

Biorazgradnja anthelmintika aktivnim muljem

Čavarović, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:837757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nina Čavarović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nina Čavarović

BIORAZGRADNJA ANTIHELMINTIKA AKTIVNIM MULJEM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Davor Dolar

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Davor Dolar

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, rujan 2020.

*Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za fizikalnu kemiju, Zavod za analitičku kemiju, akademske godine 2019./2020.*

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (AdWaTMiR, IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Davoru Dolaru na stručnim savjetima i vodstvu prilikom izrade ovog rada. Također veliko hvala na suradnji, strpljenju, velikodušnoj pomoći i uloženom vremenu kroz zadnje tri godine.

Hvala prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na pruženoj prilici rada na Zavodu za analitičku kemiju, stručnim savjetima i pomoći prilikom izrade rada.

Veliko hvala doktorandici Bruni Babić na strpljenju, pružanju pomoći u provedbi eksperimenta i izradi rada kao i davanju savjeta.

Hvala i dr. sc. Lidiji Furač koja je od prve godine fakulteta kao dio nas.

Hvala mojim prijateljima na pažnji, ljubavi, pomoći i timskom radu bez kojih mi ovo studiranje ne bi ostalo u tako lijepom pamćenju.

Najveće hvala mojoj obitelji.

SAŽETAK

BIORAZGRADNJA ANTIHELMINTIKA AKTIVNIM MULJEM

Povećanjem uporabe antihelmintika u veterinarske i druge medicinske terapijske svrhe dolazi do njihovog kontinuiranog i nekontroliranog ispuštanja u okoliš. Iako se farmaceutici i njihovi metaboliti u okolišu nalaze u tragovima mogu dovesti do visoke dugoročne koncentracije i time štetno djelovati na okoliš. Obzirom da njihova kemijska postojanost, mogućnost akumulacije, otpornost na mikrobe i sinergistički učinci još uvijek nisu u potpunosti poznati potrebno je razvijati i primjenjivati analitičke i bioanalitičke metode detekcije antihelmintika i njihovih razgradnih i/ili transformacijskih produkata.

Cilj ovog rada bio je ispitati učinkovitost biorazgradnje antihelmintika mebendazola, albendazola i febantela te njihove smjese. Proces biorazgradnje provodio se u tri aerirana šaržna reaktora različitih sadržaja. Prvi reaktor je kontrolni reaktor koji je sadržavao samo radnu otopinu ispitivanog farmaceutika masene koncentracije 3 mg L^{-1} . Dodatak drugom reaktoru je aktivni mulj, dok je u treći uz sve prethodno navedeno dodana i poznata masa mikroplastike.

Uz ispitivanje fizikalno-kemijskih parametara biorazgradnje, praćenje koncentracije antihelmintika u definiranim vremenskim razmacima uzorkovanja, procijenjen je i ekotoksični utjecaj pojedinačnih komponenti i njihove smjese.

U ovom radu je postignuta biorazgradnja antihelmintika s aktivnim muljem masene koncentracije $4 - 5 \text{ g L}^{-1}$. Pretpostavka je da se uz glavni mehanizam uklanjanja antiparazitika - biorazgradnju, javljaju i hidroliza i adsorpcija na pahuljice mulja. Praćeni parametri tijekom biorazgradnje bili su pH-vrijednost, temperatura okoline, temperatura svakog reaktora i preostali radni volumen otopine u reaktoru. Novonastali razgradni i/ili transformacijski produkti detektirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Također je procijenjena toksičnost odabranih istraživanih antihelmintika i njihove smjese nakon provedene biorazgradnje pomoću bioluminiscentne metode određivanja akutne toksičnosti bakterijom *Vibrio fischeri*.

Ključne riječi: biorazgradnja, mebendazol, albendazol, febantel, toksičnost

ABSTRACT

BIODEGRADABILITY OF ANTIHELMINTICS WITH ACTIVATED SLUDGE

Increasing the use of anthelmintics for veterinary and other medical therapeutic purposes leads to their continuous and uncontrolled release into the environment. Although pharmaceuticals and their metabolites are found in traces, they can lead to high long-term concentrations and therefore have a detrimental effect on the environment. Since their chemical resistance, accumulation potential, microbial resistance and synergistic effects are not yet fully known, it is necessary to develop and apply analytical and bioanalytical methods for the detection of anthelmintics and their degradation and/or transformation products.

The aim of this study was to examine the biodegradation efficiency of the anthelmintics mebendazole, albendazole and febantel, and their mixture. The biodegradation process was carried out in three aerated batch reactors of different contents. The first reactor was a control reactor containing only the working solution of the test pharmaceutical at a mass concentration of 3 mg L⁻¹. The addition to the second reactor is activated sludge, while in the third, in addition to all the above, a known mass of microplastics was added.

In addition to examining the physicochemical parameters of biodegradation, monitoring the concentration of anthelmintics at defined sampling intervals, the ecotoxic effect of individual components and their mixture was assessed.

In this study, biodegradation of anthelmintics with activated sludge with a mass concentration of 4 - 5 g L⁻¹ was achieved. It is assumed that in addition to the main mechanism of antiparasitic removal - biodegradation, hydrolysis, and adsorption on the floculae of activated sludge are also occurring. The parameters monitored during biodegradation were pH-value, room temperature, temperature of each reactor and the remaining working volume of the solution in the reactor. The newly formed degradation and/or transformation products were detected by high performance liquid chromatography. The toxicity of the selected investigated anthelmintics and their mixture after biodegradation was also assessed using the bioluminescent method of determining acute toxicity with bacteria *Vibrio fischeri*.

Key words: *biodegradation, mebendazole, albendazole, febantel, toxicity*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Farmaceutici	2
2.1.1. Veterinarski farmaceutici	3
2.1.2. Antihelmintici	4
2.1.2.1. Mebendazol	5
2.1.2.2. Albendazol	6
2.1.2.3. Febantel	7
2.2. Farmaceutici u okolišu.....	7
2.2.1. Mikroplastika u okolišu	8
2.2.2. Toksičnost	9
2.3. Problematika obrade farmaceutskih otpadnih voda.....	10
2.3.1. Biološka obrada farmaceutika	11
2.4. Biorazgradnja.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Farmaceutici.....	16
3.1.2. Aktivni mulj.....	17
3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR	17
3.2.1. Aparatura za biorazgradnju	17
3.2.2. Kromatograf HPLC-DAD.....	17
3.2.3. Luminometar	18
3.2.4. Ostali uređaji	18
3.3. METODE RADA	19
3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika	19
3.3.2. Biorazgradnja.....	19
3.3.2. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje	20
3.3.3. Postupak određivanja toksičnosti.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Biorazgradnja i fizikalno-kemijski parametri	24
4.2. Kromatografska detekcija i kvantifikacija.....	25
4.2.1. Kromatografska detekcija zasebnih komponenata.....	25

4.2.2. Validacija	27
4.2.3. Rezultati kromatografske analize HPLC-DAD sustavom.....	28
4.2.3.1. Mebendazol	29
4.2.3.2. Albendazol	30
4.2.3.3. Febantel.....	32
4.2.3.4. Smjesa antihelminatika.....	33
4.3. Test toksičnosti	35
5. ZAKLJUČAK	38
6. LITERATURA	39
7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA.....	46
8. PRILOZI.....	48
8. ŽIVOTOPIS	52

1. UVOD

Pojava farmaceutika, njihovih metabolita i transformacijskih produkata u okolišu je zabrinjavajuća jer se ti spojevi, koji mogu imati štetne učinke na žive organizme, sve više koriste u ljudskoj i veterinarskoj medicini te se kontinuirano ispuštaju u okoliš.¹ Farmaceutici se ispuštaju u vodni okoliš tijekom njihove proizvodnje, nakon potrošnje, otpadnim vodama iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) ili izravnim ispuštanjem.²

Povećanjem populacije, brzo se širi i uzgoj životinja u svrhu prehrane stanovništva. Zato se u poljoprivrednu praksu uvodi primjena planskog hranjenja životinja za što se koriste veterinarski farmaceutici i to ne samo u lijekovite svrhe, nego i profilaktičku upotrebu. Veterinarski farmaceutici koji se sve više koriste u stočarstvu doveli su do njihove prisutnosti u vodenom okruženju - površinskoj, podzemnoj vodi čak i u vodi za piće. U svijetu je kvantificirano 68 različitih veterinarskih farmaceutika u prirodnim vodama u koncentracijama od ng L^{-1} do $\mu\text{g L}^{-1}$.³

Nadalje, kontinuirano izlaganje patogena, parazita ili okolišnih bakterija farmaceuticima može dovesti do pojave rezistencije organizama na farmaceutike. Rezistencija na lijekove predstavlja globalni problem jer nastaje kada se organizmi prilagode i počinju se razmnožavati u prisustvu farmaceutika, tj. kada organizmi postanu otporni na farmaceutike, koje bi ih trebali uništavati.⁴

Zbog sve veće često neopravdane uporabe i nepravilnog odlaganja veterinarskih farmaceutika (antihelmintika), potrebno je obratiti veću pažnju na njihovu detekciju i ukoliko je moguće identifikaciju njihovih razgradnih i/ili transformacijskih produkata. Uz to, potrebno je provesti i bioanalitičke metode određivanja toksikološkog utjecaja farmaceutika na okoliš te na taj način povećati trenutno slabo dostupne podatka o akutnoj toksičnosti antihelmintika. Mjerenje akutne toksičnosti najčešće se provodi bakterijom *Vibrio fischeri*.

Za kontrolu ispuštanja antihelmintika u okoliš presudno je poboljšanje procesa biorazgradnje tijekom pročišćavanja otpadnih voda. Obzirom na nedostatak radova i istraživanja o sudbini antihelmintika u okolišu, cilj ovog rada je provesti preliminarna ispitivanja o mogućnosti biorazgradnje antihelmintika pri početnoj koncentraciji od 3 mg L^{-1} . Stoga je u ovom radu proveden proces biorazgradnje mebendazola (MBZ), albendazola (ALB) i febantela (FEB) u aeriranim reaktorima s aktivnim muljem koncentracija $4 - 5 \text{ g L}^{-1}$.

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici

Prisutnost farmaceutika i proizvoda za osobnu njegu (PPCP) prvi put je identificirana u površinskim i otpadnim vodama u SAD-u i Europi u 1960. godinama.⁵ Farmaceutsko tržište na globalnoj razini vrijedi gotovo jedan bilijun američkih dolara što objašnjava masovnu distribuciju i potrošnju farmaceutika, a time i razne mogućnosti njihovog dolaska u okoliš kao i razvijanje otpornosti na lijekove. Najistaknutije globalne farmaceutske kompanije su Pfizer, Merck i Johnson & Johnson iz SAD-a, Novartis i Roche iz Švicarske, Sanofi iz Francuske itd.⁶ Iako se PPCP obično u okolišu nalaze u tragovima, njihova kemijska postojanost, otpornost na mikrobe i sinergistički učinci još uvijek nisu u potpunosti poznati. Međutim, poznato je da se kontinuiranim unošenjem čak i niskih koncentracija farmaceutika i njihovih bioaktivnih metabolita može dovesti do visoke dugoročne koncentracije, a time prouzročiti štetne učinke na okoliš.^{5,7}

Farmaceutici se definiraju kao kemijske tvari namijenjene za uporabu u medicinskoj dijagnostici, liječenju ili sprječavanju bolesti. Predstavljaju vrlo složene molekule s točno određenim ciljem djelovanja za što je zaslužna aktivna komponenta farmaceutika (API).⁸ Pojam PPCP uz izvorni oblik farmaceutika obuhvaća i njene bioaktivne metabolite i razgradne produkte. Farmaceutici spadaju u skupinu prioritetnih onečišćivala i obuhvaćaju raznolike skupine kemikalije koje se koriste u veterinarstvu, poljoprivrednoj praksi, zdravlju ljudi i kozmetičkoj njezi. Glavna razlika koja farmaceutike razlikuje od konvencionalnih onečišćivala je njihovo disperzno podrijetlo iz ljudskih djelovanja, aktivnosti i ponašanja te procesa okoliša.⁷

Prioritetna onečišćivala, koje jednim imenom nazivamo PO postala su sveprisutna u površinskim i otpadnim vodama. U PO spadaju diklofenak, klofibrična kiselina, acetaminofen, ibuprofen, aspirin, karbamazepin, atorvastatin, gemfibrozil, fluoksetin, 17 β -etinilestradiol i mnogi drugi. Mnogi farmaceutici se transformiraju u ljudskom tijelu, što rezultira oslobađanjem značajnih količina raznih metabolita u okolišu. Na primjer, za ibuprofen, metaboliti uključuju njegove konjugate hidroksi i karboksi ibuprofen, dok su klofibrat i etofibrat metaboliti klofibrične kiseline. Ti se metaboliti mogu dalje transformirati tijekom pročišćavanja otpadnih voda. Farmaceutici se mogu razgraditi biotskim i/ili abiotskim procesima, na primjer hidrolizom i fotolizom. Zabrinjavajući su i nusprodukti razgradnje jer mogu imati toksičnost sličnu ili veću od matičnih spojeva.¹

Farmaceutici se primjenjuju u veterinarske svrhe još iz 1950.-ih kada su prvo uočeni njihovi ljekoviti učinci dok se u njihovoj proizvodnji za životinjsku prehranu koristi preko 400 aktivnih spojeva. U posljednjih 60 godina je njihova primjena postala globalni trend na kojeg se svakim danom oslanja sve više industrija za uzgoj i proizvodnju hrane. Općenito nema regulative koja bi određivala maksimalne dopuštene koncentracije (MDK) farmaceutika u okolišu, pa se njihovo štetno djelovanje određuje usporedbom „predviđenih koncentracija u okolišu“ i „koncentracija koje u okolišu ne izazivaju biološke učinke“.⁹

Rastom potražnje stočnih proizvoda razvija se i stočarski sektor čiji je razvitak potaknut rastom ljudskog stanovništva, urbanizacijom i povećanjem prihoda. Glavni ograničavajući faktor profitabilne stočne proizvodnje je česta pojava zaraznih bolesti što izaziva veliki socioekonomski utjecaj radi čega je neophodna upotreba antimikrobnih lijekova i antibiotika.¹⁰

2.1.1. Veterinarski farmaceutici

Veterinarski farmaceutici uključuju širok spektar antimikrobnih sredstava i aditiva koji se koriste u liječenju ili sprječavanju bolesti životinja radi zdravlja, promicanja rasta i produktivnosti. Ovi lijekovi mogu se podijeliti u kategorije prema različitim patogenima ili ciljanim infekcijama. Uključuju antimikrobne lijekove, protuupalne, reproduktivne lijekove, kirurške lijekove, anestetike, prehrambene lijekove i dodatke hrani za životinje koji se ponekad koriste kao pokretači rasta. Antimikrobni lijekovi uništavaju mikroorganizme (bakterije, viruse, gljivice, parazite itd.) ili usporavaju njihov rast, dok antibiotici spadaju u antimikrobne lijekove koji uništavaju ili usporavaju rast bakterija. Iako se antibiotici koriste i u liječenju bolesnih životinja, često se neopravdano koriste kao prevencija bolesti ili kao promotori rasta životinja.¹⁰

Antimikrobni lijekovi spadaju u najčešće korištene lijekove, uglavnom radi rastuće stočarske i poljoprivredne proizvodnje, a time i opterećenja zaraznim bolestima. Uvođenjem penicilina 1943. kao i drugih antibiotika nakon toga, osigurani su lijekovi za mnoge infekcije kod ljudi i životinja, smanjujući smrtnost i produktivne gubitke.

Unatoč tome što su određeni antibiotici i antimikrobiotici uvedeni pod kemoterapeutike i/ili profilaksu, postoje mnogi patogeni koji više nisu osjetljivi zbog pojave rezistentnosti organizama. Rezistentnost se javlja u nekim slučajevima prekomjernom uporabom kemoterapeutika kod životinja i subterapijskih dodataka prilikom hranidbe. Dugo izlaganje mikroorganizama subletalnim dozama antimikrobnih lijekova može rezultirati spontanom nastankom gena rezistencije i njegovim naknadnim prijenosom među životinjama, okolišem i životinjskim proizvodima u prehrambenom lancu te prijenosom otpornosti na čovjeka.

Važno je naglasiti kako je rezistentnost prirodan proces prilagodbe mikroorganizama na uvjete okoliša, no pogrešnim korištenjem antibiotika, ovaj proces se znatno ubrzava.^{10,11}

Posljedice rezistentnosti zahvaćaju mnoge društvene sektore i mogu biti izuzetno teške, od posljedica po samog pacijenta do utjecaja na globalnu ekonomiju. Liječnici danas sve češće moraju upotrebljavati rezervne antibiotike (lijekove druge linije), koji su puno skuplji i s više nuspojava od onih uobičajenih, a i na njih neke bakterije postaju otporne. Razlika u troškovima između prve i druge linije za lijekove protiv tuberkuloze iznosi 50-100 puta, dok za druge antibiotike iznosi 2-60 puta. Zato je svjetski ekonomski forum naveo rezistentnost kao globalni rizik kojeg niti jedna organizacija niti nacija ne mogu same riješiti. Samo u EU posljedice rezistentnosti su odgovorne za 25 000 smrti godišnje s troškovima zdravstvenog sustava i smanjene produktivnosti od 1,5 milijardi eura.

