiewicz E., Stolte S., Puckowski A., Pazda M., Stepnowski P., Białk-Bielińska A. (2020). Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms. Environmental Science and Pollution Research (2020), 27:26103–26114, [https://www.researchgate.net/publication/341093905\\_Ecotoxicity\\_screening\\_evaluation\\_of\\_selected\\_pharmaceuticals\\_and\\_their\\_transformation\\_products\\_towards\\_various\\_organisms](https://www.researchgate.net/publication/341093905_Ecotoxicity_screening_evaluation_of_selected_pharmaceuticals_and_their_transformation_products_towards_various_organisms) (pristup lipanj 2024.)
- [38] McKenna J. Prirodni antibiotici. Zagreb: Školska knjiga; 2009;24-35.

- [39] Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010;1:134.
- [40] Kalenić S. i sur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013;130-133.
- [41] Linčir I. *Farmakologija za stomatologe*. 3 ed. Zagreb Medicinska naklada; 2011.
- [42] Bedenić, B. Antibakterijski lijekovi. *Medicinska mikrobiologija*. Uzunović-Kamberović, S. (ur.). Zenica: Štamparija Fojnica, 2009. str. 221-252
- [43] Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48, Suppl. S1:5-16.
- [44] L. Ruangpan, Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria. In manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, (2004), 31-55.
- [45] WIEGAND I., K. HILPERT, R. E. W. HANCOCK (2008.): Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3 (2), 163–75.
- [46] FERRARO, J. H. J., M. J. JORGENSEN (2009.): Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Inf. Dis.* 7750, 1749–1755.
- [47] Faculty of Pharmacy, Charles University. (n.d.). Metoda mikrodilucijskog bujona. Preuzeto s <https://portal.faf.cuni.cz/Groups/Group-of-microbiology-and-immunology/Research/> (pristup lipanj 2024.)
- [48] Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., Ntale, M. (2014): Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*. 6, 410-425.
- [49] Fouz, N., Pangesti, K. N., Yasir, M., Al-Malki, A. L., Azhar, E. I., Hill-Cawthorne, G. A., Abd El Ghany, M. (2020): The contribution of wastewater to the transmission of antimicrobial resistance in the environment: implications of mass gathering settings. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 5 (1), 33
- [50] Vardanyan, R.S., Hruby, V.J. (2006) *Synthesis of Essential Drugs*. U: *Antimicrobial Drugs*, 1.izd. Elsevier. str.499-523.
- [51] Almofti Y. A., Elnasri H. A., Bushra A., El Ayis A. A., *Antimicrobial Resistance: The Great Hurdle*, *Journal of Applied and Industrial Sciences*, 2015, 3 (5): 189-205 [https://www.researchgate.net/publication/296467559\\_Antimicrobial\\_Resistance\\_The\\_Great\\_Hurdle](https://www.researchgate.net/publication/296467559_Antimicrobial_Resistance_The_Great_Hurdle)

- [52] Gładysz I., Sikora A., Wójtowicz-Bobin M., Szepeluk A., Matuszewska R., Bartosik M., Karczewski J. K., Antibiotic sensitivity of environmental *Legionella pneumophila* strains isolated in Poland, *Ann Agric Environ Med.* 2023;30(4):602-605, <https://doi.org/10.26444/aaem/167934>
- [53] Livermore DM.  $\beta$ -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother* 1998;41(Suppl D):25–41.
- [54] Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R. Soc. London Ser. B.* 1980;289:321–31.
- [55] J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. G. Goodman, Goodman and Gillman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th Edition, McGrawHill, 1996, 1065-8.
- [56] D. C. Hooper, *The Lancet Infectious Diseases* 2 (2002) 530- 8.
- [57] Aminov, R. I. (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11 (12) 2970–2988.
- [58] Hoffman, L. R., Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., Miller, S. I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436 (25) 1171–1175.
- [59] R. S. Vandaryan, V. J. Hruba, *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, Amsterdam, 2006, str. 499–501.
- [60] F. Marinelli, O. Genilloud, *Antimicrobials*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014, str. 211–230
- [61] A. E. Fohnera, A. Sparreboom, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* 27 (2017) 164–167.
- [62] Knežević A., *Racionalizacija uporabe antimikrobnih lijekova i koncepcija rezervnih antibiotika Medicus*, 2000, Vol. 9 (2); 215-220.
- [63] Tambić Andrašević A, Tambić T. Rezistencija bakterijskih izolata u 2005. godini. U: Tambić Andrašević A, Tambić T, ur. *Osjetljivost i rezistencija bakterija na antibiotike u Republici Hrvatskoj u 2005.g.* Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2006;795.
- [64] Antimicrobial Resistance Review. (2014). *Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations.* Preuzeto s <https://amrreview.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations.pdf> (pristup lipanj 2024.)

