

# Bioremedijacija kationskog surfaktanta benzalkonijevog klorida

---

Đapić, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:761672>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**Domagoj Đapić**

**BIOREMEDIJACIJA KATIONSKEG SURFAKTANTA BENZALKONIJEVOG  
KLORIDA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za bakteriologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Tomislava Ivankovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Od srca zahvaljujem svojem mentoru, docentu Tomislavu Ivankoviću na iskazanom povjerenju, izdvojenom vremenu, susretljivosti, strpljivosti, pomoći i savjetima tijekom provedbe i pisanja ovoga diplomskog rada. Najveća hvala Bogu, mojoj obitelji, mojim kolegama, nastavnicima, profesorima i svima ostalima na bezuvjetnoj podršci, pomoći, razumijevanju i vjeri u mene tijekom studija. Hvala i Google prevoditelju što mi je olakšao pisanje diplomskog rada. Bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Bioremedijacija kationskog surfaktanta benzalkonijevog klorida**

Domagoj Đapić,

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Tema je mojega diplomskog rada bioremedijacija benzalkonijeva klorida, cikličnog aromatskog ugljikovodika koji služi kao biocid i kationski surfaktant. Upotrebljava se u prašcima za pranje rublja i omekšivačima za tkanine. Bioremedijacija je svaki proces koji se koristi mikroorganizmima u svrhu vraćanja okoliša u prirodno stanje prije nego što je nastupilo onečišćenje ili zagađenje iz nekog antropogenog izvora. Cilj mojega diplomskog rada jest utvrditi mogu li benzalkonijev klorid razgrađivati prirodno prisutne bakterije iz Jarunskog jezera i jezera u Botaničkom vrtu ili bakterije iz aktivnog mulja, otpadne vode, tla te suspenzije bakterija *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aeruginosa*. Nije bilo na pločama s bakterijskim agarom kolonija bakterija *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*, što znači da te bakterije nisu razgrađivale benzalkonijev klorid. Bakterije iz jezera Jarun i jezera u Botaničkom vrtu nisu razgradile benzalkonijev klorid. Bakterije iz otpadne vode, aktivnog mulja i tla koje smo izolirali u laboratoriju razgradile su benzalkonijev klorid u potpunosti. Bakterije koje su identificirane kao razgrađivači benzalkonijevog klorida jesu *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Bacillus cereus*.

(37 stranica, 14 slika, 4 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi : bioremedijacija, benzalkonijev klorid, *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*.

Voditelj: Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Ocjenitelji: Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Rad prihvaćen: 7. lipnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation thesis

### **Bioremediation of cationic surfactant benzalkonium chloride**

Domagoj Đapić,

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The topic of my graduate thesis is bioremediation of benzalkonium chloride, a cyclic aromatic hydrocarbon that serves as a biocide and a cationic surfactant. It is used in laundry detergents and fabric softeners. Bioremediation is any process that uses microorganisms for the purpose of restoring the environment to a natural state before pollution or contamination from an anthropogenic source occurred. The aim of my graduate thesis is to determine whether benzalkonium chloride can be degraded by native bacteria from Lake Jarun and lake in botanical garden or specifically grown bacteria from activated sludge, wastewater, soils and suspensions of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. It was not on bacterial agar plates any bacterial colonies of *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, meaning that these bacteria did not break down benzalkonium chloride. Native bacteria from Jarun lake and lake in the botanical garden did not degrade benzalkonium chloride either. Bacteria from the waste water, the activated sludge and the soil we isolated in the laboratory degraded the benzalkonium chloride completely. Bacteria identified as benzalkonium chloride degraders were *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Bacillus cereus*.

(37 pages, 14 figures, 4 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the central Biological Library

Key words: bioremediation, benzalkonium chloride, *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*.

Supervisor: Dr. Tomislav Ivankovic, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Tomislav Ivankovic, Asst. Prof.

Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof.

Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Thesis accepted: June, 7th 2018

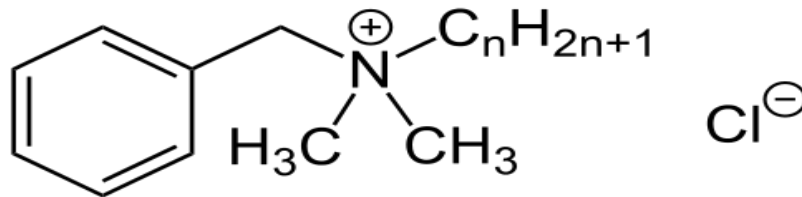
## KAZALO

1. UVOD	1
1.1. Bioremedijacija	1
1.2. Strategije bioremedijacije	3
1.2.1. <i>In situ</i> bioremedijacija	4
1.2.2. <i>Ex situ</i> bioremedijacija	5
1.2.3. Bioreaktori	6
1.3. Surfaktanti u okolišu	6
1.3.1. Svojstva i podjele	6
1.3.2. Toksičnost za okoliš	7
1.3.3. Biodegradacija u okolišu	9
1.4. Benzalkonijev klorid	10
2. CILJ RADA	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Izolacija razgrađivača iz okoliša	13
3.2. Otkrivanje najpogodnije vrste bioremedijacije	14
3.3. Identifikacija razgrađivača	16
4. REZULTATI	17
4.1. Izolacija razgrađivača	17
4.2. Bioremedijacija	18
4.3. Identifikacija razgrađivača	20
5. RASPRAVA	22
5.1. Razgrađivači benzalkonijeva klorida	22
5.1.1. <i>Agrobacterium radiobacter</i>	22
5.1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24
5.1.3. <i>Bacillus cereus</i>	27
5.2. Usporedba rezultata pokusa	30
6. ZAKLJUČAK	32
7. LITERATURA	33
8. ŽIVOTOPIS	37

## 1. UVOD

### 1.1. Bioremedijacija

Tema mojega diplomskog rada bit će bioremedijacija benzalkonijeva klorida, cikličnog aromatskog ugljikovodika strukturne formule  $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$  koji služi kao biocid i kationski surfaktant (slika 1). Upotrebljava se u prašcima za pranje rublje i omekšivačima za tkanine.



$$n = 8, 10, 12, 14, 16, 18$$

Slika 1. Strukturna formula benzalkonijeva klorida

Bioremedijacija je svaki proces koji se koristi mikroorganizmima u svrhu vraćanja okoliša u stanje prirodne ravnoteže kakvo je bilo prije nego što je nastupilo onečišćenje ili zagađenje iz nekog ljudskog izvora koje je toksično jer uzrokuje odumiranje biljnoga i životinjskoga svijeta. Bioremedijacija se dijeli na bioatenuaciju, biostimulaciju i bioaugmentaciju. Bioatenuacija je sposobnost mikroorganizama da sami razgrade kemikaliju. Biostimulacija je sposobnost mikroorganizama da razgrade kemikaliju uz dodatak dušika, fosfora i kalija. Bioaugmentacija je proces u kojemu se dodaju ciljani organizmi koji će razgraditi kemikaliju.

U bioremedijaciji se upotrebljava mikrobn metabolizam u prisutnosti optimalnih uvjeta okoliša i dovoljnih nutrijenata da razgradi različite zagađivače iz ljudskih izvora koji znače opasnost za prirodni okoliš od teških metala i radionuklida preko organskih spojeva kao što su detergents, surfaktants i ugljikovodici nafte do eksploziva, pesticida i plastike. Za upotrebu mikroba u modernoj bioremedijaciji zaslužan je George Robinson (Godleads i sur., 2015). On je upotrijebio mikrobe da konzumiraju izljeve nafte uzduž obala Santa Barbare u Kaliforniji u kasnim šezdesetima. Od 80-ih godina 20. stoljeća bioremedijacija je predmet istraživanja. Biostimulacijske i bioaugmentacijske studije veoma su prisutne u literaturi i pregledi su ovih tehnologija koji se orijentiraju na tehničke aspekte mnogobrojni. Očito, selekcija tehnologija ovisi o strani specifične opreme, o dostupnosti mikroorganizama koji su sposobni za degradaciju u zadovoljavajućim količinama, o dostupnosti nutrijenata da podupiru rast



mikroorganizama, o okolišnim parametrima kao što su temperatura, pH, prisutnost kisika i ostalih akceptora elektrona i o duljini izloženosti. Obilježja mjesta kao što su tip tla i faktori okoliša imaju znatan utjecaj na učinkovitost bilo koje strategije bioremedijacije (Godleads i sur., 2015). Taj proces ovisi o optimalnoj prisutnosti raznih drugih čimbenika koji podržavaju biološke funkcije (Tablica 1.), a to su:

**1. kontaminantne koncentracije:** izravno utječu na mikrobnu aktivnost. Kada su koncentracije previsoke, kontaminanti mogu imati toksične učinke na bakterije. Nasuprot tomu, koncentracija niskog onečišćenja može spriječiti indukciju bakterijskih degradacijskih enzima (Godleads i sur., 2015).

**2. bioraspoloživost kontaminanta:** ovisi o stupnju do kojeg su kontaminanti apsorbirani unutar krutina, odvojeni od drugih molekula u kontaminiranom mediju, raspršeni u makroporama tla ili sedimenta, ili drugi čimbenici kao što je prisutnost zagađivača u nevodenoj fazi. Bioraspoloživost za mikrobne reakcije niža je za zagađivače koji su snažnije apsorbirani u krutinama, zatvoreni u matricama molekula u kontaminiranim medijima, široko rasprostranjeni u makroporama tla i sedimenta ili su prisutni u obliku nevodene faze tekućine (Godleads i sur., 2015). Za visoke koncentracije kontaminanta, tlo je pomiješano u vodenoj otopini da, zadržavajući svojstvo površinski aktivnoga sredstva, odvoji vodu od tla. Tada bioremedijacija počinje učinkovito čistiti tlo (Das, 2014).

**3. redoks-potencijal i sadržaj kisika:** tipiziranja oksidacijskih ili redukcijskih uvjeta. Na redoks-potencijal utječu prisutnost akceptora elektrona kao što su nitrat, manganovi oksidi, željezni oksidi i sulfat (Godleads i sur., 2015).

**4. hranjive tvari:** potrebne su za rast i podjelu mikrobnih stanica. Prikladne količine hranjivih tvari u tragovima za rast mikroba obično su prisutne, ali se hranjive tvari mogu dodati u upotrebljivom obliku ili preko amandmana organskog supstrata koji također služi kao donator elektrona kako bi se stimulirala bioremedijacija (Godleads i sur., 2015). Tip bioremedijacije ovisi o koncentraciji kontaminanta te o prisutnosti i odsutnosti drugih nutrijenata kao što su fosfor i sumpor. Za optimalnu mikrobiološku bioremedijaciju prehrambene potrebe ugljika u odnosu prema dušiku jesu 10 : 1 i ugljika u odnosu prema fosforu 30 : 1 (Das, 2014).

**5. sadržaj vlage:** mikrobiološki rast zahtijeva optimalnu prisutnost vode. Za optimalni rast i proliferaciju mikroorganizmi zahtijevaju 12 do 25 % vlage (Godleads i sur., 2015).

**6. pH-vrijednost:** u optimalnom rasponu od 6 do 8 (Godleads i sur. 2015).

**7. temperatura:** izravno utječe na brzinu mikrobiološkog metabolizma i posljedično na mikrobnu aktivnost u okolišu. Brzina biorazgradnje raste povećanjem temperature, a usporuje s padom temperature (Godleads i sur., 2015).

Tablica 1. Optimalni uvjeti potrebni za mikrobiološku aktivnost (Das, 2014)

Okolišni faktori	Optimalni uvjeti	Uvjeti potrebni za mikrobiološku aktivnost
dostupnost vlage tla	25 – 85 % kapaciteta zadržavanja vode	25 – 85 % kapaciteta zadržavanja vode
kisik	>0,2 mg/L, >10 % zrakom ispunjenog prostora za aerobnu biodegradaciju	aerobni, pore minimalno ispunjene zrakom od 10 %
redoks-potencijal	Eh >50 mV	
nutrijenti	C (ugljik) : N (dušik) : P (fosfor) = 120 : 10 : 1, molarni omjer	N (dušik) i P (fosfor) za mikrobiološki rast
pH	6,5 – 8,0	5,5 – 8,5
temperatura	20 – 30 °C	15 – 45 °C
zagađivači	ugljikovodici 5 – 10 % od suhe težine tla	ne previše toksični
teški metali	700 ppm	ukupni sadržaj 2000 ppm

## 1.2. Strategije bioremedijacije

Izvedivost bioremedijacije ovisi o lokaciji onečišćenja. Pristupi za provedbu bioremedijacije ovise o tome je li utrošeno tlo koje se tretira netaknuto u okolišu ili se treba uzeti za obradu u pogonu izvan mjesta onečišćenja. Ako je na licu mjesta, dovoljan je termin *in situ*, a, ako je izvan mjesta, opisano je kao *ex situ*. Neki su se autori ovime koristili kako bi opisali vrstu bioremedijacije. Međutim, potrebno je utvrditi što se točno radi u *in situ* i *ex situ* bioremedijaciji i rabiti ih kako bi se opisale vrste bioremedijacije (Das, 2014).

