

# Bioremedijacija lijekova u vodi

---

Uhrl, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:417115>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Klara Uhl

Prediplomski studij Znanosti o okolišu

# **Bioremedijacija lijekova u vodi**

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Klara Uhl

Undergraduate Study of Environmental sciences

# **Bioremediation of pharmaceuticals in water**

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Znanosti o okolišu na zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tomislava Ivankovića.

---

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek  
Prediplomski studij Znanosti o okolišu

Završni rad

## Bioremedijacija lijekova u vodi

Klara Uhlr

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

**Sažetak:** Prisutnost novih zagađivala u vodenim ekosustavima postaje ozbiljan globalni problem. Prekomjerna proizvodnja i potrošnja farmaceutskih proizvoda uzrokovala je njihovo nakupljanje u vodnim tijelima. Zbog mogućeg štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, ali i zdravlje okoliša, razvijaju se alternativne metode za pročišćavanje otpadnih voda farmaceutske industrije. Biološke metode obrade su danas u širokoj upotrebi zbog ekonomičnosti te ekološke prihvatljivosti. Bioremedijacija podrazumijeva iskorištavanje metabolizma mikroorganizama za uklanjanje onečišćivača iz okoliša. Primjenom metoda bioaugmentacije ili biostimulacije dodatno možemo ubrzati razgradnju lijekova u otpadnoj vodi.

Ključne riječi: farmaceutici, farmaceutske otpadne vode, biološke metode obrade (18 stranica, 2 slike, 1 tablica, literaturna navoda 18, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Undergraduate Study of Environmental sciences

Bachelor thesis

### Bioremediation of pharmaceuticals in water

Klara Uhrl

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

**Summary:** The presence of new pollutants in water ecosystems becomes a serious global problem. Excessive production and consumption of the pharmaceutical products causes their accumulation in water bodies. Because of the possible harmful impact on human health but also on welfare of the environment new alternative methods have been developed. These methods are used for cleaning the liquid waste which is the result of pharmaceutical industry. Biological methods of water treatment are widespread due to their economic and ecological suitability. Bioremediation implies the use of microorganisms and their metabolism for the pollutant elimination in the environment. The application of methods such as bioaugmentation and biostimulation additionally increases drugs breakdown in liquid waste.

Keywords: pharmaceuticals, pharmaceutical waste water, biological treatment  
(18 pages, 2 figures, 1 table, references 18, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>7</b>
<b>2. FARMACEUTICI I NJIHOVI IZVORI U OKOLIŠU .....</b>	<b>7</b>
<b>3. FARMACEUTSKE OTPADNE VODE .....</b>	<b>3</b>
<b>4. OBRADA OTPADNIH VODA FARMACEUTSKE INDUSTRIJE.....</b>	<b>4</b>
4.1.    BIOREMEDIJACIJA.....	4
4.1.1.    BIOREMEDIJACIJA ANTIBIOTIKA .....	6
4.1.2.    BIOREMEDIJACIJA NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA .....	8
4.1.3.    BIOREMEDIJACIJA ANTINEOPLASTIČNIH LIJEKOVA.....	9
4.1.4.    BIOREMEDIJACIJA ANTIDEPRESIVA .....	12
4.2.    FIZIKALNO KEMIJSKI PROCESI OBRADE .....	13
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>15</b>
<b>6. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>16</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>18</b>

## 1. UVOD

Voda je esencijalni resurs koji ima veliku važnost za život ljudske populacije. Ubrzani porast broja stanovnika i urbanizacija, naročito u zemljama u razvoju te nagli početak industrijalizacije sredinom prošloga stoljeća, doveli su do ozbiljnih onečišćenja vodnih tijela. Povećane emisije industrijskih otpadnih voda u velikim gradovima, predstavljaju sve veći rizik za okoliš.

Posljednjih desetljeća pronađena je velika količina organskih i anorganskih tvari čije djelovanje na ljudsko zdravlje još nije u potpunosti poznato. U tu skupinu ubrajaju se i farmaceutske aktivne tvari iz različitih lijekova. Njihova prisutnost u vodenim ekosustavima, a posebice u vodi za piće predstavlja sve veću zabrinutost zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje i žive organizme prisutne u vodi. Kako bi se smanjio mogući štetan učinak ovih tvari, razvijaju se brojne metode kojima bi se ovi onečišćivači uklonili iz okoliša. U ovome radu biti će razmotreni mogući učinci farmaceutskih proizvoda na zdravlje ljudi i ostalih organizama te će biti objašnjene metode obrade otpadnih voda s naglaskom na biološke procese obrade.

