

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ**

**Martina Miloloža**  
**Nikolina Janton**

**POTENCIJAL IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH KULTURA U**  
**STVARANJU AKTIVNOG MULJA ZA BIOREMEDIJACIJU**  
**FARMACEUTSKE OTPADNE VODE**

**Zagreb, 2017.**

*Ovaj rad izrađen je u Zavodu za industrijsku ekologiju pod vodstvom  
izv. prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac i predan je na natječaj za dodjelu  
Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. OTPADNE VODE.....	2
2.2. FARMACEUTSKE OTPADNE VODE .....	2
2.3. FARMACEUTICI .....	4
2.4. OBRADA FARMACEUTSKIH OTPADNIH VODA.....	7
2.4.1. BIOLOŠKA OBRADA FARMACEUTSKIH OTPADNIH VODA .....	8
2.4.2. AKTIVNI MULJ .....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Aktivni mulj .....	13
3.1.2. Otpadna voda iz proizvodnje farmaceutika.....	13
3.2. MJERNI INSTRUMENTI I OPREMA .....	13
3.3. METODE RADA .....	14
3.3.1. Izolacija i identifikacija bakterijskih kultura iz aktivnoga mulja.....	14
3.3.2. Određivanje kemijske potrošnje kisika .....	15
3.3.3. Određivanje toksičnosti farmaceutske otpadne vode.....	15
3.3.4. Proces stvaranja pahuljica aktivnoga mulja.....	15
3.3.5. Mikroskopska analiza mulja .....	17
4. REZULTATI.....	19
4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ AKTIVNOG MULJA .....	19
4.2. PROCES STVARANJA PAHULJICA AKTIVNOG MULJA.....	27
4.3. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA.....	30
5. RASPRAVA .....	33
5.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ AKTIVNOG MULJA .....	33
5.2. PROCES STVARANJA PAHULJICA AKTIVNOG MULJA.....	34
5.3. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA .....	35
6. ZAKLJUČCI.....	37
7. LITERATURA.....	39

## 1. UVOD

Promjenom načina života, tehnološkim napretkom kao i sve dužim životnim vijekom, raste proizvodnja farmaceutskih proizvoda u svijetu.<sup>1</sup> Tek zadnjih par godina, uočene su veće koncentracije farmaceutika koji dopijevaju u okoliš upotrebom lijekova, ali i korištenjem sredstava za osobnu higijenu. Prevencija, odnosno djelovanje na izvoru, je najbolji način djelovanja jer se na samome početku rješava problem i time se umanjuju posljedice. No ipak, farmaceutska industrija je industrija proizvodnje lijekova te preventivni pristup nije najučinkovitije rješenje. Pri proizvodnji nastaju visoko opterećene<sup>2</sup> otpadne vode koje se moraju obraditi.<sup>3-5</sup>

Prisustvo farmaceutika u okolišu povećava rizik za vodene i životinjske organizme zbog njihove sposobnosti bioakumulacije i svojstva ekotoksičnosti. Povećane koncentracije uočene su upravo u razvijenim državama zbog urbanizacije i industrijalizacije. Zabrinutost je sve veća jer su prisutni u pitkim vodama što izravno utječe na ljudsko zdravlje. Koliko su farmaceutici štetni, potvrđuje činjenica da uzrokuju nepovratne promjene za prirodna okruženja i za čovjekovo zdravlje. Promjenom navika i bržim načinom života, farmaceutici su sve više uključeni u naš svakodnevni život te je samim time i izloženost veća. Nalaze se u plastičnim bocama i posuđu, u lijekovima, sredstvima za osobnu higijenu i sredstvima za čišćenje u kućanstvu. U ljudskom organizmu zaostaju prilikom upotrebe lijekova. Mogu uzrokovati poremećaje endokrinog sustava, karcinom, oštećenja reproduktivnih organa te razne hormonske poremećaje. Djeluju i na embrionalni razvoj djece, a kod trudnica uzrokuju manjak mlijeka. Stoga, neophodna su nova istraživanja i razvoj postupaka kojima će se postići uklanjanje farmaceutika iz okoliša.<sup>6-9</sup>

Do sada su poznati različiti fizikalni, kemijski i biološki načini obrade. Biološka obrada s aktivnim muljem koristi se zbog učinkovitosti i ekonomičnosti procesa. Za uklanjanje onečišćujućih tvari iz farmaceutskih otpadnih voda zaslužna je mješovita zajednica mikroorganizama koja se nalazi unutar pahuljica aktivnog mulja.

U ovome radu provedena je izolacija i identifikacija bakterijskih kultura *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* iz aktivnog mulja. Navedene kulture su korištene u pokusima stvaranja pahuljica aktivnog mulja za obradu farmaceutske otpadne vode.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. OTPADNE VODE

Otpadne vode definiraju se kao potencijalno onečišćene vode koje su promijenile svoj prvobitan sastav, odnosno fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Prema podrijetlu, dijele se na oborinske, komunalne i tehnološke (industrijske).<sup>3</sup>

Tehnološke ili industrijske otpadne vode se razlikuju s obzirom na različite vrste industrija i tehnoloških procesa te sukladno tome je i sastav raznolik. To su visoko opterećene vode koje je neophodno obraditi prije ispuštanja u prirodne recipijente.<sup>2</sup> Iako okoliš ima sposobnost samopročišćavanja, s obzirom na njihovu koncentriranost ne može razrijediti takve vode. Industrijske otpadne vode sadrže štetne i toksične tvari organskog i anorganskog podrijetla koje mogu imati negativan utjecaj na prirodne prijavnike.<sup>3</sup> Stoga, kvaliteta industrijskih otpadnih voda je regulirana zakonskim propisima. Prema Pravilniku<sup>10</sup>, propisane su granične vrijednosti karakterističnih pokazatelja za farmaceutske otpadne vode ovisno o prijemniku u koji se ispušta. Propisani fizikalno-kemijski, ekotoksikološki, organski te anorganski pokazatelji dani su u tablici 2.1.

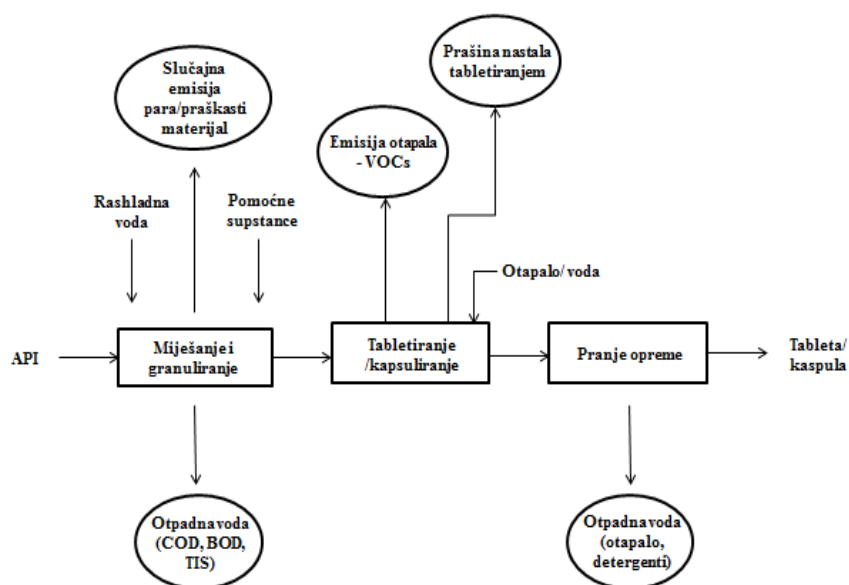
Tablica 2.1. Regulirani pokazatelji i parametri farmaceutskih otpadnih voda.<sup>10</sup>

<i>Pokazatelji</i>	<i>Parametri</i>
<b>Fizikalno-kemijski</b>	temperatura, pH-vrijednost, suspendirane i taložive tvari
<b>Ekotoksikološki</b>	toksičnost na dafnije, alge, svijetleće bakterije, genotoksičnost
<b>Organski</b>	KPK <sub>5</sub> , BPK <sub>Cr</sub> , TOC, fenoli, detergentski
<b>Anorganski</b>	ukupan dušik, fosfor, nitrati, kloridi, ukupan krom, bakar, živa

### 2.2. FARMACEUTSKE OTPADNE VODE

Industrija predstavlja važan faktor za gospodarski razvoj zemlje, a farmaceutska industrija utječe na čovjekov život i na stanje okoliša.<sup>5</sup> Farmaceutska industrija bilježi sve veći porast dobiti jer se nameće potreba za većom proizvodnjom zbog rasta broja

stanovnika i brige za ljudsko zdravlje. Nakon proizvodnje zaostaje veća količina industrijske otpadne vode koja sadrži farmaceutike i druge onečišćujuće tvari.<sup>6</sup> Karakteristike farmaceutskih otpadnih voda ovise o ulaznim sirovinama, postupcima pripreme istih, samome proizvodnom procesu te o načinu održavanja proizvodnog pogona. Stoga, takve otpadne vode uz farmaceutike sadrže i razna organska otapala, katalizatore, neizreagirane reaktante, međuprodukte i aditive.<sup>4</sup> Odabir odgovarajuće tehnologije za ugradnju aktivne farmaceutske tvari (API) u ljekoviti oblik jedan je od ključnih čimbenika kvalitetnog proizvoda.



Slika 2.1. Proizvodni procesi u farmaceutskoj industriji i nastale otpadne vode.<sup>4</sup>

Otpadne vode mogu nastati i pranjem međuprodukata i konačnog produkta te kao rezultat pranja opreme i površina tijekom određenih procesa proizvodnje farmaceutika što je vidljivo na slici 2.1. Farmaceutske otpadne vode nastaju u ekstrakcijskim procesima, prilikom pranja proizvodne opreme i pakiranja kemijskih i bioloških materijala, krutina i tekućina, kako bi se upotrijebile u pripremi lijekova za ljudsku ili veterinarsku upotrebu. Veća količina otpadnih voda nastaje prilikom kemijskih sintezi novih lijekova gdje se koriste različiti organski, anorganski i biološki reaktanti. Teško je točno okarakterizirati takve otpadne vode jer uz glavni proces postoji i bezbroj dodatnih procesa prilikom kojih nastaju neki sekundarni spojevi. S obzirom na proizvodni proces, otpadne vode mogu sadržavati fermentacijske i sintetizirane organske molekule, biološke produkte (antibiotike, vitamine, enzime) te razna otapala, dijelove tableta i kapsula.<sup>2</sup>

### 2.3. FARMACEUTICI

U posljednjih dvadesetak godina, sve se učestalije u vodenim ekosustavima pronalaze farmaceutici što izaziva zabrinutost ekologa i znanstvenika. Aktivne farmaceutičke tvari predstavljaju ekološki problem globalnih razmjera.<sup>8,9</sup> U razvijenim državama dokazana je prisutnost farmaceutika u koncentracijama koje nisu nimalo zanemarive, a vrste i koncentracije u kojima su prisutni u okolišu razlikuju se od zemlje do zemlje. Farmaceutici ili „nove onečišćujuće tvari“ prisutni su svuda oko nas. Nazivaju se novim onečišćujućim tvarima jer se do sada nije smatralo da ono što je na dobrobit čovjeka, može imati štetan utjecaj na okoliš. Tek zadnjih nekoliko godina postajemo svjesni njihovog štetnog utjecaja. Promjenom načina života, koji je dinamičniji, sve se više koriste lijekovi i dodatci prehrani. Uspoređujući potrošnju lijekova po stanovniku, u Austriji, Njemačkoj i Poljskoj je od 30-250 % veća nego u Hrvatskoj. Potrošnja lijekova po stanovniku, u Bugarskoj i Rumunjskoj je dvostruko manja nego u Hrvatskoj. Navedene činjenice ukazuju na to kako potrošnja lijekova raste sa stupnjem razvijenosti neke zemlje. Poznato je kako se najviše kupuju antibiotici, kontracepcijska sredstva i lijekovi iz terapijskih skupina za kardiovaskularni, gastrointestinalni sustav, te dišni, živčani i mišićni sustav.

Prisutnost farmaceutika u okolišu te njihovo djelovanje predstavlja sve veći problem te potiče donošenje sve strožih zakonskih propisa. Važno je istaknuti Europsku legislativu za vodene ekosustave koja je regulirana preko Direktive 2000/60/EC (Water Framework Directive, WFD) i 2006/118/EC (GWD) za zaštitu podzemnih voda i direktive kojom se štite površinske vode, Direktiva 2008/105/EC (PSD), poznatije kao Annex X. Pozivajući se na te direktive, sve europske vode su trebale imati dobar ekološki i kemijski status do 2015., što se postiže smanjenjem, ograničavanjem i prevencijom onečišćenja.<sup>7,8</sup> Na listu prioritarnih farmaceutika Europske unije potrebno je unijeti one farmaceutike koji su većinom prisutni u vodenom okolišu tijekom proteklih 20 godina kako bi se detaljnije istražila njihova fenotipska, genotipska i toksična svojstva. Također, svrha liste je kontinuiranim monitoringom postići smanjenje koncentracije farmaceutika kao i njihov štetan utjecaj na ugrožene organizme.<sup>7</sup> Istraživanjem njihova djelovanja omogućuje se poboljšanje stanja u okolišu jer se „upoznavanjem“ problema isti može riješiti.<sup>7,8</sup>

Stoga je, neophodno provoditi istraživanja određivanjem karakteristika farmaceutika te razvoj postupaka za njihovo uspješno uklanjanje iz okoliša.