### 1.2.1. *In situ* bioremedijacija

*In situ* bioremedijacija jest aplikacija biološkog tretmana koja služi tomu da počisti onečišćenje prisutno u okolišu na licu mjesta. Optimizacija i kontrola mikrobioloških transformacija organskog onečišćenja zahtijeva integraciju mnogih znanstvenih i inženjerskih disciplina. Neke od *in situ* strategija opisane su ovdje (Das, 2014).

#### 1. Bioatenuacija

Bioatenuacija se svodi na sposobnost mikroorganizama da sami razgrade kemikaliju. Može biti ondje gdje je onečišćenje nastalo (*in situ*), ali može biti i *ex situ* ako želimo u laboratoriju iz okoliša izolirati razgrađivače određene kemikalije.

#### 2. Biostimulacija

Biostimulacija uključuje modifikaciju okoliša za poticanje postojećih bakterija sposobnih za bioremedijaciju. To se može postići dodavanjem različitih oblika ograničavajućih hranjivih tvari i akceptora elektrona, kao što su fosfor, dušik, kisik ili ugljik (npr. u obliku melase), koji su inače dostupni u količinama dovoljno niskima da ograničavaju mikrobnu aktivnost. U biostimulacijske metode ubrajaju se nove tehnologije poput biosparinga, bioventinga i biospilinga (Das, 2014).

**Biosparing** uključuje injekciju zraka pod tlakom da bismo povećali koncentraciju kisika i stopu biološke degradacije kontaminanta bakterijama koje se prirodno upotrebljavaju. Biosparing povećava miješanje u saturiranoj zoni i time povećava kontakt između tla i podzemne vode. Lakoća i niži trošak instaliranja malenog dijametra injekcije zraka osiguravaju znatnu fleksibilnost u dizajnu konstrukcije sistema (Das, 2014).

**Bioventing** je obećavajuća nova tehnologija koja stimulira prirodnu *in situ* biodegradaciju bilo koje aerobno razgradive supstancije pružanjem kisika postojećim mikroorganizmima u tlu. Upotrebljava niski tlak zraka da pruži dovoljno kisika za održavanje mikrobiološke aktivnosti. Kisik se često isporučuje uštrcavanjem u preostali zagađivač u središtu bušotine (Das, 2014).

**Biospiling** je kompletna tehnologija gdje su iskopana tla pomiješana s dopunama tla, stavljena na tretirano područje i dalje bioremedizirana primjenom prisilne aeracije (Das, 2014).

Primarna prednost biostimulacije jest u tome da će bioremedijacija biti učinjena s već prisutnim nativnim mikroorganizmima koji su dobro prilagođeni podzemnom okolišu i

prostorno su raspoređeni unutar podzemlja. Primarni izazov da se aditivi isporučuju na način koji im omogućuje da budu lako dostupni mikroorganizmima ispod površine temelji se na lokalnoj geologiji podzemlja. Čvrsta, nepropusna podzemna litologija (uske gline ili drugi sitnozrnati materijal) otežava širenje aditiva kroz zahvaćeno područje. Prijelomi u podzemlju stvaraju povlaštene putove u podlozi i pri tome sprečavaju ravnomjernu raspodjelu aditiva. Dodatak hranjivih tvari može također promicati rast heterotrofnih mikroorganizama koji nisu urođeni degradatori naftnih ugljikovodika, stvarajući tako konkurenciju između rezidentne mikroflore (Godleads i sur., 2015).

### **Bioaugmentacija**

Od sedamdesetih godina prošloga stoljeća predložena je bioaugmentacija ili dodavanje mikroorganizama koji razgrađuju ulje za dopunjivanje autohtonih populacija kao alternativnu strategiju bioremedijacije okoliša onečišćenih uljem. Bioaugmentacija uključuje uvođenje mikroorganizama izoliranih iz kontaminiranog područja ili pomno odabranih i genetski modificiranih, kako bi se potaknula sanacija mjesta kontaminiranih na ugljikovodiku na temelju pretpostavke i/ili potvrde da autohtoni organizmi ne mogu biodegradirati naftne ugljikovodike. Razlog za ovakav pristup jest da autohtone mikrobne populacije ne moraju biti sposobne degradirati širok raspon potencijalnih supstrata prisutnih u složenim smjesama kao što su nafta ili da mogu biti u stresnom stanju kao rezultat nedavnih izlivanja (Das, 2014).

Da bi taj pristup bio uspješan, mikroorganizmi moraju biti kadri degradirati većinu komponenti, održavati genetsku stabilnost i održivost tijekom skladištenja, preživjeti u stranim i neprijateljskim sredinama, učinkovito se natjecati s autohtonim mikroorganizmima i prelaziti kroz pore sedimenta do zagađivača. Uspješni tretmani biorasploživosti ovise o uporabi inokula koji se sastoji od mikrobnih sojeva ili mikrobnih konzorcija koji su dobro prilagođeni mjestu koje treba dekontaminirati (Das, 2014).

#### *1.2.2. Ex situ* bioremedijacija

Najčešća *ex situ* bioremedijacija uključuje kompostiranje, koje je proces u kojemu organski otpad degradiraju mikroorganizmi tipično pri povišenim temperaturama. Tipična temperatura kompostiranja u rasponu je od 55 do 65 °C. Temperatura se povisuje zbog topline koju mikroorganizmi proizvode tijekom biodegradacije organskog materijala u otpadu (Das, 2014).

### 1.2.3. Bioreaktori

Muljni ili akvatički reaktori upotrebljavaju se za *ex situ* tretman i vodu crpe iz onečišćenog područja. Bioreaktori uključuju procesuiranje otpadnih krutih materijala i vode kroz projektiran sustav zaštite. Muljni reaktor je posuda i uređaj za zadržavanje upotrebljavan da stvori trofazno stanje (krutina, tekućina i plin) miješanja. To povećava biodegradacijski stupanj zagađivača vode vezane za tlo i povećava biorasploživost ciljnih zagađivača u biomasi (Das, 2014).

## 1.3. Surfaktanti u okolišu

### 1.3.1. Svojstva i podjela

Surfaktanti su različita skupina kemikalija koje su najbolje znane po širokoj uporabi kao detergentski i ostali proizvodi za čišćenje (Ivanković i Hrenović, 2010). Surfaktanti su glavni sastojci deterdženta u kućanstvu koji uključuju deterdžente za pranje, sredstva za čišćenje kućnih potrepština i osobne toaletne potrepštine (Yuan i sur., 2014). Ostatci surfaktanta ispušteni su u divljinu u ekosustav ili izravno na površinu vode i najviše završavaju u različitim dijelovima okoliša kao što su tlo, voda ili sedimenti (Ivanković i Hrenović, 2010). Velik broj površinski aktivnih sastojaka koje sadržavaju otpadne vode ispušta se u okoliš, što uzrokuje oštećenje vodenog života, zagađivanje vode i ugrozu zdravlja ljudi. Stoga je važno pratiti i kontrolirati emisije surfaktanta u vode (Yuan i sur., 2014).

Surfaktanti (površinski aktivna sredstva) čine različitu grupu kemikalija koja se sastoji od u vodi topljive glave i netopljivoga hidrofobnog repa. Najbolje su znani po svojoj topljivosti i svojstvima čišćenja, koji ih stavljaju iznad ostalih proizvoda za čišćenje. Goleme količine surfaktanta svakodnevno se upotrebljavaju u kućanstvima i industriji. Potrošnja surfaktanta diljem svijeta u 2014. godini iznosila je 17,5 milijuna tona godišnje, a predviđanja očekuju da će biti povećana za 3,4 % u razdoblju do 2020. godine ([www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market](http://www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market)). Nakon upotrebe, rezidualni su detergentski pušteni u divljinu ili izravno na površinu vode. Dobro su poznati njihovi toksični učinci na razne organizme (Ivanković i Hrenović, 2010). Povišena koncentracija surfaktanta u okolišu može u njemu znatno utjecati na ekosustav. Njihova toksičnost za organizme (Tablica 2.), od sisavaca do bakterija, dobro je znana (Ivanković i Hrenović, 2010).

### 1.3.2. Toksičnost za okoliš

Surfaktanti pokazuju znatnu biološku aktivnost. Anionski surfaktanti mogu biti vezani za bioaktivne makromolekule kao što su peptidi, enzimi i DNA. Vezanjem za proteine i peptide mogu promijeniti preklapanje polipeptida i površinski naboj molekule. To pak može promijeniti biološku funkciju. Primarna meta kationskih surfaktanta jest unutarnja citoplazmatska membrana. Vežu se za unutarnju membranu i destabiliziraju je zbog svojih dugih alkilnih lanaca. Neionski surfaktanti pokazuju antimikrobnu aktivnost vezujući se za razne proteine na fosfolipnoj membrani. Ovakvo vezanje povećava permeabilnost membrane i vezikula, uzrokujući propuštanje spojeva male molekularne mase. To može rezultirati smrću stanice ili oštećenjem prouzrokovanim gubitkom iona i aminokiselina (Ivanković i Hrenović, 2010).

Stupanj oštećenja površinski aktivnih tvari na vodene biljke razmjernan je njihovoj koncentraciji. Kada je sadržaj površinski aktivnih sredstava u vodi visok, to će utjecati na rast algi i drugih mikroorganizama u vodi, što rezultira smanjenjem primarne produktivnosti vodenih tijela, čime se potkopava lanac hrane vodenih organizama u vodenim tijelima. Određena toksičnost surfaktanta koji su površinski aktivne tvari prelazi u životinju njihovim hranjenjem te preko kože. Kada je koncentracija surfaktanta u vodi previsoka, surfaktanti mogu ući u škrge, krv, bubreg, gušteraču, žučni mjehur i jetru, te proizvede akvatični učinak toksičnosti. Ribe ih vrlo lako apsorbiraju površinom tijela i kroz tjelesne šupljine, a cirkulacijom krvi oni se distribuiraju u tjelesna tkiva i organe. Kada se riba izloži surfaktantima, to na ribe proizvodi štetne učinke. Kontamirana riba ulazi u tijelo kroz hranidbeni lanac i inhibira na različite enzime u ljudskom tijelu, čime se smanjuje tjelesna imunost. Nakon što surfaktanti uđu u ljudsko tijelo, oštećuju enzimsku aktivnost i time ometaju normalnu fiziološku funkciju tijela. Surfaktanti imaju toksičnost i mogu se akumulirati u ljudskom tijelu, tako da ih je teško degradirati (Yuan i sur., 2014).

Tablica 2. Raspon  $EC_{50}$  (efektivna koncentracija koja uzrokuje smrtnost polovice izloženih organizama) za empicol, AES tip surfaktanta za slatkovodne i morske organizme (Ivanković i Hrenović, 2010)

Skupina organizama	$EC_{50}$ za empicol ( koncentracija $mg L^{-1}$ )
alge	0,5 – 65
beskralježnjaci	0,78 – 167,3
ribe	0,8 – 250

Otpadne vode koje sadržavaju površinski aktivne tvari surfaktanta ispuštene u okoliš mogu uzrokovati probleme s onečišćenjem vode. Kada koncentracija surfaktanta doseže do 0,1 mg/L, na vodi se mogu pojaviti stalne pjene. Izolacijski sloj slabi razmjenu između tijela vode i plinske atmosfere, što uzrokuje smanjenje otopljenog kisika. Velik broj mikroorganizama umire zbog hipoksije, što rezultira pogoršanjem vodenih tijela (Yuan i sur., 2014).

Odnos između kemijske strukture surfaktanta i toksičnosti za vodu i vodene organizme može se sažeti u tri točke: 1) što je veća hidrofobnost surfaktanta, to je veća toksičnost u vodi; 2) više skupina etoksilata znači nižu toksičnost za vodene organizme; 3) u usporedbi s neionskim surfaktantima, toksičnost je anionskih površinskih surfaktanta smanjena (Yuan i sur., 2014).

Amfoterni AO također su toksični, ali su kationski kvartarno amonijevi spojevi (QAC) najtoksičniji. Oni se široko upotrebljavaju kao dezinficijensi za dekontaminaciju površina u zdravstvu ili kao dezinficijensi za ruke bolničkog osoblja i u liječenju pacijenata inficiranih bakterijom *Staphylococcus aureus*. Najviše zabrinjava činjenica da intenzivna eksploatacija takvih dezinficijensa može uzrokovati rezistenciju bakterija na ta sredstva. Bakterijska će se rezistencija vjerojatno pojaviti kada se upotrebljavaju subletalne koncentracije i koncentracije ispod preporučenih za uporabu. Postoje hipoteze da QAC (engl. *quarternary ammonium compound*) može imati štetan učinak na tretman otpadne vode kroz biocidni učinak na bakterije, čime inhibiraju aktivni mulj, što može narušiti krhku biološku ravnotežu takvog okoliša. Kationski surfaktanti najveći su zagađivači i njihov je limit zbog toga najmanji (Ivanković i Hrenović, 2010).