- [65] Lebaron, P., Henry, A., Lepeuple, A.S., Pena, G., Servais, P. 2005. An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. *Mar Poll Bull* 50: 652-659.
- [66] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *E. coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb ; 2 (2) :123-40
- [67] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014.
- [68] Dhakal, P., Nepal R. (2014) Microbiological quality of slaughterhouses and antibiotic susceptibility pattern of some isolates.
- [69] Abu-Basha E. A., Gharaibeh S. M., Thabe A. M., (2012) In vitro susceptibility of resistant *Escherichia coli* field isolates to antimicrobial combinations 2012, *J. Appl. Poult. Res.* 21 :595–602. <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2011-00500>
- [70] Resistancemap. Antibiotic Resistance. Preuzeto s <https://resistancemap.onehealthtrust.org/AntibioticResistance.php> (pristup lipanj 2024.)
- [71] Jawetz, Melnick, Adelberg. (2015): Medicinska mikrobiologija. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split. 864.
- [72] Guida M., Di Onofrio V., Galle F., Gesuele E., Valeriani F., Liguori R., Spica R.V., Liguori G. (2016): *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pool water: Evidences and perspectives for new control strategy. *International journal of Enviromental Research and Public Health*. 13 (9): 919-921.
- [73] Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Carmeli Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 306–13.
- [74] Ibrahim Abu Lail, L. (2006). An atomic force microscopy study of bacterial adhesion to natural organic matter-coated surfaces in the environment.
- [75] Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K (2015) Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Pneumonia at a Single University Hospital Center in Germany over a 10-Year Period. *PLoS ONE* 10(10): e0139836. doi:10.1371/journal.pone.0139836
- [76] Štimac, I., Vasiljev Marchesi, V., Tomljenović, M., Rukavina, T. 2009. Preživljavanje vrste *Klebsiella pneumoniae* u različitim uzorcima vode. *Hrvatske vode*, 18, 13-18.
- [77] Andrašević, Š., Vranić-Ladavac, M., Tambić-Andrašević, A. 2009. Osjetljivost enterobakterija na antibiotike. *Infektološki glasnik*, 654, 171-176.

- [78] *Klebsiella pneumoniae* panophthalmitis. Tumblr. Preuzeto s <https://10minus6cosm.tumblr.com/post/105854165431/klebsiella-pneumoniae-panophthalmitis> (pristup lipanj 2024.)
- [79] ] El Nekidy W. S., Y. Mooty M., Attallah N., Cardona L, Bonilla M. F., M. Ghazi I. Successful treatment of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* using dual carbapenem regimen in immunocompromised patient 2017(9):53-55 <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.06.005>
- [80] Phin N., Parry-Ford T., Harrison T., Stagg H.R., Zhang N., Kumar K. (2014.): Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis.*, 14, 1011–1021.
- [81] Flemming, H.C. (2011.): *Biofilm Highlights*. Springer Verlag, Berlin, Germany
- [82] ] American Society for Microbiology. (2021). Cooling Tower of Terror: Legionella's Public Health Impact. Preuzeto s <https://asm.org/articles/2021/march/cooling-tower-of-terror-legionella-s-public-health> (pristup lipanj 2024.)
- [83] Al-Matawah Q. A., Al-Zenki S. F., Qasem J. A., E. Al-Waalan T., H.Ben Heji A. (2012) Detection and Quantification of *Legionella pneumophila* from Water Systems in Kuwait Residential Facilities 2012(4):138389,
- [84] Smith, J. D., & Johnson, A. (2022). Impact of pollution on urban environments. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(10), 1234-1245. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-022-22950-9/figures/1> (pristup lipanj 2024.)
- [85] Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, urednici. "Medicinska mikrobiologija (Jawetz, Melnick i Adelberg)". Dvadeset šesto američko izdanje/prvo hrvatsko izdanje. Split: Placebo d.o.o., 2015 (prijevod udžbenika). str. 199-250.
- [86] Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus Aureus*. [obnovljeno July 17, 2023.]. In: *Stat Pearls* [Internet]. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing;2021 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- [87] Ragab T., Rady A., Mahmoud M. A., (2021). The antimicrobial effect of *Bacillus* secondary metabolites on the human pathogen.
- [88] S. Abdalrahman L. S. , Stanley A., Wells H., Fakhr M. K. (2015) Isolation, Virulence, and Antimicrobial Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) Strains from Oklahoma Retail Poultry Meats12(6), 6148-6161 <https://doi.org/10.3390/ijerph120606148>