Zbog iznimno velikog utjecaja na zdravlje ljudi, 2015. godine Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je usvojila „Global Action Plan“ (GAP) o praćenju rezistentnosti na organizme. Ovaj plan ističe nužnost „one health“ pristupa koji uključuje suradnju raznih sektora, od humane i veterinarske medicine do poljoprivrede, financija, okoliša i dobro informirane javnosti. U Hrvatskoj je usvojen Nacionalni program za kontrolu otpornosti bakterija na antibiotike 2017. – 2021.^{12,13} Radi sve veće pojave zaraznih bolesti u zemljama u razvoju i intenzivnog korištenja antimikrobnih lijekova tijekom razdoblja 2010.-2030. godine, očekuje se globalni porast (67 %) primjene antibiotika od kojih će se trećina naći u životinjskoj hrani.¹⁴ Ista tendencija se primjećuje i kod šire uporabe antimikrobnih lijekova to jest antihelmintika.

2.1.2. Antihelmintici

Antihelmintik se opisuje kao lijek koji djeluje protiv infekcija uzrokovanih parazitskim crvima (helmintima) točnije antiparazitik. Helmiti po znanstvenoj klasifikaciji pripadaju u dva koljena: 1. plošnjaci, s tri razreda: i trakavice kao isključivi nametnici i virnjaci i 2. oblenjaci, a parazitski se oblici nalaze u oblicima - nematodama te strunašima i kukašima.^{15,16}

Helmiti se od ostalih zaraznih organizama razlikuju po tome što imaju složenu tjelesnu strukturu. Višestanični su i imaju djelomične ili cjelovite organske sustave (npr. mišićni, živčani, probavni i reproduktivni). Njihova veličina varira od 1 mm do nekoliko m, dakle oni nisu mikrobi iako su im jaja mikroskopska i izbacuju se u okoliš s fekalijama, a oralno-fekalni put je glavni put širenja bolesti.

Neadekvatno gospodarenje i zbrinjavanje otpadnih voda, mulja i fekalnog otpada zagađuje usjeve, vodu i hranu koji konzumiranjem služe kao prijenosnici bolesti. Jaja helminta koja se nalaze u otpadnim vodama obično nisu zarazna. Zarazna postaju kada su u održivom stanju i kad razviju larvu.

Određeni lijekovi za liječenje helmintoza djeluju na živčani sustav parazita i rezultiraju mišićnom paralizom. Ostali lijekovi utječu na unos glukoze i samim tim na zalihe energije. Svi su kemijska sredstva i uglavnom se primjenjuju oralno, a mnogi se koriste i u ljudskoj i u veterinarskoj medicini. Međutim, antihelmintik nije u potpunosti učinkovit, ostavlja određeni toksični učinak na domaćina te nije jednako aktivan protiv svih helminta. Antihelmintici su podijeljeni u klase na temelju slične kemijske strukture i načina djelovanja. Neki od antihelmintika su pirantel, ivermektin, prazikvantel te MBZ i ABZ.^{15,18,19}

Liječenje nematoda je komplicirano jer se mogu nastaniti u krvi, limfi i drugim tkivima te stoga zahtijevaju uporabu lijekova koji se apsorbiraju iz crijevnog trakta i prodiru u tkiva. ABZ i MBZ ometaju unos glukoze i posljedično proizvodnju energije. MBZ se akumulira u crijevima i koristi se za liječenje velikih dječjih glista - askarida. Piperazin, koji je u ljudsku medicinu uveden oko 1950. godine, a nedugo zatim u veterinarsku medicinu u velikoj mjeri zamijenjen je MBZ. Kod ljudi se najčešće pojavljuje mala dječja glista točnije enterobijaza koja je najčešći crijevni parazit čovjeka.^{15,20,21}

Antihelmintici mogu oštetiti vanjski omotač helminta ili djelovati paralitički na njega, što vodi ka parcijalnoj digestiji ili imunološkom odbacivanju helminta iz tijela domaćina.

2.1.2.1. Mebendazol

MBZ je antihelmintik širokog spektra iz grupe benzimidazola (BZD) koji je namijenjen za liječenje helmintoza. Osim antihelmintičkog, ima ovcidni i larvicidni učinak. MBZ je bijeli - blago žuti amorfni prah, ugodnog ukusa i u vodi netopljiv. Općenito se smatra da je antihelmintička učinkovitost BZD i njegovih derivata posljedica njihove selektivne interakcije s β -tubulinom do čega dolazi zbog različitih osjetljivosti domaćina i stanica parazita na učinke spajanja BZD-a s tubulinom. BZD se reverzibilno vežu na tubulin sisavaca, dok se za tubulin nematoda vežu ireverzibilno zbog čega trajno sprječavaju polimerizaciju tubulina u mikrotubule kod nematoda.^{18,22,23}

MBZ nepovratno inhibira unos glukoze i drugih hranjivih sastojaka male molekulske mase. MBZ uzrokuje degenerativne promjene tegumenta i crijevnih stanica helminta vezanjem na mjesto tubulina, pa tako inhibira polimerizaciju tubulina ili prodire u mikrotubule.

Gubitak citoplazmatskih mikrotubula dovodi do smanjenog unosa glukoze u fazi larve i helminta i time iscrpljuje njihove zalihe glikogena. Degenerativne promjene endoplazmatskog retikuluma, mitohondrijima u zametku i kasnije oslobađanje lizosoma dovode do smanjene proizvodnje adenozin trifosfata (ATP), koji predstavlja energiju potrebnu za preživljavanje helminta. Zbog smanjene proizvodnje energije, parazit se imobilizira i na kraju umre. Međutim, nema učinka na metabolizam glukoze kod sisavaca koji se liječe MBZ-om. Mikrotubularni poremećaj u helmintima dovodi do blokade pokretljivosti organela, nakupljanja hidroliznih i proteolitičkih supstanci i stanične autolize. MBZ se zbog svoje netopljivosti u vodi slabo apsorbira u crijevnom traktu, a apsorpciju je moguće povećati ako se uzima s hranom.

Za metabolizam MBZ-a prvenstveno je zadužena jetra. MBZ ima keto skupinu koja se može reducirati u hidroksilnu skupinu, pa nastaje hidroksi-MBZ. MBZ isto tako ima i karbamatnu skupinu koja se hidrolizom može pretvoriti u amino-BZD.

Primarni metabolit je 2-amino-5-benzoilbenzimidazol, ali također se metabolizira u neaktivne metabolite metil-5-(α -5-hidroksibenzil)-2-BZD karbamat i 2-amino-5-(α -5-hidroksibenzil)-BZD. Konjugati MBZ-a i njegovih metabolita pronađeni su u žuči, dok se dio nepromijenjenog MBZ-a pojavljuje i u urinu. Biološko vrijeme poluživota MBZ-a je 2,5 do 5,5 h (raspon 2,5 do 9 h) kod bolesnika s normalnom funkcijom jetre. Otprilike 35 h kod bolesnika s oštećenom funkcijom jetre. Komercijalni nazivi lijeka: Telmintic, Telmin, Vermox.

23-29

2.1.2.2. Albendazol

ABZ je antihelmintik širokoga spektra iz grupe BZD-a kojeg odlikuje vrlo slično djelovanje kao kod MBZ-a. Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u njegova sva tri razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samim parazitima točnije smanjeno stvaranje ATP-a. Probavni sustav samostalno apsorbira manje od 5 % ABZ-a radi slabe topljivosti u vodi. Apsorbirani ABZ se u jetri metabolizira u primarni metabolit, ABZ-sulfoksid, koji se veže za serumske bjelančevine. Takav metabolički put je predodređen time što ABZ posjeduje sulfidnu funkcionalnu grupu koja je podložna oksidaciji, a rezultat toga je oksidacija ABZ-a u ABZ sulfoksid.

ABZ sulfoksid se djelomično oksidira u ABZ sulfon i ostale primarne oksidativne metabolite koji su identificirani u ljudskoj mokraći. Nakon oksidacije dolazi i do deacetilacije karbamatne skupine i nastajanja 2-aminosulfona. ABZ se pretežno koristi u liječenju ehinokokoze, helminta koji uzrokuje ciste u jetri i plućima.

Terapija ABZ uobičajeno je povezana s blagim i prolaznim povišenjima enzima u serumu te rijetko može dovesti do klinički akutnog oštećenja jetre. Biološko vrijeme poluživota ABZ-a iznosi 8,5 h, a izlučuje se mokraćom. Neželjena nuspojava su uglavnom crijevni poremećaji, nisu uobičajeni i obično ne zahtijevaju prekid primjene lijeka. Komercijalni naziv lijeka: Valbazen.^{23,29,30}

2.1.2.3. Febantel

FEB je predlijek, koji se *in vivo* metabolizira u BZD antihelmintik fenbendazol. FEB se koristi za liječenje i kontrolu helmintoza. Polazni se lijek fenbendazol sulfid vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako vrlo važan antihelmintik. Sulfoksid se dalje može oksidirati u sulfon, manje aktivan metabolit, kao i u *p*-hidroksifenbendazol također slabe antihelmintične aktivnosti. Svi se navedeni lijekovi koriste kod liječenja stoke, koza, ovaca, konja i svinja.

Studije na životinjama pokazale su da se nakon tretiranja febantelom, fenbendazolom i oksfendazolom najzastupljeniji ostatci bili fenbendazol, oksfendazol i fenbendazol sulfon. Slično kao i kod ABZ, fenbendazol i odgovarajući ostatci lijeka većinom su pronađeni u jetri i bubrezima, uz manju količinu pronađenu u mišićima i masnom tkivu. Komercijalni nazivi lijeka: Rintal i Vercom.^{23,29,30}

2.2. Farmaceutici u okolišu

Toksičnost i pojava farmaceutika u okolišu predstavljaju fokus mnogih istraživanja u posljednjih 20 godina. U posljednje vrijeme posebna pažnja usredotočena je na antimikrobna sredstva za čiju se pojavu u okolišu smatra da doprinosi štetnim ishodima, uključujući pojavu rezistentnosti i endokrine poremećaje u izloženim neciljanim organizmima. Potrebno je mnogo rada i istraživanja kako bi se našao najefikasniji i najekonomičniji način za uklanjanje farmaceutika iz komunalnih (KOV) i farmaceutskih otpadnih voda te time spriječio njihov potencijalni unos u okoliš.³¹

Onečišćivanje poljoprivrednog tla i vode anorganskim i/ili organskim onečišćivalima postalo je pitanje od velike važnosti u mnogim razvijenim zemljama svijeta. UPOV-i su prepoznati kao glavni izvor farmaceutika jer nisu posebno dizajnirani za njihovo uklanjanje. Mulj iz otpadne vode također može sadržavati znatne količine farmaceutika koji se mogu adsorbirati na aktivnoj biomasi. Također, važan način ulaska farmaceutika u okoliš su nepropisna odlagališta neiskorištenih lijekova te farme na kojima se antihelmintici dodaju životinjskoj hrani.^{1,32-34}

Sastav farmaceutskih otpadnih voda ovisi o polaznoj sirovini, tehnološkim postupcima i procesima te otpadnim produktima, a specifična onečišćivala koja mogu dospjeti u otpadne vode iz farmaceutske proizvodnje su organska otapala, katalizatori, aditivi, neizreagirani reaktanti, međuprodukti te API. Industrijske otpadne vode predstavljaju posebnu opasnost za okoliš, budući da nerijetko sadrže štetne i toksične tvari organskog i anorganskog podrijetla koje imaju izrazito negativan utjecaj na prijemnike takvih otpadnih voda. Osim što prilikom razgradnje troše kisik iz vode, organska onečišćivala mogu uzrokovati i akutno trovanje živih organizama, što za posljedicu ima narušavanje ravnoteže ekosustava. Zbog toga su kvaliteta industrijskih otpadnih voda i MDK onečišćivala u vodama regulirane zakonskim propisima. Potencijalni negativni učinci farmaceutika na vodene ekosustave, kopnene ekosustave i divljinu pokrenuli su istraživački interes za prisutnost farmaceutika u okolišu. Nakupljanjem toksičnih onečišćivala u organizmima, moguće je dostizanje MDK bioakumulacijom u prehrambenom lancu, uzrokujući dugoročnu ili kumulativnu toksičnost za organizme i/ili okoliš.^{35,36}

2.2.1. Mikroplastika u okolišu

Onečišćenje plastikom na globalnoj razini negativno utječe na okoliš. Zato se posljednjih desetljeća sve više usredotočava na istraživanje mikroplastike (MP) i nanoplastike (NP) kao i njihovog potencijalno štetnog biološkog učinka. MP je definirana veličinom od 0,06-0,5 mm ili manje od 1 mm, a potječe od plastike različitog podrijetla i sastava (polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), termoplastični poliester (PET), poli(vinilklorid) (PVC) i drugi). MP je netopljiva u vodi, nerazgradiva i posjeduje različita fizikalno-kemijska svojstva koja određuju njezinu bioraspodivnost u kopnenim i vodenim ekosustavima. Otpadne vode UPOV-a su glavni prijenosnici velikih količina MP u tla, rijeke, jezera i oceane.

Problem predstavlja pojava adsorpcije i akumulacije PO na MP. Na proces adsorpcije-desorpcije MP na PO utječe molekularni sastav i struktura MP. Tako sorpcijska moć raste prema: PE > PP > PVC. Adsorpcijom PO na MP može doći do promjene fizioloških i metaboličkih procesa u okolišu.

Nadalje, neki izvori tvrde da se utjecaj PO prenesenih MP-om može zanemariti, dok ostali smatraju da MP s novim fizikalno-kemijskim svojstvima može uzrokovati direktnu i indirektnu toksičnost.³⁷

2.2.2. Toksičnost

Za pročišćavanje otpadnih voda koriste se biološki sustavi koji se temelje na mikrobnjoj aktivnosti na koju može utjecati prisutnost PO. Dakle, prije biološke obrade potrebno je procijeniti toksičnost i biorazgradivost otpadnih voda na aktivnom mulju koji nisu uvijek međusobno isključivi.

Toksični spojevi mogu se učinkovito ukloniti u bioreaktoru u koncentracijama ispod njihove EC_{50} , koncentracije uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije, dok će se drugi manje toksični ili inhibitorni spojevi pustiti u okoliš s rizikom nakupljanja i dostizanja MDK u okolišu radi njihove slabe biorazgradivosti. Toksičnost se ispituje testovima toksičnosti koji se provode u ovlaštenim laboratorijima kako bi se odredile i ozakonile MDK ispitivanih kemikalija u proizvodima i okolišu. Kao mjerilo toksičnosti uzima se učinkovita koncentracija, odnosno učinkovita doza (EC_{50}) koja uzrokuje određenu mjerljivu subletalnu promjenu. Testovi toksičnosti mogu se podijeliti prema trajanju izlaganja organizama ispitivanoj kemikaliji (akutni, subkronični, kronični), prema vrstama organizama koji se ispituju (bakterije, protisti, biljke, životinje) i prema vrsti negativnih učinaka koji se mjere.³⁸

U ovom radu ispitivana je akutna toksičnost antihelmintika (MBZ, ABZ i FEB) pomoću bakterije *Vibrio fischeri*. *Vibrio fischeri* je bioluminiscentna, Gram-negativna, štapićasta i heterotrofna bakterija. Pronalazimo ju u morskom okolišu pretežno u simbiozi s raznim ribama i glavonošcima.

Bioluminiscencija je posljedica oksidacije molekule luciferina katalizirane enzimom luciferazom. Kod vrste *Vibrio fischeri* luminiscencija je kontinuirani proces i sastoji se od više reakcija u različitim fazama.^{39,40} Krivulja toksičnosti pokazuje međuovisnost doze i odgovora (**Slika 2.1.**). Najčešće (kod normalne razdiobe) ima karakteristični oblik slova S.⁴¹

Popis određivanih fizikalno-kemijskih veličina:⁴²

l_0 – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija),

l_t – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu t (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka),

l_{0K}/ l_{tK} – početna i konačna luminiscencija kontrolne otopine (2 % NaCl),

fK – faktor korekcije

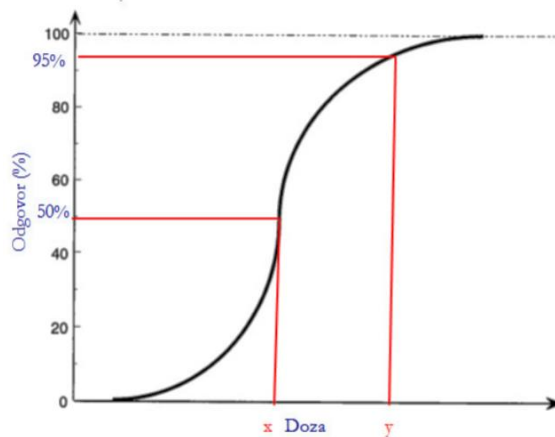
$$fK = l_tK / l_0K \quad (1),$$

l_c – ispravljeni fK

$$l_c = fK \times l_0 \quad (2) \text{ i}$$

I – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu t .

$$I = (l_c - l_t) \times 100 / l_c \quad (3)$$



Slika 2.1. Krivulja toksičnosti.