Tablica 3. Maksimalno dopuštene koncentracije (MAC) surfaktanata u kanalizacijskim otpadnim vodama koje mogu biti puštene u vodene primatelje i kanalizacijske sustave (Ivanković i Hrenović, 2010)

Kategorija surfaktanta	MAC ( mg L <sup>-1</sup> )	
	Površinska voda	Kanalizacijski sustav
anionski surfaktant	1,0	10,0
neionski surfaktant	1,0	10,0
kationski surfaktant	0,2	2,0

### 1.3.3. Biodegradacija u okolišu

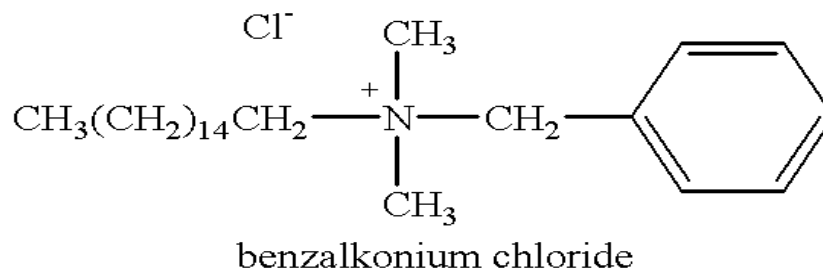
U okolišu surfaktanti primarno degradiraju mikrobiološkom aktivnošću, a u prirodi kroz tretman biljkama (Ivanković i Hrenović, 2010). U postupanju s biljnim pročistačima, kada koncentracija površinski aktivnih tvari prelazi određenu koncentraciju, utjecat će na prozračivanje, sedimentaciju, nitrifikaciju mulja i mnoge druge procese i povećati poteškoće u pročišćavanju otpadnih voda. Surfaktanti promoviraju emulgiranje i raspršivanje netopljivih ulja u vodi i polikloriranih organskih tvari, čime se smanjuje učinkovitost tretmana onečišćujućih tvari (Yuan i sur., 2014).

Kationski surfaktanti su biorazgradivi pod aerobnim uvjetima u različitim stopama. U studijama o *in situ* modifikacijama tla uporabom kationskih surfaktanata neki su organizmi sposobni da iskoristiti QAC kao jedini izvor ugljika i energije. Fizikalno-kemijska svojstva QAC-a također mogu imati važnu ulogu u biodegradaciji ovih supstancija u okolišu. Na primjer biodegradacija pod aerobnim uvjetima općenito se smanjuje povećanjem broja nemetilnih alkilnih grupa. Zamjena metilnih grupa benzenskom grupom može također smanjiti biorazgradivost QAC-a. Zahvaljujući istraživanju biološki nerazgradivi bis (hidrogenirani lojni alkil) dimetil amonijev kloriddimetil amonijev klorid (DTDMAC) koji se upotrebljavao kao surfaktant u tvorničkim omekšivačima zamijenjen je biorazgradivim dietilester dimetil amonijevim kloridom (DEEDMAC) koji se pokazao biorazgradivim u standardnim laboratorijskim testovima i u medijima okoliša kao što su mulj, tlo, sirova kanalizacija i riječna voda. Ovo je dobar primjer kako biodegradacijske studije uklopiti u svakodnevni život (Ivanković i Hrenović, 2010).

Općenito, surfaktanti koji su sada prisutni u okolišu ispod su razine toksičnosti i u Hrvatskoj su njihove koncentracije niže od nacionalnog limita. Mnogi surfaktanti su biorazgradivi i njihov je udio uvelike reducirana sekundarnim tretmanom biljkama čistačima otpadnih voda. Najviše zabrinjava puštanje netretirane otpadne vode ili otpadne vode koja je prošla samo primarnu obradu. Pražnjene otpadne vode s golemom količinom surfaktanta može štetiti ekosustavu. Buduće studije o toksičnosti surfaktanta i biodegradaciji nužne su da bi se povukle visoko toksične i nerazgradive komponente iz komercijalne upotrebe i zamijenile ekološki prihvatljivima (Ivanković i Hrenović, 2010).



#### 1.4. Benzalkonijev klorid

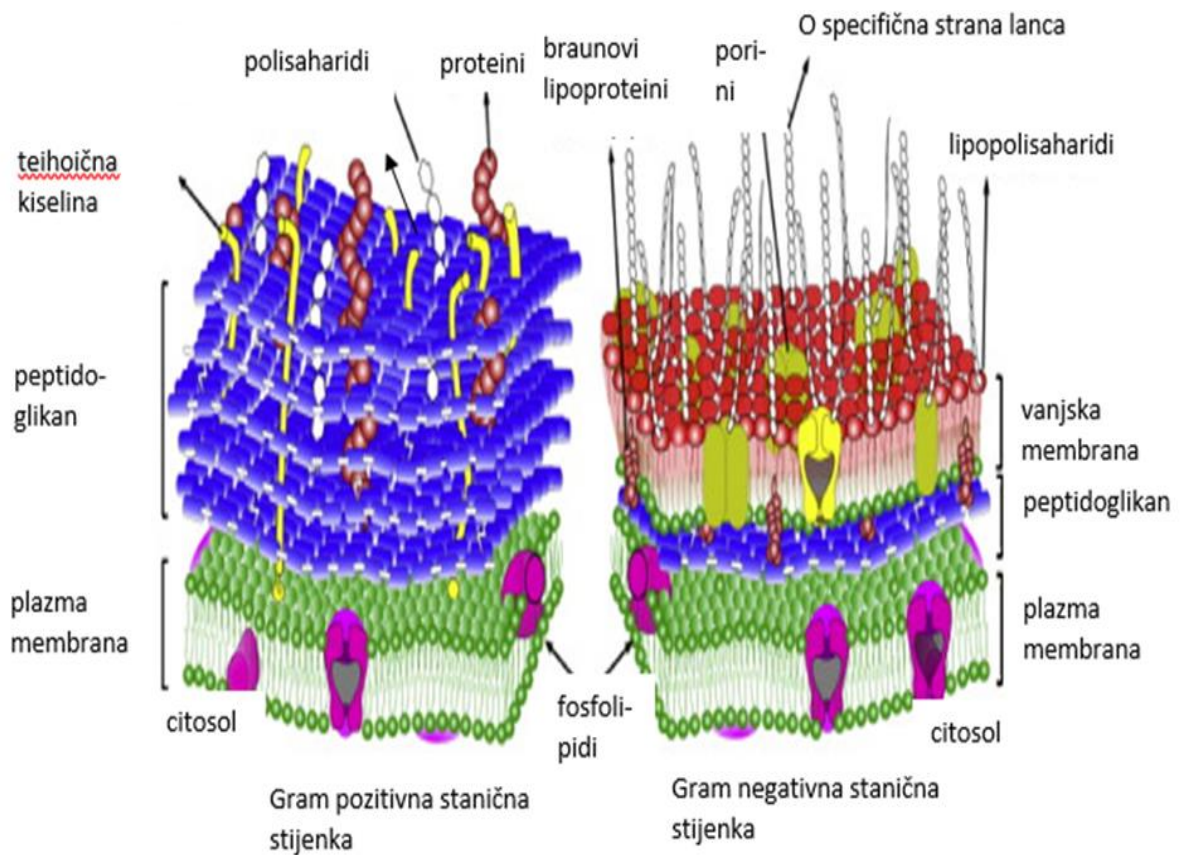


Slika 2. Strukturna formula benzalkonijeva klorida (BAC)  
(izvor: [www.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium\\_chloride](http://www.wikipedia.org/wiki/Benzalkonium_chloride))

Benzalkonijev klorid ciklični je dugolančani aromatski ugljikovodik strukturne formule  $C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl$  koji služi kao biocid i kationski surfaktant (slika 2.) (Lackner i Guggenbichler, 2013). Upotrebljava se u prašcima za rublje i omekšivačima za tkanine (Bartlett, 2013). Benzalkonijev klorid klasificiran je u skupinu kvartarnih amonijevih spojeva (QAC) koji su pozitivno nabijeni derivati amonijevih spojeva s kemijskom formulom  $NR_4^+$ , pri čemu R mogu biti različite skupine koje sadržavaju ugljik-vodik (Nic i sur., 2006). Benzalkonijev je klorid lako topljiv u etanolu i acetonu. Iako je otapanje u vodi sporo, vodene se otopine lakše obrađuju i preferiraju se. Vodene otopine trebaju biti neutralne do blago alkalne. Koncentrirana otopina ima gorak okus i slab miris na badem (Lackner i Guggenbichler 2013). Benzalkonijev klorid (BAC) glavni je aktivni sastojak koji nije baziran na alkoholu i koji se upotrebljuje za kliničke, prehrambene i domaće kućne biocide, za sredstva koja se mogu primijeniti lokalno na živo tkivo (antiseptik) ili na nežive predmete (Kampf i Kramer, 2004). Posebno glede njegove antimikrobne aktivnosti, benzalkonijev klorid aktivni je sastojak u mnogim potrošačkim proizvodima (Ash i Ash, 2004). Također se upotrebljava u mnogim procesima i proizvodima koji nisu potrošački, uključujući i kao aktivni sastojak u kirurškoj dezinfekciji. Prednost benzalkonijeva klorida, koju nemaju antiseptici na osnovi etanola ili antiseptik vodikova peroksida, jest u tome to što ne uzrokuje osjećaj pečenja kad se nanosi na ozlijeđenu kožu (Ash i Ash, 2004).

Ključna komponenta BAC-ova antimikrobnoga djelovanja jest uništenje membrane, što je najučinkovitije protiv gram-pozitivnih bakterija (slika 3.), nekih gram-negativnih bakterija (slika 3.), nekih virusa, gljivica, kvasaca i protozoa (Fazlara i Ekhtelat, 2012).

U rujnu 2016. godine US FDA (United States Food and Drug Administration) objavila je zabranu šesnaest sastojaka u potrošačkim bakterijskim sapunima, navodeći nedostatak dokaza o sigurnosti i učinkovitosti. Zabrana triju dodatnih sastojaka, uključujući benzalkonijev klorid, odgođena je kako bi se omogućilo dovršenje tekućih studija ([www.federalregister.gov//safety](http://www.federalregister.gov//safety) and effectiveness of consumer antiseptics topical antimicrobial drug products for human use).



Slika 3. Opća usporedba gram-pozitivne (a) i gram-negativne (b) strukture bakterijskih staničnih stijenki ([www. microbewiki.kenyon.edu/.../Antiseptic\\_efficacy\\_of\\_benzalkonium chloride](http://www.microbewiki.kenyon.edu/.../Antiseptic_efficacy_of_benzalkonium_chloride))

## 2. CILJ RADA

U svojem diplomskom radu usporedit ću uspješnost bioatenuacijske i biostimulacijske bioremedijacije sa bakterijama iz jezera Jarun i jezera iz Botaničkog vrta i bioaugmentacijske bioremedijacije s mikroorganizmima uzgojenima u bakteriološkom laboratoriju te s onima iz otpadne vode, tla i aktivnog mulja uređaja za pročišćavanje voda. Cilj je ovoga diplomskog rada utvrditi mogu li benzalkonijev klorid razgrađivati bakterije iz Jarunskog jezera i Botaničkog vrta ili bakterije iz aktivnog mulja, otpadne vode, tla i suspenzije *P. fluorescens* i *P. aeruginosa*, koje sam izolirao u laboratoriju kao razgrađivače benzalkonijeva klorida.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izolacija razgrađivača iz okoliša

U prvom sam eksperimentu izolirao razgrađivače benzalkonijeva klorida iz okoliša. Za to sam uzeo četiri Schottove boce od 100 mL. U svaku Schottovu bocu dodano je 100 mL medija mineralnih soli (MSM, engl. mineral salt medium) te 0,5 mL benzalkonijeva klorida da postignem koncentraciju od 50 mg/L. Zatim sam u otopinu u jednu bocu dodao 10 mL otpadne vode, u drugu 10 mL aktivnog mulja, u treću 1 g tla, a u četvrtu 1 mL pripremljene suspenzije bakterija *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas aureginosa*. Nakon toga sam boce stavio na inkubaciju tjedan dana na sobnoj temperaturi od 25 °C uz aeraciju. (Slika 4.)



Slika 4: Priprema Schottovih boca za inkubaciju sa aeracijom, upuhivanje zraka u boce

U drugom sam eksperimentu izolirao razgrađivače iz okoliša koje sam dobio u prvom eksperimentu na krutom MSM mediju (MSM agar) koji omogućuje rast bakterijskih kolonija. To su ploče koje služe kao podloge izolaciju razgrađivača iz okoliša. Dodao sam na ploče s agarom 0,2 mL otopine benzalkonijeva klorida koncentracije 50 mg/L (služi kao isključivi izvor ugljika) te 0,1 mL bakterijske suspenzije iz Schottovih boca koje su bile na inkubaciji te ploče inkubirao tjedan dana na sobnoj temperaturi od 24 °C. Nakon inkubacije izbrojao sam broj kolonija te odredio broj bakterija (metoda CFU/Colony Forming Unit) na svakoj ploči. Izveo sam bojenje po Gramu i usporedio s početnim mikroskopskim slikama. Razgrađivačima koje sam izolirao u ovom eksperimentu koristio sam i u idućem.