- [89] Franz CM, Holzapel W (2004) The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues. U: Salminen S, von Wright A (ured.) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3 izd., CRC Press, Boca Raton, str. 199-231.
- [90] Franz, C., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapel, W.H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety, *International Journal of Food Microbiology*. 2003;88(23):106-111.
- [91] KRISTICH, C. J., L. B. RICE and C. A. ARIAS (2014): Enterococcal infection - Treatment and antibiotic resistance. In: Gilmore, M. S., D. B. Clewell, Y. Ike and N. Shankar: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- [92] Kowalski J., Rygas J., Homa K., Dobrzyński W., Dobrzyński M. (2015). Evaluation of Antimicrobial and Antifungal Efficacy of Inter Appointment Intracanal Medicaments against *Enterococcus* and *Candida albicans*: An *In Vitro* Study Preuzeto s
- [93] Barlow RS, McMillan KE, Duffy LL, Fegan N, Jordan D, Mellor GE (2017) Antimicrobial resistance status of *Enterococcus* from Australian cattle populations at slaughter. *PLoS ONE* 12(5): e0177728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177728>
- [94] Doron S, Davidson L.E. Antimicrobial Stewardship: *Mayo Clin Proc*; Nov 2011;86(11):1113-11235.
- [95] Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1:134.
- [96] AOKI, W., M. UEDA (2013): Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals*, 6(8), 1055–1081.
- [97] BAHAR, A., D. REN (2013): Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575
- [98] Y. J. Gordon, E. G. Romanowski, *Curr Eye Res*. 30 (2005) 505–515.
- [99] Kakasis, A.; Panitsa, G. Bacteriophage Therapy as an Alternative Treatment for Human Infections. A Comprehensive Review. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2019, 53 (1),16–21.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857918302632?via%3Dihub>
- [100] Seed, K. D.; Faruque, S. M.; Mekalanos, J. J.; Calderwood, S. B.; Qadri, F.; Camilli, A. Phase Variable O Antigen Biosynthetic Genes Control Expression of the Major Protective Antigen and Bacteriophage Receptor in *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Pathog* 2012, 8 (9), e1002917. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002917>.
- [101] Science Photo Library. (n. d.). Phage Therapy TEM. Preuzeto s <https://www.sciencephoto.com/media/891869/view/phage-therapy-tem> (pristup lipanj 2024.)

## 8. ŽIVOTOPIS

Maja Bujan [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje pohađala je u osnovnoj školi „OŠ Gornje Vrapče“ u Zagrebu nakon čega 2015. godine upisuje X. gimnaziju „Ivan Supek“. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja, 2019. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Ekoinženjerstvo. Tijekom studiranja radila je studentske poslove izvan struke, a stručnu praksu odradila je na Institutu „Ruđer Bošković“ u laboratoriju za radioekologiju unutar zavoda koji se bavi istraživanjem mora i okoliša.