2.3. Problematika obrade farmaceutskih otpadnih voda

Posljednjih godina sve je veća briga za pojavu i posljedice API-ja, otapala, intermedijara i sirovina koji mogu biti prisutni u vodi i otpadnim vodama. Konvencionalne metode pročišćavanja otpadnih voda, poput aktivnog mulja (CAS), nisu dovoljne za potpuno uklanjanje aktivnih farmaceutskih sastojaka i ostalih sastojaka otpadnih voda iz tih voda. Kao rezultat toga, metode pročišćavanja poput membranske obrade, reverzne osmoze (RO) i aktivnog ugljena često se koriste integrirano s konvencionalnim metodama za pročišćavanje industrijskih otpadnih voda. Trenutno se KOV smatra jednim od glavnih puteva kojim farmaceutici ulaze u vodena okruženja poput površinske, podzemne i riječne vode.⁵

CAS je neučinkovit za uklanjanje farmaceutika što rezultira ispuštanjem visokih koncentracija zaostalog organskog sadržaja u okoliš. Zato su postavljeni strogi zakonski zahtjevi za pročišćavanjem otpadnih voda i sve stroža ograničenja za ispuštanje postojećih otpadnih voda.^{1,43,44}

Kako bi se osiguralo da farmaceutska otpadna voda ispunjava tražene standarde za koncentraciju onečišćivala, za tretiranje zaostale organske tvari prisutnih u efluentu upotrebljava se napredna tehnologija obrade koja uključuje naprednu oksidaciju, membranske procese, adsorpciju aktivnim ugljenom i dr. U konačnici je potrebna ciljno usmjerena i klasificirana strategija obrade kako bi se minimalizirao utrošak resursa i energije za obradu farmaceutskih otpadnih voda te postigla održivost okoliša uz učinkovito uklanjanje farmaceutika. Ključni korak ka tom cilju je učinkovito identificiranje kemijskog sastava, distribucije i posljedice visoke koncentracije zaostale organske tvari u efluentu.³⁶

2.3.1. Biološka obrada farmaceutika

Biološka obrada otpadnih voda je najčešća i najekonomičnija metoda pročišćavanja otpadnih voda. Međutim, pokazalo se da su same biološke metode nedovoljne za uklanjanje svih potencijalno toksičnih tvari u otpadnim vodama. Zato su tehnologija membranskog bioreaktora (MBR), ozoniranje i napredni oksidacijski procesi pokazali različite stupnjeve učinkovitosti za obradu farmaceutskih otpadnih voda. Također, integriranjem i kombinacijom tehnologija očekujemo učinkovitije pročišćavanje.

Metode biološke obrade mogu se podijeliti na aerobne i anaerobne procese. Aerobnu primjenu uključuju CAS, MBR i sekvencijalni šaržni reaktor (SBR). Anaerobne metode uključuju anaerobne reaktore mulja, reaktore anaerobnog filma i anaerobne filtre.

Karakteristike otpadnih voda igraju ključnu ulogu u odabiru postupka biološke obrade. Otapala, API, međuprodukti i sirovine predstavljaju teško biorazgradive tvari koje utječu na učinkovitost biološkog sustava obrade. CAS podrazumijeva primjenu mješovite mikrobne zajednice koja uz aeriranje kisikom koristi organsku tvar kao hranu i tako ih razgrađuje. Mikroorganizmi aktivnog mulja, pomoću kojih se tijekom aerobne obrade uklanjaju otopljeni sastojci iz otpadne vode, održavaju se ili raspršeni u vodenom okolišu u obliku pahuljica aktivnog mulja ili na nosačima kao slojevi biomase aktivnog mulja nazvan biofilm.^{5,45}

CAS pročišćavanje je neprikladno za pročišćavanje otpadnih voda gdje je razina kemijske potrošnje kisika (KPK) veća od 4000 mg L⁻¹. CAS s dugim hidrauličkim vremenom zadržavanja (HRT) je poznata metoda izbora za obradu otpadnih voda farmaceutske industrije. Odlikuju ga niži kapitalni troškovi za razliku od naprednijih metoda pročišćavanja, kao i ograničeni operativni zahtjevi te je općenito ekološki prihvatljivija od kloriranja.

Međutim, velika potrošnja energije, proizvodnja velikih količina mulja i operativni problemi (boja, pjenjenje i koagulacija) u sekundarnim pročišćivačima, povezani su s CAS postrojenjima. Čimbenici koji utječu na učinkovitost CAS postrojenja za pročišćavanje farmaceutskih otpadnih voda uključuju kakvoću otpadne vode kao hranjivog supstrata, HRT, temperaturu, pH-vrijednosti izvanstaničnog okoliša, otopljeni kisik, organsku tvar, mikrobnu zajednicu, koncentraciju toksičnih ili teško biorazgradivih tvari, održavanje mikrobiološke kakvoće i mikrobne aktivnosti aktivnog mulja te provedbu i praćenje procesa.^{5,45}

Utjecaj farmaceutika na CAS je neznatan u normalnim operativnim uvjetima, no više koncentracije, koje se mogu očekivati u farmaceutskim otpadnim vodama, mogu inhibirati proces. CAS je učinkovita metoda uklanjanja nekih API-ja, ali ne svih iz komunalnih objekata.⁵

Prisutnost specifičnih farmaceutika tijekom CAS procesa u koncentracijama nižim od 1 mg L^{-1} mogu imati toksične učinke na biomasu aktivnog mulja. Također, njihova prisutnost može smanjiti uklanjanje drugih tvari, ovisno o vrsti, koncentraciji i kombinaciji farmaceutika. Otkriveno je da uklanjanje farmaceutika ovisi o njihovoj promjenjivoj pH raspodjeli između tekuće i čvrste faze (mulja). Pokazalo se da su ibuprofen i diklofenak biorazgradivi nitrificirajućim bakterijama čak i na niskim temperaturama ($12 \text{ }^\circ\text{C}$).³³

β -laktamski antibiotici (npr. penicilin) pokazali su visoku biorazgradivost zbog hidrološkog cijepanja β -laktamskog prstena. CAS procesom najmanje su uklonjeni linkomicin i sulfonamidi dok su ibuprofen, naproksen, bezafibrat i estrogeni pokazali visok, a sulfametoksazol, karbamezapin i diklofenak ograničeni stupanj uklanjanja. Učinkovitost uklanjanja smanjuje razvoj otpornijih API-ja.⁵

Ukratko, CAS je pokazao djelotvorno uklanjanje nekih farmaceutika, s djelotvornošću koja značajno ovisi o vrsti postupka, radnim uvjetima posebice vremenu zadržavanja mulja (SRT) i smjesi prisutnih farmaceutika. Među raznim tehnologijama koje su razvijene i primijenjene za uklanjanje farmaceutika prije ispuštanja u okoliš efikasnim se pokazao MBR.

MBR predstavlja procesnu tehnologiju koja koristi membrane različitih vrsta za razdvajanje krutih tekućina, zamjenjujući tradicionalne gravitacijske taložnike i postižući višu razinu odvajanja čestica, sve do dimenzija submikrona. Prednosti MBR-a naspram CAS obrade su mnogo veće koncentracije mulja (MLSS) i veći SRT, smanjen prinos biomase, proizvodnja visokokvalitetnog efluenta, povećana otpornost na iznenadne razlike u hidrauličkim i organskim opterećenjima, zahtjeva puno manje prostora za izvedbu procesa te se može koristiti u svrhu obrade raznih vrsta otpadnih voda.^{33,36}

MBR sam po sebi nema visok stupanj uklanjanja farmaceutika, jer se pretpostavlja da su farmaceutici veličinom generalno manji od membranskih pora tako da jedino veće tvari zaostaju na membrani. Međutim, uklanjanje farmaceutika moguće je obradom putem reverzno osmotskih (RO) ili nanofiltracijskih (NF) membrana koje imaju pore ispod 2 nm, a time i sposobnost zadržavanja farmaceutika. U usporedbi s CAS-om, pokazuju veću učinkovitost uklanjanja za veći raspon farmaceutika i endokrinih disruptora (EDC). Sinergistički učinci među različitim molekulama također mogu utjecati na biorazgradivost farmaceutika. Kako su moguće kombinacije molekula i koncentracija praktički beskonačne, gotovo je nemoguće sa sigurnošću utvrditi takve učinke.⁵

2.4. Biorazgradnja

Biorazgradnja, sorpcija i hlapljenje su glavni mehanizmi uklanjanja farmaceutika.^{46,47} Sorpcija kao značajan mehanizam uklanjanja farmaceutika u biološkim sustavima može pridonijeti konačnom smanjenju koncentracije farmaceutika u otpadnim vodama. Sorpcija se može izraziti koeficijentom raspodjele između mulja i vodene faze (K_d), koeficijentom razdvajanja oktanol-vode ($K_{O/W}$) te koeficijent razdvajanja oktanol-vode pri određenoj pH vrijednosti ($\log D$).^{48,49} Kod K_d se razmatraju dva glavna mehanizma sorpcije: apsorpcija (hidrofobne interakcije karakterizirane $K_{O/W}$) i adsorpcija (elektrostatske interakcije izražene konstantom disocijacije, pK_a).⁵⁰

K_d predstavlja omjer koncentracija farmaceutika između čvrste i vodene faze u ravnotežnim uvjetima. Možemo zaključiti da spojevi s vrijednostima K_d većim od 500 L kg^{-1} se uklanjaju s manje od 10 % sorpcijom na aktivni mulj, a u slučaju K_d nižeg od 300 L kg^{-1} , sorpcija na mulj nije bitna. Prema svojim fizikalno-kemijskim svojstvima, farmaceutici se mogu podijeliti u tri glavne skupine: lipofilni (s visokim vrijednostima $K_{O/W}$), neutralni (neionski) i kiseli (hidrofilni i ionski) spojevi.⁴⁸⁻⁵⁰ Hidrofobni spojevi se mogu dobro ukloniti MBR-om zbog adsorpcije farmaceutika na aktivni mulj. Nakon vezanja hidrofobnih spojeva na aktivni mulj može se naknadno nastaviti proces biorazgradnje. Za hidrofilne spojeve je takva adsorpcija zanemariva i uklanjanje ovih spojeva ovisi gotovo samo o biorazgradnji.⁵¹

Tako se u radu Alturki i sur. (2010)⁵² prikazalo vrlo raspršeno uklanjanje hidrofilnih spojeva. Slične rezultate dobiva i Tadkaew i sur. (2011)⁵³ gdje je uklanjanje vrlo hidrofobnih ($\log D > 3,2$) spojeva bilo iznad 85 %, dok su hidrofilni i umjereno hidrofobni ($\log D < 3,2$) spojevi koji imaju jake elektronski odvlačeće funkcionalne skupine pokazali uklanjanje manje od 20 %.

Isti je zaključak donio Rogers (1996.)⁵⁴ prema kojem niski sorpcijski potencijal imaju spojevi s $\log K_{O/W}$ manjim od 2,5, srednji sorpcijski potencijal između 2,5 i 4,0, a spojevi s vrijednostima $\log K_{O/W}$ većim od 4,0 visoki sorpcijski potencijal. Posljednji mehanizam, hlapljenje, općenito se smatra beznačajnim jer ovisi o Henryjevom koeficijentu (K_H) za svaki specifični spoj. Prema Cirja i sur. (2008.)⁵⁵ hlapljenje postaje značajno kada se K_H kreće od 10^{-2} do 10^{-3} .

Koncentracija mulja u MBR-u obično je u rasponu od 8 – 12 g L⁻¹, dok je u CAS-u u rasponu 2 – 3 g L⁻¹, pružajući tako visoku biološku aktivnost po jedinici volumena. Također kod MBR-a je prepoznato potpuno zadržavanje suspendiranih i koloidnih čestica na koje se PO mogu sorbirati ili zarobiti na površini membrane. Razlog tomu je manja veličina čestica mulja i veća površina kod MBR obrade što može povećati kapacitet sorpcije, a time i potencijal biorazgradnje. Poboljšanje biorazgradnje i povećanje SRT-a je u tom slučaju inducirano visokom gustoćom biomase točnije većom MLSS koncentracijom. Takve značajke potiču veću raznolikost biote i poboljšaju biorazgradnju farmaceutika. Također, dugotrajni SRT može potaknuti rast spororastućih bakterija, koje pokazuju pozitivne učinke uklanjanja raznih PO. Visoke koncentracije biomase daju veću stabilnost, postojanost udarnim opterećenjima te povećani kontakt mikroorganizama i PO što olakšava njihovu biorazgradnju.^{33,56,57}

Nguyen i sur. (2019.)⁵⁸ su u svom radu procijenili uklanjanje diklofenaka (DCF) aktivnim muljem i njegove dugoročne učinke na funkciju i strukturu mikrobne zajednice. Aktivni mulj uklonio je 50 % DCF od 50 µg L⁻¹. Uklanjanje se značajno smanjilo na ispod 15 % povećanjem koncentracije DCF-a na 500 i 5000 µg L⁻¹. Kvantitativnom procjenom pokazano je da su glavni načini uklanjanja DCF-a upravo biorazgradnja (21 %) i adsorpcija (7 %), a ostala abiotička uklanjanja su beznačajna (5 %).

Nadalje, u radu Alvarino i sur. (2018.)⁵⁹ komparativnom analizom različitih tehnologija korištenih za biološku obradu otpadnih voda došli su do zaključka koji operativni parametri utječu na dva glavna mehanizma za uklanjanje PO: sorpcija i biotransformacija. Zaključeno je da na sorpciju utječe veličina čestica. Samo u slučaju flokulentne biomase, sorpcijska ravnoteža brzo se postiže, dok na sorpciju na granulama utječe nekoliko parametara, poput HRT-a i SRT-a. Za MBR sustave je potvrđeno da fizikalno-kemijske karakteristike membrane određuje sposobnost sorpcije. Hidrofobne membrane mogu zadržati lipofilne PO, dok nabijene membrane mogu PO zadržati elektrostatskim interakcijama. Integriranje različitih redoks potencijala u hibridnim naprednim biološkim konfiguracijama predstavlja dobru alternativu povećanju učinkovitosti uklanjanja PO.

Baresel i sur. (2019.)⁶⁰ proveli su proces kombiniran ultrafiltracijom (UF) u MBR-u i adsorpcijom uz biorazgradnju u biofilteru s granuliranim aktivnim ugljenom (GAC). Ovakvim kombiniranim procesom ne dolazi do stvaranja toksičnih ostataka, a dugoročnom procjenom GAC-biofiltera nakon MBR-a potvrđeno je da 90–98 % uklanjanje farmaceutika iz vode.

Izvršenom analizom i bilancom mase dokazana je adsorpcija male količine farmaceutika, dok je većina uklonjenih farmaceutika razgrađena. Rezultatima je ukazano i na to da biološka aktivnost u GAC-biofilteru može osigurati bioregeneraciju GAC-a razgradnjom ciljanih tvari i na taj način vratiti adsorpcijsku sposobnost GAC-a. Kako će zahtjevi za obradom otpadnih voda neprestano postajati stroži, ovakav sustav obrade MBR-om i GAC-biofilterom može biti jedno od najatraktivnijih rješenja za učinkovito uklanjanje farmaceutika iz otpadnih voda.

Unatoč detaljnom istraživanju uklanjanja farmaceutika biorazgradnjom konačni mehanizmi još nisu u potpunosti razriješeni. Potrebna je identifikacija bakterijskih vrsta i/ili enzima zaslužnih za uklanjanje farmaceutika, određivanje optimalnih radnih uvjeta te identifikacija nastalih metabolita, njihovih razgradnih i/ili transformacijskih produkata nastalih procesom biorazgradnje. Konačni produkti mogu imati različite strukturne karakteristike u usporedbi s matičnim spojevima, što ih može učiniti toksičnima, te takvi mogu završiti u pročišćenom efluentu. Biorazgradnja antihelmintika, njihovi razgradni produkti i studije s kojim bi mogli usporediti naše podatke nisu još istraženi. Ono što je poznato jest da o početnim koncentracijama ispitivanih uzoraka, koncentraciji mulja, vrsti realnog uzorka i operativnim uvjetima provođenja ispitivanja uvelike ovise krajnji rezultati analize.⁶¹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

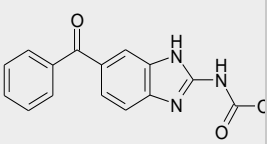
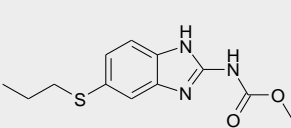
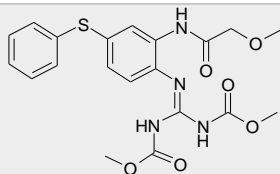
Eksperimentalni dio ovog rada obuhvaća preliminarna ispitivanja biorazgradnje triju farmaceutika (MBZ, ABZ i FEB) i smjese koja je sadržavala sve ispitivane farmaceutike (MIX). Analizirane su otopine farmaceutika masene koncentracije 3 mg L^{-1} pri koncentraciji mulja $4 - 5 \text{ g L}^{-1}$. Istovremeno, u tri reaktora različitih sadržaja, ispitivan je svaki farmaceutik zasebno, a potom i njihova smjesa. Prvi reaktor je sadržavao radnu otopinu farmaceutika, drugi radnu otopinu farmaceutika i definiranu koncentraciju mulja, a treći uz farmaceutik i mulj sadržavao je i mikroplastiku. Uzorkovanje iz reaktora se provodilo u vremenskim razmacima od 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72 i 96 h. Također, određivana je i toksičnost otopina farmaceutika i njihove smjese na početku (0 h) i na kraju rada (96 h).