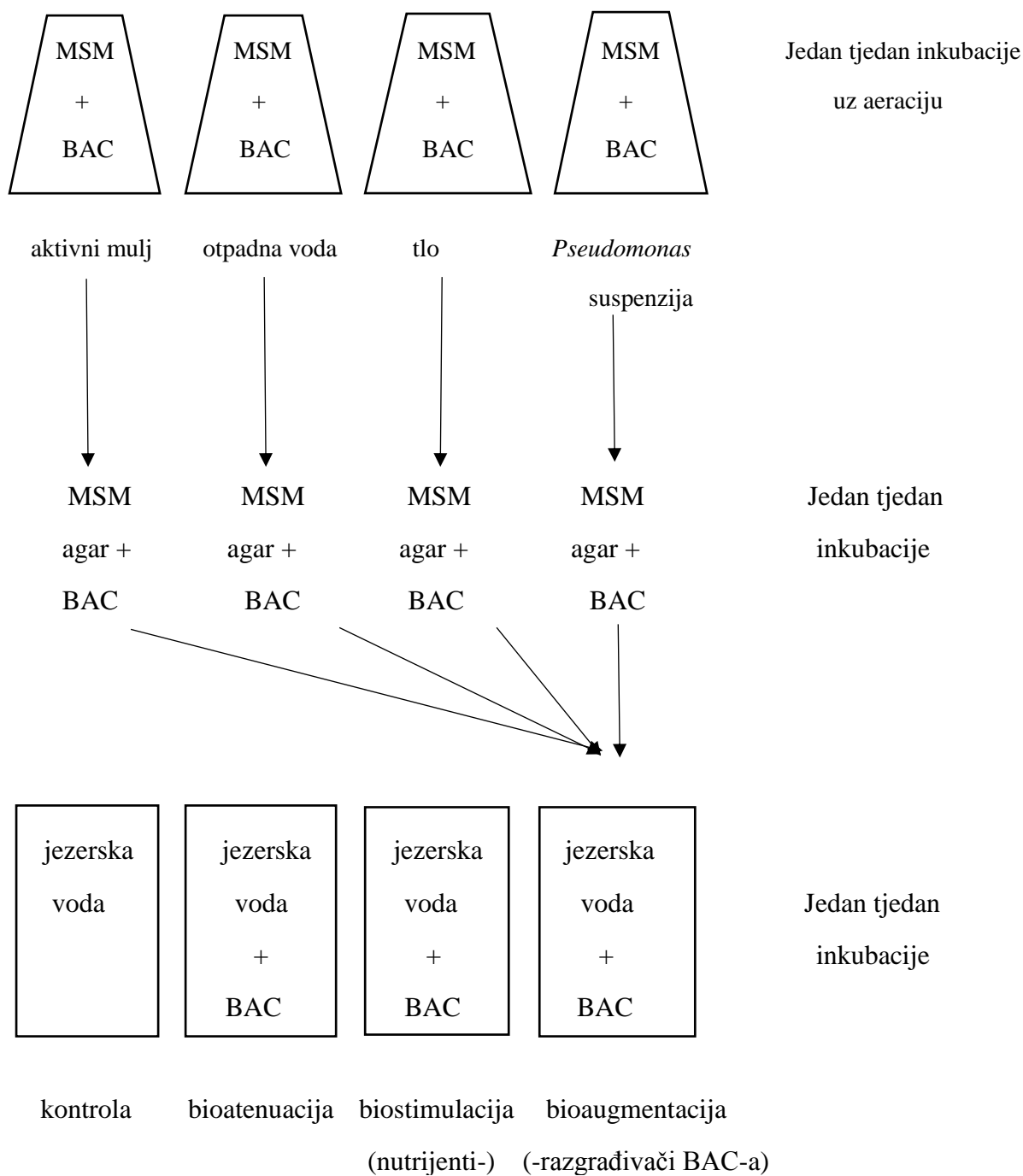
### 3.2. Otkrivanje najpogodnije vrste bioremedijacije

U trećem sam eksperimentu napravio simuliranu bioremedijaciju s bakterijama iz Jarunskog jezera i jezera u Botaničkom vrtu. Vodu iz jezera rasporedio sam u četiri Schottove boce. Prva je boca kontrolna s vodom iz jezera Jarun (slika 5). U druge tri boce dodao sam vodu iz jezera Jarun i 0,5 mL benzalkonijeva klorida da se postigne koncentracija od 50 mg/L. U boci broj dva imamo otopinu benzalkonijeva klorida i vode iz Jarunskog jezera i predočuje nam bioatenuaciju. U boci broj tri otopini benzalkonijeva klorida i vode iz Jarunskog jezera dodao sam fosforno-dušično NPK hranjiva i predočuje nam biostimulaciju. U boci broj četiri u otopinu benzalkonijeva klorida i vode iz Jarunskog jezera dodao sam razgrađivače koje sam izolirao u drugom eksperimentu i to predočuje bioaugmentaciju (slika 6). Boce su pokrivene kapicom od pamuka i stavio sam ih na inkubaciju uz miješanje pri sobnoj temperaturi u mehaničku miješalicu brzine 150 okretaja u minuti. Isti sam eksperiment ponovio i s bakterijama iz jezera u Botaničkom vrtu.



Slika 5. Jezero Jarun iz kojega su uzeti uzorci vode za bioremedijaciju (izvor: [www.flickr.com](http://www.flickr.com))

Pokus 1. Izolacija razgrađivača benzalkonijeva klorida iz okoliša



Slika 6. Shematski prikaz eksperimenta. MSM – medij mineralnih soli (mineral salt medij); BAC – benzalkonijev klorid

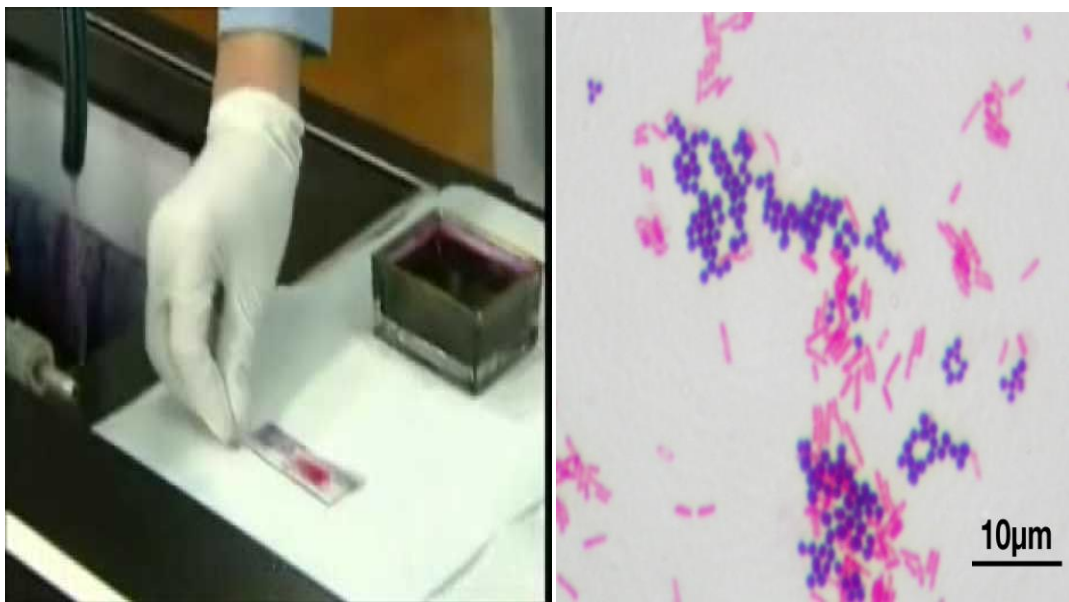
U svakoj sam boci odredio početnu koncentraciju benzalkonijeva klorida, koncentraciju nakon jednog sata i nakon jednoga tjedna upotrebom Hach DR2500 spektrofotometra. Metodom CFU (engl. *colony forming unit*) odredio sam početni broj bakterija i broj bakterija nakon tjedan

dana. Naposljetku sam napravio bojenje po Gramu i izolirao razgrađivače benzalkonijeva klorida.

### 3.2. Identifikacija razgrađivača

Određene bakterijske kolonije izolirao sam iz MSM agara za uzgoj razgrađivača BAC-a (2. eksperiment). Kolonije bakterija razgrađivača iz kulture na agaru prenio sam ezom uz 3 do 4 kapi vodovodne vode na pokrovno stakalce. Stakalce sam fiksirao na plameniku i obojao po Gramu (Slika 7).

U bojenju po Gramu prvo sam jednokratnom kapaljkom nanio genciana violet ili kristal violet ljubičastu boju i držao 3 do 5 minuta. Zatim sam nanio lugolovu otopinu i držao jednu do dvije minute. Stakalca sam potom isprao 96 %-tnim etanolom i vodovodnom vodom. Nakon ispiranja preparate sam kapalicom obojio u karbol fuksin ili saharin Na kraju sam ih isprao vodovodnom vodom i pregledao pod mikroskopom. Dobio sam četiri morfološki različita uzorka.



Slika 7. Metoda bojenja po Gramu (izvor : [www.svetbiologije.com](http://www.svetbiologije.com))

## 4. REZULTATI

### 4.1. Izolacija razgrađivača

U drugom eksperimentu na pločama s krutim MSM-om i benzalkonijevim kloridom (BAC) nije bilo kolonija *Pseudomonas aureginosa* i *Pseudomonas flourescens*, što znači da *P. aureginosa* i *P. flourescens* ne razgrađuju BAC jer ih je BAC sve pobio. To znači da ti sojevi bakterija uzgojenih u laboratoriju Zavoda za bakteriologiju Biološkog odsjeka u Zagrebu ne razgrađuju benzalkonijev klorid. Kolonije bakterija porasle su samo na pločama s MSM-om i benzalkonijevim kloridom, kamo smo dodali otpadnu vodu, aktivni mulj i tlo. To znači da benzalkonijev klorid ne razgrađuju sojevi bakterija uzgojeni u laboratoriju, nego sojevi bakterija iz okoliša. Bakterijama iz okoliša koje su se pokazale kao razgrađivači benzalkonijeva klorida (BAC) u drugom eksperimentu koristio sam se i u trećem eksperimentu.



Slika 8. Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba, odakle su uzeti otpadna voda, aktivni mulj i tlo (izvor: [www.epirh.com](http://www.epirh.com))



## 4.2. Bioremedijacija

U trećem eksperimentu bakterije iz okoliša u bioaugmentacijskoj boci koje sam izolirao iz otpadne vode i aktivnog mulja u drugom eksperimentu razgradile su polovicu BAC-a (Tablica 4.). U prvoj skupini bakterije iz jezera Jarun ni u boci za bioatenuaciju ni u boci za biostimulaciju nisu razgradile ništa jer je BAC za njih toksičan pa ih je pobio i broj se njihovih kolonija prepolovio. U drugom eksperimentu bakterije iz jezera u Botaničkom vrtu i u boci za bioatenuaciju i u boci za biostimulaciju ipak su nešto razgradile. Međutim, njihova uspješnost nije bila velika jer nisu razgradile više od 20 % benzalkonijeva klorida. I na njih je benzalkonijev klorid djelovao toksično pa se broj njihovih kolonija drastično smanjio.

Bakterije iz opadne vode, aktivnog mulja i tla koje smo izolirali i stavili u bioaugmentacijsku bocu razgradile su benzalkonijev klorid jer smo ih u prvom eksperimentu „trenirali“ da im benzalkonijev klorid bude jedini izvor ugljika. Broj se njihovih kolonija, CFU (engl. *colony forming unit*), povećao s  $1,04 \times 10^6$  na  $1,48 \times 10^6$ . Njihov je broj s obzirom na početak narastao za 2,5 %, što znači da su se malo namnožile. Koncentracija benzalkonijeva klorida se smanjila s 42 na 18 miligrama po litri u bioaugmentacijskoj epruveti, što znači da bakterije iz bioaugmentacije razgradile 57,1 % benzalkonijeva klorida. Bakterije iz kontrole, gdje nismo dodavali benzalkonijev klorid, preživjele su, ali se njihov broj smanjio sa 100 na 83 %.

U drugoj skupini bakterije iz jezera Botaničkoga vrta u bioatenuacijskoj boci razgradile su 13,64 % benzalkonijevog klorida čija se koncentracija smanjila s 44 na 38 mg/L. Međutim, broj se bakterija smanjio s  $2,35 \times 10^4$  na  $3,01 \times 10^1$ . Broj se kolonija smanjio za 99,81 %, što znači da je benzalkonijev klorid na njih djelovao toksično. Bakterije iz jezera u Botaničkom vrtu u biostimulacijskoj boci u koju smo dodali dušično-fosforna gnojiva NPK razgradile su 16,8 % benzalkonijeva klorida čija se koncentracija smanjila s 43 na 36 mg/L i bile su malo uspješnije. Međutim, i broj njihovih bakterija smanjio se s  $2,85 \times 10^4$  na  $2,01 \times 10^1$ . Njihov se broj smanjio za 99,92 %, što znači da je benzalkonijev klorid na njih djelovao još toksičnije. Bakterije iz kontrole u koju nismo dodavali benzalkonijev klorid preživjele su. Broj se njihovih kolonija povećao s  $1,61 \times 10^4$  na  $2,81 \times 10^5$ . Njihov se broj se povećao za 1354 %. Bakterije iz otpadne vode, aktivnog mulja i tla koje smo izolirali i stavili u bioaugmentacijsku bocu razgradile su benzalkonijev klorid jer su „trenirane“ da im benzalkonijev klorid bude jedini izvor ugljika. Broj se njihovih kolonija povećao sa  $6,07 \times 10^5$  na  $2,56 \times 10^6$ . Njihov je broj s obzirom na početak narastao za 382 %, što znači da su se namnožile jer im se broj gotovo

učetverostručio. Koncentracija benzalkonijeva klorida smanjila se s 40 na 26 miligrama po litri u bioaugmentacijskoj epruveti, što znači da su bakterije iz bioaugmentacije razgradile 35 % benzalkonijeva klorida. Bakterije iz bioaugmentacijske boce bile su najuspješnije i jedine uspješne u ovom mojem pokusu.