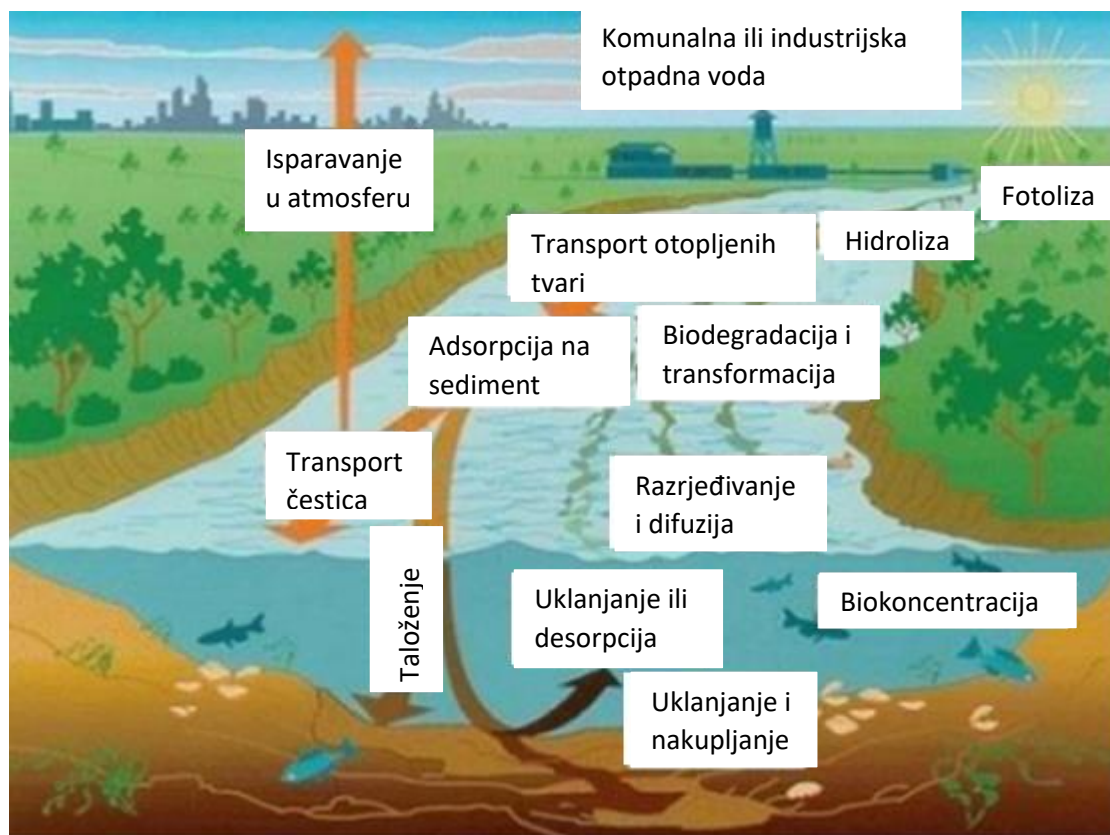
## 2. FARMACEUTICI I NJIHOVI IZVORI U OKOLIŠU

Razvojem medicine proizvodnja i potrošnja farmaceutskih proizvoda naglo se povećava. Velika količina ovih proizvoda svakodnevno se koristi u svrhu liječenja, dijagnosticiranja te sprječavanja nastanka bolesti kod ljudi i životinja. U svijetu se prema nekim procjenama za humanu medicinu koristi oko 4000 različitih farmaceutskih supstanci s različitom terapijskom primjenom, čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100000 tona (Zrnčević, 2016). Većinom su to organski spojevi molekulske mase od 200 do 500 Da, dobre topljivosti i adsorpcije što im omogućuje postojanost u okolišu (Vuković Domanovac i sur. 2019 ; Zrnčević, 2016). S obzirom da su u okolišu prisutni u mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama možemo ih svrstati u skupinu mikrozađivala.

Nakon primjene, farmaceutici se iz organizma izlučuju fekalijama ili urinom te tako dospijevaju u komunalne otpadne vode. Sustavom cjevovoda dolaze u uređaje za obradu komunalnih



otpadnih voda gdje mogu podleći razgradnji. Općenito su se uređaji za obradu otpadnih voda pokazali neučinkovitim u uklanjanju niskomolekulskih spojeva poput farmaceutika (Zrnčević, 2016). Veliki broj farmaceutika koji se nije uspio razgraditi odlazi u površinske vode, a procjeđivanjem kroz tlo i u podzemne vode. Daljnja sudbina lijeka ovisi o njegovoj otpornosti na mikrobiološku razgradnju i afinitetu vezanja na krute čestice. Farmaceutici s velikom sposobnošću adsorpcije akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode gdje podliježu daljnjoj biotičkoj transformaciji (Slika 1, Deželalija 2017). Glavni izvor zagađenja površinskih i podzemnih voda je farmaceutska industrija te farme na kojima se lijekovi, posebice antibiotici dodaju životinjskoj hrani u svrhu poboljšanog rasta. Gnojenjem, antibiotici se mogu prenijeti na poljoprivredno zemljište, a njegovim ispiranjem i u podzemne vode. Ostali načini zagađenja su bolnice te nepropisno odloženi lijekovi.



Slika 1. Shematski prikaz sudbine farmaceutika u okolišu (Preuzeto iz Deželalija 2017)

Zbog široke primjene lijekovi su danas u okolišu sveprisutni, a kako se radi o biološki aktivnim tvarima, dovoljne su i vrlo male doze za štetno djelovanje na ljude i ostale žive organizme. Problemi vezani uz prisutnost lijekova u okolišu uključuju poremećaje fizioloških procesa, pojavu

rezistentnih bakterija te povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih supstanci (Zrnčević, 2016). Prve spoznaje o mogućem štetnom utjecaju farmaceutika na okoliš i živi svijet objavljene su početkom dvadesetog stoljeća kada su znanstvenici otkrili pojavu feminiziranih mužjaka riba u rijekama (Vuković Domanovac i sur. 2019). Feminizacija je povezana s djelovanjem sintetskog estrogenog hormona  $17\alpha$ -etinil estradiola koji se koristi za kontracepciju. Osim estrogenih spojeva, u vodama su zabilježene i velike koncentracije nekih antiepileptika koji utječu na smanjenje populacije vodenih kukaca te antidepresiva koji negativno djeluju na mriještenje školjaka (Vuković Domanovac et al, 2019).