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Farmaceutici

U eksperimentalnom radu korišteni su antihelmintici (MBZ, ABZ i FEB) i smjesa svih triju farmaceutika (MIX). Njihove fizikalno-kemijske karakteristike prikazane su u **Tablici 3.1**.

Tablica 3.1. Fizikalno-kemijski parametri ispitivanih farmaceutika.

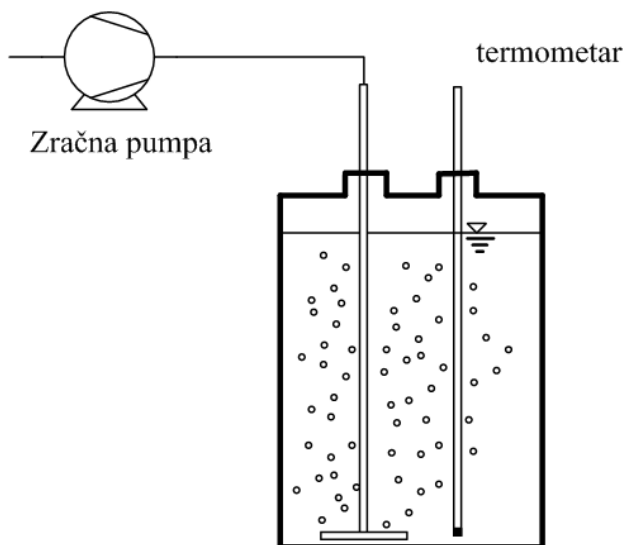
Farmaceutik	MBZ	ABZ	FEB
Strukturna formula			
CAS broj	31431-39-7	54965-21-8	58306-30-2
Kemijska formula	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$
Molekulska masa, g mol^{-1}	295,29	265,33	446,48
Proizvođač i čistoća standarda	Sigma–Aldrich ≥ 98	Veterina ≥ 99	Veterina ≥ 99
$\log K_{ow}$	2,71	3,14	1,95
K_H , $\text{atm m}^3 \text{mol}^{-1}$	$6,548 \cdot 10^{-14}$	$1,268 \cdot 10^{-11}$	$4,191 \cdot 10^{-15}$

3.1.2. Aktivni mulj

U ovom eksperimentu korišten je aktivni mulj s UPOV-a. Za svaki eksperiment biorazgradnje odabranih farmaceutika korišten je svježi mulj koji se homogenizirao te je postupkom razrjeđenja pripremljena koncentracija 4 - 5 g L⁻¹.

3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR

3.2.1. Aparatura za biorazgradnju



Slika 3.1. Aparatura za biorazgradnju

3.2.2. Kromatograf HPLC-DAD

Uzorci su analizirani tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti (HPLC) Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države. Instrument se sastoji od ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatiranog držača kolone, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala s programom STAR 5.2. preko kojeg se upravlja HPLC-om, prikupljaju i obrađuju podaci. Za analizu pojedinačnih farmaceutika korištena je kolona Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD), a za smjesu InertSustain C₁₈ (GL Sciences, Japan). Dimenzije prve kolone su 150 mm x 4,6 mm, a veličina čestica je 5 μm dok su za drugu 250 mm x 4,6 mm, a veličina čestica 5 μm. Volumen injektiranja uzorka je 30 μL, temperatura 20-25 °C. Uzorak je injektiran dva puta. Kolona se prala 65 %-tnim acetonitrilom (ACN) jedan sat protokom od 0,5 mL min⁻¹ prije i nakon analize uzoraka. Volumen injektiranog ACN-a je 10 μL.

3.2.3. Luminometar

Za potrebe mjerenja toksičnosti korišten je mjerni instrument LUMIStox 300 Hach Lange (Düsseldorf, Njemačka). To je instrument koji je razvijen za mjerenje jačine svjetlosti luminiscentnih bakterija. Zajedno s termostatskim blokom za inkubaciju naziva LUMIStherm, ovaj sustav odgovara tehničkim zahtjevima DIN 38412 L34 i L341 te međunarodnom standardu ISO DIS 11348. LUMIStox 300 je spoj luminometra i računala. LUMIStox 300 ima ugrađenu funkciju fotometra i automatsko mjerenje. Te značajke omogućuju prepoznavanje efekata boja pri ispitivanju luminiscentnih bakterija, pa uređaj može uzeti u obzir korekciju u slučaju obojene otopine. Osim toga, moguće je unaprijed procijeniti učinkovitost određenih boja na mjerenje te se može koristiti za određivanje optičke gustoće bakterijskih suspenzija u svrhu procjene inhibicije rasta u luminiscentnom bakterijskom testu za kroničnu toksičnost LUMIS·24·tox (LCK486). LUMIStox 300 ima i automatski referentni upravljački sustav kojim se provjerava funkcioniranje cijelog mjerenja prije svake serije luminiscentnih bakterija.

3.2.4. Ostali uređaji

- pH-metar Mettler Toledo Seven Easy, Švicarska. Korištena za mjerenje pH-vrijednosti svakog reaktora prilikom svakog uzorkovanja.
- ultrazvučna kupelj Sonorex Digital 10P proizvođača Bandelin, Njemačka. Kupelj ima sučelje na kojem se programira vrijeme, temperatura, snaga i degaziranje, a ima mogućnost spremanja 10 različitih programa. Ultrazvučna kupelj koristi se za pripremu otopina farmaceutika kako bi ubrzao proces otapanja standarda u čvrstom stanju.
- precizna analitička vaga XA105 DualRange proizvođača Mettler Toledo, Švicarska. Korištena je za odvage farmaceutika i mikroplastike potrebne za eksperiment.
- zbog čvrstih čestica iz aktivnog mulja koje se nalaze u reaktoru za filtriranje uzoraka koristile su i šprice volumena 5 mL, Becton Dickinson, BD Discardit II, Indija, igle Becton Dickinson BD Microlance 3, Indija te najlonski filteri, FilterBio, Labex Ltd., Kina, veličina pora 45 µm i promjera 25 mm.

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Zadane masene koncentracije temeljne standardne otopine (TSO) iznosile su 50 mg L^{-1} za MBZ i 500 mg L^{-1} za ABZ i FEB. Priprema TSO obuhvaća otapanje $0,05 \text{ g MBZ}$ -a u MilliQ (MQ) vodi i $0,5 \text{ g ABZ}$ i FEB u metanolu (MeOH) te nadopunjavanje u tikvici od 100 mL . Tikvica se dodatno uranja u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzao i poboljšao proces otapanja farmaceutika. Iz te otopine pripremljene su radne otopine masene koncentracije 3 mg L^{-1} tako da je 6 mL TSO MBZ -a i 60 mL TSO ABZ -a i FEB-a pipetirano u reaktore od 1 L .

3.3.2. Biorazgradnja

Biorazgradnja se provodila u staklenim bocama širokog grla volumena 1 L . Ukupan radni volumen se sastojao od radne otopine farmaceutika masene koncentracije 3 mg L^{-1} i aktivnog mulja koncentracije $4 - 5 \text{ g L}^{-1}$. Reaktori su omatani aluminijskom folijom kako bi se spriječilo stvaranje foto-razgradnih produkata nastalih djelovanjem Sunčevog zračenja na farmaceutike (**Slika 3.2.**). Reaktori su konstantno aerirani pomoću akvarijske zračne pumpe koja je gumenom cijevi preko filtera za zrak spojena sa staklenim štapićem koja je uronjena u sadržaj reaktora kako bi se osigurala dobava zraka na dno spremnika. Protok zraka je iznosio $3,7 \text{ L min}^{-1}$ te je ujedno i osigurao miješanje sadržaja u reaktorima kako bi smjesa bila homogena.

Proces biorazgradnje praćen je u dva reaktora (R2 i R3). U oba reaktora je MLSS slične vrijednosti, dok je u jedan od reaktora dodano i 400 mg mikroplastike (polipropilen). Mikroplastika je pripremljena mljevenjem u mlincu i naknadnim prosijavanjem kroz sita različitih veličina čime se dobije raspodjela veličina čestica $90 - 315 \text{ }\mu\text{m}$. Prilikom svakog uzorkovanja mjereni su parametri: pH-vrijednost, temperatura svakog reaktora, preostali radni volumen sadržaja u reaktoru i temperatura okoline kojima se prati proces biorazgradnje. Paralelno, uz pokuse biorazgradnje, za svaki odabrani antihelmintik, u R1 pri istim procesnim i okolišnim uvjetima, provedeni su pokusi bez dodanog aktivnog mulja, a istom dinamikom su uzimani uzorci i motreni su isti analitički pokazatelji.

Uzorkovanje za analizu provodilo se u definiranim vremenskim razmacima i to nakon $0, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72$ i 96 h . Neposredno nakon filtriranja uzorka kroz najlonski filter, uzorak je pohranjen na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ za daljnju analizu. Uzimalo se oko $1,5 \text{ mL}$ uzorka za HPLC analizu, 10 mL za ispitivanje toksičnosti te 25 mL kako bi se utvrdila MLSS na početku i kraju eksperimenta za određeni farmaceutik.



Slika 3.2. Prikaz reaktora za proces biorazgradnje

3.3.2. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje

Nakon uzorkovanja uzorci su najprije profiltrirani kroz najlonski filtar za injekcije (FilterBio, Labex Ltd., Kina), a zatim je provedena kromatografska analiza. Pripremljene standardne otopine farmaceutika i uzorci uzimani tijekom biorazgradnje snimani su tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti kojim je omogućena identifikacija i kvantifikacija korištenih farmaceutika nakon biorazgradnje čija je koncentracija u realnim uzorcima vrlo niska.

Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u ACN-u) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze tijekom snimanja kromatograma pojedinačnih komponenata na HPLC-DAD kromatografskom sustavu prikazan je u **Tablici 3.2**. Brzina protoka pokretne faze je $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Gradijent pokretne faze za drugu kolonu korišten za snimanje kromatograma MIX otopine prikazan je u **Tablici 3.3**.

Tablica 3.2. Gradijent pokretne faze za analizu pojedinačnih komponenata.

t_R, min	A, %	B, %
0	100	0
2,3	92	8
6	90	10
11	70	30
15	40	60
18	5	95
28	5	95
28,06	100	0
30	100	0

Tablica 3.3. Gradijent pokretne faze za analizu MIX otopine.

t_R, min	A, %	B, %
0	53	47
3	53	47
11	25	75
23	25	75
23,50	53	47
28,00	53	47

Ispitivani farmaceutici praćeni su pomoću kvantitativnog parametra, površine ispod kromatografske krivulje izražene jedinicama mAU. Osim toga, kvalitativni parametri bili su vrijeme zadržavanja (t_R) te apsorpcijski spektar karakterističan za pojedinu komponentu. Snimanje kromatograma provodilo se pri valnim duljinama od 210 do 365 nm. Na temelju snimljenih kromatograma očitani su praćeni parametri za ABZ i FEB pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije od 210 nm te za MBZ pri 254 nm.

3.3.3. Postupak određivanja toksičnosti

Postupak se prvotno sastoji od pripreme hranjive podloge koja predstavlja umjetni medij za uzgoj bakterija *in vitro* i održavanje čiste kulture. Priprema se otapanjem sastojaka (NaCl, CaCO₃, agar, pepton, kvaščev ekstrakt, glicerol) u redeioniziranoj vodi uz zagrijavanje do vrenja.

Smjesa se zatim sterilizira 15 min u autoklavu na temperaturi od 121 °C te se po završetku hladi na sobnoj temperaturi dok se temperatura smjese ne spusti na 45 °C. Sterilizirana podloga se tada izlijeva u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice tako da sloj bude maksimalne debljine 0,5 cm. Petrijeve zdjelice se čuvaju u hladnjaku na 4 °C te se po potrebi vade i koriste bez potrebe temperiranja.

Zatim se priprema otopina za resuspenziju koja predstavlja hranjivu izoosmotsku otopinu za resuspendiranje bakterijske kulture. U redeioniziranoj vodi se otope svi sastojci (NaCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, glicerol) osim šećera koji se dodaje naknadno radi potencijalnog zgušnjavanja. Otopina se prokuha, ohladi na sobnoj temperaturi i po potrebi profiltrira, a na posljetku sterilizira. pH-vrijednost otopine za resuspenziju se namješta netom prije korištenja otopine, a vrijednost mora biti između 6,8 i 7,2 jer su to optimalni uvjeti za život bakterija *Vibrio fischeri*.

Potom se priprema radna otopina za resuspenziju, referentne tvari i njihovu smjesu. Radna otopina je 2 % NaCl, a koristi se za pripremu niza razrjeđenja. Priprema se otapanjem 20 g NaCl u 1 L redeionizirane vode. Ova otopina se također sterilizira 15 min u autoklavu na 121 °C. Otopina referentnih tvari je otopina ZnSO₄·7H₂O u redeioniziranoj vodi, masene koncentracije 25 mg L⁻¹. Ova otopina se koristi za provjeru valjanosti bakterijske kulture. *Vibrio fischeri* su morske bakterije pa dodavanjem NaCl imitiramo njihovo prirodno stanište, dok je sol poput ZnSO₄ nepogodan za ovu vrstu.

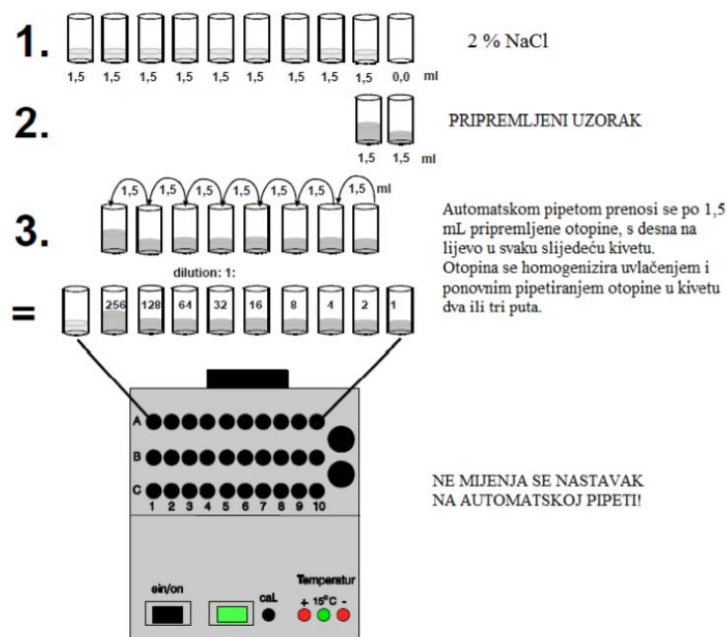
Konačni korak pripreme za mjerenje toksičnosti uključuje odmrzavanje kiveta s liofiliziranim bakterijama te ulijevanje 1 mL sterilizirane otopine 2 % NaCl ili gotove otopine za reaktivaciju od proizvođača.

Idući korak je izlijevanje suspenzije na hranjivu podlogu te razvlačenje sterilnom ezom po podlozi. Kultura se ostavi u inkubatoru na 18 °C. Ukoliko je aktivacija prošla kako treba, nakon 24 h bakterije intenzivno svijetle u mraku i to je znak da su uredno oživljene i spremne za mjerenje toksičnosti. Oživljena kultura je valjana za rad najmanje 2, a najviše 9 dana od oživljavanja, odnosno precjepljivanja. Međutim, već nakon 4 dana primjećuje se puno slabija luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije. Bakterijska suspenzija se radi tako da se epruveta napuni otopinom za resuspenziju do otprilike $\frac{3}{4}$ punog volumena. Zatim se ušicom eze zahvati grudica bakterijske kulture te se otapa u napunjenoj epruveti. Grudice je potrebno usitniti i opreznim miješanjem postići što veći stupanj homogenosti otopine. Bakterijska suspenzija se prije korištenja mora termostatirati 15 min na 15 °C (adaptacija kulture).

Prije samog mjerenja nužno je napraviti test valjanosti ili tzv. „*screen test*“ koji se izvodi tako da se u referentnu kivetu stavi 0,5 mL otopine 2 % NaCl i 0,5 mL bakterijske suspenzije. U test kivetu se stavi 0,5 mL otopine ZnSO₄·7H₂O i također 0,5 mL bakterijske suspenzije. Obje kivete se termostatiraju 15 min na 15 °C. Nakon toga se u glavnom izborniku LUMISTox 300 uređaja odabere opcija SCR.N, umetne se referentna, a zatim test kiveta i očitava se vrijednost. Poželjan rezultat je između 20 % i 80 % luminiscencije. Pri nižim i višim vrijednostima od navedenih, potrebno je prirediti novu bakterijsku suspenziju i ponoviti test valjanosti. Razrjeđenje se radi po geometrijskom nizu kako je prikazano na **Slici 3.3.** gdje termoblok ima A, B i C red, svaki s 10 mjesta za 10 kiveta. Mjerenje i očitavanje rezultata se provodi postavljanjem uvjeta na EC programu koji su prikazani u **Tablici 3.4.**

Tablica 3.4. Uvjeti postavljeni za EC program.