Tablica 4. Rezultati razgradnje BAC-a s pomoću vode iz jezera Jarun i jezera u Botaničkom vrtu

<b>1. Pokus: jezero Jarun</b>				
	Kontrola	Bioatenuacija	Biostimulacija	Bioaugmentacija
c BAC mg/L start	0	40	38	42
c BAC mg/L fin	0	43	39	18
BAC uklonjeno %	0,0	-7,5	-2,6	57,1
CFU start /mL	5,20 x 10 <sup>3</sup>	8,00 x 10 <sup>3</sup>	2,30 x 10 <sup>3</sup>	4,84 x 10 <sup>5</sup>
	1,49 x 10 <sup>3</sup>	1,24 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>3</sup>	1,60 x 10 <sup>6</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>3,35 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1,02 x 10<sup>4</sup></b>	<b>1,91 x 10<sup>3</sup></b>	<b>1,04 x 10<sup>6</sup></b>
CFU konačni /mL	1,80 x 10 <sup>3</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	0,00 x 10 <sup>0</sup>	1,90 x 10 <sup>6</sup>
	2,00x10 <sup>2</sup>			1,05 x 10 <sup>6</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>1,00 x 10<sup>3</sup></b>	<b>0,00 x 10<sup>0</sup></b>	<b>0,00 x 10<sup>0</sup></b>	<b>1,48 x 10<sup>6</sup></b>
Preživljavanje (%)	85,1	0,0	0,0	102,5

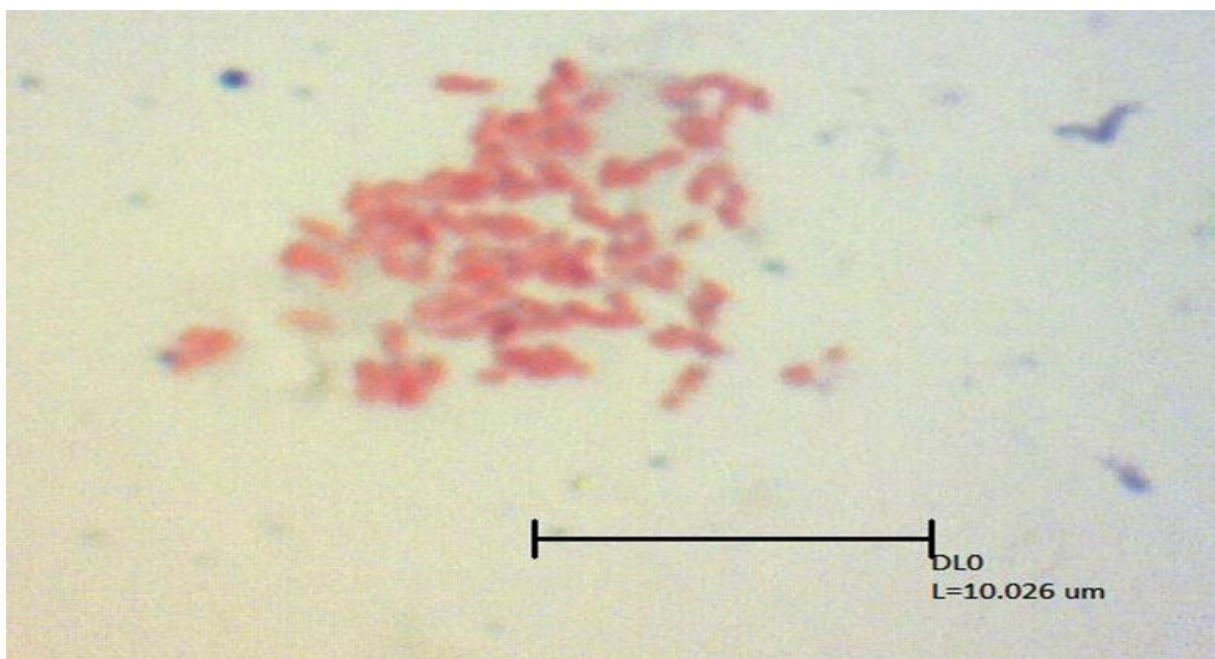
<b>2. Pokus: jezero u Botaničkom vrtu</b>				
c BAC mg/L start	0	44	43	40
c BAC mg/L fin	0	38	36	26
BAC uklonjeno %	0,00	13,64	16,28	35,00
CFU start /mL	1,90 x 10 <sup>4</sup>	1,40 x 10 <sup>4</sup>	1,10 x 10 <sup>4</sup>	6,70 x 10 <sup>5</sup>
	1,31 x 10 <sup>4</sup>	3,30 x 10 <sup>4</sup>	4,60 x 10 <sup>4</sup>	
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>1,61 x 10<sup>4</sup></b>	<b>2,35 x 10<sup>4</sup></b>	<b>2,85 x 10<sup>4</sup></b>	<b>6,70 x 10<sup>5</sup></b>
CFU konačni /ml	2,70 x 10 <sup>5</sup>	3,00 x 10 <sup>1</sup>	2,00E x 10 <sup>1</sup>	2,56 x 10 <sup>6</sup>
	1,66E x 10 <sup>5</sup>			
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>2,18 x 10<sup>5</sup></b>	<b>3,00 x 10<sup>1</sup></b>	<b>2,00 x 10<sup>1</sup></b>	<b>2,56 x 10<sup>6</sup></b>
Preživljavanje (%)	1354	0,127	0,07	382,5

### 3.3. Identifikacija razgrađivača

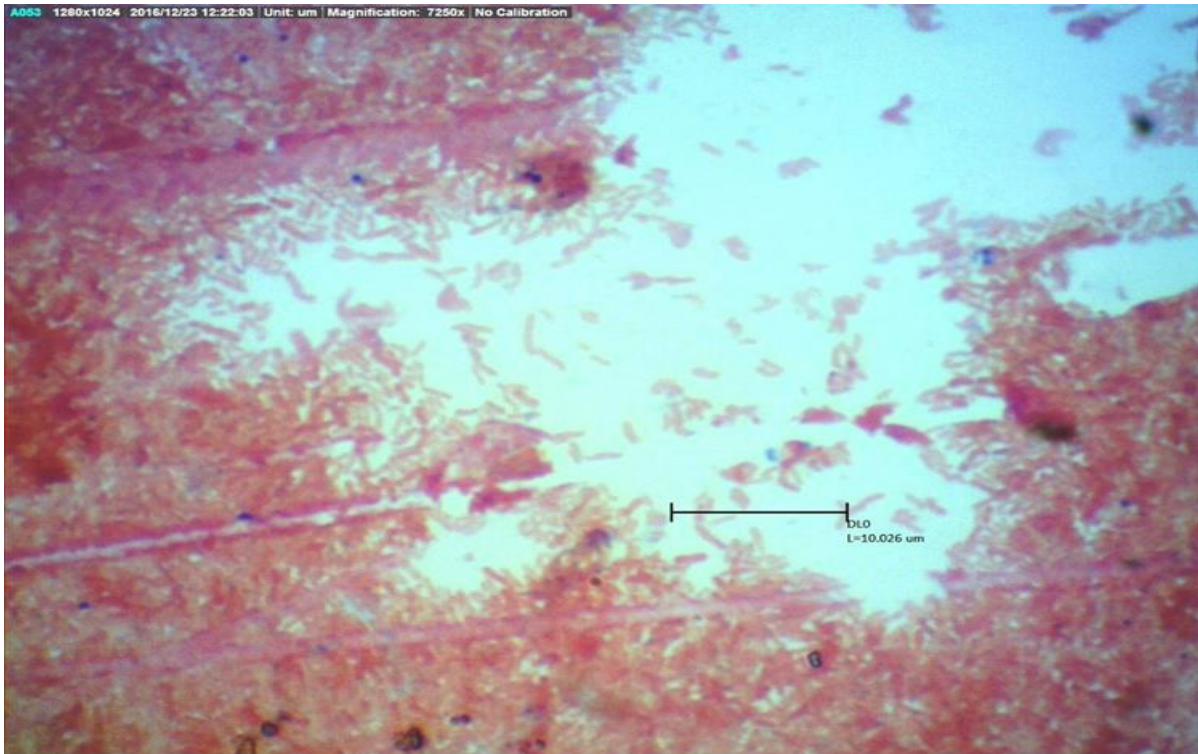
Sljedeće rezultate nakon bojenja po Gramu sam dobio pod mikroskopom:

- 1) crveni gram-negativni bacili (štapići) manji od 1  $\mu\text{m}$  (Slika 9);
- 2) crveni gram-negativni bacili, nekoliko vrsta bacila jedni veličine 1  $\mu\text{m}$ , drugi veličine 2  $\mu\text{m}$ , nečista miješana kultura, kapljice ljubičaste boje (Slika 10);
- 3) uzorak 4: štapićasti gram-pozitivni diplobacili (po dva štapića zajedno) veličine 3 do 4  $\mu\text{m}$ , prozirne uklopine u njihovim stanicama jesu endospore (Slika 11).

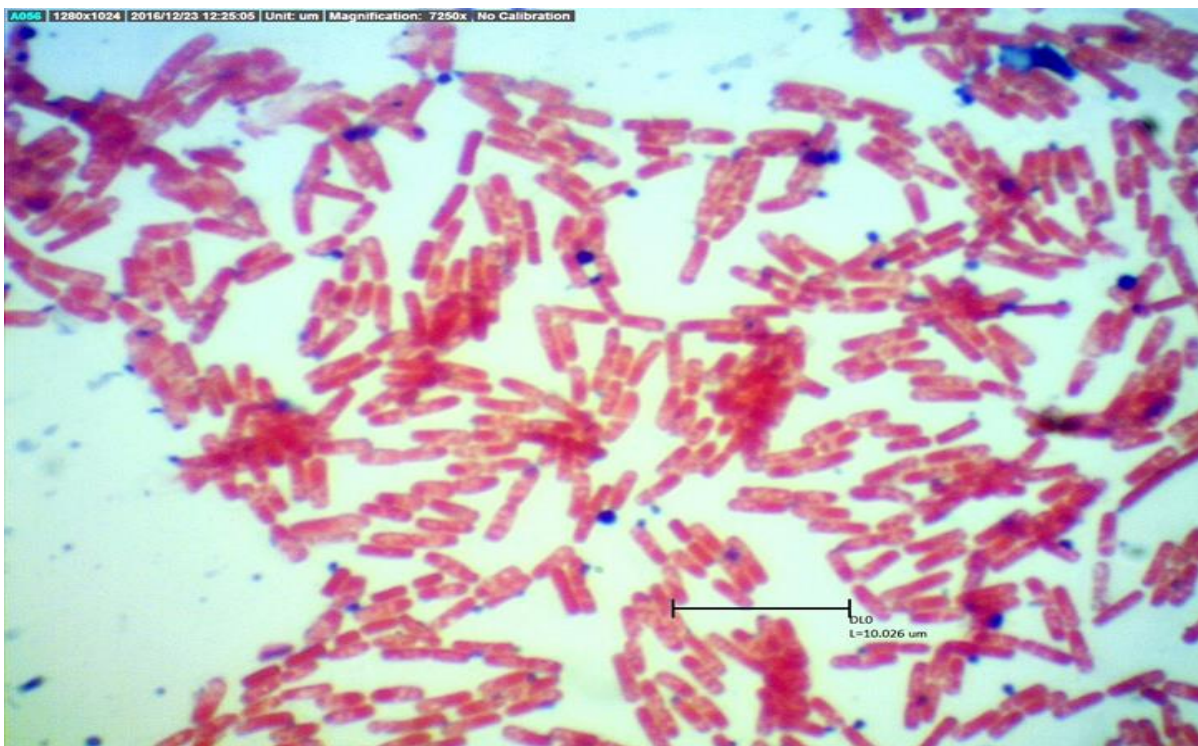
Bakterije koje su identificirane kao razgrađivači benzalkonijeva klorida jesu *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus* (Slike 9, 10, 11).



Slika 9. Izolirane bakterije razgrađivači benzalkonijeva klorida. Uzorak 1, identificiran kao *Agrobacterium radiobacter*. Metoda bojenja po Gramu, povećanje 1000 puta.



Slika 10. Izolirane bakterije razgrađivači benzalkonijeva klorida. Uzorak 2, identificiran je kao *Stenotrophomonas maltophilia*. Metoda bojenja po Gramu, povećanje 1000 puta.



Slika 11. Izolirane bakterije razgrađivači benzalkonijevog klorida. Uzorak 3, identificiran kao *Bacillus cereus*. Metoda bojenja po Gramu, povećanje 1000 puta.