### 3. FARMACEUTSKE OTPADNE VODE

Većina farmaceutskih proizvoda nastaje kemijskom sintezom u takozvanim šaržnim reaktorima. Sama kemijska sinteza vrlo je složen proces gdje se upotrebljava velika količina reaktanata, katalizatora i otapala, a važna sirovina je i voda koja se rabi prilikom obrade i formuliranja lijekova (Vuković Domanovac i sur. 2019). Tako nastaju otpadne vode koje u svom sastavu sadrže različite neizreagirane reaktante, katalizatore i ostale organske spojeve.

Zbog velike količine organske tvari, farmaceutske otpadne vode karakterizira visoka kemijska i biološka potrošnja kisika, velike količine ugljika, fosfora i dušika te varijacije u pH vrijednosti. Vrijednosti ovih parametara prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Rasponi vrijednosti karakterističnih parametara za farmaceutske otpadne vode (Preuzeto iz: Vuković Domanovac i sur. 2019)

Parametri	Vrijednosti
kemijska potrošnja kisika, mgdm <sup>-3</sup>	250-60 000
biokemijska potrošnja kisika, mgdm <sup>-3</sup>	1,3-21 000
pH	3,6-11,5
ukupni organski ugljik, mgdm <sup>-3</sup>	29,7-1202
ukupne otopljene tvari, mgdm <sup>-3</sup>	136-26 880
ukupni dušik, mgdm <sup>-3</sup>	49-370
Ukupni fosfor, mgdm <sup>-3</sup>	1-250

#### 4. OBRADA OTPADNIH VODA FARMACEUTSKE INDUSTRIJE

Sve veća koncentracija farmaceutika u okolišu potaknula je znanstvenike na otkrivanje novih metoda njihovog uklanjanja. Prisutnost farmaceutika u okolišu može izazvati brojne, već prije spomenute negativne čimbenike na žive organizme koji tamo obitavaju kao i na samog čovjeka. U tu svrhu razvijaju se različite metode obrade farmaceutskih otpadnih voda budući da su one glavni izvor farmaceutika u okolišu.

U ovom radu naglasak će biti na procesu bioremedijacije koji zbog ekološke i ekonomske isplativosti sve više nalazi primjenu u obradi otpadnih voda.

##### 4.1. BIOREMEDIJACIJA

Bioremedijacija podrazumijeva upotrebu metaboličkog potencijala bioloških organizama u svrhu uklanjanja određenog onečišćivača iz okoliša. Pod pojmom „biološki organizmi“ najčešće se misli na mikroorganizme poput algi, gljivica ili bakterija, međutim za remedijaciju okoliša moguće je upotrijebiti i biljke.

S obzirom na mjesto obrade, bioremedijacija se može provoditi in situ, na samom mjestu zagađenja, ili ex situ, u kontroliranim uvjetima izvan mjesta kontaminacije, primjerice u bioreaktorima. Jedna od prednosti ove metode jest to što bioremedijacija ne uključuje unos opasnih kemikalija u okoliš čime se smanjuje utjecaj na prisutnu zajednicu živih organizama. Također, proces se može izvoditi i u nepristupačnim predjelima te je tako utrošak energije i novca minimalan. Međutim, nedostatak bioremedijacije je taj što često traje dulje od ostalih metoda uklanjanja zagađivala te je ograničen samo na biorazgradive spojeve. Osim toga, nedavne studije su pokazale kako krajnji produkt bioremedijacije može biti puno toksičniji od početnog spoja.

Proces bioremedijacije uključuje razgradnju, uklanjanje, mijenjanje ili imobilizaciju štetnih kemikalija iz okoliša kroz djelovanje gljivica, bakterija, algi ili biljaka. Ovi mikroorganizmi proizvode različite enzime koji omogućuju uspješno uklanjanje toksikanta iz onečišćenog okoliša. Međutim biodegradacija ne ovisi samo o enzimima koje proizvode mikroorganizmi, već je proces puno složeniji. Prije nego što organizam počne razgrađivati onečišćujuću tvar, on ju treba metabolizirati. Ako je onečišćivač topljiv u vodi poput većine farmaceutika, on će lakše biti unesen u stanicu kako bi se razgradio. Bitni čimbenici o kojima ovisi bioremedijacija jesu pH vrijednost i temperatura (Sharma, 2019). PH vrijednosti koje izrazito odstupaju od one optimalne (6,5 – 8,5) mogu uvelike utjecati na učinkovitost procesa (Sharma 2019). Pri temperaturi od 20 do 30 °C postiže se optimalna aktivnost enzima te je proces biodegradacije najučinkovitiji (Vuković Domanovac i sur. 2019). Često se prilikom bioremedijacije dodaju biogeni elementi poput dušika i fosfora čime se dodatno potiče rast mikroorganizama. Ovaj proces nazivamo biostimulacijom. Ukoliko aktivnost mikroorganizama nije zadovoljavajuća, može se primijeniti postupak bioaugmentacije – dodavanje laboratorijski selektiranih mikroorganizama u obliku aktivnog mulja ili komposta. Učinkovitost bioaugmentacije ovisi o kemijskom sastavu zagađivala te aktivnosti i stabilnosti izoliranih mikroorganizama. Iako se najviše upotrebljava u bioremedijaciji tla, bioaugmentacija sve češće nalazi primjenu i u obradi otpadnih voda, posebice onih koje su opterećene spojevima otpornim na biorazgradnju.

Primjena bioremedijacije danas raste eksponencijalnom brzinom, a zbog ekološke i ekonomske isplativosti pokazala se vrlo učinkovitom i pouzdanom metodom. Razvoj biotehnologije i detaljnije poznavanje genetike mikroorganizama mogao bi u budućnosti povećati izgled

bioremedijacije. Međutim zbog prije navedenih nedostataka bioremedijacija i nije baš uvijek najpoželjnija tehnika remedijacije okoliša stoga se vrlo često pribjegava „nebiološkim metodama“.