Eksperimentalni uvjeti EC programa na uređaju LUMISTox 300	
koraci razrjeđenja	8
tip razrjeđenja	2
mjerna jedinica	%
početna koncentracija	100 %
vrijeme inkubacije	1. 30 min
	2. 0 min



Radna otopina za resuspenziju, 2 % NaCl uvijek se nalazi u A1. Uzorak najviše koncentracije, u ovom slučaju nerazrijeđene otopine, nalazi se krajnje desno, A10.

Slika 3.3. Priprema geometrijskog niza razrjeđenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Biorazgradnja i fizikalno-kemijski parametri

Tijekom procesa biorazgradnje pojedinačnih farmaceutika (MBZ, ABZ i FEB) i njihove smjese (MIX) praćene su promjene fizikalno-kemijskih parametara. Praćeni su pH-vrijednost, temperatura okoline, temperatura svakog reaktora i preostali radni volumen sadržaja u reaktoru. Eksperimentom dobivene vrijednosti, za sva tri reaktora i sve komponente, nalaze se u **Tablici 4.1**.

Tablica 4.1. Eksperimentalno dobiveni fizikalno-kemijski parametri za ispitivane farmaceutike i njihovu smjesu.

FARMACEUTIK	REAKTOR	pH	T(sobna), °C	T(reaktor), °C	V(radni), L
MBZ	R1	5,06	23,0	21,0	0,95
	R2	6,78	26,0	23,0	0,95
	R3	6,82	26,0	22,0	0,95
ABZ	R1	5,01	26,0	22,0	0,95
	R2	7,45	26,0	23,0	0,95
	R3	7,33	26,0	23,0	0,94
FEB	R1	5,13	28,0	24,0	0,94
	R2	7,44	28,0	24,5	0,94
	R3	7,51	28,0	23,0	0,94
MIX	R1	5,21	28,0	23,5	0,94
	R2	7,45	26,0	23,0	0,95
	R3	7,56	26,0	24,5	0,94

Iz dobivenih vrijednosti parametara možemo zaključiti da su pH-vrijednosti za isti reaktor za sva tri farmaceutika i MIX slična i iznosi $5,21 \pm 0,20$ za R1, $7,45 \pm 0,21$ za R2 i $7,56 \pm 0,17$ za R3. U svim slučajevima, razlika između pH-vrijednosti R1 u odnosu na R2 i R3 objašnjava se aeracijom koja znatno povećava pH-vrijednost u prisutnosti mulja. Naime, aeracija povećava brzinu otplinjavanja plinova, pa tako u slučaju reaktora s muljem ima dosta CO₂ čijim se isparavanjem automatski povećava pH-vrijednost. Također, pH-vrijednost aeriranog reaktora trebao bi biti između 6,5 - 8,5 kako bi se izbjegao stres na mikrobnu zajednicu i postigla optimalna biološka aktivnost.⁶²

Temperatura reaktora tijekom eksperimenta raste usporedno s rastom sobne temperature koja je pri kraju mjerenja za 2-5 °C viša. Tijekom biorazgradnje u trajanju u 96 h došlo je do smanjenja ukupnog radnog volumena za 5 do 6 % ovisno o reaktoru. Smanjenje vrijednosti radnog volumena u odnosu na početni volumen od 1 L može se pripisati uzorkovanju manjih volumena tijekom provođenja eksperimenata. Nadalje, zbog otvorenih aeriranih reaktora moguće je da je došlo i do isparavanja vodene otopine radi dugog perioda (96 h) provođenja procesa biorazgradnje.

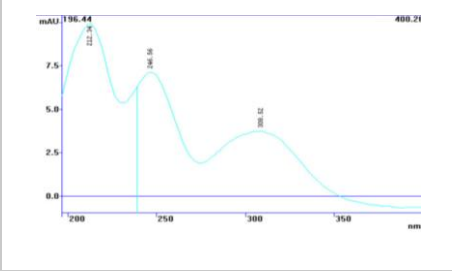
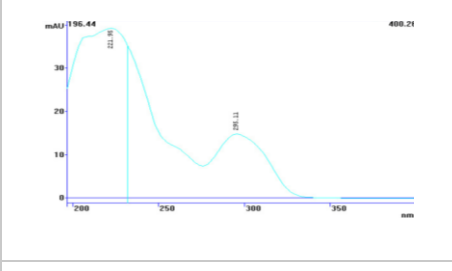
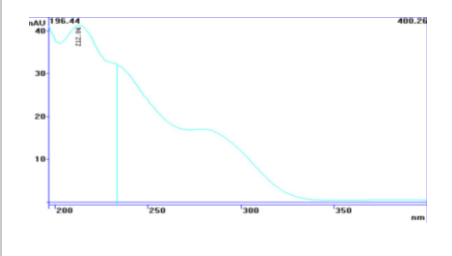
4.2. Kromatografska detekcija i kvantifikacija

Proces biorazgradnje pratio se kromatografskom metodom pri čemu su se iz dobivenih kromatograma očitavali kvantitativni parametri pomoću kojih se određivala učinkovitost samog procesa, te kvalitativni parametri kromatograma za detekciju istraživanih komponenti i identifikaciju eventualno novonastalih spojeva tijekom procesa biorazgradnje (transformacijski i/ili razgradni). Prvotno se provodila kvalitativna detekcija ispitivanih antihelmintika pomoću apsorpcijskog spektra i vremena zadržavanja (t_R , min) na HPLC-DAD-u. Zatim su očitavane površine kromatografskih krivulja istraživanih komponenti (A , mAU) za kvantitativno određivanje farmaceutika te ranije spomenute učinkovitosti procesa biorazgradnje.

4.2.1. Kromatografska detekcija zasebnih komponenata

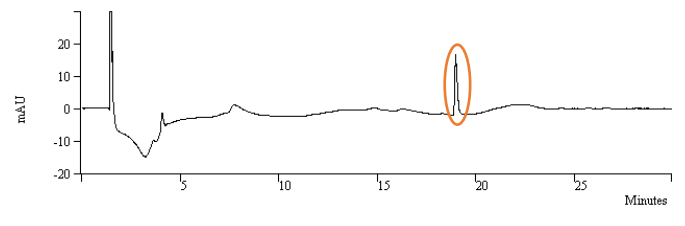
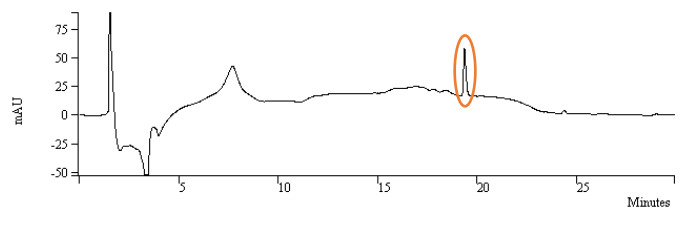
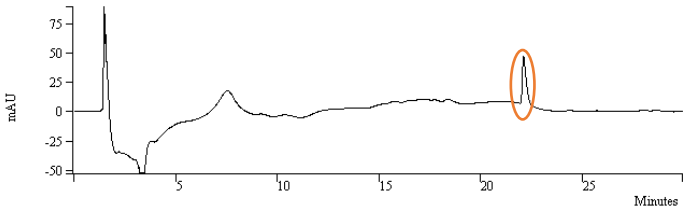
Da bi bilo uopće moguće pratiti istraživane komponente antihelmintika kromatografskim metodama prvo su snimljeni apsorpcijski spektri za svaku istraživanu komponentu kako bi se odredio maksimum apsorbanije. Kod maksimuma apsorbanije integrirati će se površina kromatografske krivulje za kvantitativno određivanje istraživanih komponenti kromatografskim putem. Osim navedenog, nužno je detektirati istraživane komponente i prema vremenu zadržavanja kako bi bili sigurni da u realnom sustavu, ali i u smjesi antihelminitka određujemo baš željeni analit. Dakle, kod detekcije kada provodimo ciljanu analizu, poželjno je imati što više kvalitativnih parametara pomoću kojih ćemo sa sto postotnom sigurnošću moći odrediti istraživane spojeve čak i u vrlo složenim maticama poput ovih nastalih tijekom procesa biorazgradnje. Parametri za detekciju istraživanih spojeva u ovome radu prikazani su u **Tablici 4.2**.

Tablica 4.2. Apsorpcijski spektri i vrijeme zadržavanja istraživanih čistih komponenti u standardnoj otopini masene koncentracije 3 mg L⁻¹

Antihelmintik	Apsorpcijski spektar	λ / nm	Maksimumi apsorpcije	t_R / min
MBZ		254	211,85, 246,26 i 306,75	18,986
ABZ		210	219,88 i 295,01	19,334
FEB		210	212,93	22,093

Kromatografska detekcija antihelmintika i njihovih razgradnih/transformacijskih produkata provodila se snimanjem apsorpcijskog spektra (**Tablica 4.2.**) i određivanjem t_R (**Tablica 4.3.**). Nastanak novih spojeva ne može se identificirati niti kvantificirati HPLC-DAD kromatografskim sustavom već se može odrediti samo njihovo postojanje, te u svrhu identifikacije treba koristiti kromatografski sustav HPLC-MS/MS. HPLC-DAD sustavom praćeni su ispitivani farmaceutici pojedinačno i u smjesi. Dobiveni kromatogrami prikazuju ovisnost apsorbanije (A) o vremenu zadržavanja, a koristeći DAD se za svaku komponentu dobiva njezin apsorpcijski spektar. Snimanjem pojedinačnih apsorpcijskih spektara otopine svih farmaceutika potvrđuje se prisutnost određenog antihelmintika.

Tablica 4.3. Kromatogrami i očitane t_R vrijednosti čistih komponenti.

Farmaceutik	Kromatogram	t_R / min
MBZ		18,986
ABZ		19,334
FEB		22,093

4.2.2. Validacija

Provedena je djelomična validacija kojom je određena linearnost, granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK). Linearnost se utvrđuje umjernim pravcem i pripadajuće jednadžbe pravca pripremom 6 radnih standardnih otopina (RSO) koje predstavljaju umjerne točke (0, 1, 3, 5, 7 i 10 mg L⁻¹).

Sve RSO pripremljene su u MQ vodi. Linearnost određuje koeficijent determinacije, R^2 , koji za onečišćenja mora biti $> 0,995$ kako bi metoda bila primjenjiva. Analizom RSO različitih koncentracija farmaceutika te grafičkim prikazom ovisnosti odziva instrumenta o koncentraciji analita točnije umjeravanjem određena je linearnost metode. U **Tablici 4.4** prikazane su dobivene jednadžbe pravaca i iznosi R^2 za svaki od istraživanih farmaceutika i njihovu smjesu. Linearnost metode je potvrđena eksperimentalno dobivenim vrijednostima $R^2 > 0,995$. Primjenjivost metode je odobrena i vizualnom potvrdom da je unutar zadanog koncentracijskog područja dobivena izravno proporcionalna ovisnost signala o koncentraciji pojedinog farmaceutika i njihove smjese (**Prilozi 8.1.-8.6.**). GK je 0,5 mg L⁻¹, a GD je 0,25 mg L⁻¹.

Tablica 4.4. Eksperimentalno dobivene jednadžbe pravaca za pojedine farmaceutike i njihovu smjesu.

Farmaceutik		Jednadžba pravca	R^2
MBZ		$y = 76,947x + 25,874$	0,9938
ABZ		$y = 336,35x - 178,64$	0,9963
FEB		$y = 298,66x - 124,35$	0,9953
MIX	MBZ	$y = 30,38x - 1,1532$	0,9906
	ABZ	$y = 120,46x + 5,281$	0,9962
	FEB	$y = 101,69x - 11,056$	0,9999

4.2.3. Rezultati kromatografske analize HPLC-DAD sustavom

Kromatografskom analizom dobivene su vrijednosti površine kromatografskih krivulja, a iz jednadžbi pravaca i koncentracije istraživanih farmaceutika u definiranim vremenima uzorkovanja. Uglavnom, koncentracije istraživanih komponenti dobivene su unošenjem vrijednosti površina kromatografskih krivulja u jednadžbu kalibracijskih pravaca (**Tablica 4.2.**) pripadajućeg farmaceutika. U svrhu prikazivanja promjene koncentracije farmaceutika, tijekom procesa biorazgradnje, napravljeni su grafički prikazi ovisnosti koncentracije farmaceutika, γ , o vremenu uzorkovanja.

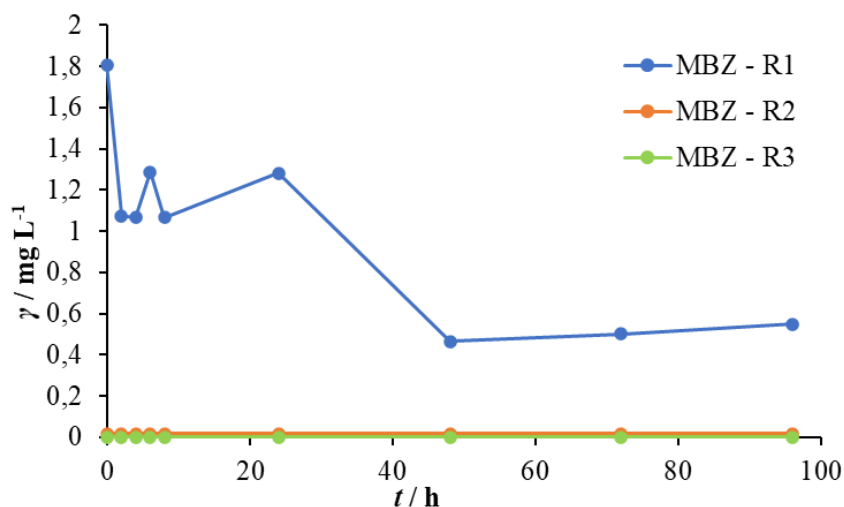
Također snimanjem kromatograma, pri valnim duljinama od 210 do 365 nm, te usporedbom kromatograma antihelmintika nakon 0 h i 96 h izlaganja aktivnom mulju, uočeno je smanjenje površina ispod kromatografskih krivulja glavnih komponenata i pojavljivanje novih kromatografskih krivulja.

Razlog tomu je nastajanje razgradnih i/ili transformacijskih produkata procesom biorazgradnje. Osim toga DAD detektor omogućuje uvid u apsorpcijske spektre pripadajućih kromatografskih krivulja za nepoznate spojeve nastale tijekom procesa biorazgradnje, što omogućuje razlučivanje krivulje od krivulje i pri tome se može zaključiti dolazi li do nastanka novih spojeva ili se radi o prethodno prisutnim onečišćivalima, nečistoćama iz opreme i/ili šumovima bazne linije. MBZ na kromatogramu prepoznamo pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije od 254 nm, a ABZ i FEB na 210 nm.

4.2.3.1. Mebendazol

Provedenom kromatografskom analizom dobivena je ovisnost koncentracije MBZ-a u svim vremenima uzorkovanja za sva tri reaktora. **Slika 4.1** prikazuje ovisnost koncentracije MBZ-a u sva tri ispitivana reaktora u ovisnosti o vremenu uzorkovanja. U R1 vidljivo je inicijalno smanjenje koncentracije MBZ-a s $1,809 \text{ mg L}^{-1}$ na $1,074 \text{ mg L}^{-1}$ nakon 2 h procesa biorazgradnje te drugi pad s $1,282 \text{ mg L}^{-1}$ na $> 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (GK) nakon 24 h. Do povećanja koncentracije u R1 nakon 24 h potencijalno dolazi zbog slabe topljivosti MBZ-a koji se tijekom vođenja procesa biorazgradnje nastavlja otapati jer se smanjenjem volumena otopine i promjenom temperature u bioreaktoru mijenja njegova topljivost s vremenom.

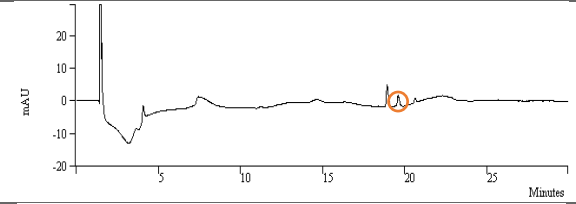
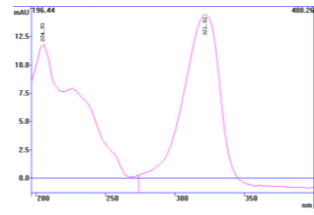
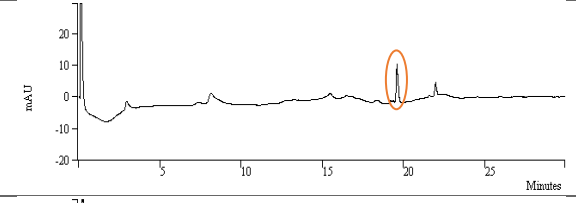
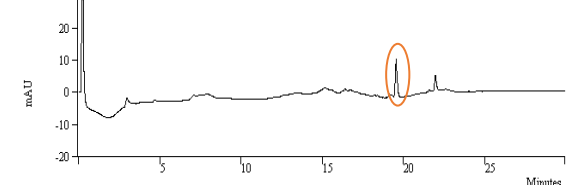
U reaktorima R2 i R3 vidljiv je trenutni pad koncentracije $< \text{GK}$. S obzirom da je $K_{O/W}$ ⁵⁴ parametar koji govori o mogućnosti bioakumulacije farmaceutika u okolišu ili njegove adsorpcije na mulj, a MBZ spada u farmaceutike srednjeg sorpcijskog potencijala ($\log K_{O/W} = 2,5 - 4$). S $\log K_{O/W}$ od 2,71 u slučaju MBZ-a moguća je pojava trenutačne sorpcije na pahuljice mulja ili MP.⁶³



Slika 4.1. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije, γ , o vremenu uzorkovanja za MBZ.