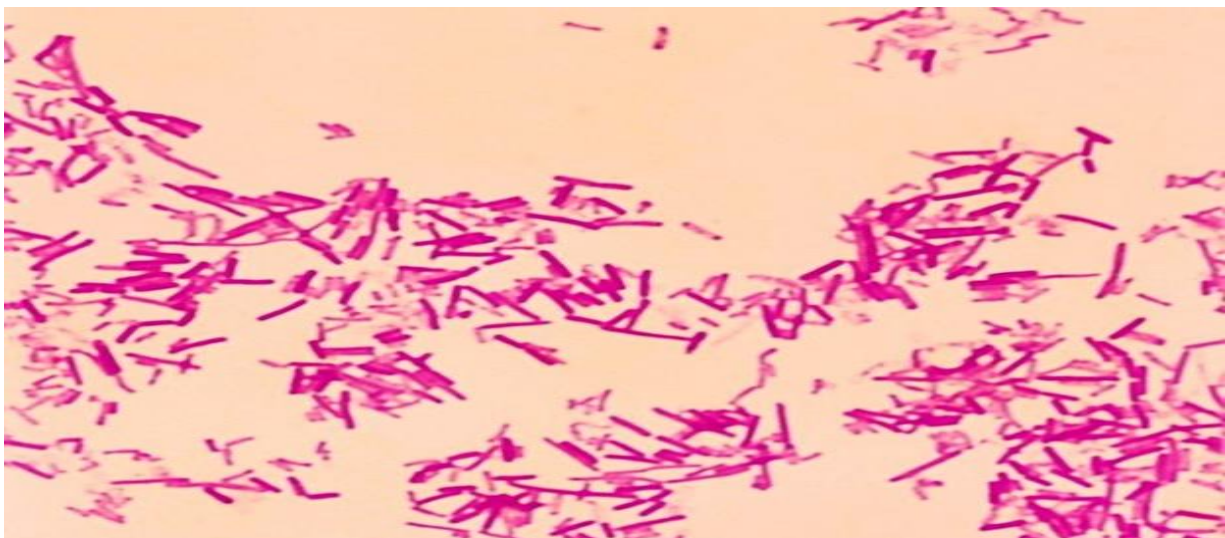


## 5. RASPRAVA

### 5.1. Razgrađivači benzalkonijeva klorida

Bakterije koje su identificirane kao razgrađivači benzalkonijeva klorida jesu *Agrobacterium radiobacte*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Bacillus cereus*. Po građi su bacili koji žive u tlu i vodi kao saprofiti koji razgrađuju mrtvu organsku tvar i djeluju kao oportunistički patogeni koji mogu uzrokovati infekcije ako iz okoliša dospiju u žive organizme i razviti pri tome rezistenciju na brojne antibiotike.

#### 5.1.1. *Agrobacterium radiobacter*



Slika 12. *Agrobacterium radiobacter* pod mikroskopom (izvor: [www.gettyimages.com](http://www.gettyimages.com))

*Agrobacterium radiobacter* (prethodno poznat kao *Agrobacterium tumefaciens*) aerobna je, gram-negativna, pokretna štapićasta bakterija s jednim do šest flagela. Veličina je oko 1,5 – 3,0 x 0,6 – 1,0 µm i uzrokuje nastanak zaraznih tumora u obliku žuči na biljnim domaćinima. Ta je bakterija usko povezana s bakterijama koje fiksiraju dušik, a mogu se naći na čvorovima korijena u mahunarkama ([www.bugwood.org/Agrobacterium\\_tumefaciens](http://www.bugwood.org/Agrobacterium_tumefaciens)).

To je oportunistički patogen koji malokad uzrokuje bakterijske bolesti, endokarditis i peritonitis, uglavnom u imunokompromitiranih pacijenata i rijedak je uzrok infekcije mokraćnog sustava ([www.medical-dictionary.thefreedictionary.com/Rhizobium+radiobacter](http://www.medical-dictionary.thefreedictionary.com/Rhizobium+radiobacter)). Odavno je prepoznat kao biljni patogen ([www.bugwood.org/Agrobacterium\\_tumefaciens](http://www.bugwood.org/Agrobacterium_tumefaciens)). Identificiran je kao ljudski patogen samo u bolesnika s karcinomom ili pri imunosupresivnim bolestima ([www.bugwood.org/Agrobacterium\\_tumefaciens](http://www.bugwood.org/Agrobacterium_tumefaciens)).

U istraživanju Struthersa i sur. (1998) iz Nacionalnog centra za biotehnologiju u Sjedinjenim Američkim Državama istraživana je sposobnost bakterije tla, *A. radiobacter* J14a, da razgrađuje herbicid atrazin u različitim kulturnim uvjetima, a rabili su tu bakteriju za povećanje biorazgradnje atrazina u tlima iz poljoprivrednih kemijskih distribucijskih mjesta. Kontaminacija tla od miješanja pesticida, utovara, skladištenja i ispiranja poljoprivrednih kemijskih zastupnika na Srednjem zapadu uzrokovala je zabrinutost zbog potencijalnog onečišćenja površinske i podzemne vode. Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) izvijestila je da je atrazin pronađen u podzemnim vodama u približno 25 država. U ovom su istraživanju opisane izolacija i karakterizacija *A. radiobacter* J14a, soja koji je sposoban iskoristiti atrazin kao jedini izvor dušika. Provedeni su također eksperimenti kako bi se odredili učinci sekundarnih ugljikovih i dušikovih supstrata na degradaciju atrazina u kulturi i u tlima kontaminiranim atrazinom. Atrazin se uglavnom razgrađuje u biološkim procesima, uključujući N-dealkilaciju (uklanjanje atoma vodika vezanog za dušik u lancu), dekloriranje (uklanjanje atoma klora vezanog za prsten) i cijepanje prstena. U nekim je mikroorganizmima dobivena kompletna biorazgradnja atrazina u amonijak ( $\text{NH}_3$ ) i ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) (Struthers i sur., 1998).

Ove, prethodne studije pokazuju veliku varijaciju u kinetici i opsegu degradacije atrazina i sposobnosti bakterija da rastu na atrazinu. Prethodne su studije pokazale da bakterije koje degradiraju atrazin primjenjene kao pojedine vrste ili kao konzorcije mogu povećati degradaciju atrazina u tlu, ali ovi postupci variraju u njihovoj učinkovitosti (Siripattanakul i sur., 2008).

Važni postupci remedijacije uključuju primjenu tehnika bioremedijacije uporabom raznih degradirajućih enzima, kao što je fosfotriesteraza iz *A. radiobacter*. Zbog velikog broja ispuštanja kontaminanata godišnje, od ključne je važnosti tražiti snažnije i učinkovitije metode liječenja, a, u tome smislu, tehnike koje uključuju bioremedijaciju čine se prilično obećavajućima za tu svrhu (Alves de Castro i sur., 2017).

Cilj jednoga kineskoga istraživanja Wanga i sur. (2009) bio je izolirati i karakterizirati bakterije koje mogu poništiti nikotin iz rizosferskog tla duhanskog bilja i koristiti se njima da razgrađuju nikotin u krutom duhanu. Ova je studija pokazala da je *Agrobacterium* sp. može biti pogodan za zbrinjavanje duhanskog otpada i smanjenje sadržaja nikotina u listovima duhana (Wang i sur., 2009).

Iako je *A. radiobacter* opaki biljni patogen koji uzrokuje nastanak tumora na mladim stablima i samim time njihovo odumiranje, pokazao se učinkovitim u bioremedijaciji antrazina, organofosfornih spojeva i polikloriranih ugljikovodika. Nedavno se primjena bakterije *A. radiobacter* pokazala učinkovitom u bioremedijaciji nikotina u duhanu. Zbog iskustva u razgradnji aromatskih klorovih ugljikovodika poput antrazina u mojemu se pokusu pokazala učinkovita i u razgradnji benzalkonijeva klorida.

#### 5.1.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* (slika 13) rasprostranjena je u različitim prirodnim okolišima. Kao i druge srodne bakterije, oportunistički je patogen te može uzrokovati sepsu, endokarditise, pneumonije, urinarne i druge nozokomijalne infekcije. Iako može uzrokovati teške i smrtonosne infekcije u mnogih bolesnika, u drugih je bolest laka i samolimitirajuća, osobito u onih koji imaju infekciju rane. Od kolonizacije i infekcije ovim patogenom u opasnosti su bolesnici u strojnoj ventilaciji u jedinicama intenzivnog liječenja, bolesnici na dugotrajnijim antibiotskim terapijama, kao i neuroenički bolesnici. Bakterija je otporna na većinu primjenjivih antibiotika poput  $\beta$ -laktama, ali je trimetopirin-sulfametoksazol najučinkovitiji antibiotik u liječenju infekcije ovim patogenom (Kalenić i sur., 2013).



Slika 13 : Bakterijska kultura *Stenotrophomonas maltophilia* (izvor: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com))

Kao i njemu srodne vrste roda *Pseudomonas* ima predikciju prema vlažnom miljeu i može se naći kao kontaminant u dezinficijensu, nebulizatorima, strojevima za ventilaciju, kupkama, ledomatima, umivaonicima, a također u hladnjacima koji služe za pohranu različitih medicinskih pripravaka te je ustanovljen kao najučestaliji kontaminant uzoraka u fertilizacijskim klinikama u uzorcima sjemena i embrija koji su pohranjeni u tekućem dušiku (Mukherjee i Roy, 2003).

Genomska analiza pokazala je kako različiti sojevi *Stenotrophomonas* mogu napraviti enzime koji imaju vitalnu ulogu u degradiranju polikloriranih ugljikovodika ili uzimanju teških metala okretanjem i isključivanjem gena (Mukherjee i Roy, 2003).

Postupak optimizacije bioremedijacije pokazao je blisku interakciju između eksperimentalnih i simuliranih vrijednosti uklanjanja bakra. Studija Ghosha i sur. istražuje bioremedijaciju bakra s pomoću bakterija otpornih na bakar, *S. maltophilia* PD2. Živi je mikroorganizam upotrebljavan za uklanjanje bakra iz vodene otopine. Istraživan je utjecaj različitih parametara na bioremedijaciju *S. maltophilia* PD2, kao što su početna koncentracija bakra i početni pH te vrijeme kontakta otopine. Metodologija površine odziva (RSM) primijenjena je za optimiranje parametara procesa koji su odgovorni za bioremedijaciju bakrenog iona i za procjenu učinaka i interakcija procesnih varijabli. Na temelju statističke analize optimalni je uvjet pronađen pri pH 5,50, koncentracija bakra 50,00 mg L<sup>-1</sup>, vrijeme kontakta 26,00 sati i uklanjanje bakra je bilo 90 % (Ghosha i Das Sahab, 2013).

Bioremedijacija kromata primjenom bakterija prije svega uključuje uklanjanje/smanjenje teških metala u otpadnim vodama uporabom autohtonih mikroorganizama kao što su bakterije za smanjenje kroma kao biosorbenta za čišći i zdraviji okoliš. U radu Ramana N. M. i suradnika ispitivano je uklanjanje heksavalentnog kroma uz pomoć mikroorganizama izoliranih iz aklimatiziranog pročišćavanja kože. Fourier transformirane infracrvene spektroskopske analize i skenirane elektronske mikroskopije pokazale su učinkovitu biosorpciju kroma uz pomoć *S. maltophilia* SRS05 bez intracelularnih promjena koje morfološki pokazuju stabilnost organizma u prisutnosti kroma. Stoga se preporučuje da se ova bakterija može široko rabiti za sanaciju heksavalentnog kroma (Raman i sur., 2018).