#### 4.1.1. BIOREMEDIJACIJA ANTIBIOTIKA

Antibiotici su jedna od najčešće korištenih skupina farmaceutika u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Ovi lijekovi se dijele u nekoliko klasa kao što su kinoloni i fluorokinoloni, tetraciklini, sulfonamidi, makrolidi te  $\beta$  laktami (Fernandes i sur. 2021). Danas je poznato preko 250 vrsta antibiotika čije podrijetlo može biti prirodno (produkt sekundarnog metabolizma gljivica ili bakterija), polusintetsko (nusproizvodi dobiveni od prirodnih proizvoda) i sintetsko.

Podatci o potrošnji antibiotika pokazuju značajan porast konzumacije u gotovo svim državama svijeta. Prema posljednjem izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) ukupna potrošnja antibiotika iznosila je od 4,4 do 64,4 definiranih dnevnih doza (DDD) na 1000 stanovnika dnevno. Penicilini, kinoloni, makrolidi i  $\beta$  laktami jedni su od najčešće propisanih antibiotika u posljednjih nekoliko godina.

Sve veća konzumacija antibiotika dovela je do povećanja njihove koncentracije u okolišu. Danas antibiotike možemo naći u gotovo svim ekosustavima uključujući i onaj vodeni gdje izaziva niz ekoloških i medicinskih problema. Konstantno izlaganje bakterija niskim koncentracijama antibiotika uzrokuje rezistentnost na antibakterijske tvari što ugrožava život ljudi i životinja, budući da se sve veći broj infekcija ne može liječiti antibioticima. Zabrinjavajuća je činjenica kako je više od 70% bakterija rezistentno barem na jedan antibiotik, a broj smrtnih slučajeva uzrokovanih ovakvim infekcijama premašuje 35000 (Zrnčević, 2016; CDC, 2021). Najviše je rezistentnosti stvoreno prema penicilinima, tetraciklinima, ampicilinima i makrolidima (Zrnčević, 2016).

Drugi problem koji antibiotici uzrokuju u vodi jesu njihove kemijske reakcije s klorom koji se najčešće koristi za uklanjanje štetnih i patogenih bakterija. Produkti ovih reakcija su najčešće puno toksičniji od početnog farmaceutskog spoja. Ako ne dođe do reakcija s klorom antibiotici ostaju u svom originalnom obliku te se počinju stvarati kolonije „superbakterija“.

Dosadašnje studije uklanjanja antibiotika iz okoliša usredotočile su se uglavnom na fizikalno - kemijske metode poput fotolize, hidrolize, termolize ili oksidacijskih procesa. Međutim brojna ograničenja poput visokih troškova, neadekvatnosti degradacije te skupe opreme, potaknuli su

znanstvenike na istraživanje procesa bioremedijacije kao moguće alternative. Bioremedijacija se pokazala vrlo učinkovitom i ekološki prihvatljivom metodom u svrhu uklanjanja antibiotika.

Sulfametokasazol je antibiotik koji se koristi za liječenje infekcija mokraćnog sustava, a učinkovit je i protiv gram negativnih bakterija poput *L. monocytogenes* te *E. coli*. Istraživana je sposobnost pojedinačnih i mješanih bakterijskih kultura da razgrade sulfametoksazol. Utvrđeno je kako među sedam bakterijskih izolata (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. rhodocrous* i *R. zopfii*), *R. equi* ima najveću učinkovitost razgradnje, dok *P. putida* nije pokazivao sposobnost uklanjanja antibiotika (Warsito, 2022). Dodatkom ugljika u hranjivi medij može se pospiješiti aktivnost *R. erythropolis* i *R. rhodocrous* dok ostali izolati pokazuju najbolji kapacitet uklanjanja kada koriste sulfametoksazol ili glukozu kao izvor ugljika (Warsito, 2022).

Gentamicin spada u skupinu antibiotika širokog spektra te se u vodenom okolišu vrlo teško razgrađuje. Međutim, bakterijski konzorcij sastavljen od *Providencia vermicola*, *Brevundimonas diminuta*, *Alcaligenes sp.* i *Acinetobacter sp.* pokazuje učinkovitost razgradnje od 47,7 do 56,8%, izvještava Warsito (2022). Pretpostavljeno je kako *B. diminuta* ima 50% veću učinkovitost razgradnje od ostalih bakterijskih izolata. Gen *aac3iia* odgovoran je za razgradnju antibiotika, a konačni produkt degradacije je 3-acetilgentamicin (Warsito, 2022).

Kako bakterije tijekom bioremedijacije mogu steći rezistentnost na antibiotike, uporaba gljivica pokazala se boljim rješenjem. U posljednjih nekoliko godina, provedene su različite studije koje su dokazale učinkovitost gljivica u bioremedijaciji antibiotika. Ovi mikroorganizmi mogu biti učinkoviti u biodegradaciji gotovo jednako kao i bakterije, pa se sve češće upotrebljavaju i za uklanjanje nekih drugih zagađivala.

Prethodno spomenuti gentamicin vrlo lako može razgraditi *Aspergillus terreus*, gljivica izolirana iz otpadnih voda tvornice gentamicina. Ova gljivica pokazala je 95% učinkovitost u razgradnji gentamicina nakon 7 dana fermentacije pod optimiziranim uvjetima (Warsito, 2022).

Ortúzar i sur. (2022) su dokazali kako *P. osteratus* i *T. harzianum* mogu biti vrlo učinkovite u razgradnji klaritromicina. U laboratorijskim uvjetima *P. osteratus* je također uspio razgraditi oksitetraciklin (Warsito 2022). Antifungalni lijekovi bifonazol i klotrimazol mogu biti razgrađeni micelijom gljivice *Lentitus edodes*, dok antibiotik cefuroksim aksetil u potpunosti razgrađuju gljivice *Imleria badia* i *L. edodesunutar* (Ortúzar i sur. 2022).