Kromatogrami u **Tablici 4.5** prikazuju novonastale kromatografske krivulje razgradnih/transformacijskih produkata koje se prvi put javljaju nakon 48 h biorazgradnje u vremenu zadržavanja od 19,605 min. Primjećujemo da u R1 dolazi do nastanka novog spoja, no obzirom da je to reaktor bez aktivnog mulja, moguće je da hidrolizom MBZ-a nastaje transformacijski produkt. Tako su Wei i sur.⁶³ dokazali da je hidroliza prvi stupanj u procesu biorazgradnje nekih farmaceutika.

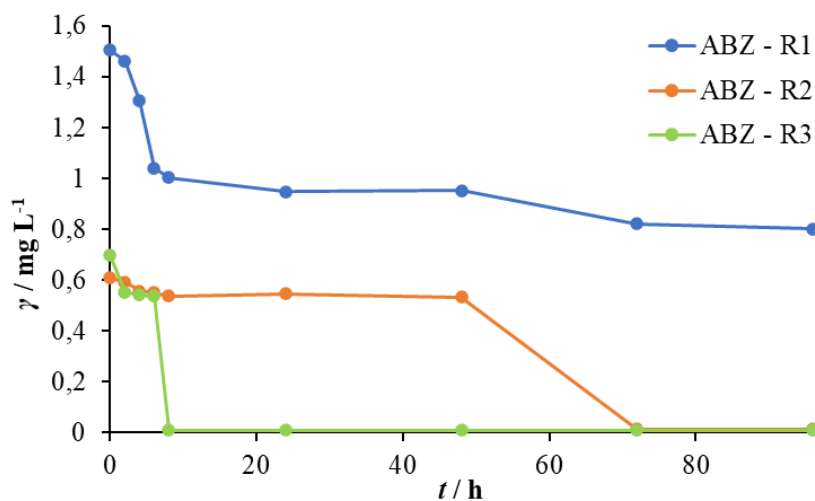
Tablica 4.5. Prikaz novonastalih kromatografskih krivulja prilikom biorazgradnje MBZ-a.

Uzorak	Kromatogram	t_R , min	Apsorpcijski spektar
R-1-96		19,605	
R-2-96			
R-3-96			

Obzirom da je HPLC-DAD analizom dobiven apsorpcijski spektar, nepoznatu komponentu potrebno je odrediti drugim analitičkim metodama, kao što je HPLC-MS/MS, jer apsorpcijski spektar nije dovoljan, osobito ukoliko se radi o razgradnom/transformacijskom produktu.

4.2.3.2. Albendazol

Kod ABZ-a u R1 se ponovno javlja trenutni pad koncentracije s $1,505 \text{ mg L}^{-1}$ na $1,004 \text{ mg L}^{-1}$, dok se vrijednosti koncentracija za R2 i R3 kroz cijeli proces nalaze ispod granice kvantifikacije ili određivanja ($\leq \text{GK}$) (Slika 4.2.). Porastom vrijednosti $\log K_{O/W}$ ⁵⁴ dolazi do porasta postotka uklanjanja antihelmintika što ukazuje da hidrofobnost farmaceutika uvelike igra ulogu u procesu biorazgradnje. Tako kod R3 inicijalno dolazi do sorpcije ABZ-a na mulj ili MP uslijed velikog sorpcijskog potencijala ($\log K_{O/W}$ od 3,14). Razlog tomu je hidrofobnost enzima oksigenaze s kojim hidrofobni farmaceutici lakše reagiraju, što uzrokuje veću učinkovitost njihovog uklanjanja.



Slika 4.2. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije, γ , o vremenu uzorkovanja za ABZ.

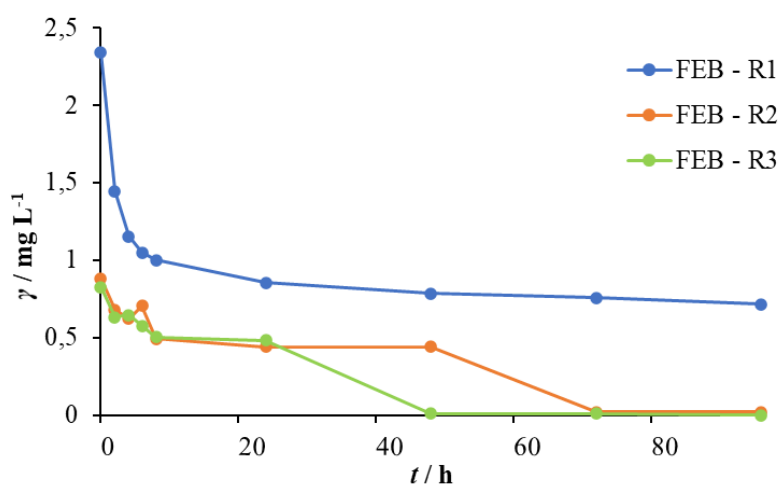
Tablica 4.6. Prikaz novonastalih kromatografskih krivulja prilikom biorazgradnje ABZ-a.

Uzorak	Kromatogram	t_R , min	Apsorpcijski spektar
R-2-2		16,493	
R-2-24		17,880	
R-3-2		16,493	
R-3-8		17,880	

Biorazgradnjom ABZ-a nastaju novi spojevi, nakon 96 h, koji su detektirani u oba reaktora s muljem prikazani u **Tablici 4.6**. U R2 se prva kromatografska krivulja na vremenu zadržavanja 16,493 min javlja nakon 2 h, a druga krivulja na 17,880 min za uzorak uzorkovan nakon 24 h. U R3 koji uz mulj sadržava i definiranu količinu mikroplastike javljaju se isti spojevi, no pri drugim vremenima uzorkovanja (nakon 2 h i 8 h).

4.2.3.3. Febantel

FEB je antihelmintik koji je pokazao očekivane rezultate, a to je postepeno smanjenje njegove koncentracije u sva tri reaktora prikazano na **Slici 4.3**. Razlog tomu je relativno nizak sorpcijski potencijal gdje njegov $\log K_{O/W}^{54}$ iznosi 1,95, čime je njegova tendencija sorpciji najniža od svih ispitivanih farmaceutika.



Slika 4.3. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije, γ , o vremenu uzorkovanja za FEB.

Također, novonastali spoj prikazan u **Tablici 4.7** javlja se na 19,480 min u R2 i R3. Dobivene vrijednosti koncentracija kroz cijelo vrijeme uzorkovanja i manji broj novonastalih spojeva nam ukazuje da je FEB od sva tri ispitivana farmaceutika najpostojaniji.

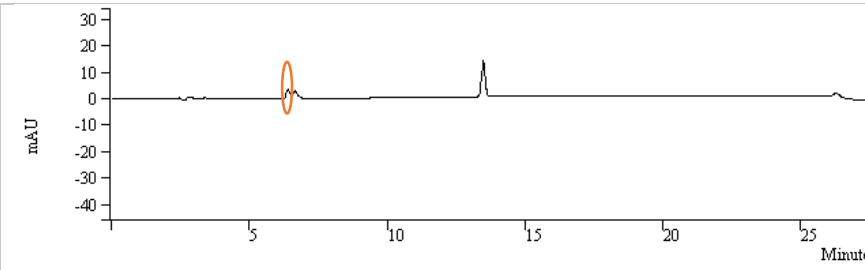
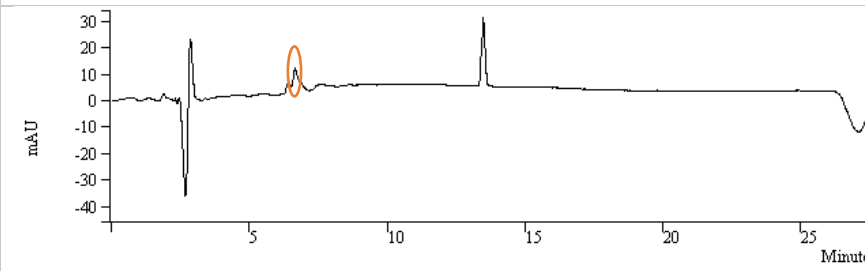
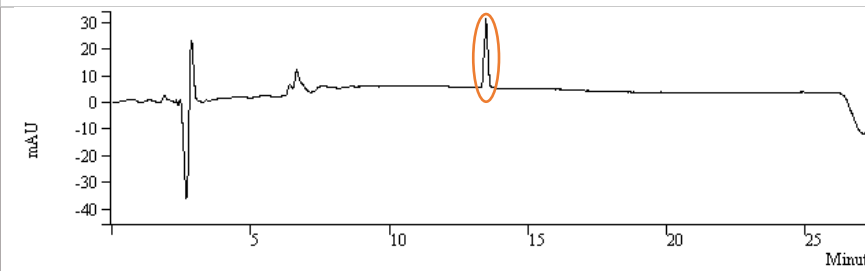
Tablica 4.7. Prikaz novonastalih kromatografskih krivulja prilikom biorazgradnje FEB-a.

Uzorak	Kromatogram	t_R , min	Apsorpcijski spektar
R-2-96		19,480	
R-3-96			

4.2.3.4. Smjesa antihelmintika

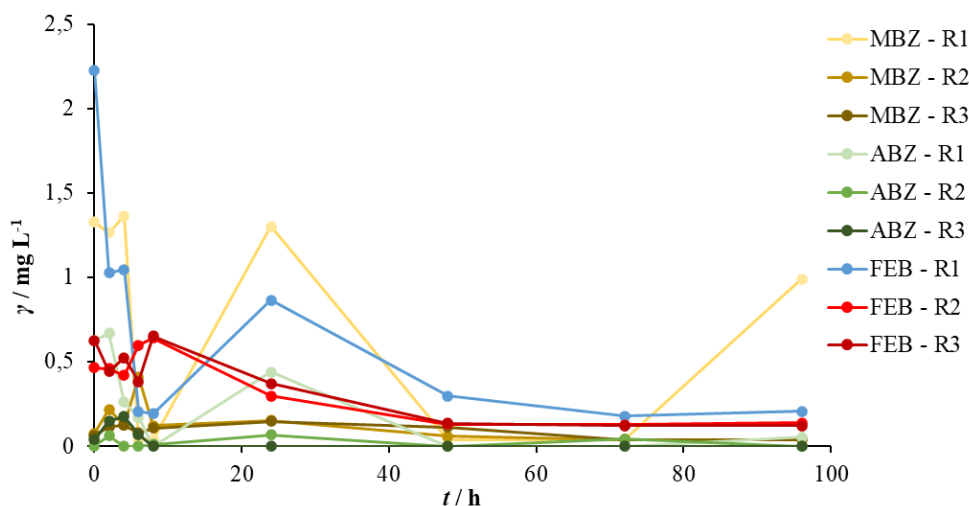
Radi praćenja eventualnog sinergijskog učinka među farmaceuticima ispitana je smjesa farmaceutika (MIX). Uslijed lošeg razdvajanja kromatografskih krivulja detekcija i kvantifikacija pojedinih kopONENTI za otopine smjesa, tj. otopine MIX-a provodila se na drugoj HPLC koloni. Posljedica toga su pomaci vremena zadržavanja čistih farmaceutika čije su nove vrijednosti prikazane u **Tablici 4.8**. Tako je vrijeme zadržavanja MBZ-a u smjesi, tj. MIX-u na 6,407 min za MBZ, na 6,653 min za ABZ, a na 13,465 min za FEB.

Tablica 4.8. Kromatogrami za čiste komponente u smjesi, tj. MIX-u.

Farmaceutik	Kromatogram	t_R / min
MBZ		6,407
ABZ		6,653
FEB		13,465

Vrijednosti K_H (**Tablica 3.2.**) su manje od $3 \times 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mol}^{-1}$ za sve ispitivane antiparazitike što nam govori da ne dolazi do hlapljenja. Tako preostaju tri mehanizma uklanjanja koja bi mogla objasniti pad koncentracija ispitivanih antihelmintika u šaržnom sustavu, a to su biorazgradnja, adsorpcija na pahuljice mulja ili MP i hidroliza.⁶⁴

Slika 4.4 prikazuje promjenu koncentracije svakog pojedinog farmaceutika u svim reaktorima unutar MIX-a. Iz grafičkog prikaza se mogu primijetiti povremeni skokovi u koncentracijama sva tri farmaceutika u R2 i R3 što se može objasniti njihovom eventualnom adsorpcijom na pahuljice mulja.⁶⁵



Slika 4.4. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije, γ , o vremenu uzorkovanja za MIX.

Kao i u slučaju ispitivanja samostalnog MBZ-a, opet dolazi do porasta koncentracije u MBZ - R1 i ABZ – R1 nakon 24 h zbog slabe topljivosti oba antihelmintika. Pretpostavlja se da je razlog niske topljivosti, uz hidrofobnost i planarna struktura koja uzrokuje snažne interakcije slaganja u kristalnu rešetku, pojačane intermolekularnim vodikovim vezama.⁶⁶ Također, aeracijom izazvano miješanje pridonosi homogenizaciji otopine radi čega je također moguć rast koncentracije.

Tablica 4.9. Prikaz novonastalih kromatografskih krivulja prilikom biorazgradnje MIX-a.

Uzorak	λ , nm	Kromatogram	t_R , min	Apsorpcijski spektar
R-2-96	254		7,859	
R-2-96	210			
R-3-96	254			
R-3-96	210			

Nadalje, inicijalni pad koncentracije u R1 za sve ispitivane antihelmintike, na iznose koncentracija manje od GK, može se objasniti pojavom hidrolize. Također, do fluktuacija u koncentraciji kroz cijelo vrijeme provođenja procesa biorazgradnje moguće je da dolazi radi uspostavljanja ravnotežnog stanja adsorpcija-desorpcija.

Kod MBZ-a i ABZ-a u reaktorima s muljem primjećujemo novu kromatografsku krivulju nakon 96 h (razgradni ili transformacijski produkt) čiji su kromatogrami i apsorpcijski spektar priloženi u **Tablici 4.9**.

4.3. Test toksičnosti

Korištena je bioanalitička metoda određivanja toksičnog učinka antihelmintika MBZ-a, ABZ-a, FEB-a i njihove smjese na okoliš. Cilj provedbe testa toksičnosti, bakterijskom vrstom *Vibrio fischeri*, bio je donijeti zaključak nastaju li procesom biorazgradnje toksičniji produkti od samog početnog spoja. Problem predstavlja činjenica da postoji malo podataka o akutnoj toksičnosti antihelmintika, s kojima bi se mogli usporediti naši dobiveni rezultati. U ovom radu su pomoću eksperimentalno dobivenih vrijednosti luminiscencija za uzorke uzorkovane u početnom vremenu (0 h) i nakon procesa biorazgradnje (96 h), izračunati postotci inhibicija pojedinačnih farmaceutika i MIX-a (**Prilozi 8.7.-8.10.**).

Iz dobivenih rezultata za ispitivane farmaceutike i njihovu smjesu možemo primijetiti da se pri velikim razrjeđenjima inhibicija kreće prema negativnim vrijednostima, dok pri manjim raste. Sama pojava inhibicije je sprječavanje luminiscencije bakterija *Vibrio fisheri* radi toksičnog djelovanja farmaceutika i njihove smjese ili radi nastanka novih razgradnih i/ili transformacijskih produkata. U ovom radu zadana koncentracija radne otopine je 3 mg L^{-1} , a geometrijskim nizom razrjeđenja dobivamo jako niske vrijednosti koncentracija farmaceutika.

U slučaju MBZ-a (**Prilog 8.7.**) u svim ispitivanim reaktorima dolazi do porasta toksičnosti nakon 96 h u odnosu na vrijednost inhibicije na početku eksperimenta. U R1 radi eventualne hidrolize MBZ-a nakon 96 h, pri koncentraciji od $0,550 \text{ mg L}^{-1}$, došlo je do 16 % inhibicije. Za početnu koncentraciju od 3 mg L^{-1} u R2 inhibicija iznosi 15,152 %, dok je na kraju eksperimenta u vrijednosti od 33,182 %. Tako je za R3 smanjenje luminiscencije bakterijske vrste *Vibrio fisheri* 40,178 % što nam eventualno potvrđuje da je MBZ manje toksičan od novonastalih produkata dobivenih procesom biorazgradnje.

Nadalje, u **Prilogu 8.8.** prikazani su dobiveni rezultati za ABZ gdje u R1 za 0 h postotak inhibicije iznosi 2,641 %, a za 96 h pri koncentraciji 0,801 mg L⁻¹ 31,587 %. Na početku eksperimenta inhibicija za R3 je 28,704 %, dok je u konačnom mjerenju iznosila 48,835 %.