Većina se izolata smatra organizmima razine 1 biosigurnosti (BSL-1) visokog rizika, pri čemu su štetni učinci jaki, dugotrajni i široko rasprostranjeni. Međutim, postoje važne iznimke, uključujući i neke uobičajeno proučavane izolate, koji se smatraju patogenima razine



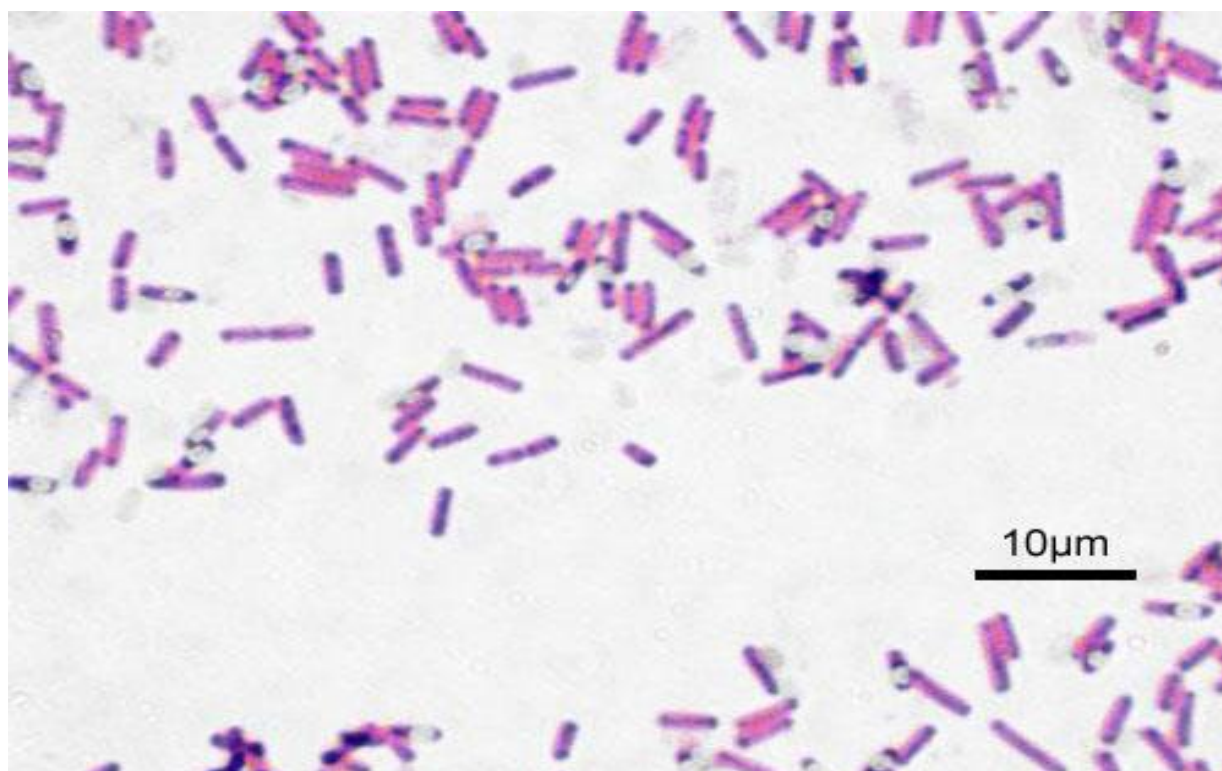
2 biosigurnosti (BSL-2), pri čemu su štetni učinci umjereni. Procjena ovih čimbenika rizika nameće prepreku u postupcima registracije za oslobađanje mikroba u okoliš za bioremedijacijske svrhe u Europi i SAD-u, iako u Australiji ograničenje primjene mikrobiološke bioremedijacije nije toliko usko (Mukherjee i Roy, 2003).

Mnogo je jednostavnije u bioremedijaciji primijeniti biljku povezanu s prirodnom pojavom *S. malthophilia*. Endofitičke bakterije imaju nekoliko mehanizama kojima mogu promicati rast biljaka i zdravlje na rubnim, zagađenim tlima. To uključuje proizvodnju fitohormona ili enzima koji su uključeni u metabolizam regulatora rasta kao što su etilen, 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina, deaminaza, auksini i indoleoctena kiselina. Osim toga, endofitičke bakterije mogu pomoći biljci domaćinu da prevlada fitotoksične učinke uzrokovane onečišćenjem okoliša (Mukherjee i Roy, 2003).

Unatoč početnom otkriću kao ljudskom oportunističkom patogenu, različite primjene bakterije *S. malthophilia* nisu ostale neistražene, iako pitanje biološke sigurnosti ostaje. Nepatogeni sojevi mogu se primijeniti u različitim okolišnim pitanjima: prirodna bakterija tla, sojevi *Stenotrophomonas* imaju široku primjenu u poljoprivredi kao potencijalni biokontrolni agensi u liječenju gljivičnih infekcija i u promicanja rasta biljaka. *S. malthophilia* je široko povezana s biljnim korijenima i vrlo obećavajuća u fitoremedijaciji kontaminiranih podzemnih voda. Primjena transgeničnih biljaka na *in situ* bioremedijaciju nije jasna do danas jer da nisu objavljene adekvatne terenske studije. Utjecaj transgenika na okoliš kao što su konkurentnost transgenskih prijenosa na biljke divljeg tipa, utjecaj na ptice ili kukce i mogućnost prijenosa gena na druge prirodne biljke oprašivanjem upućuje na razmatranje (Mukherjee i Roy, 2003).

### 5.1.3. *Bacillus cereus* :

*Bacillus cereus* (slika 14) sveprisutna je bakterija koja u čovjeka može uzrokovati trovanje hranom i infekcije oka, a rjeđe druge infekcije. Rezistentan je na penicilin i cefalosporine te se infekcije oka i druge teške infekcije liječe vankomicinom (Kalenić i sur., 2013).



Slika 14. *Bacillus sp.* pod mikroskopom (izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus>)

Bakterija *B. cereus* pokazuje višestruku otpornost na teške metale poput bakra, nikla, olova i kobalta, ali je vrsta osjetljiva na živu i kadmij jer se spomenuti metali smatraju vrlo otrovnim čak i pri vrlo niskoj koncentraciji. Indijska studija Rohinia i sur. usmjerena je na izradu modela bioremedijacije bakra. U tu svrhu izolirane su bakterije otporne na bakar iz industrijskih područja i karakterizirane su za akumulacijska svojstva bakra koristeći se različitim metodama, uključujući akumulaciju bakra, optimizaciju, otpornost na antibiotike, proizvodnju tiola, SEM (engl. *scanning electron microscope*). Izolirani sojevi *B. cereus* pokazali su otpornost na više teških metala. Soj je proučavan zbog otpornosti na nikal, olovo, kobalt, krom, kadmij i živu. Soj je pokazao MTC (maksimalni dopušten kapacitet) od 100 ppm na kobalt i kadmij, 400 ppm protiv kroma, rast od 500 ppm u prisutnosti nikla i olova, što ga čini vrlo potencijalnim

organizmom za sanaciju teških metala. Organizam je bio vrlo osjetljiv na živu jer je to najopasniji teški metal (Rohini i Jayalakshmi, 2015).

Potencijal za primjenu transgene bakterije *B. cereus* za *in situ* bioremedijaciju pokazan je u eksperimentu, u kojemu je uklonjeno 96,4 %- anorganske žive. Dodatno, *B. cereus* soja BW-03 može odoljeti velikom promjenama slanosti (5 – 30 ppt), pH i koncentracije žive (5 – 50 ppm) te do 7 dana preživjeli u simuliranom okolišu kontaminiranom živom (Dash i Das, 2015).

Uklanjanje toksičnog i karcinogenog arsena iz podzemnih voda bitno je za sigurnost vode koja se može rabiti za piće ili navodnjavanje. U istraživanju Eman i sur. (2015) izolirano je šest različitih bakterijskih sojeva iz uzorka podzemnih voda koje se rutinski upotrebljavaju za navodnjavanje u gradu Taifu u Saudijskoj Arabiji i u kojima ima arsena, vanadija i bora. *Bacillus cereus* soja EA5 bio je djelotvoran pri uklanjanju različitih koncentracija arsena. Visoke koncentracije arsenika pokazale su dramatično smanjenje aktivnosti bioremedijacije spomenutog soja (Eman i sur., 2015).

*Bacillus cereus* testiran je zbog njegove učinkovitosti kako bi se dekolorizirao industrijski otpadni papir. Istražen je i utjecaj izvora ugljika, izvora dušika, temperature, početnog pH i perioda inkubacije na redukciju boje. Istraživanja raspodjele molekularne veličine kontrolnih i bakterijskih tretiranih efluenata pokazala su degradaciju spojeva visoke i srednje molekularne mase. Pronađeno je da su optimalni pH i temperatura 6,5 i 45 °C. *B. cereus* je djelotvoran pri dekolorizaciji efluenata u prisutnosti glukoze, ksiloze i škroba (84, 45,5 i 66%), ali je maksimalna redukcija boje (90,6 %) dobivena 0,5 %-tnom saharozom kao izvorom ugljika u prisutnosti 1 % amonijeva sulfata. Rezultati pokazuju visoki potencijal *B. cereus* kao važnog kandidata za uklanjanje boje iz efluenata pulpe i papira (Saleem i sur., 2014).

Ispuštanje uljnih otpadnih voda u okoliš uzrokuje ozbiljne štete u okolišu i bioremedijacija je privlačna alternativa kemijskoj metodi za uklanjanje ugljikovodika iz industrijskih otpadnih voda. Studija Marine Bujang i sur. pokazala je vrlo dobru sposobnost biorazgradnje uljnih otpadnih voda bacilom *B. cereus*. Unatoč složenom sastavu uljnih otpadnih voda iz triju različitih radionica u automobilskoj industriji, biorazgradnja bi se mogla postići tim mikroorganizmom. Uzorci zauljenih otpadnih voda sakupljeni su iz triju autoradionica, a zatim su karakterizirani za parametre poput koncentracije ulja i masti i sadržaja ugljikovodika. *Bacillus cereus* je imao sposobnost iskorištavanja uljnih otpadnih voda u radionicama T od 5 do 95 %, P od 20 do 62 % i K od 3 do 47 %. Utvrđeni su optimalna temperatura i pH za

povećani rast *B. cereus* soja UMK1 na 30 °C, a pH 7 upućuje na maksimalni rast *B. cereus*. Studija je pokazala da se organizam koji poništava ugljikovodik može izolirati iz onečišćenog ugljikovodika i sposobnost njegova degradiranja bacilom *B. cereus* jasan je pokazatelj da se ove bakterije mogu primijeniti u bioremedijacijskim tehnikama (Bujang i sur., 2013).

Dvanaest mikroorganizama koji razgrađuju ugljikovodike izolirano je iz četiriju mjesta zagađenih ugljikovodikom i na temelju morfoloških i biokemijskih svojstava identificirani su kao *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultati su pokazali da svi izolati posjeduju potencijal da razgrađuju široku lepezu ugljikovodika. Može se zaključiti da se domaća flora onečišćenih ugljikovodika prilagođuje okolišu i može biti implicirana za uklanjanje ugljikovodika (Shekhar i sur., 2014).

U istraživanju Saimmaia i sur. (2012) konzole primijenjenih bakterija koje degradiraju ulje za podmazivanje izolirane su iz tla koje je zagađeno uljem. Najaktivniji konzorcij u asimilaciji rabljenog ulja za podmazivanje bio je SC-9. Tvaj je konzorcij sadržavao četiri bakterijska izolata zasnovana na tehnici koja ovisi o kulturi. Identificirani su kao *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium* sp. i *Sphingobacterium multivorum* temeljeni na 16S rDNA sekvencijskoj analizi. Bakterijski izolati koji razgrađuju ulje i koji pokazuju znatan potencijal za proizvodnju biosintefaktanata mogu se primijeniti u bioremedijaciji tala onečišćenih naftnim ugljikovodicima (Saimmai i sur., 2012).

Iako je *B. cereus* poznat kao ljudski patogen koji može uzrokovati trovanje hranom i infekcije oka, otkriveno je da nepatogeni sojevi ove bakterije koji su uzeti iz okoliša imaju široku primjenu u bioremedijaciji jer *B. cereus* pokazuje višestruku otpornost na teške metale poput bakra, nikla, olova, kobalta i arsena. Međutim, nakon što se prijede MTC (maksimalni dopušten kapacitet) otpada sposobnost degradacije teških metala i oni postaju previše toksični da bi ih razgradio *B. cereus*. Donedavno je živa za *B. cereus* bila najtoksičniji metal. Međutim, nadavno su razvijeni transgenični sojevi bakterije *B. cereus* koji razgrađuju živu u koncentracijama do 50 ppm. Utvrđeni su i optimalni uvjeti kada je bioremedijacija tom bakterijom najučinkovitija pri 30 – 50 °C i pri pH 6,5 – 7,5. *Bacillus cereus* se pokazao učinkovit u dekolorizaciji industrijskog papira uz dodatak otopina raznih ugljikohidrata, posebice dodatkom 0,5 %-tne otopine saharoze uz 1 % dodanog amonijeva sulfata, kada je uklonio i do 90 % boje, što znači da bioaugmetacijske i biostimulacijske tehnologije najbolje funkcioniraju u zajedničkoj primjeni. Pokazao se učinkovitim pri uklanjanju ulja iz automehaničkih radionica i naftnih ugljikovodika, najviše benzina, pri optimalnoj koncentraciji od 5 % u periodu od 10 dana. U ovom je radu dokazano da je *B.cereus* u tjedan dana sposoban

degradirati benzalkonijev klorid koncentracije 50 mg/L. Što još sve može razgrađivati, to trebaju utvrditi neka buduća istraživanja.

## 5.2. Usporedba rezultata pokusa

Bakterije iz jezera Jarun i jezera u Botaničkom vrtu ni iz bioatenuacijske boce, ni iz biostimulacijske boce u koju smo dodali dušično-fosforna NPK gnojiva nisu razgradile BAC (benzalkonijev klorid) jer on služi kao dezinficijens, ubija njihove kolonije i djeluje baktericidno na njih. Bakterije iz otpadne, vode aktivnog mulja i tla koje smo uzgojili u bioaugmentaciji razgradile su benzalkonijev klorid u potpunosti jer smo ih „trenirali“ da im benzalkonijev klorid bude jedini izvor ugljika. Koncentracija benzalkonijeva klorida smanjila se s 40 na 26 miligrama po litri u bioaugmentacijskoj boci i njihov je broj s obzirom na početak narastao za 103 %, što znači da su bakterije iz bioaugmentacije bile najuspješnije i jedine uspješne u ovome pokusu. Očekivao sam i bojao sam se da bakterije iz jezera Jarun i jezera u Botaničkom vrtu neće biti uspješne u razgradnji benzalkonijeva klorida. Međutim, nisam očekivao da *Pseudomonas* uzgojen u laboratoriju također neće imati nikakva uspjeha jer je prije utvrđeno da bakterije roda *Pseudomonas* razgrađuju benzalkonijev klorid. Pretpostavio sam da bih razgrađivače mogao pronaći u okolišu među bakterijama iz tla, otpadne vode i aktivnog mulja uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba. To se ostvarilo pa mi je pošlo za rukom da otkrijem neke nove razgrađivače. Nakon bojenja po Gramu i identifikacije spora u ovom su pokusu otkrivene tri nove okolišne vrste bakterijskih razgrađivača benzalkonijeva klorida: *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Bacillus cereus* koje sam izolirao iz otpadne vode, aktivnog mulja i tla, pa ih uspješno iskoristio u bioaugmentaciji bioremedijaciji.

*Agrobacterium radiobacter* je biljni patogen koji uzrokuje odumiranje mladih stabala, ali rijetko uzrokuje infekcije u čovjeka. Može uzrokovati samo endokarditis i infekcije mokraćnog sustava u osoba koje su inficirane HIV-om ili boluju od raka, ali se lako liječi antibioticima. Međutim, pokazao se kao i razgrađivač antrazina organofosfornih spojeva i polikloriranih ugljikovodika. Prema novijim istraživanjima, uspješan je i u razgradnji nikotina. *S. maltophilia* je oportunistički patogen te može uzrokovati sepsu, endokarditise, pneumonije, urinarne i druge nozokomijalne infekcije. Bakterija je otporna na većinu primjenjivih antibiotika poput  $\beta$ -laktama, ali je trimetopirin-sulfametoksazol najučinkovitiji antibiotik u liječenju infekcije ovim patogenom. Osim u razgradnji antrazina, *S. maltophilia* pokazala se učinkovitom i u razgradnji teških metala, antrazina, polikloriranih ugljikovodika i klorovih pesticida. Kao prirodna bakterija tla široko je povezana s biljnim korijenima i ima veliku

učinkovitost u fitoremedijaciji kontaminiranih podzemnih voda. *B. cereus* ubikvitarna je bakterija koja u čovjeka uzrokuje otrovanje hranom i infekcije oka. Rezistentan je na penicilin i cefalosporine te se infekcije oka i druge teške infekcije liječe vankomicinom. Međutim, pokazao je obećavajuću primjenu u bioremedijaciji kao razgrađivač teških metala, ulja i naftnih ugljikovodika.

Pražnjene otpadne vode s golemom količinom surfaktanta može štetiti ekosustavu, pa su zbog toga buduće studije o toksičnosti surfaktanta i biodegradaciji nužne da se iz komercijalne uporabe povuku visoko toksične i nerazgradive komponente i zamijene ekološki prihvatljiva. Ovim sam radom nastojao pokazati koliko je važno da se otpadni surfaktanti iz kanalizacije razgrade bakterijama uređaja za pročišćavanje prije nego što se puste u rijeke i ostale vodene tokove jer toksično djeluju na lokalne vodene organizme i sav živi svijet akvatičkog sustava slatkovodnih rijeka i vodenih tokova. Na svu sreću surfaktanti koji su sada prisutni u okolišu ispod razine toksičnosti i u Hrvatskoj im je razina niža od nacionalnog limita, a nadam se da će tako ostati i u budućnosti. Benzalkonijev klorid na kraju se pokazao bio razgradiv jer su nađene tri vrste bakterija koje ga razgrađuju. Međutim, ovim radom nije utvrđeno kako razgradivost benzalkonijskoga klorida ovisi o koncentraciji jer je pri nekoj koncentraciji višoj od 50 mg/L vjerojatno toksičan za razgrađivače iz okoliša. Sve tri bakterije koje obitavaju kao saprofiti, razgrađivači mrtve organske tvari u vodi i tlu, oportunistički i dokazani patogeni koji mogu napraviti pravu štetu i uzrokovati teške infekcije ako dospiju u žive organizme, pokazali su se kao izvrsni razgrađivači benzalkonijskoga klorida u mojem eksperimentu.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mikrobiološke razgradnje benzalkonijeva klorida mogu donijeti sljedeće zaključke.

1. Bakterije iz jezera Jarun i jezera u Botaničkom vrtu ni iz bioatenuacijske boce, ni iz biostimulacijske boce u koju smo dodali dušično-fosforna gnojiva nisu razgradile benzalkonijev klorid jer on služi kao dezinficijens i djeluje baktericidno na njih.

2. Na pločama s krutim medijem mineralnih soli (mineral salt medijem) i benzalkonijevim kloridom nije bilo kolonija *Pseudomonas aeruginosa* i *P. fluorescens*, pa ove bakterije nisu mogle razgrađivati benzalkonijev klorid jer ih je on sve pobio, što znači da ti sojevi bakterija uzgojenih u laboratoriju Zavoda za bakteriologiju Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu ne razgrađuju benzalkonijev klorid.

3. Bakterije iz otpadne vode, aktivnog mulja i tla koje smo izolirali i stavili u bioaugmentacijsku bocu potpuno su razgradile benzalkonijev klorid jer su „trenirane“ da im on bude jedini izvor ugljika.

4. Bakterije koje su identificirane kao razgrađivači benzalkonijeva klorida jesu *Agrobacterium radiobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Bacillus cereus*.

5. Sve bakterije koje su identificirane kao razgrađivači benzalkonijeva klorida žive u tlu i vodi kao saprofiti koji razgrađuju mrtvu organsku tvar i djeluju kao oportunistički patogeni jer mogu uzrokovati infekcije ako iz okoliša dospiju u žive organizme i razviti pri tome rezistenciju na brojne antibiotike. S obzirom na to da su se pokazale kao izvrsni razgrađivači moglo bi se reći da na svako zlo dolazi neko dobro.

## 7. LITERATURA

Alves de Castro A., Guarnetti Prandi I., Kuca K., et al. (2017.): Organophosphorus degrading enzymes: Molecular basis and perspectives for enzymatic bioremediation of agrochemicals. *Ciência e Agrotecnologia* 41: 471-482.

Ash, M; Ash, I (2004.): *Handbook of Preservative*. Synapse Info Resources p. 286.

Bartlett J. (2013.): *Clinical Ocular Pharmacology* (2 ed.). Elsevier p. 20.

Bujang M., Ibrahim NA., Eh Rak A. (2013.): Biodegradation of oily wastewater by *Bacillus cereus*. *Journal of Agricultural and Biological Science* 8: 108-115.

Das S. (2014.): *Microbiological degradation and bioremediation*.

U: Das S. (ur.) *Factors of bioremediation*. U: Das S. (ur.) *Microbiological bioremediation strategies*. London, Elsevier, str. 10-12.

Dash H.R., Das S. (2015.): Bioremediation of inorganic mercury through volatilization and biosorption by transgenic *Bacillus cereus* BW-03. *International Biodeterioration & Biodegradation* 103: 179-185.

Eman A.H., Mohamed A., Farag A.G. (2015.): Arsenic Removal from Aqueous Solutions by Different *Bacillus* and *Lysinibacillus* Species. *Bioremediation Journal* 19: 269-276.

Fazlara A. i Ekhtelat M. (2012.): The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science* 12 (1): 23-29.



Godleads O.A., Prekeyi T.F., Samson E.O. et al. (2015.): Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 3: 28-39.

Ghosha A., Das Sahab P. (2013.): Optimization of copper bioremediation by *Stenotrophomonas maltophilia* PD2. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1: 159-163.

Ivanković T., and Hrenović J. (2010.): Surfactants in the environment. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 61: 95-110.

Ivankovic T., Mejdandzic M., Postic S., et al. (2015.): Practical Bioremediation Course – Laboratory Exercises on Biodegradation of Cationic Surfactant. *Journal of microbiology and biology education* 16: 69-71.

Kampf G., Kramer A. (2004.): Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 863-893.

Kalenić S., Francetić I., Grubina M., et al. (2013.): *Medicinska mikrobiologija*. U: Kalenić S. (ur.) *Bacillus cereus*. U: Drenjančević D., Vraneš J. (ur.) *Streptomonas*. Zagreb, Medicinska naklada, str. 148, 222-223.

Lackner M., Guggenbichler J.P. (2013.): Antimicrobial Surfaces. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* q03 q01.

Mukherjee P., Roy P. (2003.): Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. *Cellular Microbiology* 5: 625–636.

Nic M., Jirat, B., and Kosata, B. (2006.): IUPAC of quaternary ammonium compounds. [online].

Raman N.M., Asokan S., Shobana Sundari N., et al. (2018.): Bioremediation of chromium (VI) by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from tannery effluent. International Journal of Environmental Science and Technology 15: 207–216.

Rohini B., Jayalakshmi S. (2015.): Bioremediation potential of *Bacillus cereus* against copper and other heavy metals. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 2: 200–209.

Saimmai A., Kaewrueng J., Maneerat S. (2012.): Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil. Annals of Microbiology 62: 1757–1767.

Saleem M., Ahmad S., Mubashir A. (2014.): Potential of *Bacillus cereus* for bioremediation of pulp and paper industrial waste. Annals of Microbiology 64: 823–829.

Siripattanakul S., Wirojanagud W., McEvoy J.M., et al. (2008.): Atrazine removal in agricultural infiltrate by bioaugmented polyvinyl alcohol immobilized and free *Agrobacterium radiobacter* J14a. A sand column study. Chemosphere 74: 308-313.

Shekhar S.K., Godheja J., Mod D.R. (2014.): Hydrocarbon Bioremediation Efficiency by five Indigenous Bacterial Strains isolated from Contaminated Soils. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4: 892-905.

Struthers J.K., Jayachandran K., Moorman B. (1998.): Biodegradation of Atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and Use of This Strain in Bioremediation of Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology 64: 3368–3375.

Wang S.N., Liu, Z., Xu P. (2009.): Biodegradation of nicotine by a newly isolated *Agrobacterium sp.* strain S33. *Journal of Applied Microbiology* 107: 838–847.

Yuan C.L., Xu Z.Z., Fan, M.X., et al. (2014.): Study on characteristics and harm of surfactants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6: 2233-2237.

Internetski izvori:

URL 1: <https://www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market>, pristupljeno 14.5.2018.

URL 2: [https://www.federalregister.gov/documents//safety and effectiveness of consumer antiseptics topical antimicrobial drug products for human use](https://www.federalregister.gov/documents//safety-and-effectiveness-of-consumer-antiseptics-topical-antimicrobial-drug-products-for-human-use), pristupljeno 17.5.2018.

URL 3: <https://www.medical-dictionary.thefreedictionary.com/Rhizobium+radiobacter>, pristupljeno 17.12.2017.

URL 4: [https://www.bugwood.org/Agrobacterium tumefaciens](https://www.bugwood.org/Agrobacterium_tumefaciens), pristupljeno 17.12.2017.

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 19. listopada 1989. u Sisku. Odrastao sam i živim u Zagrebu, kamo se moja obitelj doselila 1991., sa svojim roditeljima, ocem Tomislavom, diplomiranim liječnikom i specijalistom ortopedije, svojom majkom Natašom, diplomiranom liječnicom i specijalistom oftalmologije i svojim dvije godine mlađim bratom Krešimirom, rođenim 1992. koji je 2017. završio studij medicine.

Osnovnu školu kralja Tomislava pohađao sam od 1998. do 2005. i bio odličan učenik u svim predmetima kroz sve razrede. U osnovnoj sam školi pohađao izvannastavnu aktivnost učenja engleskog jezika od 1998. do 2004. u školi stranih jezika Tekoma koja je održavala svoju nastavu u večernjim satima na prostorima moje bivše osnovne škole. Izbornu nastavu njemačkog jezika koji mi je bio izborni predmet unutar redovite nastave pohađao sam od 2000. do 2005., od četvrtog do osmog razreda osnovne škole.

Nadbiskupsku klasičnu gimnaziju pohađao sam od 2005. do 2009. u miješanom civilnom b razredu koji je imao njemački kao drugi strani jezik. Bio sam odličan učenik u prvom, drugom i četvrtom, te vrlo dobar učenik u trećem razredu srednje. Polaganja mature nisam bio oslobođen, ali sam maturirao s odličnim uspjehom 2009. godine.

Nakon neuspjelog pokušaja upisivanja medicine upisao sam studij veterine na Sveučilištu u Zagrebu u jesen 2009. godine. Međutim, od studija veterine odustao sam u jesen 2011. jer mi je zabranjen pristup praktikumu iz patologije zbog nedostatka potrebnih motoričkih sposobnosti. U veljači 2012. uspio sam se prebaciti i upisati na preddiplomski studij znanosti o okolišu na biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, koji sam završio 2015. godine i stekao stručnu spremu prvostupnika znanosti o okolišu. Nakon završetka preddiplomskog studija znanosti o okolišu upisao sam u jesen 2015. diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer zoologija. Diplomom znanja engleskog jezika za stupanj B1 stekao sam 2015. u školi stranih jezika u Vodnikovoj koju sam pohađao od jeseni 2014. do ljeta 2015. godine. Tijekom studija biologije sudjelovao sam šest puta kao volonter na Noći biologije u razdoblju od 2013. do 2018. godine. Bio sam od 2014. do 2018. aktivni član sekcija za sisavce, ptice i herpetologiju unutar Biološkog udruženja studenata (BIUS-a) i sudjelovao s njima na malim terenima u Tuku pokraj Mrkoplja i u okolici grada Zagreba.