#### 4.1.2. BIOREMEDIJACIJA NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) jedna su od najvažnijih skupina farmaceutika koja se široko koristi za ublažavanje boli, smanjenje upale te snižavanje povišene temperature. Ova skupina lijekova jedna je od najčešće korištenih terapeutika zbog niskih cijena i dostupnosti bez recepta. Prema nekim podacima otprilike 35 milijuna ljudi svakodnevno u svijetu koristi NSAID, a Kina je povećala domaću proizvodnju s 41 537 t na 46 673 t (Ortúzar i sur. 2022).

Intenzivna upotreba protuupalnih lijekova dovela je do porasta njihove koncentracije u površinskim i podzemnim vodama. Ovi farmaceutski spojevi jedni su od najčešće otkrivenih u vodenom okolišu te predstavljaju 15% od ukupnog broja lijekova otkrivenih u vodenim ekosustavima, ističu Fernandes i sur. (2021).

Zbog svog kemijskog sastava i reaktivnosti ova skupina farmaceutika može imati brojne štetne učinke na vodene ekosustave i organizme prisutne u njemu. Istraživanja su pokazala kako vrlo male količine ovih lijekova mogu uzrokovati teške malformacije te nepavilnosti u embrionalnom razvitku vodenih organizama. Studija koju su proveli Fernandes i sur. (2021) pokazala je značajno kašnjenje u izlijeganju ribe zebrice (*Danio rerio*) nakon izlaganja malim koncentracijama ibuprofena. Kod južnoameričkog soma (*Rhamida quelen*) ibuprofen može uzrokovati histološke promjene bubrega dok diklofenak (Voltaren) oštećuje bubrege, škrge i jetru vrste *Salmo trutta f. fario* (Ortúzar i sur. 2022). Također, diklofenak je uzrokovao smanjenje populacije supova u Indiji (*Gyps*) što je skoro dovelo do njihovog izumiranja (Zrnčević 2016). Osim kod kralježnjaka, NSAID može uzrokovati oštećenja i kod nekih beskralježnjaka (člankonošci, mekušci, žarnjaci) te biljaka.

Tijekom posljednjih desetljeća korišteni su brojni fizikalno-kemijski i biološki tretmani u svrhu uklanjanja nesteroidnih protuupalnih lijekova iz okoliša. Primjerice, naproksen i ketoprofen se vrlo učinkovito mogu ukloniti procesom anaerobne razgradnje, dok su oksidacijskim procesima uklonjeni diklofenak, naproksen i ketoprofen s učinkom od 80 do 100% (Cruz-Ornelas i sur. 2019). Međutim, ekonomska neisplativost te velika količina toksičnih nusprodukata dovela je do traženja alternativa za eliminaciju NSAID u vodenim okolišima.

Kako korištenje bakterijskih kultura u bioremedijaciji protuupalnih lijekova nije pokazalo značajan učinak, znanstvenici su počeli istraživati biodegradacijske sposobnosti drugih

mikroorganizama. Gljive bijele truleži (WRF) su do sada pokazale najveću učinkovitost uklanjanja širokog spektra farmaceutika putem ekstracelularnih oksidativnih enzima.

Gljiva *Trametes versicolor* jedan je od najčešće korištenih organizama u bioremedijaciji. Budući da ima lakazu i lignin peroksidaznu aktivnost te P450 kompleks, ova gljiva vrlo učinkovito može eliminirati farmaceutike iz vodenog okoliša (Akerman-Sanchez i Rojas-Jimenez 2021). Nedavno istraživanje je potvrdilo i učinkovitost ove gljive u degradaciji NSAID. U membranskom bireaktoru (MBR), *T. versicolor* je uspješno uklonio 55% diklofenaka u koncentracijama od 0,3 do 1,5 mg/L (Ortúzar i sur. 2022). Također biofilm ove gljivice je uspio razgraditi oko 99,9% diklofenaka nakon 3 sata inkubacije u nesterilnome reziduumu vode (Akerman-Sanchez i Rojas-Jimenez 2021).

Nove studije pozabavile su se istraživanjem vrste *Pleurotus djamor*, gljivicom bijele truleži iz istoimenog roda. Ova gljivica ima sposobnost ekspresije lignin celulotičkih enzima pomoću kojih može razgrađivati mnoge toksične kemikalije poput endosulfana i AZO boja, a nedavno je potvrđena i njezina uspješnost u eliminaciji NSAID. Studija koju su proveli Cruz-Ornelas i sur. (2019) pokazala je učinkovitost *P. djamor* u razgradnji diklofenaka, naproksena i ketoprofena. Postignuto je 93% uklanjanje diklofenaka te 99% uklanjanje diklofenaka u smjesi s naproksenom i ketoprofenom nakon 6h inkubacije. Razine eliminacije naproksena i ketoprofena u pojedinačnim kulturama iznosile su 90% odnosno 87% .

Iako je u nekim eksperimentima potvrđena razgradnja NSAIDS i do 100%, potrebne su veće studije kako bi se procijenila učinkovitost i isplativost korištenja gljivica u bioremedijaciji. Gljivice možda nisu jedina mogućnost za bioremedijaciju ovih lijekova te je u tu svrhu potrebno istražiti metaboličke sustave ostalih mikroorganizama poput algi ili bakterija .