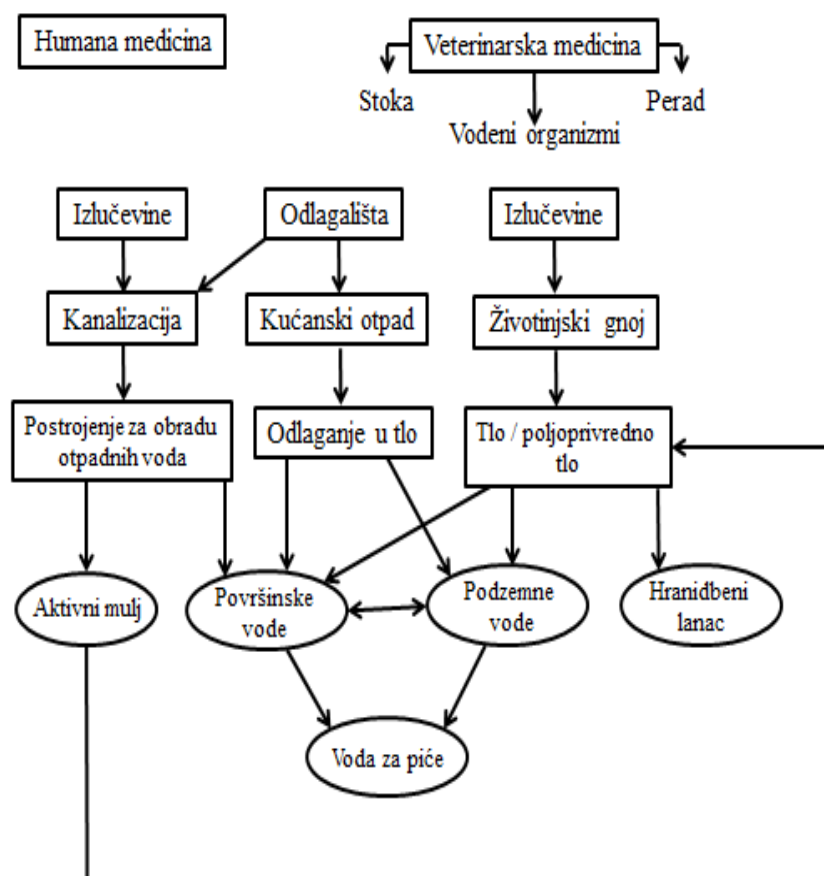
Urbanizacijom i industrijalizacijom povećava se njihova koncentracija u okolišu. U okoliš dospijevaju isključivo uslijed antropogenih aktivnosti, odnosno aktivnosti uzrokovanih ljudskom djelatnošću. Farmaceutici su većinom organski spojevi molekulske mase od 200 do 500 daltona.<sup>4</sup> Neke vrste su topljive u vodi i nisu hlapljive, neke polarne i teško taložive, a neki su lipofilni i imaju tendenciju bioakumulacije i taloženja na sediment. Različiti metaboliti farmaceutika u prisutnosti polarnih molekula hidroliziraju i transformiraju se u biološki aktivne molekule.<sup>9</sup> Farmaceutici se međusobno razlikuju po svojstvima, primjerice po stabilnosti, sposobnosti sorpcije, topljivosti, otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju te prema afinitetu vezanja na krute čestice. Oni koji imaju sposobnost sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u tlu i sedimentu, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode gdje su podložni daljnjoj biotičkoj transformaciji.<sup>4</sup> Detalji njihova ponašanja u prirodi još uvijek nisu dovoljno istražena.

Farmaceutici su specifični po biološkoj aktivnosti i kemijskoj strukturi, a klasificiraju se prema terapijskoj svrsi (antibiotici, analgetici, antihistaminici i dr.). Koriste se u humanoj medicini i veterini za liječenje i prevenciju bolesti. Obuhvaćaju različite skupine lijekova i dodataka prehrani. U svijetu se prema nekim procjenama za humanu medicinu koristi oko 4000 aktivnih farmaceutskih supstanci čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100 000 tona.<sup>4</sup> U izvore farmaceutika, slika 2.2., ubrajaju se industrije, ponajprije farmaceutska, procjedne vode s odlagališta, groblja, bolnice te korištenje sredstava u veterini i osobnih higijenskih sredstava.<sup>1</sup> Odlaganjem stajnjaka ili mulja koji nastaje tijekom obrade otpadnih voda, farmaceutici i njihovi metaboliti mogu dospjeti u podzemne vode, ući u hranidbeni lanac i/ili taložiti se u tlu, ovisno o njihovim svojstvima.<sup>8</sup> Povećanju koncentracija farmaceutika dospjelih u okoliš uvelike doprinosi odlaganje ambalaža i lijekova kojima je istekao rok trajanja na odlagališta otpada. Unatoč tome što su odlagališta osigurana po pravilima struke, moguće je prodiranje štetnih komponenti preko procjednih voda u podzemne vode ili tlo. Kao izvore farmaceutika važno je spomenuti i surfaktante iz detergenata i sapuna, plastični pribor i posuđe, perfluorirane spojeve koji se koriste za tretiranje odjeće te insekticide koji se koriste u kućanstvima.<sup>11</sup>

Farmaceutici predstavljaju opasnost jer su farmakološki aktivne tvari otporne na razgradnju te imaju dugi vijek poluraspada u okolišu. Vrijeme poluraspada definira se kao tendencija razgradnje, odnosno vrijeme koje je potrebno da se razgradi pola od ukupno primijenjene količine farmaceutika. Što je dulje vrijeme poluraspada



farmaceutika, opasniji su jer je povećana mogućnost od prodiranja u podzemne vode preko koje mogu dospjeti do pitkih voda.<sup>8</sup> Zaostaju u okolišu što ukazuje na njihovu sposobnost bioakumulacije. Također, ekotoksični su jer već i male koncentracije, nekoliko ng/L ili  $\mu\text{g/L}$ , ostavljaju negativne posljedice po izložene organizme. Upravo zbog prisutnosti u vrlo malim koncentracijama ubrajaju se u mikroonečišćujuće tvari.<sup>4</sup> Dokazano je kako se već  $0,01 \mu\text{g/L}$  tih tvari smatra opasno po okoliš.<sup>12</sup> Iako su doze uglavnom male, prevladava zabrinutost za ljudsko zdravlje te kopnene ili vodene organizme zbog trajne izloženosti tim štetnim spojevima.<sup>4</sup> Veliki problem predstavljaju za vodene organizme zbog prisutnosti većih koncentracija aktivnih farmaceutskih supstanci u vodenom okolišu.<sup>9</sup> Konzumacijom vodenih organizama posljedično može doći do štetnosti za ljudsko zdravlje.



Slika 2.2. Izvori farmaceutika u okolišu.<sup>8</sup>

Dokumentirana je prisutnost antibiotika, steroida, lipidnih krvnih regulatora, estrogena, antiseptika, antiepileptika i drugih farmaceutika u površinskim vodama. Uočeno je i taloženje farmaceutika u podzemnim vodama, kao i u morskim

ekosustavima.<sup>9</sup> Ugrožavanje organizama prisutnih u vodama potvrđuju studije iz devedesetih godina prošloga stoljeća. Znanstvenici su uočili feminizirane ribe mužjaka u područjima rijeka koje se nalaze nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda. Takva patološka feminizacija povezana je s djelovanjem sintetskog estrogenog hormona koji se koristi za kontracepciju.<sup>13</sup> Osim estrogenih spojeva, u vodama su otkriveni lijekovi poput antiepileptika karbamazepina, zbog kojeg se naglo smanjuje populacija vodenih kukaca te antidepresiva, kao što je fluoksetin koji nepovoljno utječe na mriještenje školjaka.<sup>14</sup> Također je otkriveno da je lijek diklofenak, poznatiji kao voltaren, skoro uzrokovao izumiranje bengalskih i indijskih tankokljunih supova. Voltaren se upotrebljavao kao protuupalno sredstvo za stoku čijim su se uginulim ostacima hranili supovi.<sup>15</sup> Na temelju ovih podataka, prevladava zabrinutost za sve vodene sustave, ali i za bioraznolikost.

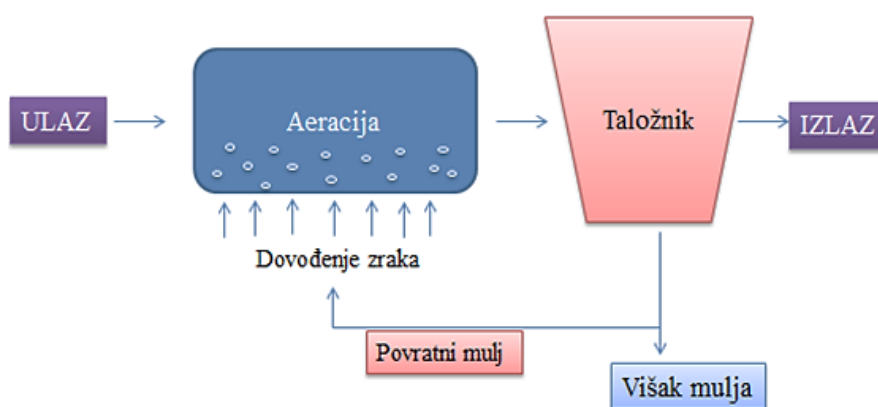
#### **2.4. OBRADA FARMACEUTSKIH OTPADNIH VODA**

Farmaceutske otpadne vode su visoko opterećene i toksične zbog čega mogu dovesti do različitih negativnih učinaka na neciljane organizme u okolišu. Takve vode je potrebno obraditi prije ispuštanja u okoliš u svrhu zadovoljavanja zakonskih i moralnih obaveza. Sastav farmaceutskih otpadnih voda je varijabilan i ovisi o vrsti proizvodnje. Razvijaju se različiti procesi obrade koji se isto tako razlikuju ovisno karakteristikama nastalih otpadnih voda. S toga su najčešće korišteni postupci obrade svrstani u tri kategorije: biološka obrada, napredne tehnologije i napredne oksidacijske tehnike.<sup>1</sup> U napredne tehnologije ulaze membranske tehnologije i adsorpcija na aktivni ugljik. Obe tehnologije su učinkovite kod uklanjanja farmaceutika. Problemi koji se javljaju su vezani uz čepljenje membrana i izdvajanje aktivnog ugljika iz obrađene vode te njegovo zbrinjavanje nakon uporabe. Napredne oksidacijske tehnike su također često spominjane tehnologije u obradi farmaceutske otpadne vode i one uključuju Fentonov proces, obradu ozon/vodikov peroksid sustavom i fotokatalizu. Navedeni su procesi učinkoviti kod transformacije teško razgradivih komponenata u lakše razgradive pa se s toga mogu koristiti kao predobrada u postrojenjima za obradu farmaceutskih otpadnih voda. Biološka obrada se često koristi za uklanjanje farmaceutika i ona se može provoditi u aerobnim ili anaerobnim uvjetima.<sup>1,16-18</sup>

### 2.4.1. Biološka obrada farmaceutskih otpadnih voda

Biološka obrada jedna je od najčešće korištena za uklanjanje onečišćujućih tvari iz farmaceutskih otpadnih voda. Sam proces je učinkovit te ekonomski isplativ. Zbog toga se konstantno radi na unaprijeđenju procesa u svrhu dodatnog povećanja učinkovitosti. Kao što je ranije navedeno, biološka obrada može se izvoditi aerobno ili anaerobno. Najčešće primjenjivani proces je aerobni s aktivnim muljem zbog jednostavnije izvedbe samog procesa. Za obradu bez prisustva kisika potreban je posebno prilagođen sustav u kojem se održavaju anaerobni uvjeti te je takav proces vrlo osjetljiv na male promjene nekih od parametara sustava kao što su pH-vrijednost i temperatura.<sup>4</sup>

Proces s aktivnim muljem je egzoterman gdje se razgradnja onečišćujućih tvari odvija pomoću aerobnih mikroorganizama. Mikroorganizmi tvore pahuljice aktivnoga mulja, veličine od 10 do 300  $\mu\text{m}$ . Veličina, oblik i kompaktnost pahuljica ukazuju na kakvoću aktivnog mulja. Ukoliko su pahuljice rahle i raspadaju se, znači da je došlo do poremećaja u sustavu pa se time smanjuje učinkovitost procesa.<sup>19,20</sup> Za stvaranje aglomerata ključna je ekstracelularna polimerna tvar (EPS) koju izlučuju određeni mikroorganizmi poput bakterija iz roda *Pseudomonas*. EPS je želatinozni polimer sastavljen od polisaharida i peptida koji omogućuje pričvršćivanje mikroorganizama te njihov bolji kontakt sa supstratom.<sup>20,21</sup>



Slika 2.3. Prikaz procesa biološke obrade otpadnih voda.