Razlog velikoj inhibiciji za MBZ, a pogotovo ABZ je u poveznici toksikološkog djelovanja s logK_{O/W} vrijednostima što su Wagil i sur.⁶⁷ potvrdili. Velike vrijednosti logK_{O/W} MBZ-a (2,71) i ABZ-a (3,14) dolaze direktno u korelaciju s porastom toksičnosti.

Kod FEB-a je obrnuta situacija jer je vrijednost inhibicije za R2 i R3 u 96 h (16,174 % i 14,376 %) manja nego u početnom vremenu uzorkovanja (34,526 % i 19,752 %), čime se vidljivo i toksičnost procesom biorazgradnje smanjuje. Moguća objašnjenja za to bi bila najmanja vrijednost logK_{O/W} u vrijednosti od 1,95 čime je i manja vjerojatnost da dođe do sorpcije; veća postojanost i stabilnost samog farmaceutika naspram ostalih ispitivanih; bolja topljivost u otapalu prilikom pripreme radne otopine ciljane koncentracije i u konačnici bolja učinkovitost biorazgradnje.

Također, obzirom da je HPLC-DAD analizom pojedinačnih farmaceutika utvrđeno da je koncentracija svih ispitivanih antihelmintika, nakon 96 h u oba reaktora s muljem, manja od GK možemo zaključiti da je dobivena toksičnost posljedica nastajanja razgradnih i/ili transformacijskih produkata.

Ispitivanjem smjese svih triju farmaceutika, MIX-a, dobivamo rezultate slične kao kod FEB-a. Za MIX u R2 također uočavamo pojavu velikog smanjenja toksičnosti s 51,164 % inhibicije u 0 h na 10,832 % u 96 h.

U daljnjim istraživanjima fenomena sorpcije trebao bi se eventualno smanjiti ukupni broj sati uzorkovanja, tako da se uzorkovanje provodi svakih 15 min kroz 24 h. Razlog tomu je pad koncentracije antihelmintika nakon 24 h ispod GK što otežava detektiranje pojave sorpcije kao jednog od mehanizama uklanjanja farmaceutika. Razumijevanje fenomena sorpcije je kod ovakve vrste ispitivanja iznimno bitna jer može utjecati na smanjenje koncentracije farmaceutika tijekom ispitivanja, a time i smanjiti toksičnost. Nadalje, potrebno je primijeniti i druge analitičke metode (HPLC-MS/MS) kako bi se ustanovilo o kojim se razgradnim i/ili transformacijskim produktima radi. Time bi se osigurao bolji uvid u tijek procesa i lakše ustanovio mehanizam uklanjanja ispitivanih farmaceutika (MBZ, ABZ i FEB).

Međutim, obzirom da su se u ovom radu provodila samo preliminarna ispitivanja, dobiveni rezultati se smatraju dobrom smjernicom za buduća istraživanja ove tematike. U budućnosti bi se trebalo odrediti točan uzrok fluktuacijama u vrijednostima koncentracija. Jedan od načina bi bilo mjerenje indeksa histereze adsorpcija-desorpcija. To bi se provodilo mjerenjem sorpcije uz dodatak bioinhibitora NaN_3 u vijale koji onemogućava biorazgradnju. Na taj način moglo bi se sa sigurnošću tvrditi je li smanjenje koncentracije farmaceutika posljedica adsorpcije i/ili biorazgradnje. Nadalje, kako bi se moglo zaključiti dolazi li do sorpcije farmaceutika na aktivni mulj, na vijale u kojima je skladišten uzorak za instrumentalnu analizu ili na MP, potrebno je standardizirati analitičke metode i tehnike kojima bi se to moglo dokazati.

Zaključno, ekotoksikološka ispitivanja bi se trebala nastaviti izvoditi u kombinaciji s instrumentalnom analizom koja ne samo da povećava pouzdanost dobivenih ekotoksikoloških podataka već omogućuje i stjecanje cjelovitog uvida u bioraspoloživost, a time i rizik koji farmaceutici predstavljaju. Ovakav pristup je preporučljiv zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava farmaceutika (poput topljivosti u vodi) čime se njihova nominalna koncentracija u ispitivanjima može bitno razlikovati od stvarne, što dovodi do podcjenjivanja opasnosti koju predstavljaju ispitivane tvari. Također, potrebno je razjasniti biološke učinke ostataka MP i PO adsorbiranih na MP, a time i rizik od njihove toksičnosti.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- pH-vrijednosti istraživanih farmaceutika i njihove smjese u bioreaktorima se značajno ne razlikuju i iznose $5,21 \pm 0,20$ za R1, $7,45 \pm 0,21$ za R2 i $7,56 \pm 0,17$ za R3.
- Tijekom biorazgradnje temperatura reaktora raste usporedno s rastom sobne temperature te dolazi do smanjenja ukupnog radnog volumena za 5 do 6 %, što se treba uzeti u obzir kod tumačenja rezultata.
- **MBZ** → U R1 dolazi do inicijalnog smanjenja koncentracije MBZ-a nakon 2 h te ponovnog koncentracijskog pada na koncentracije manje od granice kvantifikacije ($< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) nakon 24 h procesa biorazgradnje. Smanjenjem stupnja razrjeđenja inhibicija raste. Potencijalnim hidroliziranjem MBZ-a u R1 dolazi do nastanka novog spoja što se očituje i rastom toksičnosti. Slaba topljivost MBZ-a uzrokuje rast koncentracije. U reaktorima R2 i R3 vidljiv je trenutni pad koncentracije komponente ispod granice kvantifikacije te dolazi do 40,178 %-tne inhibicije u 96 h, što potvrđuje veću toksičnost novonastalih produkata.
- **ABZ** → Uslijed velikog sorpcijskog potencijala i eventualne sorpcije ABZ-a na pahuljice mulja ili MP, u R1 trenutno opada koncentracija ABZ-a. Vrijednosti koncentracija za R2 i R3 kroz cijeli proces nalaze se ispod granice kvantifikacije, a nakon 96 h nastaju razgradni i/ili transformacijski spojevi. Visoka vrijednost inhibicije ABZ (48,835 %) nakon 96 h posljedica je velikog $\log K_{O/W}$ (3,14).
- **FEB** → U svim ispitivanim reaktorima dolazi do postepenog smanjenja koncentracije FEB-a radi najnižeg $\log K_{O/W}$. U reaktorima s muljem i mikroplastikom javlja se novonastali spoj. Međutim, vrijednost inhibicije za R2 i R3 u 96 h manja je nego u početnom vremenu uzorkovanja čime se značajno smanjuje i toksičnost procesom biorazgradnje.
- **MIX** → Početni pad koncentracije u R1 za sve ispitivane antihelmintike, na koncentraciju ispod granice kvantifikacije, potencijalno je posljedica hidrolize, a daljnji porast koncentracija MBZ-a i ABZ-a zbog slabe topljivosti. Do koncentracijskih fluktuacija dolazi eventualnim uspostavljanjem ravnotežnog stanja adsorpcija-desorpcija. U R2 i R3 s MBZ-om i ABZ-om detektiran je razgradni ili transformacijski produkt, unatoč čemu dolazi do velikog smanjenja toksičnosti sa 51,164 % u 0 h na 10,832 % u 96 h.

6. LITERATURA

1. Nikolaou, A.; Meric, S. & Fatta, D. (2007). *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387 (4), 1225–1234.
2. Li, Y.; Zhang, L.; Ding, J. & Liu, X. (2020). *Prioritization of pharmaceuticals in water environment in China based on environmental criteria and risk analysis of top-priority pharmaceuticals*, Journal of Environmental Management, 253, 109732.
3. Charuaud, L.; Jarde, E.; Jaffrezic, A.; Thomas, M.-F. & Le Bot, B. (2019). *Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate*, Journal of Hazardous Materials, 361, 169–186.
4. <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (pristup 23. travnja, 2020.).
5. Deegan, A. M.; Shaik, B.; Nolan, K.; Urell, K.; Oelgemöller, M.; Tobin J. & Morrissey, A. (2013). *Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies*, International journal of Environmental Science and Technology, 8 (3), 649-666.
6. <https://www.statista.com/statistics/272716/global-top-biotech-and-pharmaceutical-companies-based-on-market-value/> (pristup 20. travnja, 2020.).
7. Petrović, M.; Pérez, S. & Barcelo, D. (2007). *Analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle*, Volume 62, 2nd Edition, Comprehensive analytical chemistry, Elsevier, Amsterdam, str.
8. <https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process> (pristup 22. travnja, 2020.).
9. Tasho, R. P. & Cho, J. Y. (2016). *Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review*, Science of The Total Environment, 563-564, 366–376.
10. Clement, M.; Olabisi, M.; David, E. & Issa, M. (2020). *Veterinary Pharmaceuticals and antimicrobial resistance in developing countries*, Veterinary Medicine and Pharmaceuticals, IntechOpen.
11. <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> (pristup 23. travnja, 2020.).
12. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> (pristup 23. travnja, 2020.).

13. <https://zdravstvo.gov.hr/programi-i-projekti/nacionalni-programi-projekti-i-strategije/ostali-programi/nacionalni-program-za-kontrolu-otpornosti-bakterija-na-antibiotike-2017-2021/2198> (pristup 23. travnja, 2020.).
14. Van Boeckel, T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A. & Laxminarayan, R.. (2015). *Global trends in antimicrobial use in food animals*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 112; no. 18; 5649-5654.
15. <https://www.britannica.com/science/anthelmintic> (pristup 25. travnja, 2020.).
16. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2954> (pristup 25. travnja, 2020.).
17. http://www.wormbook.org/chapters/www_anthelminticdrugs/anthelminticdrugs.html (pristup 25. travnja, 2020.).
18. Jimenez-Cisneros, B. & Maya-Rendon, C. (2007). Helminths and sanitation. Communicating Current Research and Educational Topic and Trends in Applied Microbiology, p. 71, Formatex, Coyoacán.
19. <https://www.drugs.com/drug-class/anthelmintics.html> (pristup 25. travnja, 2020.).
20. http://zzjziz.hr/fileadmin/user_upload/dokumenti/promo_epidemiologija/Zaraza_malom_djecjom_glistom.pdf (pristup 25. travnja, 2020.).
21. Palmeirim, M. S.; Ame, S. M.; Ali, S. M.; Hattendorf, J. & Keiser, J. (2018). *Efficacy and Safety of a Single Dose versus a Multiple Dose Regimen of Mebendazole against Hookworm Infections in Children: A Randomised, Double-blind Trial*. EClinicalMedicine, 1, 7–13.
22. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00643> (pristup 27. travnja, 2020.).
23. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (pristup 27. travnja, 2020.).
24. Bueno, O.; Estévez Gallego, J. & Martins, S. (2018). *High-affinity ligands of the colchicine domain in tubulin based on a structure-guided design*, Scientific Reports, 8, 4242, 1-15.
25. Kenchappa, R.; Bodke, Y.D.; Telkar, S. & Aruna Sindhe, M. (2016). *Antifungal and anthelmintic activity of novel benzofuran derivatives containing thiazolo benzimidazole nucleus: an in vitro evaluation*, Journal of Chemical Biology, 10 (1), 11–23.

- 26.** Saidman, E.; Chattah, A. K.; Aragón, L.; Sancho, M.; Camí, G.; Garnero, C. & Longhi, M. (2018). *Inclusion complexes of β -cyclodextrin and polymorphs of mebendazole: Physicochemical characterization*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1-12.
- 27.** Xu, N.; Dong, J.; Yang, Y.; Liu, Y.; Yang, Q. & Ai, X. (2018). *Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with modified QuEChERS extraction for the quantification of mebendazole and its metabolites, albendazole and its metabolites, and levamisole in edible tissues of aquatic animals*, Food Chemistry, 269, 442–449.
- 28.** Pinto, L.C.; Soares, B.M.; Pinheiro, J.D.; Riggins, G.J.; Assumpção, P.P.; Burbano, R.M.R. & Montenegro, R.C. (2015). *The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model*, Toxicology in Vitro, 29, 2038-2044.
- 29.** Papich, M. G. (2016). *Saunders Handbook of veterinary drugs. Small and Large Animal. Elsevier*, 4th Edition, 478.
- 30.** Denžić M. & Bilandžić N. (2013). *Benzimidazolni lijekovi u hrani životinjskog podrijetla*, Veterinarska stanica 44 (5), 371-382.
- 31.** Wilkinson, J. & Hooda, P. S. (2019). *Special Issue on the Environmental Fate of Emerging Organic Micro-Contaminants*, Applied Sciences, 9(15), 2997.
- 32.** Mondal, M.; Halder, G.; Oinam, G.; Indrama, T. & Tiwari, O. N. (2019). *Bioremediation of organic and Inorganic Pollutants Using Microalgae*, New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, 223–235.
- 33.** Ceconet, D.; Molognoni, D.; Callegari, A. & Capodaglio, A. G. (2017). *Biological combination processes for efficient removal of pharmaceutically active compounds from wastewater: A review and future perspectives*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 5(4), 3590–3603.
- 34.** Karthikeyan, S.; Kumar, M.A.; Maharaja, P.; Partheeban, T.; Sridevi, J. & Sekaran, G. (2014). *Process optimization for the treatment of pharmaceutical wastewater catalyzed by poly sulphate sponge*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 45, 4, 1739–1747.
- 35.** Zrnčević S. (2016). *Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije*, Hrvatske vode 24 (96), 119-136.

- 36.** Luo, Q.; Wang, J.; Wang, J.; Shen, Y.; Yan, P.; Chen, Y. & Zhang, C. (2019). *Fate and occurrence of pharmaceutically active organic compounds during typical pharmaceutical wastewater treatment*, Journal of Chemistry, 2019, 1–12.
- 37.** Zhang, S.; Wang, J.; Liu, X.; Qu, F.; Wang, X.; Wang, X. & Sun, Y. (2018). *Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 111, 62-72.
- 38.** Tobajas, M.; Verdugo, V.; Polo, A. M.; Rodriguez, J. J. & Mohedano, A. F. (2015). *Assessment of toxicity and biodegradability on activated sludge of priority and emerging pollutants*, Environmental Technology, 37(6), 713–721.
- 39.** Farré, M.; Ašperger, D.; Kantiani, L.; González, S.; Petrović, M. & Barceló D. (2008). *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, 1999–2073
- 40.** Madden, D. & Lidsten, B. M. (2001). *Bacterial illumination*, Bioscience Explained 1, 1-7.
- 41.** Papić, S. Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša. Toksičnost, WEB materijali (pristup 22. kolovoza, 2020.).
- 42.** Đurić, I. (2010) Uklanjanje veterinarskih farmaceutika naprednim oksidacijskim metodama. Diplomski rad, FKIT, Zagreb.
- 43.** Jelić, A.; Gros, M.; Ginebreda, A.; Cespedes-Sánchez, R.; Ventura, F.; Petrović, M.; Barcelo D. (2011). *Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment*, Water Research, 45, 3, 1165–1176.
- 44.** Jelić, A.; Fatone, F.; Di Fabio, S.; Petrović, M.; Cecchi, F. & Barcelo D. (2012). *Tracing pharmaceuticals in a municipal plant for integrated wastewater and organic solid waste treatment*, Science of The Total Environment, 433, 352–361.
- 45.** Landeka Dragičević, T. Biotehnologija u zaštiti okoliša. PBF, WEB predavanje (pristup 30. travnja, 2020.).
- 46.** Senta, I.; Matošić, M.; Jakopović, H. K.; Terzic, S.; Ćurko, J.; Mijatović, I. & Ahel, M. (2011). *Removal of antimicrobials using advanced wastewater treatment*, Journal of Hazardous Materials, 192 (1), 319-328.

47. Dorival-García, N.; Zafra-Gómez, A.; Navalón, A.; González, J. & Vilchez, J. L. (2013). *Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors*, Science of The Total Environment, 442, 317–328.
48. Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Göbel, A., McArdell, C. S., Ternes, T., & Siegrist, H. (2005). *Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment*, Water Research, 39(14), 3139–3152.
49. Sipma, J.; Osuna, B.; Collado, N.; Monclús, H.; Ferrero, G.; Comas, J. & Rodriguez-Roda, I. (2010). *Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems*, Desalination, 250(2), 653–659.
50. Carballa, M.; Omil, F. & Lema, J. M. (2005). *Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment*, Water Research, 39(19), 4790–4796.
51. Sahar, E.; David, I.; Gelman, Y.; Chikurel, H.; Aharoni, A.; Messalem, R. & Brenner, A. (2011). *The use of RO to remove emerging micropollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater*, Desalination, 273(1), 142–147.
52. Alturki, A. A.; Tadkaew, N.; McDonald, J. A.; Khan, S. J.; Price, W. E. & Nghiem, L. D. (2010). *Combining MBR and NF/RO membrane filtration for the removal of trace organics in indirect potable water reuse applications*, Journal of Membrane Science, 365 (1-2), 206-215.
53. Tadkaew, N.; Hai, F. I.; McDonald, J. A.; Khan, S. J. & Nghiem, L. D. (2011). *Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties*, Water Research, 45(8), 2439–2451.
54. Rogers, H. R. (1996). *Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges*, Science of The Total Environment, 185(1-3), 3–26.
55. Cirja, M.; Ivashechkin, P.; Schäffer, A. & Corvini, P. F. X. (2007). *Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR)*, Reviews in Environmental Science, 7(1), 61–78.
56. Fernandez-Fontaina, E.; Pinho, I.; Carballa, M.; Omil, F. & Lema, J. M. (2012). *Biodegradation kinetic constants and sorption coefficients of micropollutants in membrane bioreactors*, Biodegradation, 24(2), 165–177.