#### 4.1.3. BIOREMEDIJACIJA ANTINEOPLASTIČNIH LIJEKOVA

Antineoplastični lijekovi su skupina farmaceutika koja se koriste u svrhu liječenja raka. Najčešći lijekovi koji se primjenjuju za liječenje raka uključuju ciklofosamid, tamoksifen, ifosamid te metotreksat (Ortúzar i sur. 2022). Kod liječenih pacijenata ovi lijekovi mogu izazvati čitav niz

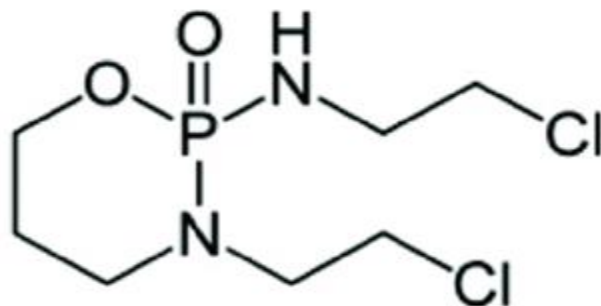


nuspojava (Mayo Clinic, 2022). Neke od njih su blage i izlječive dok druge ostavljaju teške posljedice.

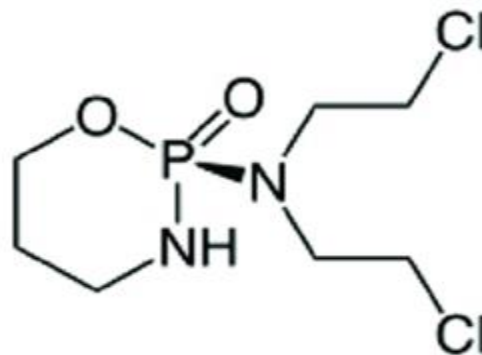
Iako su dizajnirani za ubijanje malignih stanica, ovi lijekovi nisu selektivni. To znači da ubijaju bolesne, ali i one zdrave stanice. Istraživanja su pokazala kako kronična izloženost ovim lijekovima uzrokuje histopatološke promjene u jetri i bubrezima te narušava integritet DNA uvodeći promjene u transkriptu (Ortúzar i sur. 2022). Upravo se iz toga razloga smatra kako su antineoplastični lijekovi vrlo toksični za okoliš i žive organizme. Ova skupina lijekova otkrivena je u gotovo svim površinskim vodama, podzemnim vodama te bolničkim otpadnim vodama. Budući da broj oboljelih od raka raste iz godine u godinu, očekuje se eksponencijalno povećanje ovih lijekova u okolišu. Kako bi se ipak smanjilo njihovo ispuštanje u okoliš te time i štetni učinci na ekosustave, razvijeni su različiti protokoli za njihovo pravilno skladištenje i rukovanje.

Mnoge gljivične i bakterijske vrste su se do sada pokazale vrlo učinkovitim razgrađivačima antineoplastičnih lijekova. U nastavku će biti objašnjeni rezultati nekoliko studija koje su se bavile bioremedijacijom ove skupine lijekova.

Već prije spomenuta gljivica *T. versicolor* pokazuje visoku učinkovitost uklanjanja širokog spektra antineoplastičnih lijekova. Ferrando Climent i sur. (2015) istraživali su bioremedijaciju nekih antineoplastičnih lijekova pomoću *T. versicolor*. Primjećeno je maksimalno uklanjanje za azatioparin (100%), etopozid (100%) i ciprofloksacin (97%) dok se tamoksifen slabije razgradio. Ciklofosfamid i ifosfamid se nisu uspjeli razgraditi. Ovakve rezultate možemo pripisati interakciji između gljivica i fekalnih bakterija koja je dovela do sinergističke razgradnje lijekova. Nemogućnost razgradnje ciklofosfamida i ifosfamida pripisujemo njihovoj molekulskoj strukturi. Naime, oba lijeka sadrže halogenirane funkcionalne skupine koje vjerojatno ometaju aerobnu razgradnju tako što smanjuju gustoću elektrona na mjestu reakcije (Slika 3, Chouquet i sur. 2016).



**ifosfamid**



**ciklofosfamid**

Slika 3. Dvodimenzionalni prikaz strukturne formule ifosfamida i ciklofosfamida (Preuzeto iz: Chouquet i sur. 2016)

Druga studija ispitivala je sposobnost *T. versicolor* da razgradi sulfapiridin i sulfatiazol. Nakon 24h gljivica je u potpunosti uspjela razgraditi sulfapiridin, dok za sulfatiazol nije pokazala značajniji učinak (Tripathi i sur. 2020). Korištenjem medijatora u eksperimentu (violurska kiselina) biodegradacija se kretala od 75% do 98% za sulfapiridin te od 82% do 100% za sulfatiazol (Tripathi i sur. 2020).

*Actinomicetes* pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija te morfološki nalikuju gljivama zbog izduženih stanica koje se granaju tvoreći filamente ili hife. Istraživanje koje su provodili Westamn i sur. (2012) dokazalo je rezistentnost ovih bakterija na doksorubicin, antraciklinski kemoterapeutik. Istovremeno *Streptomyces sp.* je bio sposoban razgraditi doksorubicin do alkoholnog derivata (deoksirubicinola).

Navedene studije pokazale su učinkovitost bakterija i gljivica u bioremedijaciji antineoplastičnih lijekova. Daljnja straživanja metaboličkih puteva i enzimskih sustava mogla bi pomoći znanstvenicima u otkrivanju novih bioremedijacijskih tehnologija. Na taj način bi se zaštitile površinske i podzemne vode koje su ključan faktor u ljudskom zdravlju i poljoprivrednom sektoru.