Sustav, aktivni mulj i otpadna voda, u bioreaktoru je aeriran i homogeniziran kako bi svim mikroorganizmima bio podjednako dostupan kisik i supstrat iz otpadne vode. U slici 2.3. prikazano je kako mješavina vode i mulja iz bioreaktora ulazi u

taložnik gdje se odvaja kruta od tekuće faze. Kruta faza, aktivni mulj, razdvaja se u dvije struje; povratni mulj i višak mulja. Na taj način se konstantno održava optimalna koncentracija aktivnog mulja u sustavu. Višak mulja se ugušćuje, odvodi na stabilizaciju anaerobnom digestijom i odlaže na zato predviđena mjesta ili se spaljuje. U taložniku zaostaje obrađena voda, koja se ispušta u okoliš ukoliko su zadovoljene zakonom propisane vrijednosti ili se u suprotnom odvodi na daljnju obradu.

Tehnološki naprednija izvedba biološkog reaktora je membranski bioreaktor (MBR). Vrlo je sličan klasičnom biološkom reaktoru. Aktivni mulj se nalazi unutar reaktora te se neprestano miješa i aerira. Voda (permeat) prolazi kroz membranu dok se suspendirane čestice zadržavaju unutar sustava, stoga nije potreban taložnik. Mogućnost promjene i prilagođavanja membrana na temelju njihovih veličina pora omogućava optimiranje procesa obrade ovisno o kakvoj se vrsti otpadne vode radi. U usporedbi s klasičnim biološkim uređajem, membranski ima mogućnost zadržavanja veće koncentracije aktivnog mulja, čak do 20 mg L<sup>-1</sup>. Problem koji se javlja je biološko čepljenje (eng. *fouling*) membrana. Do čepjenja dolazi zbog ranije spomenutog stvaranja EPS-a zbog čega se mikroorganizmi pričvršćuju na membrane. Membranski bioreaktor se može integrirati u klasični biološki sustav kao zamjena za taložnik te se na taj način pospješuje obrada otpadnih voda.<sup>22,23</sup>

#### 2.4.2. Aktivni mulj

Aktivni je mulj zajednica mikroorganizama od kojih 95 % čine bakterije, a ostalo su kvasci, alge, vezane i slobodne protozoe te metazoe. Bakterije, heterotrofne i autotrofne, mogu biti raznih veličina, ali prevladavaju one između 0,5 i 3 μm. Brojčano su najzastupljenija vrsta mikroorganizama te se hrane biorazgradivim tvarima, tj. otopljenim organskim sastojcima iz otpadne vode, većinom proteinima, ugljikohidratima, mastima.<sup>3,24</sup> S obzirom na prisutnu količinu hranjivih tvari, dolazi do njihova rasta. U slučaju povećane koncentracije hranjivih tvari, bakterije ih koriste za rast i energiju. No, kada je ograničena količina hranjivih tvari, bakterije ih koriste za proizvodnju energije i održavanje stanica uz smanjen rast.<sup>24</sup> Prisutne bakterije su većinom gram-negativne iz rodova *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, *Mycobacterium*, te dvije nitrificirajuće bakterije, *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*.<sup>24</sup>

Osim bakterija, prisutni su i drugi organizmi koji čine preostalih 5 % aktivnog mulja. Protozoe su jednostanični organizmi, a obuhvaćaju amebe, bičaste i trepetljikaše. Mogu biti plivajuće, puzajuće i vezane protozoe koje se hrane koloidnim otpadom, bakterijama i ostalim sitnijim organizmima.<sup>3,25</sup> Utječu na smanjenje vrijednosti biokemijske potrošnje kisika u otpadnoj vodi, indikator su kvalitete izlaznog toka i ukazuju na učinkovitost biološke obrade.<sup>3,26</sup> Nadalje, metazoe, nematode i rotifere, su višestanični organizmi koji se rijetko nalaze u većem broju u procesima obrade otpadnih voda. Njihova uloga je uklanjanje neflokuliranih bakterija i stvaranje pahuljica jer izlučuju sluzave izlučevine.<sup>3,24</sup> Dakle, protozoe i metazoe konzumiraju suspendirane bakterije i male biološke čestice pa imaju veću ulogu u završnoj fazi obrade izlaznog toka.<sup>24</sup> No, sastav mikrobne zajednice varira ovisno o vrsti supstrata, koncentraciji otopljenog kisika, temperaturi, pH-vrijednosti, prisutnosti toksičnih tvari i C:N omjeru. S obzirom na temperaturno područje, prevladavaju mezofilne bakterije te većina raste u neutralnom pH području. pH-vrijednost ujedno ima utjecaj na viskoznost, hidrofobnost i površinski naboj EPS-a što utječe na mogućnost stvaranja pahuljica.<sup>27</sup> Kisik predstavlja kritični parametar za razgradnju biorazgradivih tvari. Dispergiranje kisika omogućava se povoljnim hidrodinamičkim režimom, primjerice miješanjem. Prisutnost toksičnih tvari također utječe na proces stvaranja pahuljica, kao i na taloživost mulja.<sup>28,29</sup> Nužno je pratiti čimbenike koji utječu na rast i razmnožavanje mikroorganizama.

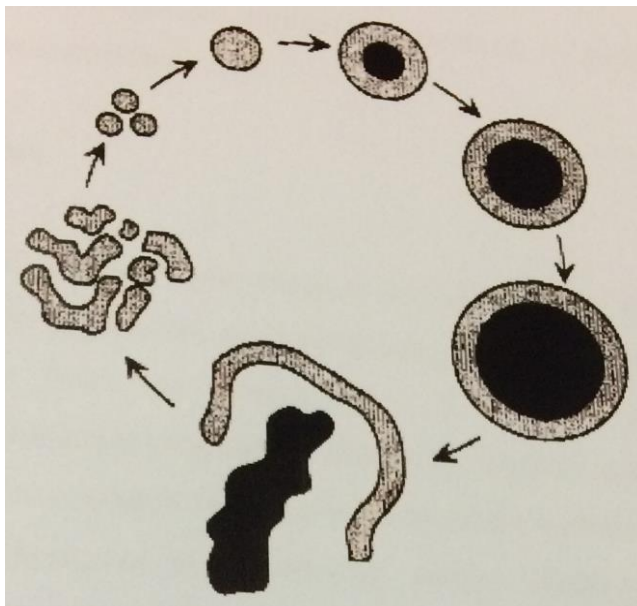
Do prirasta biomase dolazi uslijed razgradnje prisutnih hranjivih tvari, uz potrošnju kisika, pomoću enzima. Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije. S obzirom na enzime koje određena bakterijska kultura posjeduje, može ukloniti prisutne onečišćujuće tvari. Enzimi, koje proizvode bakterije, sudjeluju u procesu razgradnje supstrata i nakon toga u izgradnji novih spojeva iz razgrađenih hranjivih tvari.<sup>24,29,31,32</sup>

Mikroorganizmi se vežu u pahuljice aktivnog mulja koje su negativnog naboja i veličine 50 – 1000 nm.<sup>3,30</sup> Pahuljice posjeduju veliku površinu te sadrže različite organske i anorganske tvari. Sastoje se od 10 do 30 % mineralnih tvari pri čemu su fosfor i kalcij glavni sastojci, a 70-90 % čine organske tvari od kojih predstavljaju proteini i ugljikohidrati.<sup>3,24</sup> Sadrže i oko 80 % vode, koja je uglavnom vezana.

Pahuljice aktivnoga mulja sastoje se od velikog broja u više slojeva raspoređenih bakterija od kojih neke na površinu svoje stanične stijenke izlučuju sluz, odnosno izvanstanični polimerni materijal. To je biosintetski matrix koji povezuje

bakterijske agregate u trodimenzionalnu strukturu pomoću slabih fizikalno-kemijskih interakcija poput elektrostatskih, hidrofobnih, van der Waalsovih i vodikovih veza.<sup>30</sup> EPS ili ekstracelularna polimerna supstanca sačinjena je od makromolekula: polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida.<sup>28</sup> Ovo svojstvo utječe na njezin površinski naboj i selektivnost prema različitim kationima. Stoga, hidrofobnost, površinski naboj i sama struktura polimerne tvari imaju ulogu u adsorpcijskom (biosorpcijskom) kapacitetu, biorazgradivosti, strukturi, svojstvu sedimentiranja te fizikalno-kemijskim karakteristikama pahuljica mulja.<sup>28,30,32</sup> Na strukturu i produciranje EPS-a utječe vrsta otpadne vode, kao i procesni uvjeti.

Morfološke karakteristike pahuljica mulja mogu se podijeliti u dvije kategorije:<sup>33</sup> parametri koji opisuju veličinu pahuljice i parametri koji opisuju oblik pahuljice. Parametri koji opisuju veličinu pahuljice obuhvaćaju aktivnu površinu pahuljice i ekvivalentni promjer. S obzirom na veličinu, pahuljice se klasificiraju kao male, srednje i velike. Zaokruženost, konveksnost i faktor oblika pahuljice su parametri koji opisuju oblik pahuljice. Kompaktne pahuljice nastaju kada su bakterije tijesno približene jedna drugoj te takve pahuljice su, većinom, smeđe boje.<sup>34</sup>



Slika 2.4. Životni ciklus pahuljice aktivnoga mulja.<sup>24</sup>

Na slici 2.4. prikazan je životni ciklus pahuljice aktivnoga mulja. Pahuljice rastu i odumiru što je označeno crnom jezgrom. Raspadanjem pahuljica, stvaraju se

nove, a odumrli mikroorganizmi se razgrađuju. To označava da su stanice ušle u zadnju fazu, fazu odumiranja. Dolazi do liziranja stanica, a nove stanice nastaju na račun odumrlih. Nepravilni oblik aproksimira se sferom koja se sastoji od živih mikroorganizama u vanjskom dijelu i neživog dijela odumrlih mikroorganizama u unutrašnjosti stanice. Dakle, stvaranje pahuljica ovisi o sposobnosti samih stanica da stvaraju pahuljice, gustoći stanica i hidrodinamičkim uvjetima sustava.<sup>24</sup>

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Aktivni mulj**

Aktivni mulj korišten za izolaciju bakterijskih kultura dopremljen je iz aerobnog reaktora s postrojenja za obradu otpadne vode s lokacije Savski Marof, Pliva d.o.o.

##### **3.1.2. Otpadna voda iz proizvodnje farmaceutika**

Otpadne vode iz proizvodnje farmaceutika s lokacije Savski Marof, Pliva d.o.o. u ovom radu korištene su kao supstrat za biološku obradu u šaržnom reaktoru. Koncentracija supstrata,  $S$ , koja predstavlja ukupno onečišćenje otpadnih voda, izražena je preko vrijednosti kemijske potrošnje kisika (KPK,  $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ).

#### **3.2. MJERNI INSTRUMENTI I OPREMA**

U radu je korištena rotacijska termostatorirana tresilica Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka, za provedbe pokusa aerobne obrade otpadne vode u šaržnim uvjetima. Za sterilizaciju hranjivih podloga, čistog staklenog posuđa i aktivnim muljem onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Za homogeniziranje priređenih razrjeđenja uporabljen je homogenizator EV-100, Tehnica, Slovenija. Mikroorganizmi su uzgajani u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska. Pomoću prijenosnog mjerača koncentracije kisika WTW Multi 340i, Njemačka, određivana je koncentracija otopljenog kisika u otpadnoj vodi. Vrijednost pH određivana je pH-metrom Model 720A, Orion, USA. Instrumenti su prije svake upotrebe kalibrirani. KPK vrijednost je određivana spektrofotometrijski, Hach, Model DR/2400, USA. Sušionik Termo-Medicinski aparati, Hrvatska, korišten je za određivanje suhe tvari u uzorcima. Za precizno vaganje uporabljena je vaga Sartorius AG, Njemačka. Test toksičnosti je proveden na Lumistox 300, Dr Lange GmbH, Njemačka. Uzorak aktivnog mulja je pregledavan pomoću svjetlosnog



mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

### 3.3. METODE RADA

#### 3.3.1. Izolacija i identifikacija bakterijskih kultura iz aktivnoga mulja

Za provedbu eksperimenta, stvaranje pahuljica aktivnog mulja, korištene su bakterijske kulture izolirane iz aktivnoga mulja. Za uzgoj bakterija priređene su dvije vrste hranjivih podloga. Bakterijske kulture uzgojene su naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja aktivnoga mulja na dvije hranjive podloge, hranjivi agar (HA) i Tryptic soy broth (TSB), u Petrijeve zdjelice koje su inkubirane pri 37 °C, 24-48 sati. Nakon inkubacije određen je ukupan broj živih stanica bakterija, *CFU* (eng. *Colony forming units*)<sup>24</sup>. Kulture koje su bile najzastupljenije prema svojim morfološkim karakteristikama u svim pripravljenim razrjeđenjima su izolirane te pročišćene tehnikom iscrpljivanja u svrhu dobivanja zasebnih kolonija. Klasifikacija bakterija u jednu od dviju velikih skupina: gram pozitivne i gram negativne bakterije, provedena je bojanjem po Gramu<sup>24</sup> i testom s kalijevim hidroksidom. Također je ispitana enzimska aktivnost biokemijskim testovima; oksidaza, katalaza i nitrataza.<sup>35</sup>