- 57.** Krzeminski, P.; Tomei, M. C.; Karaolia, P.; Langenhoff, A.; Almeida, C. M. R.; Felis, E.; Fanny Gritteng, F.; Andersen, H.R.; Fernandes, T.; Manai, C.M.; Rizzio, L. & Fatta-Kassinos, D. (2019). *Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review*, Science of The Total Environment, 648, 1052–1081.
- 58.** Nguyen, L. N.; Nghiem, L. D.; Pramanik, B. K. & Oh, S. (2019). *Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities*, Science of The Total Environment, 657, 739–745.
- 59.** Alvarino, T.; Suarez, S.; Lema, J. & Omil, F. (2018). *Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment technologies*, Science of The Total Environment, 615, 297–306.
- 60.** Baresel, C.; Harding, M. & Fång, J. (2019). *Ultrafiltration/granulated active carbon-biofilter: efficient removal of a broad range of micropollutants*, Applied Sciences, 9(4), 710.
- 61.** Onesios, K. M.; Yu, J. T., & Bouwer, E. J. (2008). *Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review*, Biodegradation, 20(4), 441–466.
- 62.** KLJUČNA RIJEČ, <https://blog.hannainst.com/ph-and-do-in-a-wastewater-aeration-tank/> (pristup 31. kolovoza, 2020.).
- 63.** Min, X.; Li, W.; Wei, Z.; Spinney, R.; Dionysiou, D. D.; Seo, Y., Tang, C.J. & Xiao, R. (2018). *Sorption and biodegradation of pharmaceuticals in aerobic activated sludge system: A combined experimental and theoretical mechanistic study*, Chemical Engineering Journal, 342, 211–219.
- 64.** Peng, J.; Wang, X.; Yin, F. & Xu, G. (2019). *Characterizing the removal routes of seven pharmaceuticals in the activated sludge process*, Science of The Total Environment, 650, 2437–2445.
- 65.** Ding, T.; Huang, T.; Wu, Z.; Li, W.; Guo, K. & Li, J. (2019). *Adsorption–desorption behavior of carbendazim by sewage sludge-derived biochar and its possible mechanism*, RSC Advances, 9(60), 35209–35216.

- 66.** Zimmermann, S. C.; Tichý, T.; Vávra, J.; Dash, R. P.; Slusher, C. E.; Gadiano, A. J. & Rais, R. (2018). *N-Substituted Prodrugs of Mebendazole Provide Improved Aqueous Solubility and Oral Bioavailability in Mice and Dogs*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3918–3929.
- 67.** Wagil, M.; Białk-Bielińska, A.; Puckowski, A.; Wychodnik, K.; Maszkowska, J.; Mulkiewicz, E.; Kumirska, J.; Stepnowski, P. & Stolte, S. (2015). *Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms*, *Environmental Science and Pollution Research International*, 22, 2566–2573.

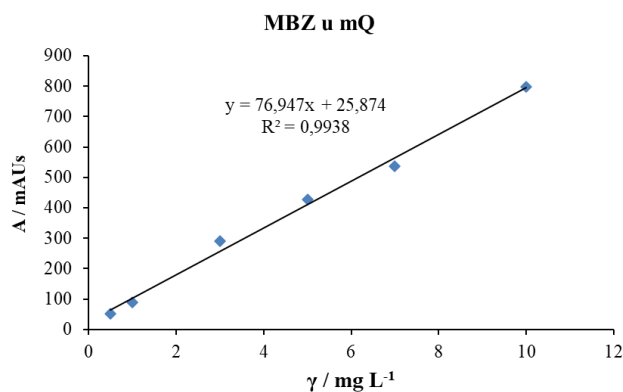
7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

A	Površina ispod kromatografske krivulje, mAU
ABZ	Albendazol
ACN	Acetonitril
API	Aktivna komponenta farmaceutika, eng. <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> ,
ATP	Adenozin trifosfat
BZD	Benzimidazol
CAS	Konvencionalni sustav sa aktivnim muljem, eng. <i>Conventional Activated Sludge System</i>
DAD	Detektor s nizom dioda, eng. <i>Diode-Array Detector</i>
DCF	Diklofenak
EC ₂₀	Koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije, mg L ⁻¹
EC ₅₀	Koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije, mg L ⁻¹
EDC	Endokrini disruptori, eng. <i>Endocrine disruptor</i>
FEB	Febantel
GAC	Granulirani aktivni ugljen, eng. <i>Granulated activated carbon</i>
GAP	Globalni akcijski plan, eng. <i>Global Action Plan</i>
GD	Granica detekcije, mg L ⁻¹
GK	Granica kvantifikacije, mg L ⁻¹
HPLC	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, eng. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRT	Hidrauličko vrijeme zadržavanja, eng. <i>Hydraulic retention time</i> , h
K _d	Koeficijent raspodjele između mulja i vodene faze, L kg ⁻¹
KOV	Komunalna otpadna voda
KPK	Kemijska potrošnja kisika, mg O ₂ L ⁻¹
log K _{O/W}	Logaritam koeficijenta razdvajanja oktanol vode
MBR	Membranski bioreaktor, eng. <i>Membrane bioreactor</i>
MBZ	Mebendazol
MDK	Maksimalno dopuštena koncentracija
MIX	Smjesa sva tri farmaceutika
MLSS	Koncentracija mulja, eng. <i>Mixed liquor suspended solids</i> , g L ⁻¹
MP	Mikroplastika
MQ	MilliQ

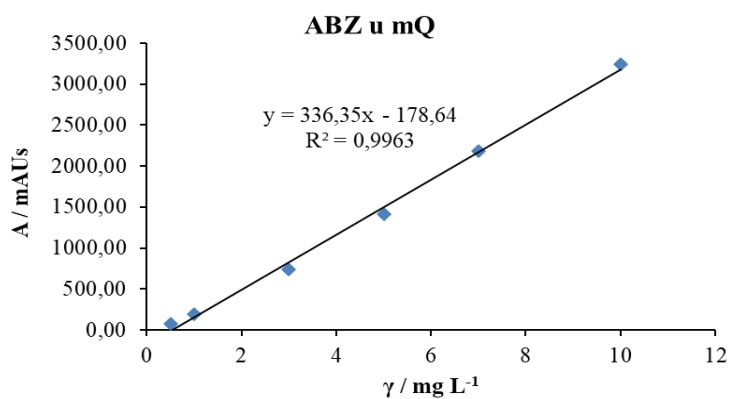
NF	Nanofiltracija
NP	Nanoplastika
pK_a	Konstanta disocijacije
PO	Prioritetna onečišćivala
PPCP	Farmaceutici i proizvodi za osobnu njegu, eng. <i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>
R	Reaktor
R^2	Koeficijent determinacije
RO	Reverzna osmoza
RSO	Radna standardna otopina
SBR	Sekvencijalni šaržni reaktor, eng. <i>Sequencing batch reactor</i>
SRT	Vrijeme zadržavanja mulja, eng. <i>Sludge retention time</i> , h
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija, eng. <i>World Health Organization</i>
T	Temperatura, °C
t	Vrijeme, h
t_R	Vrijeme zadržavanja farmaceutika, min
TSO	Temeljna standardna otopina
UF	Ultrafiltracija
UPOC	Postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda
V	Volumen, L
γ	Masena koncentracija, mg L ⁻¹
λ	Valna duljina zračenja, nm

8. PRILOZI

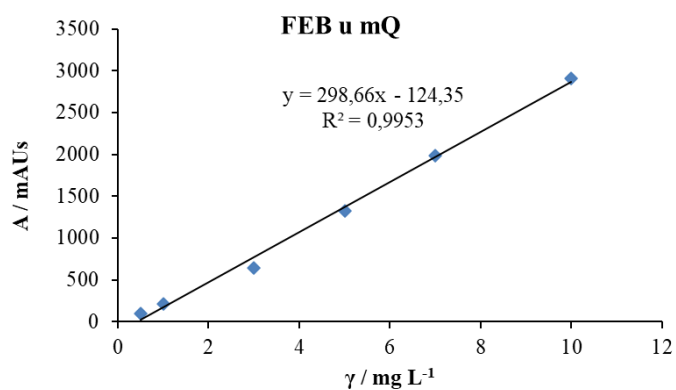
Prilog 8.1. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za otopinu MBZ-a, standardne koncentracije 3 mg L^{-1}



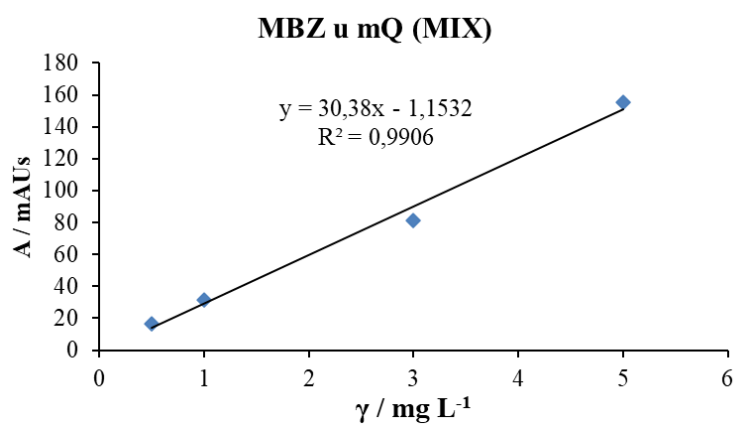
Prilog 8.2. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za otopinu ABZ-a, standardne koncentracije 3 mg L^{-1}



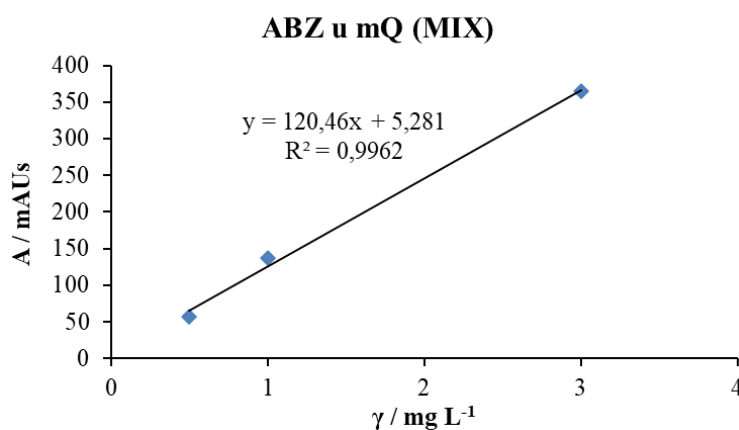
Prilog 8.3. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za otopinu FEB-a, standardne koncentracije 3 mg L^{-1}



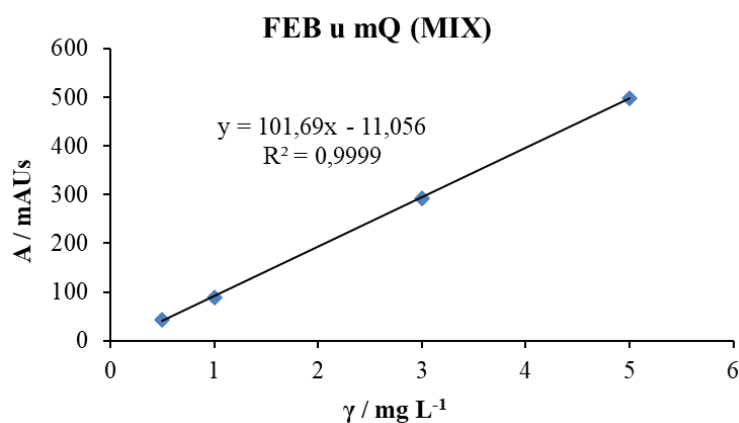
Prilog 8.4. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za MBZ-a u MIX otopini, standardne koncentracije 3 mg L⁻¹



Prilog 8.5. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za ABZ-a u MIX otopini, standardne koncentracije 3 mg L⁻¹



Prilog 8.6. Grafički prikaz kalibracijskog pravca za FEB-a u MIX otopini, standardne koncentracije 3 mg L⁻¹



Prilog 8.7. Prikaz eksperimentalno dobivenih i izračunatih vrijednosti inhibicije u % za MBZ.

MBZ	R1		R2		R3	
	Inhibicija, %					
razrjeđenje	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
128x	-44,607	-4,1186	-3,1821	-3,9696	-3,4867	-0,08012
64x	-38,323	-2,3260	-11,713	-7,0316	-7,4397	-2,3935
32x	-44,871	-5,1111	-3,6563	-9,4399	-15,188	-0,10468
16x	-42,029	-5,5566	5,3403	-11,036	-14,861	-2,0451
8x	-40,504	0,061812	11,171	-8,4778	-14,807	0,62933
4x	-38,798	0,10011	25,868	-4,0464	-15,455	6,6368
2x	-40,681	4,3059	25,088	5,1745	-17,131	18,633
orig.	-32,872	16,4711	15,152	33,182	-2,9171	40,178

Prilog 8.8. Prikaz eksperimentalno dobivenih i izračunatih vrijednosti inhibicije u % za ABZ.

ABZ	R1		R2		R3	
	Inhibicija, %					
razrjeđenje	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
128x	-6,1024	-0,38117	-0,33417	-0,79337	0,95193	-0,24609
64x	-8,3299	-0,0945	0,081503	-1,1942	1,2293	6,8126
32x	-12,013	0,22847	0,18939	-0,17444	1,6048	1,4201
16x	-7,1287	1,4906	-0,17709	-1,8128	5,9923	0,20901
8x	-13,447	2,8699	-0,09714	-1,0022	1,8993	2,3340
4x	-12,770	7,5420	-0,85419	-3,9677	1,5022	7,1660
2x	5,1104	14,364	-0,23365	-6,2252	6,5277	12,810
orig.	2,6409	31,587	0,27753	6,0107	28,704	48,835

Prilog 8.9. Prikaz eksperimentalno dobivenih i izračunatih vrijednosti inhibicije u % za FEB.

FEB	R1		R2		R3	
	Inhibicija, %					
razrjeđenje	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
128x	-4,4877	-9,1441	3,1509	-0,88176	3,4556	1,6008
64x	-7,5219	-6,6915	3,8352	-1,0448	-10,001	1,6564
32x	-6,2518	-6,0950	4,0112	0,19322	-12,258	0,60966
16x	-5,8245	-6,6820	5,4473	2,9426	-9,5138	2,0680
8x	-7,5710	-4,4417	6,8562	5,9603	-9,4328	4,4259
4x	-6,5940	-4,4050	11,402	6,7957	-5,5518	5,4421
2x	-5,6079	-4,5029	20,032	7,6922	3,6655	6,7327
orig.	6,7232	-2,4863	34,526	16,174	19,752	14,376

Prilog 8.10. Prikaz eksperimentalno dobivenih i izračunatih vrijednosti inhibicije u % za MIX.

MIX	R1		R2		R3	
	Inhibicija, / %					
razrjeđenje	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
128x	-0,30232	-0,26701	7,4834	-1,6401	-3,7743	-6,8243
64x	-3,7215	-3,5968	8,0561	-4,6137	-1,1767	-11,323
32x	-4,4392	-2,2909	10,625	1,6683	-3,2148	-6,1981
16x	-2,0092	0,23112	12,535	2,4275	-0,99471	-5,8407
8x	-0,21035	0,89148	16,003	4,6761	0,88168	-11,504
4x	1,1578	8,8787	23,219	5,0592	3,2106	-3,3031
2x	16,533	16,571	36,308	5,6817	10,467	-1,1817
orig.	26,790	33,289	51,164	10,832	25,984	12,647

8. ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnoškolsko obrazovanje završila sam u OŠ „Josipa Kozarca“ u Vinkovcima, a srednjoškolsko 2015. godine u Gimnaziji Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu pohađam od 2015. godine. Tijekom preddiplomskog studija, odradila sam praksu u tvrtki Saponia d.d. u Osijeku, na odjelu Razvoja kozmetike. Godine 2018. završila sam preddiplomski studij, obranom završnog rada pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Dolara, na temu: „*Obrada komunalne otpadne vode s UF membranama u obliku ravne plahte*“.

Dobitnica sam Rektorove nagrade za akademsku godinu 2018./2019. za zajednički rad s kolegicom Klarom Karadakić na temu: „*Oporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje MBR-NF/RO hibridnim postupkom*“ također pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Davora Dolara.

Sudjelovala sam na međunarodnoj konferenciji 8th International Conference Water for all 2019 održanoj u Osijeku s posterskim priopćenjem: D. Dolar, M. Racar, K. Karadakić, N. Čavarović, N. Glumac, K. Košutić, *Reuse of municipal wastewater for agricultural irrigation by membrane processes* i na domaćoj konferenciji 26. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera s međunarodnim sudjelovanjem održanoj u Šibeniku s posterskim priopćenjem: D. Dolar, M. Racar, K. Karadakić, N. Čavarović, N. Glumac, K. Košutić, *Oporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje s MBR i RO/NF procesima*.