#### 4.1.4. BIOREMEDIJACIJA ANTIDEPRESIVA

Antidepresivi su važna skupina lijekova koja se koristi za liječenje psihičkih poremećaja. Mogu se podijeliti u četiri glavne klase: inhibitori monoamin oksidaze (MAOI), triciklički i tidepresivi (TCA), inhibitori ponovne pohrane norepinefrina (SNRI) i selektivni serotonin inhibitori ponovne pohrane (SSRI) (Fernandes i sur. 2021). Ova posljednja skupina antidepresiva jedna je od najčešće pripisivanih, a često se koristi za liječenje depresije, paničnih poremećaja, fobija te poremećaja prehrane.

Prema izvještaju Organizacije za ekonomsku kooperaciju i razvoj (OECD), potrošnja antidepresiva udvostručila se između 2000 i 2017 godine. Pri tome Island i Kanada bilježe najveće vrijednosti konzumacije antidepresiva, dok Mađarska, Latvija, Estonija i Koreja imaju najniže vrijednosti potrošnje (OECD, 2019). U posljednjih nekoliko godina, porast potrošnje antidepresiva bio je povezan sa ekonomskom krizom koja je teško pogodila gotovo sve europske zemlje. Također epidemija uzrokovana koronavirusom predstavlja veliki izazov za mentalno zdravlje, pa možemo očekivati novi porast konzumacije ovih lijekova.

Antidepresivi mogu ući u vodene ekosustave neučinkovitim tretmanom otpadnih voda iz bolnica i farmaceutske industrije te nepravilnim odlaganjem starih lijekova. Ovi lijekovi otkriveni su u gotovo svim vodnim tijelima uključujući i podzemne, površinske te morske vode gdje izazivaju brojne ekotoksikološke probleme. Brojna istraživanja su potvrdila kako tragovi antidepresiva u rijekama, otpadnim vodama i obalnim područjima mogu imati značajne posljedice za žive organizme. Poznato je kako antidepresivi djeluju na neurotransmitere te na taj način mijenjaju ponašanje ljudi i životinja. Primjerice mramorni rakovi (*Procambarus virginalis*) izloženi citalopramu pokazali su smanjenu količinu i brzinu kretanja što bi ih moglo učiniti lakšom metom za grabežljivce (Krsnik, 2019). Fernandes i sur. (2021) otkrivaju kako velike koncentracije antidepresiva mogu negativno utjecati na razvoj embrija i larve vrste *Danio rerio*. Autori su također zabilježili smanjenje proliferacije hepatocita u ličinaka podvrgnutih paroksitenu, mianserinu te sertralinu (Fernandes i sur. 2021).

Venlafaksin i O-desmetilvenlafaksin jedni su od najčešće otkrivenih antidepresiva u vodenom okolišu. Budući da ih konvencionalna postrojenja za obradu otpadnih voda ne mogu ukloniti, znanstvenici sve više traže rješenje u procesu bioremedijacije. Llorca i sur. (2018) istražili su sposobnost gljivica bijele truleži da razgrade ova dva lijeka. Rezultati eksperimenta su pokazali

kako *T. versicolor* i *G. lucidum* mogu ukloniti od 70 do 100% venlafaksina i O-desmetilvenlafaksina. Pri tome je primjećena manja stopa nastajanja štetnih nusprodukata čime je smanjen negativni učinak na ljudsko zdravlje i okoliš.

Duarte i sur. (2018) istraživali su sposobnost autohtonih mikroorganizama iz rijeke Duoro da razgrade parokseten. Naime, ondje je zabilježena visoka koncentracija antidepresiva i drugih lijekova uslijed ispuštanja otpadnih voda iz obližnjih industrija u rijeku. Rezultati su pokazali kako se u prvom tjednu koncentracija paroksetena izrazito smanjila, a nakon 2 tjedna mikroorganizmi su uspjeli ukloniti čak 90% lijeka. Tijekom procesa degradacije, količina fluoridnog aniona u otopini se povećavala što je svojevrsni indikator razgradnje lijeka. Bitno je naglasiti kako je u posljednjim tjednima eksperimenta izmjerena znatno veća količina biomase nego na početku. Isti eksperiment ponovljen je sa bezafibratom, poznatim  $\beta$ -blokatorom te su dobiveni slični rezultati.

#### 4.2. FIZIKALNO KEMIJSKI PROCESI OBRADE

Kao što se vidi iz prethodnih poglavlja, bioremedijacija nije uvijek najbolje rješenje za uklanjanje svih farmaceutika iz vodenog okoliša. Stoga se ona često zamjenjuje fizikalno-kemijskim metodama poput membranskih procesa, adsorpcije te naprednih oksidacijskih procesa. Membranski procesi uključuju upotrebu polupropusnih membrana različitih pora te su zato pogodni za uklanjanje velikog broja organskih i anorganskih molekula različite veličine čestica (Zrnčević, 2016). Ovi procesi pogodni su za uklanjanje nekih antibiotika, analgetika te antiepileptika.

Adsorpcija je također jedna od učinkovitih metoda za uklanjanje farmaceutika s obzirom na njihova dobra adsorpcijska svojstva. Kao adsorbens najčešće se upotrebljava aktivni ugljen zbog svoje visoke poroznosti, međutim upotrijebiti se mogu i zeoliti, glina te različiti sintetički polimeri. Učinkovitost adsorpcije ovisi o površinskom afinitetu adsorbensa i adsorbata, strukturi adsorbensa te pH vrijednosti i temperaturi vode koja se obrađuje (Vuković Domanovac, 2019).