Za određivanje roda i vrste bakterija korišten je API strip (eng. *Analytical profile index*) koji se sastoji iz više različitih biokemijskih testova temeljenih na enzimskoj aktivnosti kulture mikroorganizma. Čiste bakterijske kulture inokulirane su na propisani način te je tako pripremljen strip inkubiran u termostatu pri 37°C tijekom 24-48 sati. Očitavanje rezultata provedeno je uz pomoć dopunskih reagensa i tablice sa rezultatima.<sup>35</sup>

Kao potvrđan test provedena je MALDI-TOF masena spektrometrija (eng. *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) na institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Analit, čiste bakterijske kulture, je ioniziran zajedno s matricom djelovanjem laserskog svjetla. Ioni proteina prolaze kroz ionizacijsku cijev gdje se razdvajaju na temelju njihove mase i naboja, a odziv se dobiva u obliku pikova.<sup>36</sup>

### 3.3.2. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Kemijska potrošnja kisika je pokazatelj ukupnog organskog opterećenja u uzorku otpadne vode. Postupak određivanja vrijednosti KPK se temelji na principu oksidacije organskih tvari u uzorku s kalijevim bikromatom u sumporno kiselom mediju uz srebrov sulfat kao katalizator. Analiza se provodi u zatvorenim kivetama kuhanjem 2 sata u bloku za digestiju pri temperaturi 150 °C, a količina utrošenog kalijevog bikromata mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 670$  nm. KPK vrijednost se izražava kao ekvivalent kisika koji je proporcionalan utrošku kalijevog bikromata.<sup>37</sup>

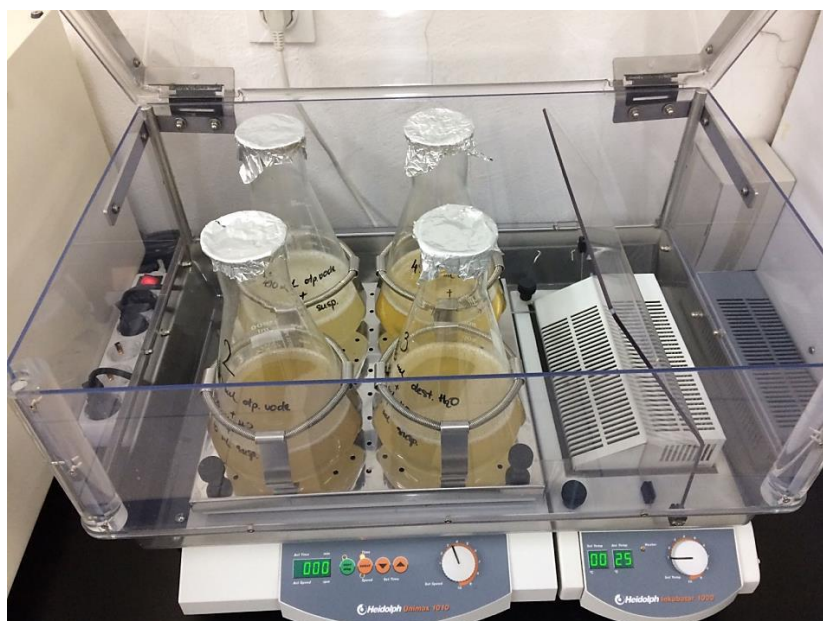
### 3.3.3. Određivanje toksičnosti farmaceutске otpadne vode

U uzorku otpadne vode proveden je test toksičnosti pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Inhibicija bioluminiscencije izmjerena je nakon inkubacije od 30 min prema standardnoj metodi EN ISO 11348-3, 1998.<sup>38</sup> Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari, u ovom slučaju farmaceutске otpadne vode. Kao mjera fiziološke aktivnosti koristi se prirodno svojstvo luminiscencije ove vrste bakterija. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 minuta. Instrument očitava dva rezultata efektivne koncentracije: EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> koji predstavljaju volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20 %-tnog i 50%-tnog pada luminiscencije.

Indeks utjecaja toksičnosti (TII) se izračunava prema jednadžbi  $TII_{50} = 100 \times (EC_{50})^{-1}$ . Prema definiranoj skali, uzorci su klasificirani kao ‘ne toksični’ (0, NT), ‘blago toksični’ (<1, BT), ‘toksični’ (1–10, T), ‘vrlo toksični’ (11–100., VT), i ‘ekstremno toksični’ (>100, ET).<sup>38,39</sup>

### 3.3.4. Proces stvaranja pahuljica aktivnoga mulja

Provedena su tri pokusa (P1-P3) stvaranja pahuljica aktivnog mulja na rotacijskoj termostatoranoj tresilici s brzinom vrtnje od 160 min<sup>-1</sup> i  $T = 25,3$  °C tijekom 72 sata (slika 3.1.).



Slika 3.1. Rotacijska termostatirana tresilica.

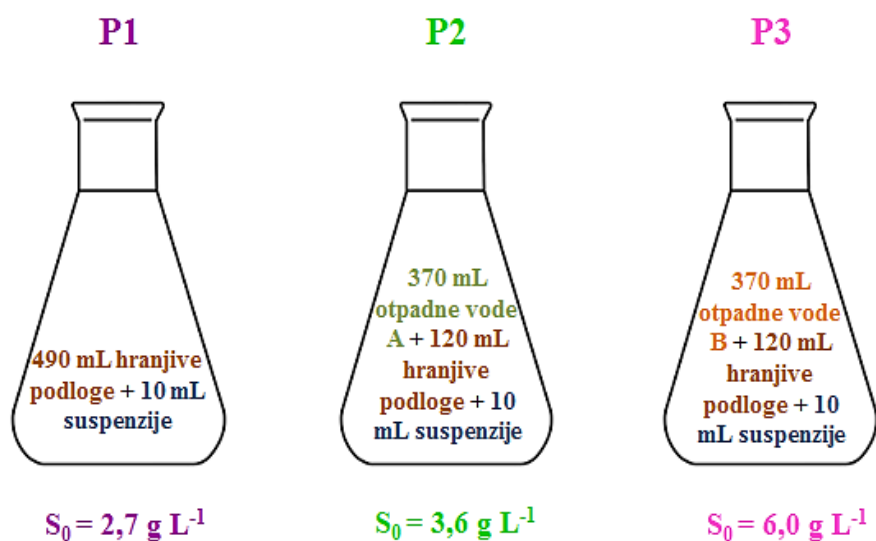
Erlenmeyerove tikvice radnog volumena od 500 mL sadržavale su hranjivu podlogu s dodatkom natrijevog acetata,<sup>40</sup> otpadne vode različitih karakteristika prikazanih u tablici 3.1. te suspenziju izoliranih bakterijskih kultura što je prikazano na slici 3.2.

Tablica 3.1. Karakteristike otpadne vode korištene u procesu stvaranja aktivnog mulja.

<i>Analize</i>	<i>Otpadna voda A</i>	<i>Otpadna voda B</i>
<b>KPK, mg L<sup>-1</sup></b>	26 440,0	8 313,0
<b>pH – vrijednost, -</b>	3,8	7,37
<b><math>\kappa</math>, mS cm<sup>-1</sup></b>	19,3	2,4
<b>TII, -</b>	7,6	85,5

Optička gustoća dodane suspenzije iznosila je 0,17 u svim pokusima, a uzorak otpadne vode A razrijeđen je 10 puta prije postavljanja pokusa zbog visoke početne vrijednosti KPK i vodljivosti.

Na slici 3.2. prikazane su početne vrijednosti koncentracije supstrata,  $S_0$ , u sva tri pokusa. U pokusu P1, koji je sadržavao samo hranjivu podlogu i bakterijsku suspenziju, početna vrijednost koncentracije iznosila je  $S_0 = 2,7 \text{ g L}^{-1}$ . Nadalje, kod pokusa P2, čiji je sastav činila otpadna voda A, hranjiva podloga i bakterijska suspenzija, početna vrijednost koncentracije supstrata iznosila je  $S_0 = 3,6 \text{ g L}^{-1}$ . Otpadna voda B, hranjiva podloga i bakterijska suspenzija činile su sastav pokusa P3, a početna vrijednost koncentracije supstrata iznosila je  $S_0 = 6,0 \text{ g L}^{-1}$ .

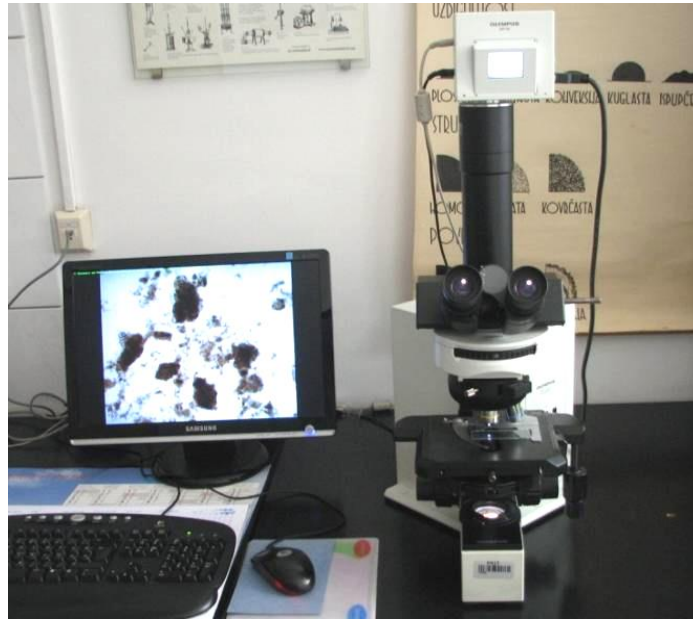


Slika 3.2. Prikaz sadržaja Erlenmayerovih tikvica uz početne vrijednosti koncentracije supstrata u P1-P3 za provedbu procesa stvaranja pahuljica aktivnog mulja.

Tijekom pokusa u uzorcima su određivani: pH–vrijednost, koncentracija otopljenog kisika, kemijska potrošnja kisika te je mikroskopskom analizom praćen nastanak pahuljica aktivnog mulja i njihova kakvoća.

### 3.3.5. Mikroskopska analiza mulja

Morfološke karakteristike nastalih pahuljica aktivnog mulja u suspenziji bakterijskih kultura i otpadne vode određivane su mikroskopskom analizom. Uzorci su uzimani svakodnevno i odmah pregledavani pomoću mikroskopa (slika 3.3.).



Slika 3.3. Svjetlosni mikroskop sa ugrađenom kamerom.

Vlažni preparat pripravljen je nanošenjem kapljice uzorka suspenzije sterilnom pipetom na predmetnicu. Preparat je pokriven pokrovnicom i promatran pod mikroskopom pri povećanjima od 100 i 400 $\times$ . Snimane su mikroskopske fotografije, tzv. mikrofotografije u prolaznoj svjetlosti. Fotografiran je reprezentativni uzorak pomoću mikroskopa opremljenog kamerom te su uočene značajne karakteristike prisutnih mikroorganizama, što omogućuje praćenje smjene mikroorganizama kao i formiranje pahuljica aktivnoga mulja.

## 4. REZULTATI

### 4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ AKTIVNOG MULJA

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.1. provedena je izolacija i identifikacija bakterijske kulture iz aktivnoga mulja. Rezultati su prikazani slikama 4.1.- 4.6. te tablici 4.1.



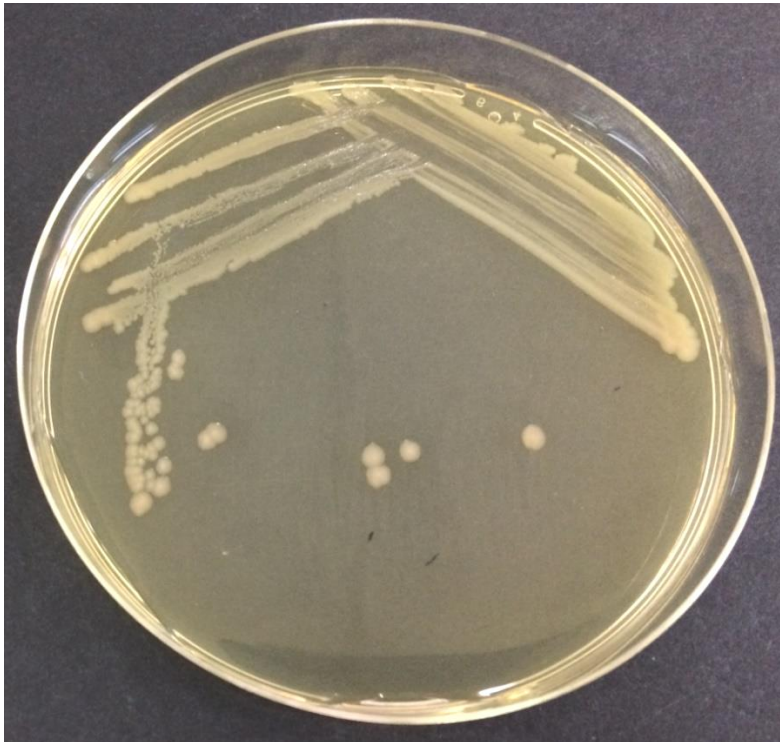
Slika 4.1. Izrasle bakterijske kulture nakon 24 - 48 h pri 37 °C na hranjivoj podlozi *Tryptic soy broth* nacijepljenom uzorkom iz aktivnoga mulja, CFU =  $7,2 \cdot 10^5$  st mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.2. Izrasle bakterijske kulture nakon 24-48 h pri 37 °C na hranjivom agaru nacijepljenoj uzorkom iz aktivnoga mulja, CFU =  $5,0 \cdot 10^5$  st mL<sup>-1</sup>.



Slika 4.3. Fotografiska snimka izrasle bakterijske kulture *Bacillus cereus* na hranjivom agaru dobivene tehnikom iscrpljivanja nakon inkubacije od 24 sata.

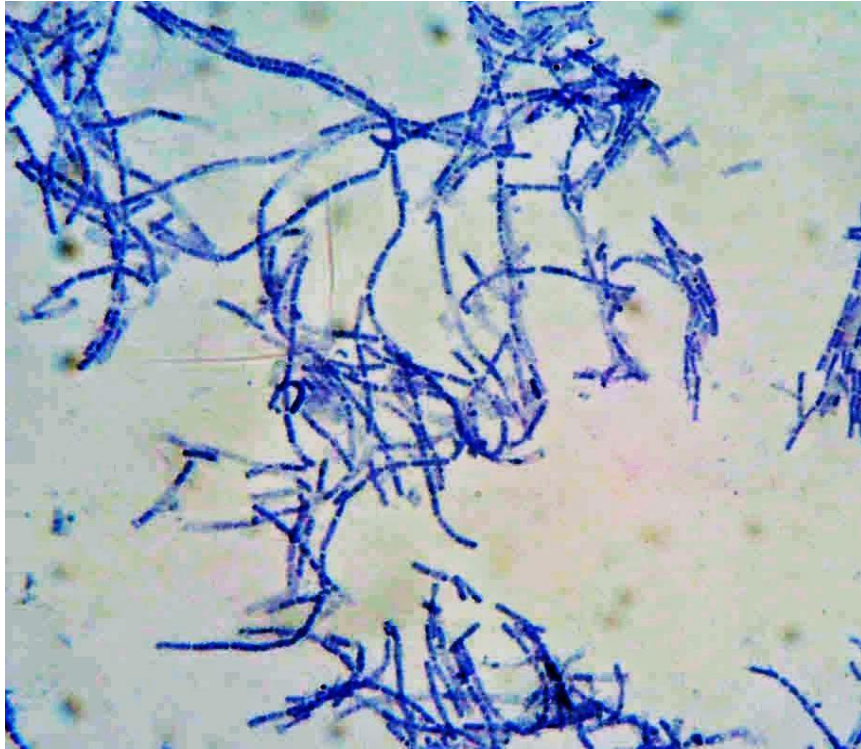


Slika 4.4. Fotografiska snimka izrasle bakterijske kulture *Cupriavidus gilardii* na hranjivom agaru dobivene tehnikom iscrpljivanja nakon inkubacije od 24 sata.

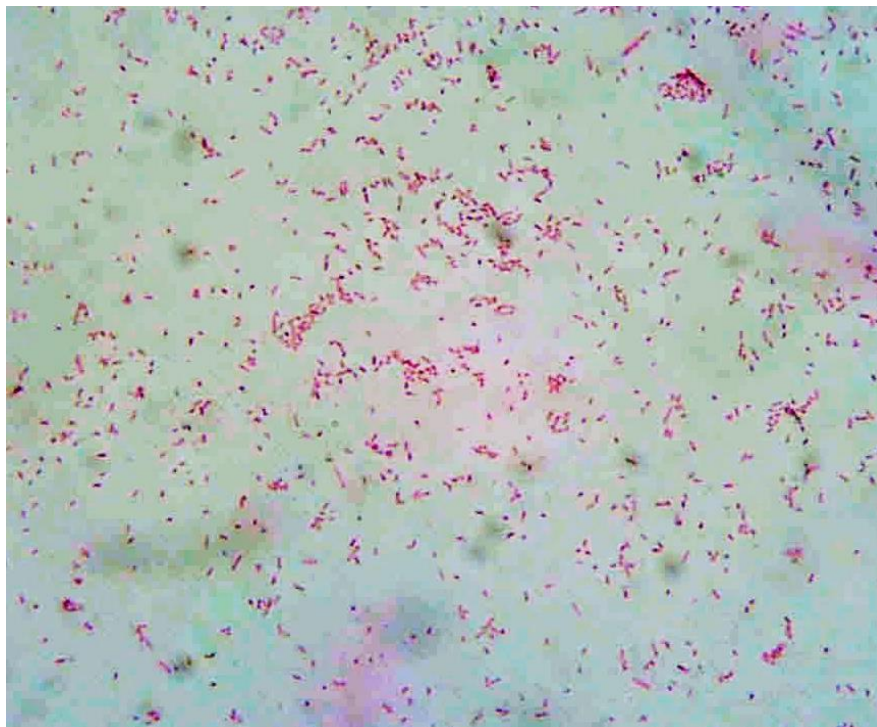


Slika 4.5. Fotografiska snimka izrasle bakterijske kulture *Alcaligenes faecalis* na hranjivoj podlozi *Tryptic soy broth* dobivene tehnikom iscrpljivanja nakon inkubacije od 24 sata.

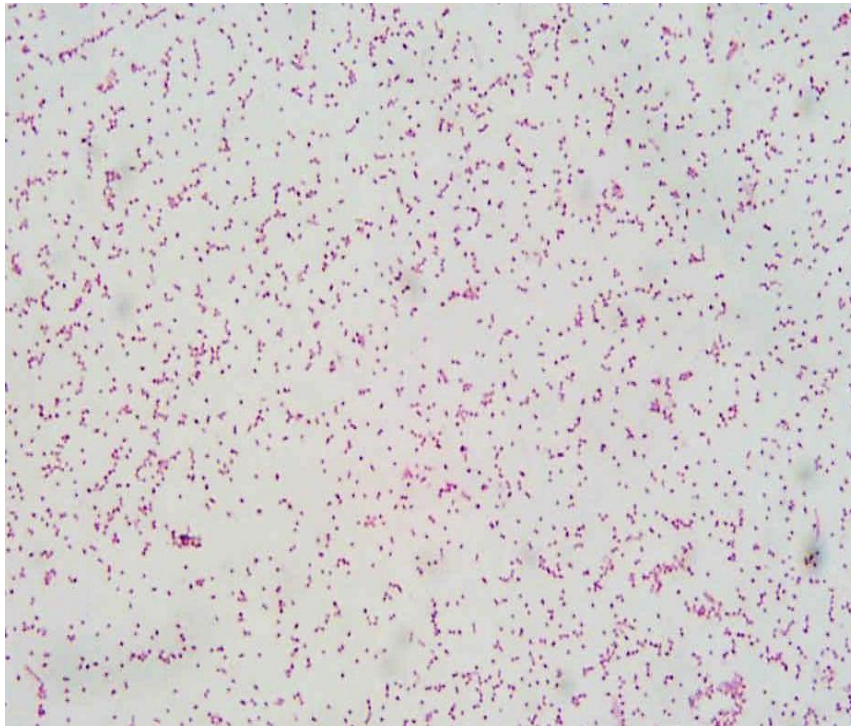




Slika 4.6. Mikrofotografija izolirane bakterijske kulture *Bacillus cereus* obojane po Gramu, P = 1000×.



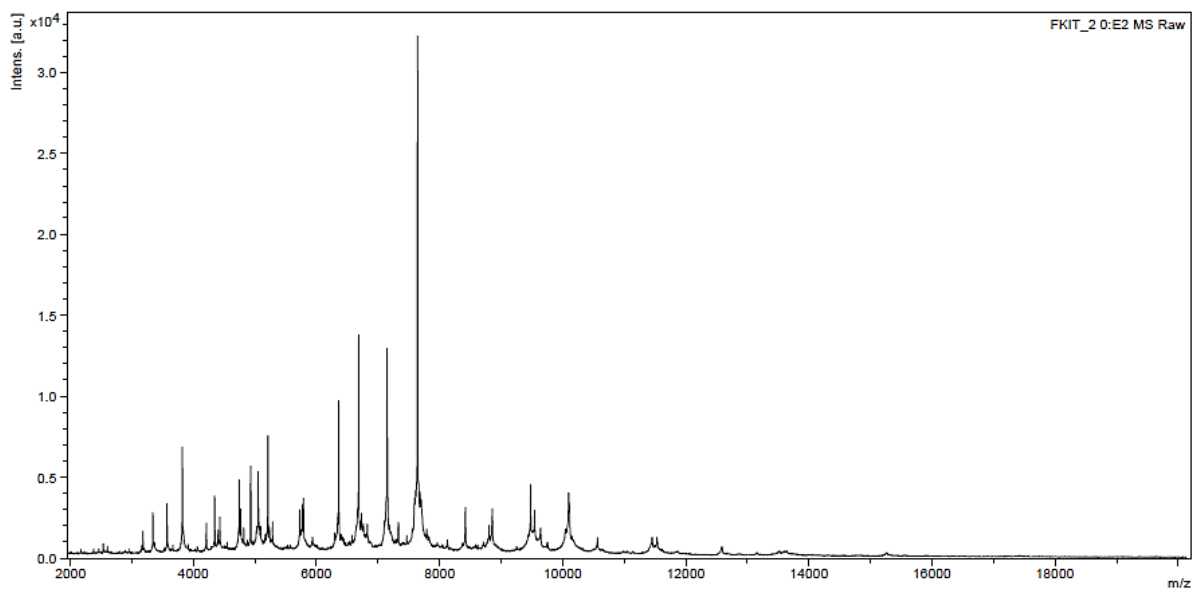
Slika 4.7. Mikrofotografija izolirane bakterijske kulture *Cupriavidus gilardii* obojane po Gramu, P = 1000×.



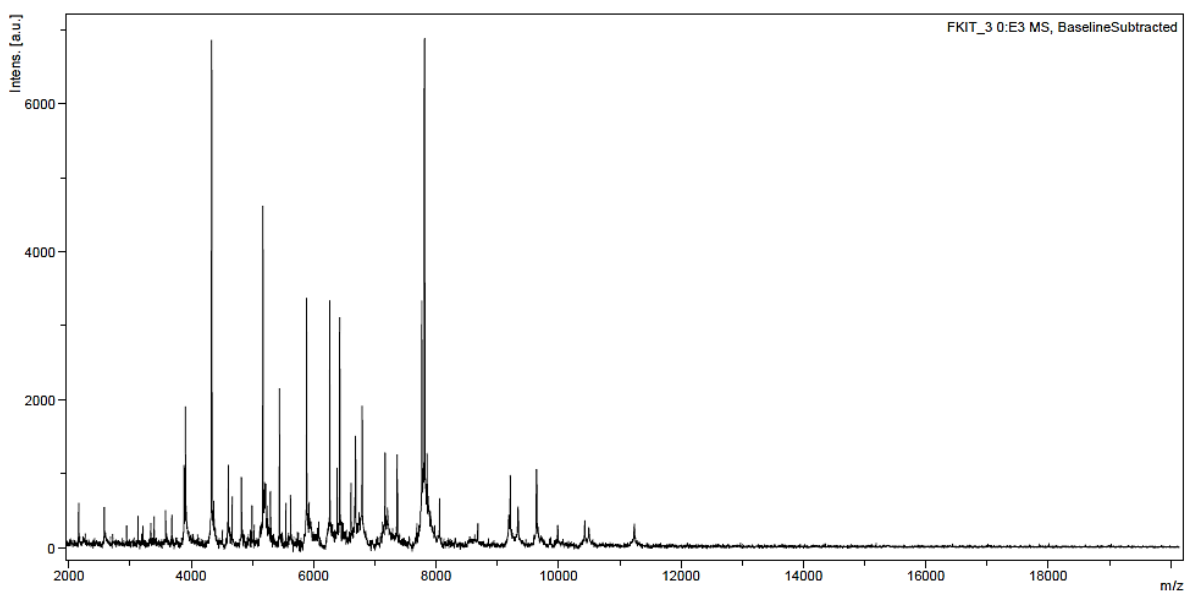
Slika 4.8. Mikrofotografija izolirane bakterijske kulture *Alcaligenes faecalis* obojane po Gramu, P = 1000×.

Tablica 4.1. Rezultati provedenih biokemijskih testova za bakterijske kulture izolirane iz aktivnoga mulja.

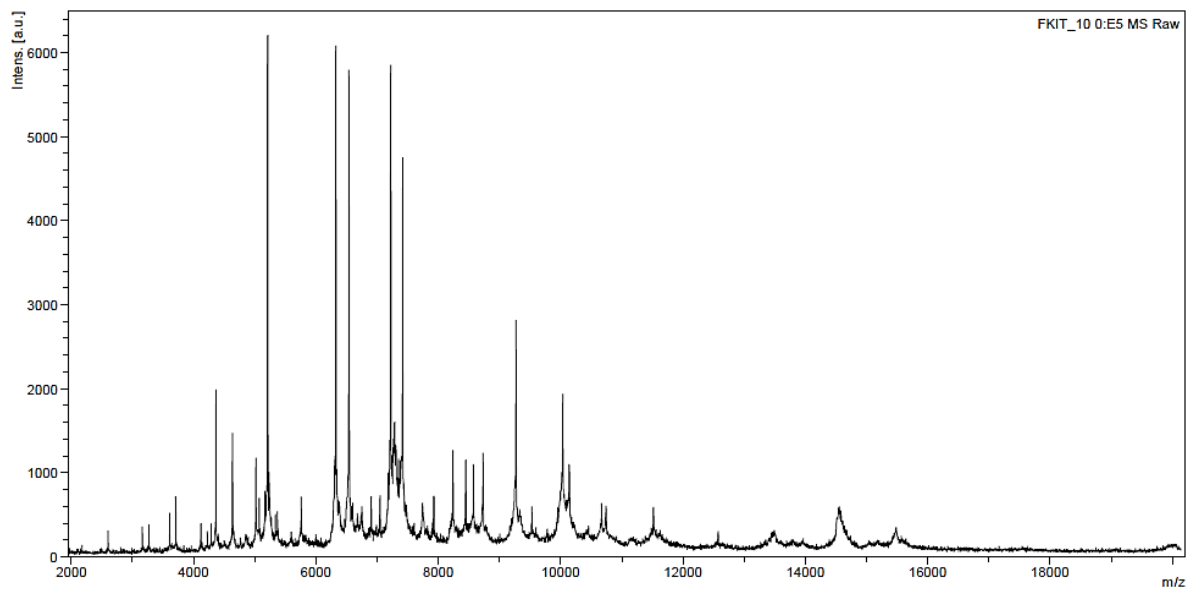
Bakterijska kultura	Oksidaza	Katalaza	Nitrataza	KOH
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	-	+
<i>Cupriavidus gilardii</i>	+	+	-	+



Slika 4.9. Snimljeni spektar MALDI-TOF masene spektrometrije za bakterijsku kulturu *Alcaligenes faecalis*.



Slika 4.10. Snimljeni spektar MALDI-TOF masene spektrometrije za bakterijsku kulturu *Bacillus cereus*.



Slika 4.11. Snimljeni spektar MALDI-TOF masene spektrometrije za bakterijsku kulturu *Cupriavidus gilardii*.

Tablica 4.2. Rezultati identifikacije dobiveni na temelju MALDI-TOF masene spektrometrije za izolirane bakterijske kulture iz aktivnoga mulja.

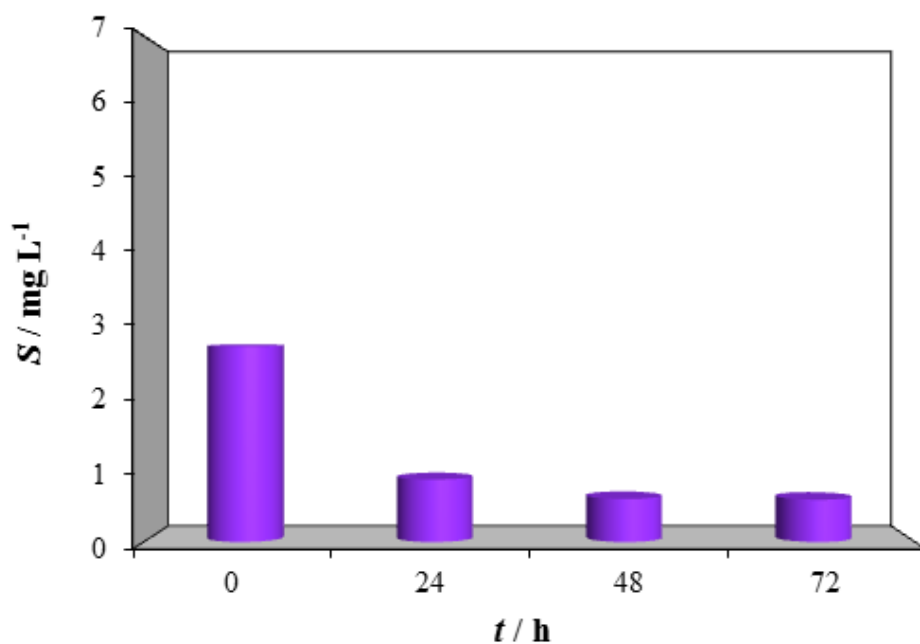
AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
<a href="#">E2</a> (+)(B)	FKIT_2	<a href="#">Alcaligenes faecalis</a>	1.979	<a href="#">Alcaligenes faecalis</a>	1.924
<a href="#">E3</a> (++)(A)	FKIT_3	Bacillus cereus	2.105	<a href="#">Bacillus weihenstephanensis</a>	1.78
<a href="#">E5</a> (++)(A)	FKIT_10	<a href="#">Cupriavidus gilardii</a>	2.121	<a href="#">Cupriavidus gilardii</a>	2.111

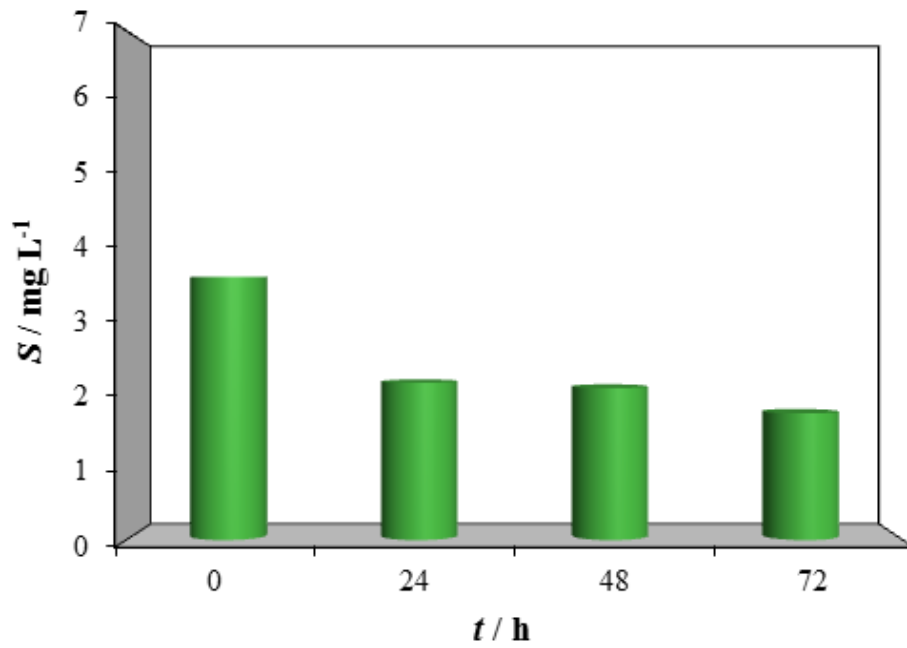
Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

## 4.2. PROCES STVARANJA PAHULJICA AKTIVNOG MULJA

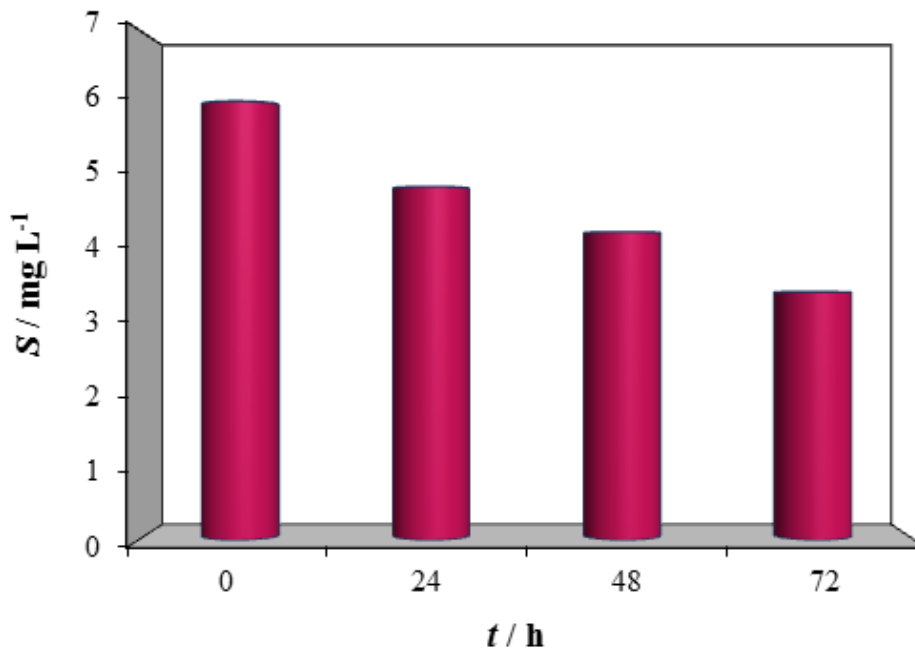
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.4. proveden je proces stvaranja pahuljica aktivnoga mulja sa izoliranim bakterijskim kulturama *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii*. Rezultati pokusa prikazani su na slikama 4.12. – 4.15.



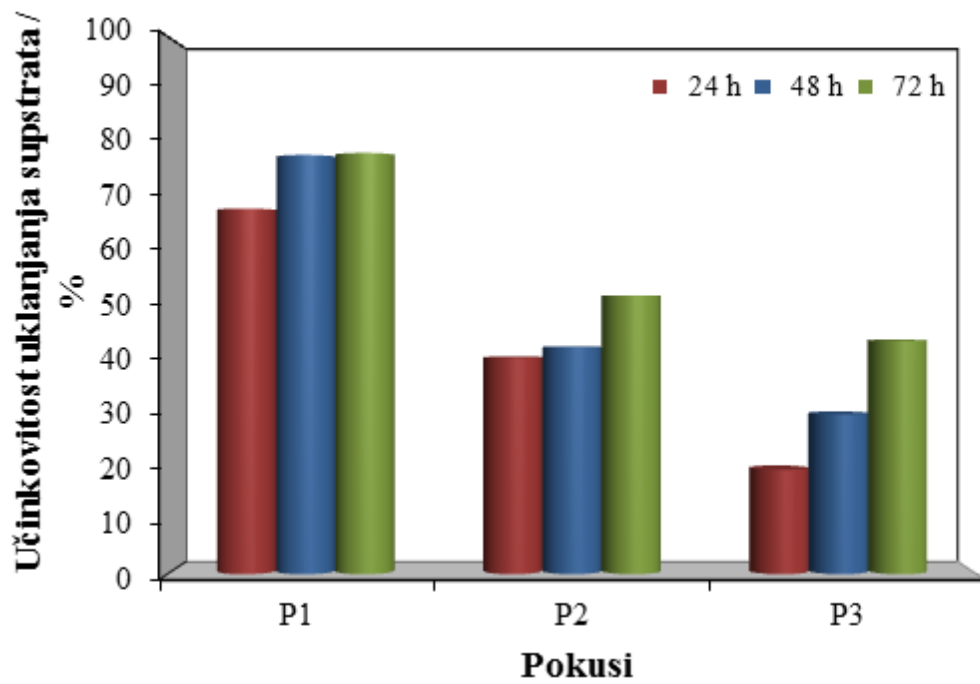
Slika 4.12. Promjena koncentracije supstrata tijekom 72 sata pri  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $160\text{ min}^{-1}$  u P1.



Slika 4.13. Promjena koncentracije supstrata tijekom 72 sata pri  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $160 \text{ min}^{-1}$  u P2.



Slika 4.14. Promjena koncentracije supstrata tijekom 72 sata pri  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $160 \text{ min}^{-1}$  u P3.



Slika 4.15. Usporedba učinkovitosti uklanjanja supstrata u P1, P2 i P3.



### 4.3. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.5. provedena je mikroskopska analiza pahuljica aktivnoga mulja. Rezultati su prikazani u slikama 4.16.- 4.20.



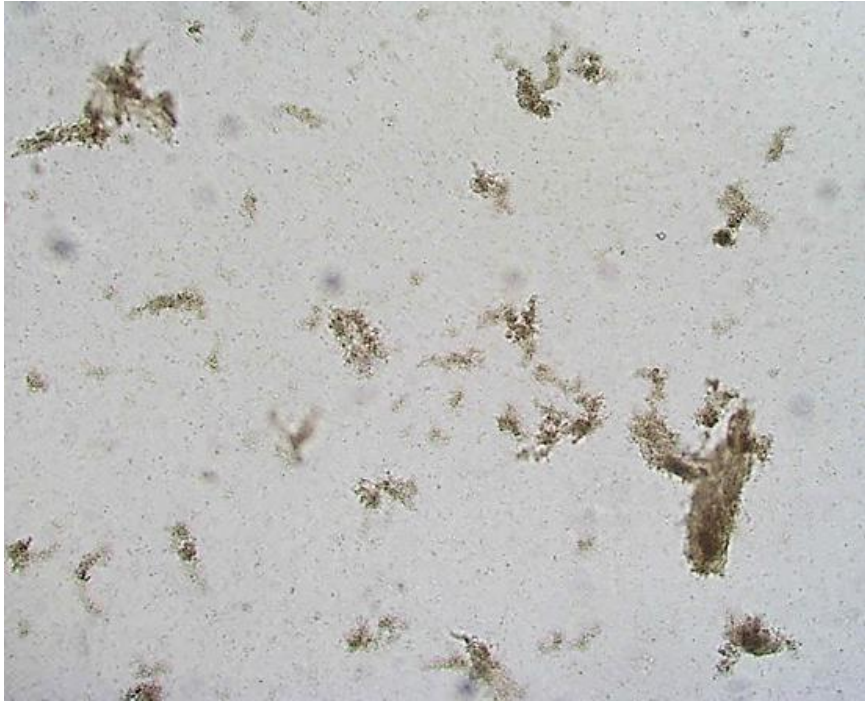
Slika 4.16. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u 24. satu provedbe procesa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja u P1 snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 100×.



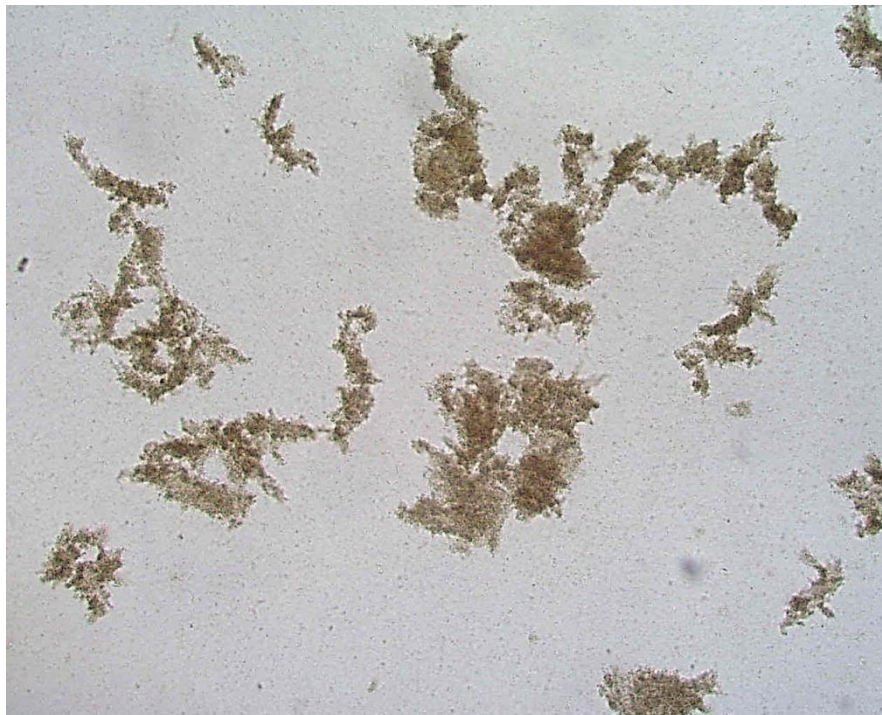
Slika 4.17. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u 24. satu provedbe procesa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja u P2 snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 100×.



Slika 4.18. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u 48. satu provedbe procesa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja u P2 snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 100×.



Slika 4.19. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u 24. satu provedbe procesa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja u P3 snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 100×.



Slika 4.20. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja u 72. satu provedbe procesa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja u P3 snimljene u prolaznoj svjetlosti, P = 100×.

## 5. RASPRAVA

Ubrzanim razvojem farmaceutske industrije i rastom proizvodnje farmaceutika javlja se potreba izbora odgovarajućeg postupka pri obradi nastalih otpadnih tokova poštivajući načela zaštite okoliša. Farmaceutska otpadna voda zbog sadržaja neizreagiranih reaktanata, intermedijera te farmaceutskih aktivnih tvari predstavlja potencijalni problem za okoliš.<sup>1-9</sup> Za obradu farmaceutske otpadne vode koristi se biološka obrada s aktivnim muljem čija učinkovitost uvelike ovisi o metaboličkom potencijalu mikroorganizama.<sup>20-23</sup> Najvažniji element u procesu biološke obrade otpadnih voda predstavljaju pahuljice aktivnog mulja. Na njihovo stvaranje utječe priroda i koncentracija prisutnog supstrata, koncentracija otopljenog kisika te hidrodinamička svojstva reaktora.<sup>31</sup>

### 5.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA IZ AKTIVNOG MULJA

Uzgojem bakterijskih kultura na dvije različite podloge, hranjivi agar (slika 4.1.) i *Tryptic soy broth* (slika 4.2.) određen je ukupan broj živih bakterijskih stanica (CFU) te je provedena izolacija. Dobivena vrijednost CFU na hranjivom agaru iznosila je  $5,0 \cdot 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ , a vrijednost za *Tryptich soy broth* bila je iste potencije, ali ipak nešto veća i iznosila je  $7,2 \cdot 10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$ . Dobiveni rezultati ukazuju da su u aktivnom mulju iz industrijske proizvodnje farmaceutika prisutne ove bakterijske kulture.

Bojanjem po Gramu ustanovljeno je da izolirane kulture *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* spadaju u skupinu gram negativnih bakterija, dok se bakterijska kultura *Bacillus cereus* spada u gram pozitivne bakterije. Zajednička karakteristika gram negativnih bakterija je tanja stanična stjenka, u odnosu na gram pozitivne bakterije, koja se sastoji od 5-12 % peptidoglikana, a s vanjske strane je obavijena lipopolisaharidnim slojem.<sup>28</sup> Mikroskopskom analizom, ujedno, je uočeno da su stanice bakterijskih kultura *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* i *Cupriavidus gilardii* štapićastog oblika, što je vidljivo na slikama 4.6., 4.7. i 4.8.

Tablica 4.1. prikazuje rezultate provedenih biokemijskih testova koji ukazuju na prisutnost enzima oksidaze, katalaze i nitrataze u izoliranim mikroorganizmima dok je potvrđan rezultat testa s kalijevim hidroksidom pokazatelj kako je bakterija gram

negativna. Za bakterijsku kulturu *Bacillus cereus* svi provedeni biokemijski testovi su pozitivni. Test s kalijevim hidroksidom je negativan što znači da je kultura gram pozitivna. To je potvrđeno i bojanjem po Gramu te mikroskopskom analizom (slika 4.6.). Bakterijske kulture *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* ne sadrže enzim nitratazu, ali sadrže enzime katalazu i oksidazu. Test s kalijevim hidroksidom, koji je brzi test provjere da li je kultura gram pozitivna ili negativna, ispao je potvrđan. Također, to se podudara s bojanjem po Gramu prikazanom slikama 4.7. i 4.8. i provedenom mikroskopskom analizom, kojima je potvrđeno da su obje bakterijske kulture gram negativne.

Rod i vrsta izoliranih bakterijskih kultura, prikazanih na slikama 4.3., 4.4. i 4.5., određeni su MALDI-TOF metodom. Na temelju rezultata (slike 9.-11.) dobivenih MALDI-TOF masenom spektrometrijom prema odzivu analize, koji je bio vrlo intenzivan, s velikom vjerojatnošću može se potvrditi da su izolirane bakterijske kulture *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* i *Cupriavidus gilardii* (tablica 4.2.).

Iz aktivnoga mulja izolirane su najzastupljenije bakterije. S obzirom na to da one obitavaju u aktivnom mulju koji se koristi za obradu farmaceutske otpadne vode pretpostavlja se njihova dobra prilagođenost dostupnom supstratu te samim time mogućnost povezivanja u pahuljice aktivnoga mulja.

Izolirane bakterijske kulture *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus cereus* i *Cupriavidus gilardii* korištene su u pokusima stvaranja pahuljica aktivnoga mulja.

## **5.2. PROCES STVARANJA PAHULJICA AKTIVNOG MULJA**

Proces stvaranja aktivnog mulja proveden je inokulacijom bakterijskih kultura *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* u sustav s hranjivom podlogom i farmaceutskom otpadnom vodom kako je opisano u odlomku 4.2.

Slikom 4.12. prikazana je promjena koncentracije supstrata tijekom 72 sata u pokusu P1. Tijekom bioflokulacije mikroorganizmi, odnosno bakterijske kulture razgrađuju otopljene tvari što im omogućuje proizvodnju ekstracelularne polimerne supstance za formiranje flokula iz suspendiranih čestica.<sup>31</sup> U slici je vidljivo smanjenje koncentracije prisutnog supstrata koje je najznačajnije u 24. satu. Razgradnja se odvila u kraćem periodu zbog toga što hranjiva podloga sadrži tvari koje bakterije lako asimiliraju i razgrađuju.

U pokusu P2 uz hranjivu podlogu korištena je otpadna voda A čije su karakteristike vidljive u tablici 3.1. Dodatkom novog supstrata u sustav su unijeti teže razgradivi organski spojevi što je i karakteristično za farmaceutske otpadne vode.<sup>16,17</sup> Učinkovitost procesa u 48. satu iznosila je 43,0 % što je i prikazano u slici 4.13. U pokusu P3 je ista učinkovitost postignuta u 72. satu. U ovom pokusu korištena je otpadna voda B, također s određenim udjelom hranjive podloge, koja je prethodno okarakterizirana kao vrlo toksična. U slici 4.14. vidljiv je postepeni pad koncentracije supstrata, a razlog tome je prisustvo toksičnih tvari koje mogu inhibitorno djelovati na metabolizam mikroorganizama ili usporiti proces stvaranja pahuljica aktivnog mulja.<sup>41</sup>

U slici 4.15. prikazana je učinkovitost uklanjanja supstrata kroz 72 sata za sva tri pokusa. Najveća učinkovitost u pokusu P1 iznosila je 78,0 %, a u pokusu P2 ona iznosi 51,8 %. Također je u navedenim pokusima najveći skok u postocima uklonjenog supstrata zabilježen u 24. satu, dok u daljnjem provođenju pokusa nisu zabilježene veće promjene. U tom periodu su bakterijske kulture ušle u eksponencijalnu fazu rasta zbog čega su više koristile dostupan supstrat za svoj rast i razmnožavanje. U pokusu P3 je najveća učinkovitost od 43,5 % postignuta u 4. satu.

### 5.3. MIKROSKOPSKA ANALIZA AKTIVNOG MULJA

Mikrofotografije, kao rezultat mikroskopske analize uzoraka aktivnog mulja, upućuju na tijek procesa bioflokulacije, odnosno stvaranja pahuljica. Nakon prvih 24. sata provedbe pokusa u P1 i P2, gdje je i zabilježen najveći pad koncentracije supstrata, vidljive su formirane pahuljice aktivnog mulja (slike 4.16. i 4.17.). uspješnom formiranju pahuljica pridonijelo je stvaranje ekstracelularne polimerne tvari od strane bakterije *Bacillus cereus*.<sup>42</sup> Pahuljice u pokusu P1 su velike i nepravilnog oblika no naziru se prozirne pahuljice koje su se tek počele razvijati. Tamnija boja većih pahuljica upućuje na to kako su pahuljice već razvijenije te su takve pahuljice doprinijele većoj učinkovitosti uklanjanja prisutnog supstrata. Za razliku od njih, u slici 4.17., vidljive su prozirne pahuljice okruglog oblika koje upućuju na mladu biomasu, odnosno na početnu fazu procesa. Nakon 48 sati provedbe pokusa P2, veličina pahuljica se vidno smanjila (slika 4.18.) što upućuje na pad koncentracije mulja zbog nedostatka hranjivih tvari ili stvaranja nusprodukata biotransformacijom onečišćujućih tvari prisutnih u otpadnoj vodi. U slici 4.19. primijećen je veliki udio slabih, prozirnih pahuljica nepravilnog

oblika koje su u procesu stvaranja. U 64. satu, u slici 4.20., nastale su velike i nepravilne pahuljice koje su po svom obliku slične pahuljicama iz pokusa P1.

Uvjeti miješanja u reaktoru imaju za posljedicu jednoliku raspodjelu pahuljica prema veličini uz postignut specifičan oblik u sustavu farmaceutskih otpadnih voda, čime se razlikuju od drugih sustava otpadnih voda u kojima se prisutno organsko onečišćenje uklanja primjenom bioloških postupaka sa aktivnim muljem.<sup>33</sup>

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa stvaranja pahuljica aktivnoga mulja može se zaključiti sljedeće:

- 1) Farmaceutska otpadna voda okarakterizirana je kao visoko opterećena s KPK vrijednostima  $26.440 \text{ mg L}^{-1}$  i  $8.313 \text{ mg L}^{-1}$  te prema vrijednostima TII od 7,6 i 85,5 toksična i vrlo toksična.
- 2) Iz aktivnog mulja izolirane su bakterijske kulture *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* koje su korištene u procesu stvaranja pahuljica aktivnog mulja.
- 3) U svim pokusima proces stvaranja pahuljica je započeo u 24. satu.
- 4) Najveća učinkovitost uklanjanja supstrata iznosila je 78,0 %.
- 5) Mikroskopskom analizom mulja utvrđeno je da vrsta supstrata utječe na morfologiju pahuljica.



*Veliko hvala cijenjenoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Mariji Vuković Domanovac, na pruženoj prilici, ukazanom povjerenju te svim savjetima i pomoći koju nam je pružila tijekom vrijednog iskustva izrade znanstvenog rada.*

*Također se zahvaljujemo asistentici Moniki Šabić, mag. ing. oecoing. na strpljenju, susretljivosti i pruženoj pomoći pri eksperimentalnom i samom pisanom dijelu rada.*

*Zahvaljujemo i svim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na stručnim savjetima i ugodnom radnom okruženju.*

## 7. LITERATURA

1. Gadipelly, C., Perez-Gonzalez, A., Yadav, D. G., Ortiz, I., Ibanez, R., Rathod, K. V., Marathe, V. K., Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Tehnologies for Water Treatment and Reuse, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53 (2014) 1157-11592.
2. Doble, M., Kumar, A., Pharmaceuticals, Biotreatment of Industrial Effluents, Oxford, Elsevier, 2005., 217-224.
3. Briški, F., Zaštita okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Element, Zagreb, 2016., 34-52.
4. Zrnčević, S., Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, 24 (2016) 119-136.
5. Tiehm, A., Schmidt, N., Stieber, M., Sacher, F., Wolf, L., Hoetzl, H., Biodegradation of Pharmaceutical Compounds and their Occurrence in the Jordan Valley, *Water Resour Manage*, 25 (2011) 1195-1203.
6. Krümmerer, K., Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks, Germany, 2008., 35-44.
7. Bottoni, P., Caroli, S., Barra Caracciolo, A., Pharmaceuticals as priority Water Contaminants, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92 (3) (2010) 549-565.
8. Silvia Diaz-Cruz, M., Lopez de Alda, J. M., Barcelo, D., Environmental Behavior and Analysis of Eterinary and Human Drugs in Soils, Sediments and Sludge, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 340-351.
9. Azuma, T., Mino, Y., Determination of Pharmaceutical Pollutants in River Environment by the SPELC-MS/MS Method: A Mini Review, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2 (2015) 1-5.
10. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 56/13.
11. Wilkinson, L. J., Hooda, S. P., Barker, J., Barton, S., Swinden, J., Ecotoxic Pharmaceuticals, Personal care Products, and other emerging Contaminants: A review of Environmental, Receptor-mediated developmental, and epigenetic toxicity with Discussion of proposed toxicity to Humans, *Critical reviews in Environmental Science and Tehnology*, 46 (2016) 336-381.
12. Mansour, B. H., Mosrati, R., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., Bioremediation of Industrial Pharmaceutical Drugs, *Drug and Chemical*

- Toxicology, 35 (2012) 235-240.
13. Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G., Sumpter, J. P., Widespread sexual disruption in wild fish, *Environmental Science & Technology*, 32 (1998) 2498-2506.
  14. Pery, A., Gust, M., Vollat, B., Mons, R., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T. A., Garric, J., Fluoxetine Effects Assessment on the Life Cycle of Aquatic Invertebrates, *Chemosphere*, 73 (2008) 300-304.
  15. Taggart, M. A., Cuthbert, R., Das, D., Sashikumar, C., Pain, D. J., Green, R. E., Feltrer, Y., Shultz, S., Cunningham, A. A., Meharg, A. A., Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to *Gyps* vulture population declines, *Environmental Pollution*, 147 (2007) 60-65.
  16. Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., Pharmaceutical residues in Environmental Waters and Wastewater: current State of Knowledge and future Research, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 251-275.
  17. Deegan, A. M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemoller, M., Tobin, J., Morrissey, A., Treatment options for Wastewater Effluents from Pharmaceutical Companies, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (2011) 649-666.
  18. Baydum, V. P. A., Dantas, F. R., Teixeira, A., Pacheco, J. G. A., Silva, V. L., Pre-treatment of Propranolol Effluent by Advanced Oxidation Processes, *Afinidad*, 69 (2012) 211-216.
  19. Keller, J., Yuan, Z., Blackall, L. L., Integrating Process Engineering and Microbiology Tools to advance Activated Sludge Wastewater Treatment Research and Development, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1 (2002) 83-97.
  20. Bitton, G., *Wastewater Microbiology*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010., 281-289.
  21. Yu, G. H., He, P. J., Shao, L. M., Lee, D. J., Enzyme activities in Activated Sludge Flocs, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77 (2007) 605-612.
  22. Radjenović, J., Petrović, M., Barcelo, D., Analysis od Pharmaceuticals in Wastewater and Removal using a Membrane Bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 1365-1377.
  23. De Cazes, M., Abejon, R., Belleville, M. P., Sanchez-Marcano J., Membrane Bioprocesses for Pharmaceutical Micropollutant Removal from Waters,

- Membranes, 4 (2014) 692-729.
24. Vuković Domanovac, M., Analiza procesa nastajanja aktivnog mulja pri obradi otpadnih voda, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2006., 70-74.
  25. Trissevyene V. Yiannakopoulou, An ecosystem analysis of the activated sludge microbial community, *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 45 (2010) 587-602.
  26. Shah MP, Microbial Community Structure of Activated Sludge As Investigated With DGGE, *Journal of Advanced Researsc in Biotechnology*, 1(2016) 1-7.
  27. Tixier, N., Guibaud, G., Baudu, M., Effect of ph and ionic environment changes on interparticle interections affectinh activated sludge flocs: A rheological approach, *Environmental Tehnology*, 24 (2008) 971-978.
  28. Durmaz, B., Sanin, F., D., Effect of carbon to nitrogen ratio on the physical and chemical properties of activated sludge, *Environmental Tehnology*, 24 (2003) 1331-1340.
  29. Soltysik, D., Ilona, B., Loch, T., Galka, S., Sypniewski, D., Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) as a method used for bulking process detection in activated sludge, *Environmental Monitoring Assessment*, 176 (2011) 343-354.
  30. Geyik, A.,G., Kihc, B., Cecen, F., Extracellular polymeric substances (EPS) and surface properties of activated sludges: effect of organic carbon sources, *Environmental Science Pollition Resource*, 23 (2016) 1653-1663.
  31. Faust, L., Temmink, H., Zwijnenburg, A., Kemperman, A. J. B., Rijnaarts, H. H. M., Effect of Dissolved Oxygen Concentration on the Bioflocculation Process in High loaded MBRs, *Water Research*, 66 (2014) 199-207.
  32. Salama, Y., Chennaoui, M., Sylla, A., Mountadar, M., Rihani, M., Assobhei, O., Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review, *Desalination and Water Treatment*, 57 (2016) 1620-16237.
  33. Liwarska-Bizukojc, E., K, Klepacz-Smolka, A., Andrzejczak, O., Variations of morphology of activated sludge flocs studied at full-scale wastewater treatment plants, *Environmental Technology*, 36 (2015) 1123-1131.
  34. Eikelboom, D., H., Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation, IWA Publishing, Alliance House, London, UK, 2000., 29-34.
  35. Leboeffe, M. J., Pierce, B. E., Microbiology: Laboratory Theory and Application,

Second Edition, Morton Publishing, United States of America, 2012.

36. Bizzini, A., Greub, G., Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, a Revolution in Clinical Microbial Identification, *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (2010) 1614-1619.
37. APHA, Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. APHA, Washington DC, USA, 1995.
38. Farre, M., Asperger, D., Kantiani, L., Gonzalez, S., Petrović, M., Barceló, D., Assessment of the Acute Toxicity of Triclosan and Methyl Triclosan in Wastewater based on the Bioluminescence Inhibition of *Vibrio fischeri*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390 (2008) 1999-2007.
39. Gros, M., Petrović, M., Barceló, D., Development of a Multi-Residue Analytical Methodology based on Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC–MS/MS) for Screening and Trace Level Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewaters, *Talanta* 70 (2006) 678-690.
40. Šabić, M., Čižmek, L., Vuković Domanovac, M., Meštrović, E., Biodegradation of Erythromycin with Environmental Microorganism *Pseudomonas aeruginosa* 3011, *Chemical and Biochemical Engineering* 29 (2015) 367-373.
41. Maier, R. M., Microorganisms and Organic Pollutants, *Environmental Microbiology*, Academic Press., 2009., 394.
42. Karunakaran, E., Biggs, C. A., Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (2011) 1161-1175.

# POTENCIJAL IZOLIRANIH BAKTERIJSKIH KULTURA U STVARANJU AKTIVNOG MULJA ZA BIOREMEDIJACIJU FARMACEUTSKE OTPADNE VODE

Martina Miloloža, Nikolina Janton

Eksplozivni rast broja stanovništva, urbanizacija i povećana industrijalizacija izazivaju različite negativne efekte na sastavnice okoliša. Tako nove onečišćujuće tvari uključujući i farmaceutike preko različitih izvora dopijevaju sve većom brzinom u okoliš. Jedan od većih izvora farmaceutika je farmaceutska otpadna voda iz industrijske proizvodnje lijekova. Predloženi su različiti postupci obrade farmaceutskih otpadnih voda među kojima se ističe biološka obrada zbog svoje ekonomičnosti i učinkovitosti. Bioremedijacija je sve korišteniji biološki postupak čiji se princip obrade zasniva potencijalu odgovarajućih mikroorganizama za uklanjanje onečišćujućih tvari u kontroliranim uvjetima. Učinkovitost uklanjanja onečišćujućih tvari može se povećati bioaugmentacijom.

U ovome radu provedena je izolacija i identifikacija bakterijskih kultura *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* i *Cupriavidus gilardii* koje su korištene u procesu stvaranja pahuljica specifičnog aktivnoga mulja. Provedena su tri pokusa P1, P2 i P3 s različitim početnim koncentracijama supstrata od 2,7 g L<sup>-1</sup> do 6,0 g L<sup>-1</sup>. Tijekom provedbe pokusa, osim supstrata, praćena je koncentracija otopljenog kisika i pH-vrijednost te je mikroskopskom analizom praćen stvaranje pahuljica aktivnog mulja. U svim pokusima došlo je do stvaranja pahuljica uz različite postotke uklonjenog supstrata, a najveća učinkovitost iznosila je 78,0 %.

**Ključne riječi:** farmaceutska otpadna voda, bioaugmentacija, izolirane bakterijske kulture, specifični aktivni mulj

# THE POTENTIAL OF ISOLATED BACTERIAL CULTURES IN THE FORMATION OF ACTIVATED SLUDGE FOR BIOREMEDIATION OF PHARMACEUTICAL WASTEWATER

Martina Miloloža, Nikolina Janton

The exponential growth of population, urbanization and increased industrialization cause various negative effects on the environment. Emerging contaminants, such as pharmaceuticals, can occur in the environment through various sources. One of the major sources of pharmaceuticals in the environment is wastewater from the pharmaceutical industrial plant. Various methods have been proposed for treating pharmaceutical wastewater, especially biological wastewater treatment due to its economic efficiency and ecological footprint. Bioremediation is controlled biological process which is based on the potential of suitable microorganisms to remove contaminants. The efficiency of contaminants removal can be increased by bioaugmentation.

In this study an isolation and identification of bacterial cultures of *Bacillus cereus*, *Alcaligenes faecalis* and *Cupriavidus gilardii* was conducted for the formation of specific activated sludge flocs. Three experiments were performed P1, P2 and P3 with different initial substrate concentrations in the range from 2.7 g L<sup>-1</sup> to 6.0 g L<sup>-1</sup>. During the experiments, except substrate concentration, dissolved oxygen and pH value were measured. The formation of activated sludge flocs was determined by microscopic analysis. In all experiments formation of the flocs was successful due to different efficiency of substrate removal. The highest efficiency value obtained was 78.0 %.

**Key words:** pharmaceutical wastewater, bioaugmentation, bacterial cultures, specific activated sludge

## ŽIVOTOPIS

Martina Miloloža rođena je 19. siječnja 1995. godine u Osijeku. Pohađala je osnovnu školu Grigor Vitez u Osijeku gdje je i završila i Opću gimnaziju. Upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2013. godine. Preddiplomski studij Ekoinženjerstvo završila je 2016. godine s najboljim uspjehom te je po odluci dekana pohvaljena. Potom je upisala diplomski studij Ekoinženjerstvo na istome fakultetu. U Zavodu za industrijsku ekologiju odrađuje demonstrature iz kolegija Mikrobiologija i Zaštita okoliša.

Nikolina Janton rođena je 1. svibnja 1993. godine u Zagrebu. Svoje srednjoškolsko obrazovanje stekla je u općoj gimnaziji „Tituš Brežovački“ u Zagrebu. Nakon polaganja ispita državne mature, u rujnu 2012. godine upisala je preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu te je na istoimenom fakultetu upisala i diplomski studij. Sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera, Sajmu ideja, sportsko-znanstvenom natjecanju Tehnologijada te na Međunarodnom susretu studenata tehnologije u Novom Sadu. U Zavodu za industrijsku ekologiju odrađuje demonstrature iz kolegija Mikrobiologija i Zaštita okoliša.