Kod naprednih oksidacijskih procesa organska se tvar oksidira pomoću hidroksil radikala ( $\cdot\text{OH}$ ). Radikal  $\cdot\text{OH}$  je snažan kemijski oksidans, napada sve organske molekule te ih u kratkom vremenu mineralizira. Napredni oksidacijski procesi su se pokazali vrlo učinkovitima u uklanjanju

aromatskih spojeva, pesticida, nitrofenola te halogeniranih ugljikovodika (Vuković Domanovac, 2019).

Fizikalno-kemijski procesi obrade su vrlo učinkoviti u uklanjanju širokog spektra lijekova iz okoliša. Različitim postupcima moguće je dobiti vodu visoke kvalitete . Međutim potrebne su investicije u posebnu opremu te kemikalije što ove metode čini ekonomski neisplativima. Također prilikom obrade dolazi do prijenosa onečišćujućih tvari iz jedne faze u drugu čime se dodatno zagađuje okoliš.

## 5. ZAKLJUČAK

Onečišćenje okoliša toksičnim kemijskim spojevima postaje globalan problem. Zbog visoke proizvodnje i široke upotrebe, farmaceutici su prisutni u brojnim kopnenim i vodenim ekosustavima. Kako bi se spriječio njihov negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i ostali živi svijet kreiraju se standardi za njihovo pravilno odlaganje i eliminaciju. Iako se fizikalno-kemijskim postupcima može ukloniti većina farmaceutika, bioremedijacija se pokazala ekonomski prihvatljivijom i ekološki sigurnijom alternativom. Mikroorganizmi su jedan od ključnih čimbenika u bioremedijaciji te je bitno poznavanje njihovog metabolizma i ponašanja u okolišu kako bi se proces učinkovito i sigurno odvijao. Primjenom genetički modificiranih organizama, razgradnja se može odvijati brže, jer se enzimi mogu proizvoditi u većim koncentracijama nego u živim stanicama što bi poboljšalo sam proces bioremedijacije.

## 6. LITERATURNI IZVORI

Akerman-Sanchez G., Rojas-Jimenez K. (2021): Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants. A bioengineering approach to water treatment. *Environmental Advances* 4: 100071

Cruz-Ornelas R., Sánchez-Vázquez E. J., Amaya-Delgado L., Guillén-Navarro K., Calixto-Romo A. (2019): Biodegradation of NSAIDs and their effect on the activity of ligninolytic enzymes from *Pleurotus djamor*. *3 Biotech* 9(10):373

Duarte P., Almeida R. M. C., Fernandes P. J., Morais D., Lino M., Gomes R. C., Carvalho F M., Mucha P. A. (2019): Bioremediation of bezafibrate and paroxetine by microorganisms from estuarine sediment and activated sludge of an associated wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment* 655: 796-806

Fernandes P. J., Almeida R. M. C., Salgado A. M., Carvalho F M., Mucha P. A. (2021): Pharmaceutical Compounds in Aquatic Environment- Occurance, Fate and Bioremediation Prospective. *Toxics* 9, 257

Ferrando-Climent L., Cruz-Morató C., Marco-Urrea E., Vincet T., Sarrà M., Rodríguez-Mozaz S. (2015): Non conventional biological treatment based on *Trametes versicolor* for the elimination of recalcitrant anticancer drugs in hospital wastewater. *Chemosphere* 136: 9-19

Krsnik J. (2019): Utjecaj antidepresiva i amfetamina na fiziološke pokazatelje u invazivne strane vrste signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb

Llorca M., Castellet-Rovira F., Farré J. M., Jaén-Gil A., Martínez-Alonso M., Rodríguez-Mozaz S., Sarrà M., Barceló D. (2019): Fungal biodegradation of the N-nitrosodimethylamine precursors venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in water. *Environmental Pollution* 246: 346-356

Mayo Clinic (2022) Chemoterapy <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/chemotherapy/about/pac-20385033> (pristupljeno 10.7.2022)

Miloloža M. (2018): Procjena utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjstva i tehnologije, Zagreb

OECD (2019): Pharmaceutical consumption. U: OECD Health at glance. OECD Publishing, str. 210

Ortúzar M., Esterhuizen M., Olicón-Hernández R. D., González-López J., Aranda E. (2022): Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Frontiers in Microbiology* 26

Sharma I. (2019): Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. U: Murillo-Tovar A. M (ur) Trace Metals in the Environment- New Approaches and Recent Advances. IntechOpen , str. 34-40

Tripathi K. A., David A., Govil T., Raunyar S., Rathinam K. N., Goh M. K., Sani R., (2020): Environmental Remediation of Antineoplastic Drugs: Present Status, Challenges, and Future Directions. *Processes* 8(7): 747

Vuković-Domanovac M., Šabić-Runjavec M., Janton N., Kučić-Grgić D. (2019): Bioremedijacija farmaceutske otpadne vode. *Kemijska Industrija* 68(9-10): 437-445

Warsito M. F. (2022): A review on potential microbes for bioremediation of antibiotics contamination in the environment. : *Earth and Environmental Science* 1017 012026

Westman L. E., Canova J. M., Radhi J. I., Koteva K., Kireeva I., Waglechner N., Wright D. G. (2012): Bacterial Inactivation of the Anticancer Drug Doxorubicin. *Chemistry and Biology* 19: 1255-1264

WHO (2020) Antibiotic resistance <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (pristupljeno 8.7.2022.)

Zrnčević S. (2016): Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije. *Hrvatske vode* 96: 119-136



## 7. ŽIVOTOPIS

Klara Uhlr rođena je 14.6. 2000 u Zagrebu. Završila je Osnovnu školu Ivane Brlić Mažuranić u Ogulinu te Gimanziju Bernardina Frankopana 2019. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Još u gimanziji pokazuje interes za biologiju. Želi upisati studij eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija.